

Utjecaj 5-azacitidina na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma u miša

Sinčić, Nino

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:079333>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nino Sinčić

**Utjecaj 5-azacitidina na razvoj
eksperimentalnog teratokarcinoma
u miša**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u laboratoriju Epigenetics Group pri International Agency for Research on Cancer u Lyonu.

Mentor: prof.dr.sc. Maja Vlahović

Komentor: dr.sc. Zdenko Herceg

Napokon. Zadnja slova još jednog „poglavlja“. S krajem bez forme, službene kritike i cenzure. Jedna od rijetkih stranica koju ne ispisuju Taština i Ambicija. Piše je „mali Nino, oni mladić, od starega Sinčića sin“. Sjedim na balkonu uz svoj amaro. Zamišljen u prošlost. I budućnost. Lete mi misli. Prebrzo za tipkanje. Da napišem nešto jednostavno? Ili potražim riječi nekog rječitijeg? Mudrijeg od sebe. Izabrao bih lijepe misli. Razgalile bi mnoge. Možda čak i zadivile. Te tuđe riječi. Ali riskiram sa svojima. Mislim nezgrapno poredanim, možda banalnim, patetičnim zasigurno ... u svojoj iskrenosti. Naposljetku, želim zahvaliti vama. Ponoviti ono u što možda sumnjate. Ponoviti ono što već znate. Jer ništa novog, neizrečenog, na ovoj stranici nećete pronaći. Poetičnog ni mudrog. Ne želim vas zadiviti. Iskreno. Ni razgaliti. Ni što već. Uistinu vam jednostavno želim reći „hvala“. Hvala što ste moj život učinili ovakvim kakav je. Prekrasnim. Po mojoj mjeri.

Mojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Vlahović. Još kao „dijete“ uveli ste me u svijet znanosti. Dvanaest predivnih godina iskazivali ste mi bezuvjetno povjerenje i pružali neizmjernu potporu. Bili ste mentor koji me poučavao, slušao i bodrio. Mentor koji je razumio moje pogreške i strahove. Prihvaćao mladenački zanos i bahatost. Mentor koji je mentorirao, ne naređivao. Objasnjavao, ne uvjeravao. Hvala Vam što ste mi darovali vrijeme u kojem sam mogao biti Vaš učenik.

Mojoj Maji. Zahvala je za Vas ispisana u mom srcu.

Mom komentoru, dr. sc. Zdenku Hercegu. Onoga sam dana u Lyonu sa strahom iščekivao čovjeka s osmog kata. Nisam sumnjao da ću upoznati velikog znanstvenika, ali sam se iznenadio upoznavši prije svega velikog čovjeka. Bilo je pravo zadovoljstvo učiti od Vas. Raditi za Vas. Raditi s Vama. Družiti se s tobom. Ne znam kada ni kako sam zaslužio iskazano povjerenje, ali čast mi je što jesam. Nadam se da ću ga jednog dana i opravdati.

Svojim roditeljima. Kako god i pod koju god cijenu, podigli ste dvoje ljudi koji ostvaruju svoje snove. Naš uspjeh, vaš je uspjeh. Ne zaboravite to nikada!

Svojoj starijoj sestri (onaj koji ima starijeg razumije!) Blanki. Hvala ti što me, usprkos svemu, voliš i prihvaćaš onakvog kakav jesam. Moje si zadnje utočište. Marku. Najbolje si što se našoj obitelji dogodilo. Nini i Filipu, jer me podsjećate koliko je život jednostavan.

Mojoj Kosi (Kosjenki Mogorović). Jesi li ikad pomislila da ću ispisivati ove riječi dok si gledala kako mi mijenjaju pelene? Hvala ti što si 31 godinu u mom životu. Mojoj BuBu (Petri Berneš), jer me onu noć nisi ostavila na mostu. Jer me od onda nisi ostavila, nikada. Mom Dudu (Dubravku Bajramoviću). Sam Bog zna koliko mi možeš ići na živce, a koliko te u isto vrijeme obožavam. Rekao bi čovjek: rođeni brat. Vas ste troje stupovi pozornice na kojoj se odigrava predstava mog života. Pa tako i ova disertacija. Hvala vam na potpori i povremenom podrezivanju krila.

Martini (Dvorščak). Od kud da krenem i gdje da ... stanem? Ukratko, činiš moj život lakšim, ljepšim i zabavnijim. Tvoje su potpora, dobrota i ludost neiscrpne. Napominjem da se za tipfelere u disertaciji obratite dotičnoj. Tri reda, naručeno, učinjeno. Bumbici (Borisu Bumberu). Prijatelju moj, lud si ko puška, ali zato si mi neizmjereno drag. Između ostalog, hvala vam što ste me primili polomljenog u jeku pisanja disertacije u svoj dom. Trpjeli i njegovali mene i mog psa. Hvala vam što mi pružate sigurnost.

Belezzi (prof. dr. sc. Jerki Dumić). Vaš je intelekt za mene izazov, a duh neuhvatljiv. Hvala Vam na poukama i potpori (i financijskoj) tijekom izrade disertacije. Ali, prije svega, hvala ti na poukama i potpori u životu, što podržavaš moje snove i dijeliš sa mnom svoje. Jednostavno, hvala ti na ovom prekrasnom prijateljstvu.

Francescu (dr. sc. Frani Paiću). Hvala ti na tipsevima, epicama, kemikalijama... Cimeru moj, daleko od toga. Hvala ti na šest godina smijeha, entuzijazma, zajedničkog rada u čudne dane i sate, planiranja i sanjanja budućnosti našega Zavoda... Hvala ti što me podsjećaš da ovaj posao ne radimo zbog titula ili novca, već zato što ga iskreno volimo.

Šefici (prof. dr. sc. Floriani Bulić Jakuš). Hvala Vam na potpori tijekom ovih dvanaest godina rada na Zavodu. Vaše je nasljeđe veliko, a očituje se ponajviše u ljudima s kojima svaki dan radim. Hvala Vam na tome!

Nataši (prof. dr. sc. Jovanov Milošević), Ljiljani (prof. dr. sc. Šerman), Tamari (doc. dr. sc. Nikuševa Martić) i Ani (dr. sc. Katušić Bojanec). Hvala Vam što me trpite, razumijete, prihvaćate... Hvala Vam što ste godinama uz mene, u svakom segmentu mog profesionalnog života. Mnogo je toga između nas, lijepog i, na trenutke, manje lijepog, ali prekrasno je raditi s ljudima s kojima dijeliš isti cilj. Učiniti naš Zavod još boljim mjestom.

Prof. dr. sc. Nives Pečini Šlaus, prof. dr. sc. Vesni Crnek Kunstelj i prof. dr. sc. Ratimiru Klepcu. Hvala Vam na savjetima, pomoći i razumijevanju. Veliko hvala prof. dr. sc. Gordani Jurić Lekić. Raditi s Vama pravo je zadovoljstvo.

Mariani (Dragojević), Milanu (Kopaču), Božici (Kavaš), Katici (Šipek), Barici (Miletić), Suzani (Ribić) i Mariji (Šestak). Hvala vam na smijehu, pomoći i potpori. Prije svega, hvala vam što uljepšavate moj dan malim stvarima koje život znače.

Boženi (Bučar). Godinama ste me pratili iz svog ureda, pružali potporu mom radu i činili ga lakšim, jednostavnijim. Poučavali me o poslu i životu. Bodrili u poslu i životu. Bili ste uvijek uz mene, borili se za mene. Ne zaboravite nikada da ste Vi jedna od onih koji su me doveli do ovog dana. Sretno!

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama Sveučilišta u Zagrebu, te osoblju Medicinskog fakulteta. Čast mi je raditi s vama!

Prijateljima iz IARC-a. Posebice C.S., T.V. i C.C. Vjerojatno nikada nećete pročitati ove retke. Ali to ne umanjuje moju iskrenu zahvalu i privrženost prema vama. Sa Z.H. učinili ste strani svijet Lyona mojim drugim domom. Hvala vam na pomoći u poslu. Hvala vam još više na svemu ostalom!

Posebne zahvale Jasni Ljubek, dr. sc. Moniki Ulamec, doc. dr. sc. Sanji Dabelić, doc. dr. sc. Ariani Znaor, prof. dr. sc. Mladenu Beliczi, prof. dr. sc. Nini Canki Klain, dr. sc. Aleksandri Fučić, dr. sc. Ivi i dr. sc. Luki Brčiću.

Svojim studentima. Razlog ste što obožavam svoj posao!

Hvala i članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Floriani Bulić Jakuš, prof. dr. sc. Boži Krušlinu i prof. dr. sc. Jerki Dumić Belamarić, što će, nadam se, 09. srpnja 2012. izgovoriti dugo očekivane riječi.

Na kraju, zahvaljujem svima koje sam upoznao tijekom izrade svoje disertacije. Što na poslu što u privatnom životu. Iako ne iščitavate svoja imena na ovim stranicama, dio ste mene zauvijek.

Hvala i avionskim kompanijama. Doslovno, put ste do moje najveće sreće.

Zahvale i Selu koje priča. Izvor ste neizrecive zabave i smijeha.

I dalje sjedim na balkonu uz svoj ispijeni amaro. Zamišljen u prošlost. I budućnost...

Mimo Sistić

. . . *meis magistris!*

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Epigenetika	1
1.1.1.	Epigenetika embrionalnog razvoja	3
1.1.2.	Epigenetika neoplastičnih procesa	5
1.1.3.	Epigenetički mehanizmi	7
1.1.3.1.	Metilacija DNA	8
1.1.3.2.	RNA interferencija	13
1.2.	5-azacitidin	16
1.2.1.	Molekularni mehanizmi djelovanja 5-azacitidina	17
1.2.2.	Biološki učinci 5-azacitidina	20
1.2.3.	5-azacitidin u terapiji neoplastičnih bolesti	21
1.3.	Tumori zametnih stanica	22
1.3.1.	Genetika i epigenetika tumora zametnih stanica testisa	25
1.3.2.	Eksperimentalni teratokarcinom u miša	28
2.	HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA	30
2.1.	Hipoteza	30
2.2.	Cilj istraživanja	30
3.	MATERIJALI I METODE	32
3.1.	Eksperimentalni teratokarcinom <i>in vivo</i>	32
3.1.1.	Izolacija zametaka	32
3.1.2.	Transplantacija zametaka pod čahuru bubrega	33
3.1.3.	Eksperimentalni dizajn i tretiranje životinja 5-azacitidinom	33
3.1.4.	Determinacija spola eksperimentalnog teratokarcinoma	34
3.2.	Eksperimentalni teratom miša <i>in vitro</i>	35
3.2.1.	Kultiviranje zametaka <i>in vitro</i>	35

3.2.2.	Mediji za kultivaciju	36
3.2.3.	Sinteza esiRNA	38
3.2.4.	Mjerenje rasta teratoma <i>in vitro</i>	39
3.3.	Izolacija DNA	39
3.4.	Izolacija RNA	39
3.5.	Homogenizacija tkiva	40
3.6.	Analiza metilacije DNA pirosekvenciranjem	41
3.6.1.	Bisulfitna konverzija DNA	41
3.6.2.	Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje	42
3.6.3.	Umnažanje promotorskih regija gena i repetitivnih sekvenci	43
3.6.4.	Pirosekvenciranje	45
3.7.	Analiza ekspresije gena	48
3.7.1.	Analiza ekspresije gena na razini mRNA	48
3.7.2.	Analiza ekspresije gena na razini proteina	49
3.8.	Histološke metode	50
3.8.1.	Priprema tkiva	50
3.8.2.	Izrada klasičnih histoloških preparata	51
3.8.3.	Imunohistokemija	52
3.8.4.	Imunofluorescencija	54
3.8.5.	TUNEL	55
3.9.	Analiza biljega oksidacijskog stresa i upale	55
3.10.	Broj uzoraka po skupinama i pojedinim metodama	56
3.11.	Statistička obrada podataka	57
4.	REZULTATI	58
4.1.	Razvoj zametka u eksperimentalni teratokarcinom	58
4.2.	Determinacija spola eksperimentalnog teratokarcinoma	64
4.3.	Rast eksperimentalnog teratokarcinoma	65

4.4.	Učinak 5-azacitidina na rast eksperimentalnog teratokarcinoma	66
4.5.	Učinak 5-azacitidina na testis	68
4.6.	Metilacija DNA u eksperimentalnom teratokarcinomu	70
4.6.1.	Metilacija DNA promotora gena <i>Oct3/4</i>	70
4.6.2.	Metilacija DNA promotora gena <i>Sox2</i>	73
4.6.3.	Metilacija DNA promotora gena <i>Nanog</i>	76
4.6.4.	Metilacija DNA promotora gena <i>Scgb3a1</i>	79
4.6.5.	Metilacija DNA promotora gena <i>Prss21</i>	82
4.6.6.	Metilacija DNA promotora gena <i>Stat3</i>	85
4.6.7.	Metilacija DNA promotora gena <i>Bra1</i>	88
4.6.8.	Metilacija DNA promotora gena <i>Mgmt</i>	90
4.6.9.	Metilacija DNA promotora gena <i>c-Myc</i>	93
4.6.10.	Metilacija DNA promotora gena <i>Trrap</i>	96
4.6.11.	Metilacija DNA promotora gena <i>Rassf1</i>	99
4.6.12.	Globalna metilacija DNA	101
4.6.12.1.	Metilacija DNA repetitivne sekvence <i>Mml</i>	101
4.6.12.2.	Metilacija DNA repetitivne sekvence <i>Mmetnltr</i>	104
4.6.12.3.	Metilacija DNA repetitivne sekvence <i>B1</i>	107
4.7.	Ekspresija gena na razini mRNA u eksperimentalnom teratokarcinomu	110
4.7.1.	Ekspresija gena <i>Oct3/4</i> na razini mRNA	110
4.7.2.	Ekspresija gena <i>Nanog</i> na razini mRNA	112
4.7.3.	Usporedba ekspresije gena <i>Oct3/4</i> i <i>Nanog</i> na razini mRNA	114
4.7.4.	Ekspresija gena <i>Trrap</i> na razini mRNA	115
4.8.	Ekspresija gena na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu	117
4.8.1.	Ekspresija gena <i>Oct3/4</i> na razini proteina	117
4.8.2.	Ekspresija gena <i>Pcna</i> na razini proteina	119
4.8.3.	Lokalizacija biljega proliferacije Ki-67	120

4.9.	Diferencijacija u eksperimentalnom teratokarcinomu	121
4.10.	Apoptoza u eksperimentalnom teratokarcinomu	124
4.11.	Biljezi oksidacijskog stresa i upale u eksperimentalnom teratokarcinomu	126
4.12.	Rast eksperimentalnog teratoma <i>in vitro</i> u medijima obogaćenima esiRNA	129
4.13.	Ekspresija gena na razini mRNA u eksperimentalnom teratomu <i>in vitro</i>	131
4.14.	Diferencijacija u eksperimentalnom teratomu <i>in vitro</i>	132
5.	RASPRAVA	134
5.1.	Eksperimentalni teratokarcinom u miša	134
5.2.	Utjecaj spola na razvoj teratokarcinoma	138
5.3.	Rast teratokarcinoma	141
5.4.	Epigenetička platforma razvoja teratokarcinoma	142
5.5.	Učinak 5-azacitidina na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma	153
6.	ZAKLJUČCI	158
7.	SAŽETAK	160
8.	SUMMARY	161
9.	POPIS LITERATURE	162
10.	ŽIVOTOPIS	179

1. UVOD

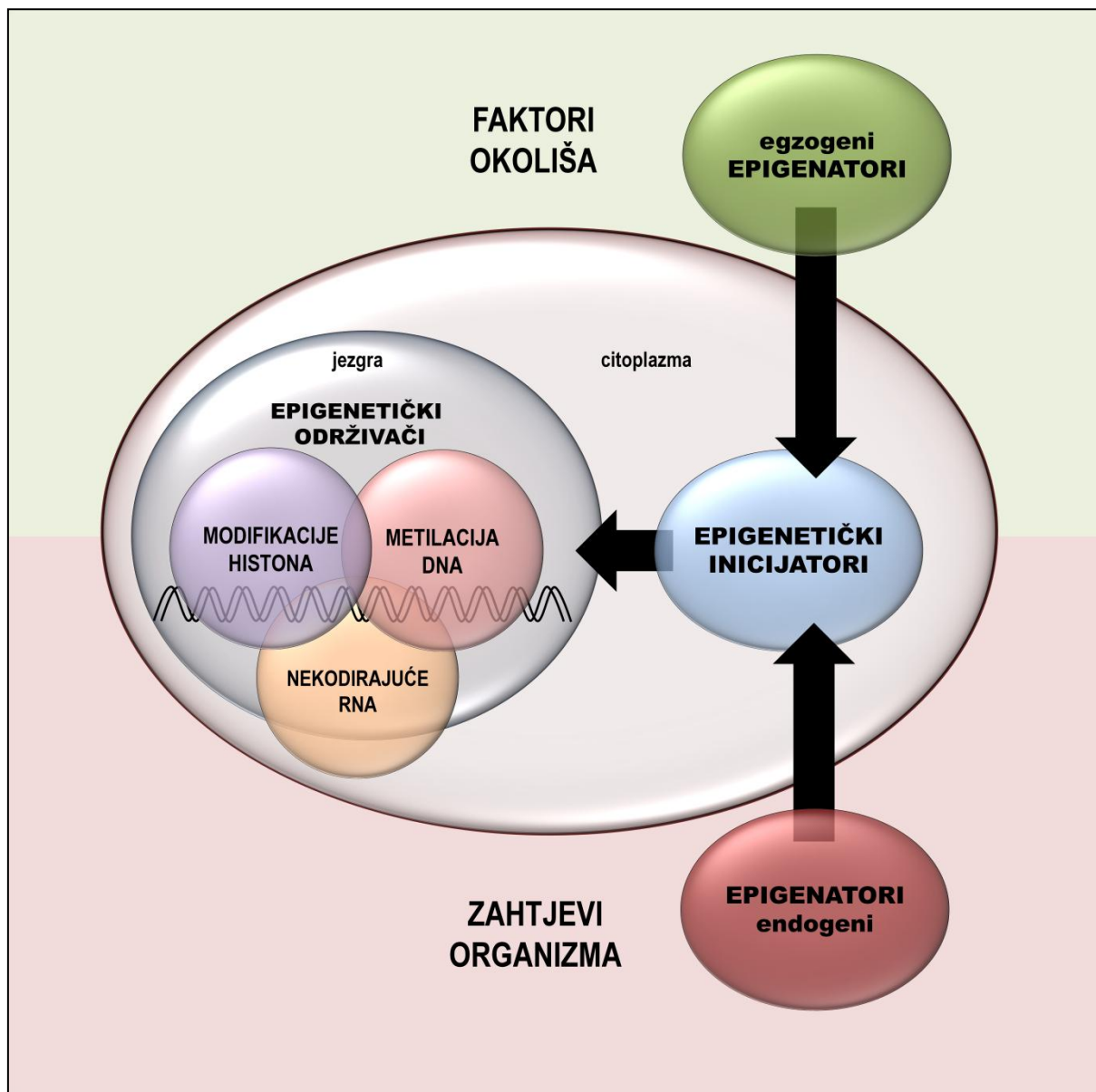
Tumori zametnih stanica testisa najčešća su neoplastična bolest mlađe muške populacije. Suvremena su istraživanja nagovijestila da u njihovoj patogenezi ključnu ulogu imaju epigenetički procesi. 5-azacitidin je demetilacijski agens koji se već koristi kao epigenetički lijek u terapiji neoplastičnih bolesti. Eksperimentalni teratokarcinom miša izniman je animalni model za istraživanje razvoja upravo tumora zametnih stanica. Naša je studija prva koja istražuje epigenetičku platformu razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma, posebice metilaciju DNA i učinke 5azaC-a na razvoj tumora, s ciljem otkrivanja terapijskog potencijala epigenetičkog demetilacijskog agensa u liječenju tumora zametnih stanica. U uvodnom poglavlju donosimo širi pregled dosadašnjih spoznaja koje su dovele do postavljanja naše hipoteze i ciljeva.

1.1. Epigenetika

Proizašla iz hipoteze C.H. Waddingtona, britanskog znanstvenika koji je 1942. godine pokušao objasniti proces manifestiranja genoma u fenotipu jedinke tijekom razvojnih procesa (1), epigenetika danas predstavlja priznatu i iznimno dinamičnu znanstvenu disciplinu. Desetljećima zapostavljena poradi nedostatka odgovarajuće metodologije i pristupačne tehnologije, istraživanja epigenetičkih fenomena postala su dostupna široj znanstvenoj zajednici potkraj prošlog stoljeća te su ubrzo inkorporirana u gotovo sve grane moderne biomedicine i znanosti o životu uopće.

Epigenetika je kao znanstvena disciplina fokusirana na istraživanje međuigre okoliša (staničnog kao i okoliša cjelokupnog organizma) i naslijeđenog materijala (genoma), te mehanizme kojima se navedeno ostvaruje. Naime, ukupna DNA sekvenca, genom, koja je po svojoj funkciji „biblioteka naslijeđenih svojstava“, mora ostati konzistentna tijekom čitavog života stanice i organizma. Genom se ne smije mijenjati na zahtjeve ni okoliša niti stanice kako stanica sama ne bi degradirala naslijeđena svojstva kodirana u DNA sekvenci. Posljedično, genom sam po sebi stanici ne osigurava adaptabilnost na zahtjeve okruženja ili organizma. Upravo epigenetički procesi kao dinamični i reverzibilni stanični mehanizmi dirigiraju izražaj nasljednih svojstava zapisanih u statičnom genomu. Epigenetički mehanizmi uspostavljaju i održavaju stabilnost cjelokupnog genoma, te uvjetuju ekspresiju pojedinog i inaktivnost preostalog dijela genoma. Navedeno stanici omogućuje rast, ali i programiranu smrt, proliferaciju, ali i mirovanje, specijalizaciju (diferencijaciju), ali i akomodaciju na eventualne promijene (2). Dakle, varijacije staničnih morfologija i funkcija (varijacije genske ekspresije, fenotipa) uvjetovane su potencijalom zapisanim u genomu (nasljeđem), a specifična morfologija i funkcija određene su specifičnim obrascem epigenetičkih modifikacija koji odražava najbolji mogući odgovor stanice na trenutnu potrebu organizma i zahtjeve okruženja. To stanje epigenetičkih modifikacija održava se dok traju dotični zahtjevi i naziva se epigenom. Promjenom zahtjeva, jednostavnom reorganizacijom epigenoma u novi odnosno uspostavom aktivnosti novog seta gena koji se ispoljavaju u fenotipu, stanica odgovara na novonastalo stanje u okruženju. Ova

osnovna karakteristika epigenetičkih mehanizama daje stanici (organizmu) svojstvo fleksibilnosti i učinkovitosti u promjenjivom okolišu (3, 4).



Slika 1. Epigenetički sustav.

Stanica kontinuirano komunicira s okolišem (stanicama istog organizma kao i s okruženjem samog organizma). U toj komunikaciji prima informacije o potrebama organizma i zahtjevima okoliša te određuje vlastite potrebe. Element epigenetičkoga puta koji sadrži dotičnu informaciju naziva se epigenator. Po definiciji epigenator je faktor iz okoliša organizma (egzogeni faktor), samog organizma (endogeni faktor), ali i iz citoplazme kada sadrži informaciju o promjeni u samoj stanici. Epigenator ima sposobnost prijenosa informacije epigenetičkim inicijatorima, elementima epigenetičkoga puta koji selektivno određuju

segmente genoma čijom se reorganizacijom ekspresije omogućuje najbolji stanični odgovor na dobivenu informaciju. Epigenetički inicijatori *de facto* samostalno oblikuju novi stanični fenotip definirajući koji će elementi genoma u danom trenutku biti ispoljeni u fenotip. Epigenetički održivači terminalni su segment epigenetičkoga puta budući da prevode zahtjeve epigenetičkih inicijatora u epigenetički kod odnosno epigenom. Epigenetički održivači aktivno reorganiziraju epigenom iako nisu sposobni samostalno započeti reorganizaciju. Dapače, bez nove indukcije epigenetičkim inicijatorima, održivači osiguravaju stabilnost uspostavljenog epigenoma tijekom života stanice, primjerice u terminalno diferenciranim stanicama, te predstavljaju molekularni mehanizam staničnog pamćenja. Epigenetički održivači iznimno su potentni molekularni sustavi sposobni održavati epigenom stabilnim čak i tijekom stanične diobe. Time se stanicama kćerima definira fenotip koji najbolje odgovara organizmu, iako stanice kćeri nikad nisu primile zahtjev epigenatora koji je potaknuo organizaciju dotičnog epigenoma odnosno formiranje njihova fenotipa. Upravo je to svojstvo epigenetičkih održivača platforma epigenetičkog nasljeđivanja. Epigenetički održivači naziv je kojim označavamo epigenetičke modifikacije, molekularne procese koji određuju status i funkciju kromatina bez zadiranja u DNA sekvencu odnosno genom. Najintenzivnije istraživane epigenetičke modifikacije su metilacija DNA, postranslacijske modifikacije histona i sustav nekodirajućih RNA molekula. Navedeni se molekularni procesi ujedno smatraju najodgovornijima i najaktivnijima u sustavu epigenetičkog održavanja. Predstavljaju srž epigenetičkog održavanja (5-9) (Slika 1.).

Epigenetički su se sustavi razvili tijekom evolucije kako bi stabilnosti genoma pridodali fleksibilnost njegova izražaja u fenotip te osigurali prijenos reverzibilnog fenotipa na potomstvo. Upravo je stoga epigenetika tradicionalno vezana za razvoj organizma odnosno biologiju razvojnih procesa.

1.1.1. Epigenetika embrionalnog razvoja

Početak života nove jedinke započinje oplodnjom, spajanjem gameta u jedinstvenu stanicu. Zanimljivo je stoga da već u samom začetku epigenetički sustav pokazuje svu svoju snagu. Naime, jajna stanica i spermij nose dijametralno suprotne epigenetičke obrasce, osobito na razini metilacije DNA. Jajna stanica primjer je hipometilirane stanice, dočim pronukleus spermija nosi izrazito metilirani genom (10). Nakon stapanja pronukleusa, DNA metilaciju zahvaća intenzivna reorganizacija. U zigoti, 3-6 sati nakon oplodnje, majčina DNA započinje snažnu metilaciju, dok očeva DNA prolazi kroz demetilacijski proces (10). Navedeni procesi demetilacije očeve i *de novo* metilacije majčine DNA međusobno isprepleteni u novoj jezgri sugeriraju da su DNA molekule različita podrijetla nekako zaštićene od metilacijskog odnosno demetilacijskog procesa ponaosob. Jedno od predloženih objašnjenja je postojanje različite kromatinske strukture tih dvaju genoma, odnosno njihova „pakiranja“, koja privlači ili štiti od antagonističkih metilacijskih mašinerija (11). Uistinu, u majčinu su genomu opisani di- i tri-metilacijski biljezi na lizinu 9 (H3K9me2, H3K9me3) i lizinu 27 (H3K27me2, H3K27m3) histona H3. Opisani histonski biljezi nisu

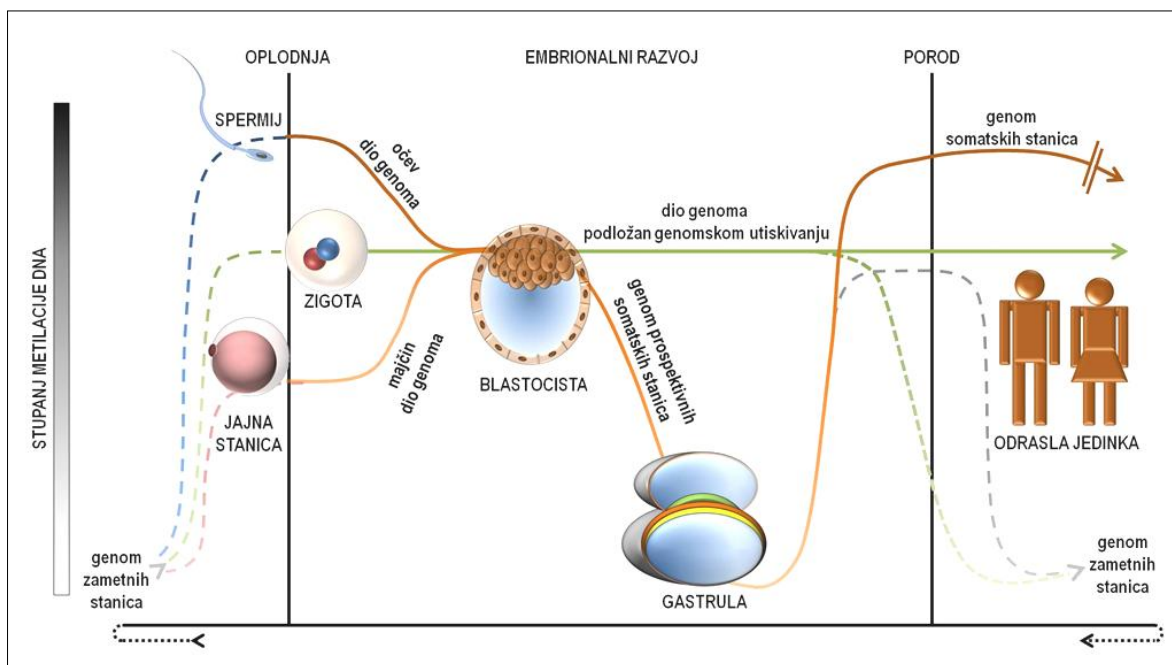
pronađeni na očevu genomu (12). Navedeni biljezi spadaju u histonske epigenetičke modifikacije, tzv. histonski kod, koje uvjetuju strukturu kromatina. Pretpostavlja se da epigenetička organizacija strukture kromatina na razini histonskoga koda uvjetuje suprotne metilacijske procese DNA koji zahvaćaju majčin odnosno očev genom. Nakon nekoliko DNA replikacijskih ciklusa, demetilacijski se val s očeva kromatina širi na majčin. Posljedično nalazimo jednaki stupanj izrazite hipometilacije majčine i očeve DNA i to u svim stanicama morule (10). Bitno je istaknuti da jednak stupanj metilacije DNA ne podrazumijeva i izjednačavanje obrazaca metilacije. Iako, parentalni genomi uspostavljaju isti stupanj globalne metilacije, zadržavaju specifične metilacijske obrasce određenih regija genoma. Do danas je opisano oko 100 gena koji nisu zahvaćeni globalnim DNA metilacijskim reorganizacijama epigenoma tijekom ranog razvoja. Taj se fenomen naziva genomsko utiskivanje (engl. *genomic imprinting*) i iznimno je bitan za fiziološki razvoj jedinke (13).

U stadiju blastociste započinju prvi procesi uspostave različitih epigenoma među stanicama zametka. Razvijaju se dvije stanične linije različita epigenoma. Na mikroskopskoj razini ovi se događaji očituju prvom diferencijacijom stanica u embrionalnom životu sisavca, formiranjem embrioblasta (engl. *inner cell mass*, ICM) i trofoblasta (TB). Stanice embrioblasta miša postaju hipermetilirane naspram hipometiliranim stanicama trofoblasta (14). U humanom zametku metilacijski su statusi ICM-a i TB-a obrnuti (15). Navedeno sugerira kako su metilacija i demetilacija DNA bitni za normalan razvoj ranog zametka i evolucijski sačuvani procesi u sisavaca, ali izgleda da je stupanj metilacije u pojedinim staničnim linijama specifičan za vrstu.

Svaka slijedeća promjena fenotipa embrionalnih stanica također je manifestacija vremenski i prostorno koordiniranih programiranih reorganizacija epigenoma jednog te istog genoma. Po dovršetku embriogeneze, prospektivne somatske stanice ne doživljavaju više dramatične već blage epigenetičke promijene duž diferencijacijskoga puta. Stanice selektivno izražavaju gene specifične za svoju diferencijacijsku liniju, čime postepeno ostvaruju zadanu im morfologiju i funkciju. Stanična diferencijacija postiže se prvenstveno demetilacijom promotorskih regija diferencijacijskih gena specifičnih za dotičnu staničnu liniju. Istodobno se provodi sustavna hipermetilacija primarno promotora gena pluripotentnosti i matičnosti, te ostalih gena specifičnih za embrionalni period, što vodi utišavanju njihove ekspresije. Naposljetku, stvoreni metilacijski obrasci predstavljaju epigenome terminalno diferenciranih stanica koje završavaju razvoj (11).

Posljednju drastičnu reorganizaciju epigenoma doživljava populacija specifičnih migracijskih stanica. Nazivamo ih spolnim prastanicama (engl. *primordial germ cells*, PGCs) a predstavljaju osnovu budućih gameta. Epigenom spolnih prastanica zahvaća snažan demetilacijski val koji rezultira izrazitom globalnom hipometilacijom. Ovaj je fenomen ujedno jedinstven proces u kojem se brišu biljezi na svim dijelovima DNA zahvaćenima genomskim utiskivanjem. Možemo slikovito reći da je molekula DNA temeljito očišćena od svih regulacijskih biljega prošlosti. Upravo je brisanje svih epigenetičkih biljega cilj ovog

procesa kako bi se osigurao „čist“ genom na kojem se može upisati novi epigenom tijekom gametogeneze, epigenetički obrazac novih gameta (16) (Slika 2.).



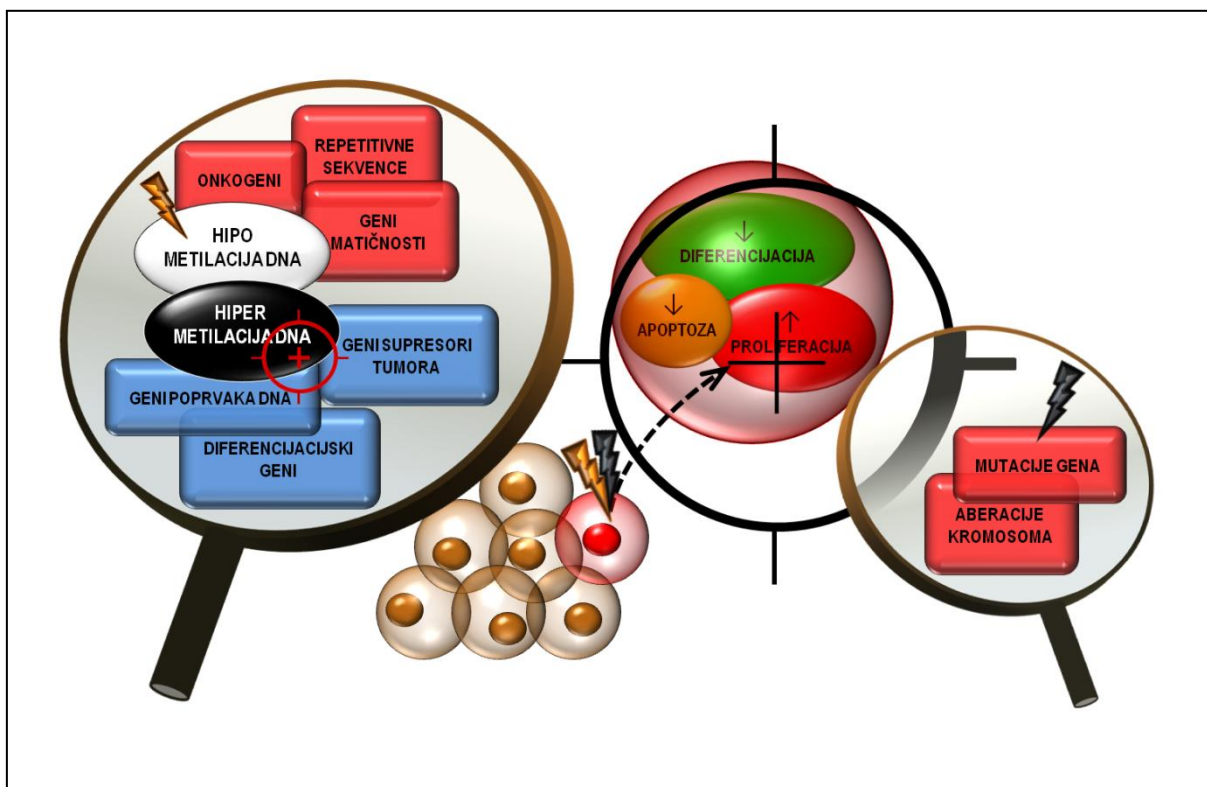
Slika 2. Promjene razine metilacije DNA tijekom života jedinke.

1.1.2. Epigenetika neoplastičnih procesa

Epigenetika je tradicionalno vezana za biologiju embrionalnog razvoja u čijem se okrilju i razvila. Danas je neosporno da epigenetički sustavi pokreću i dirigiraju razvojne procese, od zigote do terminalno diferenciranih stanica odraslog organizma. Međutim, patološki izmijenjen epigenetički sustav, kojeg opisujemo izrazom epimutacija, mora voditi stanicu u patološko stanje izmijenjene diferencijacije, potentnosti, proliferacije, apoptotičke aktivnosti ili kromatinske stabilnosti neovisno radi li se o embrionalnim ili terminalno diferenciranim stanicama. Ohrabreni spoznajama razvojne biologije i potaknuti novim tehnologijama, epigenetičari su prihvatili izazov istraživanja stanja u kojem je u stanicama poremećena većina navedenih svojstava odnosno istraživanje procesa neoplastične transformacije stanica. I uistinu, mnogobrojna su istraživanja pokazala izmijenjenu epigenetičku aktivnost u gotovo svim tumorima (7, 17). Postoje i dokazi patološki izmijenjenog epigenoma u iznimno ranoj fazi razvoja tumora što nameće hipotezu alteriranoga epigenoma kao možebitno prvog događaja na putu stanične transformacije u razvoju tumora (18). Ta istraživanja pokazuju da epigenetički incidenti mogu imati ulogu inicijatora maligne transformacije stanica.

Epimutacije mogu nastati na osnovi mutacija koje izravno mijenjaju epigenetički sustav. U navedenom scenariju, epimutacija predstavlja sekundarni incident koji nadalje propagira kancerogenezu (19). Primarni

pak poremećaji epigenetičkog sustava mogu pokrenuti kancerogenezu bez incidenta u sekvenci genoma (19, 20) odnosno prethoditi sekundarnoj degradaciji genoma (21). Primarna epimutacija može odražavati neprimjereni odgovor stanice na zahtjeve okruženja (22-24) ili pak fiziološki odgovor stanice na patološko izmijenjeno okruženje čime stanica pokazuje fiziološki odgovor, ali vremenski i prostorno na neprikladan način iz perspektive organizma (25).



Slika 3. Epigenetički i genetički pristup liječenju onkoloških bolesti. Cilj djelovanja DNA demetilacijskih lijekova (crveni marker), cilj djelovanja konvencionalne protutumorske terapije (crni marker), neželjeni efekt tumorske inicijacije DNA demetilacijskih lijekova (žuta munja), neželjeni efekt konvencionalne protutumorske terapije (crna munja).

Usku povezanost i ranu pojavu epimutacija tijekom inicijacije i progresije tumora mnogi znanstvenici pokušavaju iskoristiti u otkrivanju epigenetičkih obrazaca specifičnih za određeni tumor (engl. *cancer-specific epigenetic signatures*). Ti snažni biomarkeri pokazuju se iznimno vrijednim u otkrivanju rizičnih populacija (26), dijagnostici pretkliničkih onkoloških stanja (27), dijagnostici tumora (28, 29), tipizaciji tumora (30, 31), prognostici odgovora na terapiju (32) kao i prognostici onkološke bolesti (29, 33). Mnogo se očekuje od epigenetičkih biomarkera u budućnosti onkološke prakse. Iako se patološki izmijenjen epigenom, poput fiziološkog, prenosi stabilno kroz mitozu te osigurava nasljeđivanje tumorskog fenotipa, patološki epigenom zadržava svojstvo interagiriranja s okruženjem kao i svoju osnovnu funkciju organiziranja genoma. Ta je spoznaja temelj istraživanja jatrogene modulacije tumorskog epigenoma i ponovne

ustpostave fiziološkog fenotipa tumorski izmijenjenih stanica. Ipak, suvremeni se onkološki pristup još uvijek temelji uglavnom na otkrivanju genskih mutacija i kromosomskih aberacija u tumorskim stanicama. Hipoteza o statičnim nereverzibilnim promjenama sekvence DNA kao pokretačima tumorigeneze neosporno je dokazana kod snažnih okolišnih karcinogena koji imaju sposobnost indukcije *de novo* mutacija te klasičnog genetičkog nasljeđivanja mutiranih alela. Suvremena onkološka terapija temelji se primarno na ubijanju visoko proliferativnih stanica, mete većine protutumorskih lijekova današnjice. Epigenetički koncept promovira dinamičnije poimanje kancerogeneze prema kojem epigenetički mehanizmi kao primarni deregulatori induciraju patološku promjenu fiziološkog staničnog fenotipa odnosno patološki odgovor na stimuluse iz okoliša. Izmijenjeni fenotip pokazuje stabilan transgeneracijski prijenos sukladno principu epigenetičkog nasljeđivanja, ali zadržava dinamičnu interaktivnost sa staničnim okolišem. Terapijske aspiracije epigenetičkih istraživanja usmjerene su prema zaustavljanju daljnjeg napretka epimutacija i ponovne uspostave fiziološkog epigenetičkog koda u neoplastično izmijenjenim stanicama upotrebom epigenetičkih lijekova (epilijek, engl. epi-drug) umjesto ubijanja konvencionalnim protutumorskim terapijama, ili barem prema cilju da ubijanje učini selektivnijim (34, 35). Dakle, epigenetička terapija temeljena na modulatorima metilacije DNA usmjerena je ka ponovnoj uspostavi fiziološkog obrasca proliferacije, diferencijacije i apoptoze, *de facto* konverziji tumorskog u diferencirano tkivo. Ipak, dok suvremeni onkološki lijekovi mogu potaknuti deterioraciju sekvence DNA, modulatori metilacije DNA današnjice mogu inducirati neselektivne *de novo* epimutacije u organizmu (Slika 3.). Dakle, danas oba terapijska koncepta, iako potpuno različitih pristupa, imaju jedinstveno zajedničko svojstvo – sposobnost indukcije iste bolesti protiv koje su stvoreni.

Iako su epigenetička dijagnostika i epigenetička terapija u začetima, suvremena bazična biomedicinska istraživanja i pokušaji njihove translacije u kliničku praksu predstavljaju snažnu platformu za razvoj medicine budućnosti.

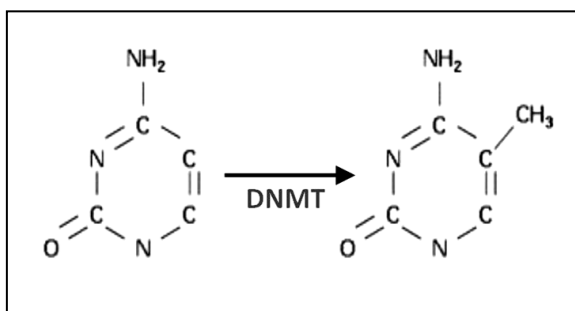
1.1.3. Epigenetički mehanizmi

Budući da je razvojem tehnologije područje istraživanja epigenetike doživjelo brz i dramatičan uzlet, mnogi su otkriveni mehanizmi predloženi kao dio epigenetičkog sustava. Stoga je postignut konsenzus o definiciji epigenetičkih modifikacija prema kojoj se epigenetičke modifikacije opisuju kao nasljedni mehanizmi koji reguliraju ekspresiju genoma i strukturu kromatina bez izmjena sekvence molekule DNA. Danas je prihvaćena misao kako sve epigenetičke modifikacije međusobno intenzivno interagiraju kao jedinstven nedjeljiv sustav kojim se ostvaruje zajednička uloga regulacije. Izolirani poremećaj jednog dijela sustava reflektira se na ostale dijelove epigenoma koji vlastitom reorganizacijom pokušavaju kompenzirati prisutnu aberaciju. Ukoliko kompenzacijski mehanizmi zakažu, izvjesno je formiranje novih staničnih fenotipova koji mogu biti osnova za razvoj patoloških stanja u organizmu, primjerice neoplastičnog procesa. Do danas je u ukupan epigenetički sustav uvršteno oko desetak staničnih mehanizama. Za

razumijevanje ovog istraživanja potrebno je predstaviti dvije epigenetičke modifikacije, metilaciju DNA i RNA interferenciju. Stoga će ti sustavi biti detaljnije opisani.

1.1.3.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA prva je opisana i trenutno najistraženija epigenetička modifikacija. Promjene metilacije DNA pokreću reorganizaciju strukture kromatina posljedično mijenjajući gensku ekspresiju, ali i stabilnost kromatina (36). Stoga je metilacija DNA odavno prepoznata kao ključni stanični mehanizam tijekom embriogeneze i razvoja organizma (11) kao i razvoja mnogih bolesti (37). Metilacija DNA predstavlja kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski ostatak u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG) diljem genoma čime se citozin pretvara u 5-metilcitozin (5mC) odnosno novu petu bazu (38) (Slika 4.). Iako su opisane metilacije drugih nukleotidnih kombinacija, metilacija CpG dinukleotida prihvaćena je kao dominantan proces u kontekstu metilacije DNA (39).

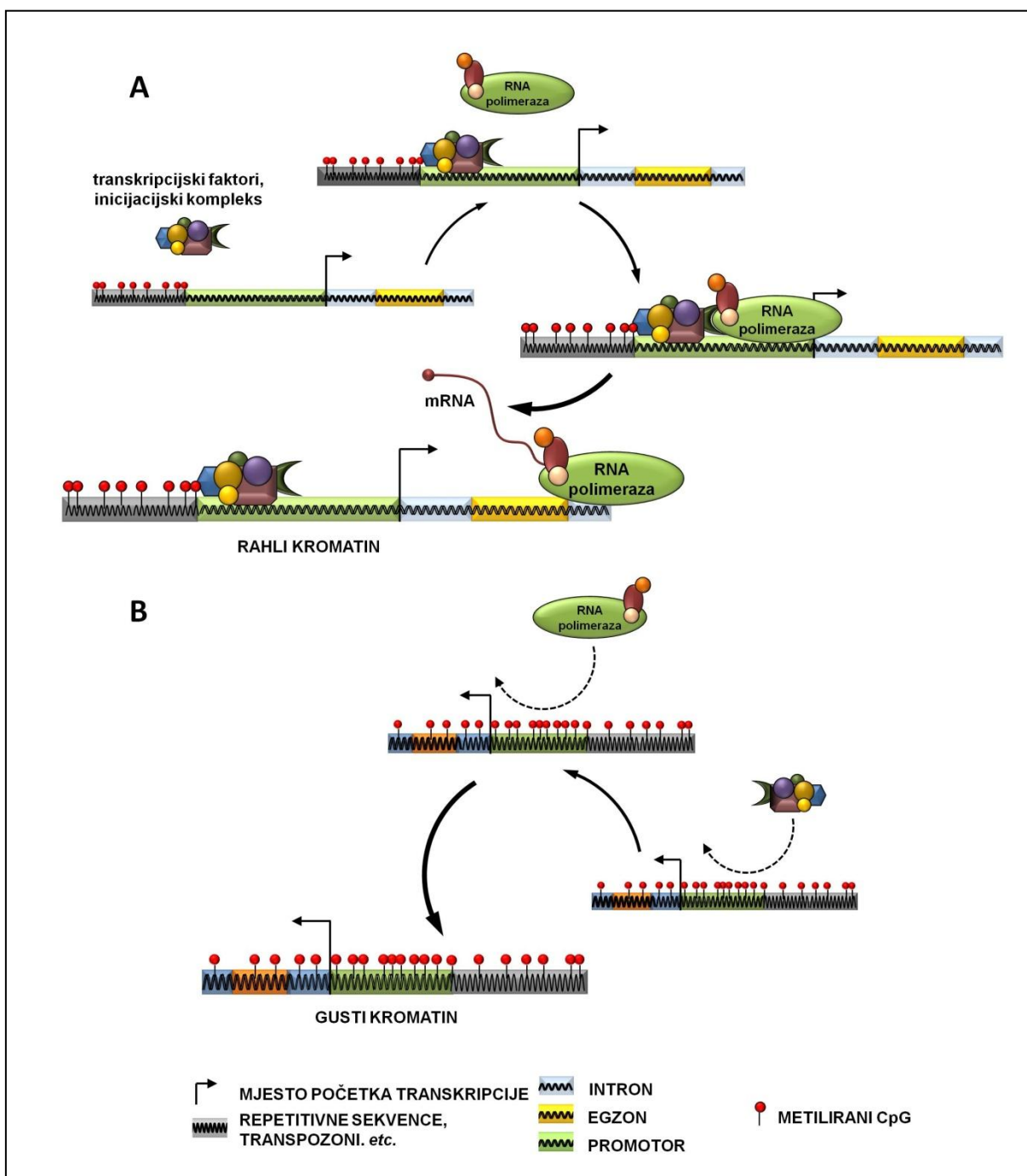


Slika 4. Enzim DNA metiltransferaza katalizira prijenos metilne skupine na peti ugljikov atom citozinskog prstena.

Metilacija DNA ovisi o postojanju jedinstvenog dinukleotida u kojem iza citozina slijedi gvanin (CpG). Čovjek posjeduje najviše 5% CpG dinukleotida što čini upravo ovu najrjeđom dinukleotidnom kombinacijom unutar humanog genoma. Pored toga, distribucija CpG dinukleotida unutar humanog genoma izrazito je asimetrična. Regije bogate CpG dinukleotidom pojavljuju se pretežito u repetitivnim sekvencama, centromeričnim ponavljanjima, endogenim retroviralnim i satelitskim sekvencama (7). Upravo su te domene DNA izrazito metilirane (hipermetilirane) što osigurava stabilnost kromatina. Poremećaji metilacijskog statusa ovih područja genoma pokreću ili propagiraju lavinu nestabilnosti u genomu što nerijetko rezultira malignom transformacijom stanice. Postoje domene DNA izrazito bogate CpG dinukleotidima koje se čine imunima na metilaciju DNA. Naime, preko 70% CpG dinukleotida je metilirano, dok je nemetilirani ostatak grupiran u CpG bogate regije koje iznimno rijetko prihvaćaju metilaciju (40). Nazivamo ih CpG otocima. Na CpG otoke otpada tek 1% humanog genoma i locirani su u promotorskoj regiji preko 50% gena (41). Prisutna metilacija DNA u području CpG otoka korelira s

kondenziranim transkripcijski inaktivnim kromatinom što podrazumijeva ekspresijski inhibirane gene. Inhibicija ekspresije postiže se ili direktnim odbijanjem transkripcijskog kompleksa s promotorske regije gena ili uspostavom složene mreže epigenetičkih modifikacija i pridruženih represivnih proteina koji transkripcijskim faktorima blokiraju pristup genu. Iako se smatra da se regulacijska uloga ekspresije gena postiže metilacijom unutar CpG otoka, objavljene su studije koje dokazuju da je za regulaciju ekspresije bitnija metilacija na rubovima CpG otoka, tzv. obalama (42, 43). Regulacija ekspresije gena metilacijom DNA opisana je i kod gena koji nemaju CpG otok. Naime, iako gustoća CpG dinukleotida u promotoru ne zadovoljava kriterij po kojem bi se smatrao otokom, kritičan broj CpG dinukleotida je prisutan i dovoljan za ostvarivanje regulacijske uloge DNA metilacije (44).

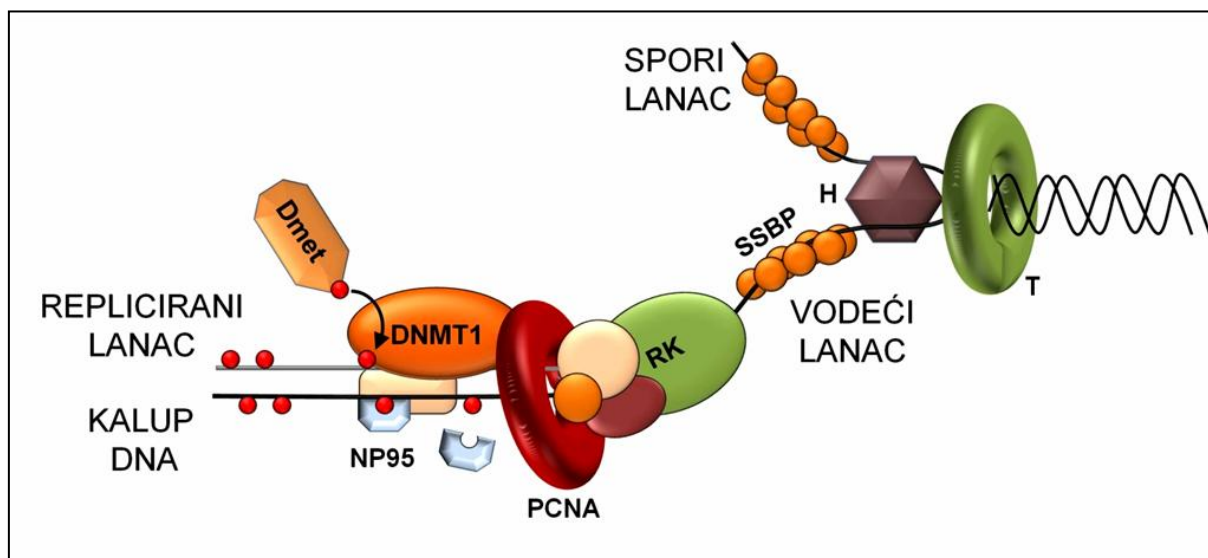
Demetilirani promotori nalaze se u otvorenoj konformaciji kromatina. Rahlost kromatina osigurava transkripcijskim faktorima i inicijatorima transkripcije pristup molekuli DNA. Vezivanjem i formiranjem inicijacijskog kompleksa osigurani su uvjeti pristupanja RNA polimeraze mjestu početka transkripcije. Slijedi sinteza molekule RNA koja se potencijalno može prevesti u protein (Slika 5.A). Takav je scenarij karakterističan za gene matičnosti i pozitivne regulatore staničnoga ciklusa tijekom embrionalnog razvoja, ali i za gene supresore tumora kao i diferencijacijske gene u terminalno diferenciranim stanicama (44, 45). Ukoliko je promotor gena metiliran, odnosno sekvenca promotora sadrži 5mC, pokreće se mašinerija ostalih epigenetičkih modifikacija koje dovode do zatvorene strukture kromatina odnosno određenog stupnja kondenzacije. Transkripcijskim je faktorima otežan pristup molekuli DNA te ne dolazi do formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa. U takvoj strukturi kromatina RNA polimeraza nema pristupa DNA molekuli niti nalazi vezno mjesto u području promotora. Posljedično ne dolazi do sinteze mRNA pa inhibicija transkripcije rezultira represijom ekspresije dotičnog gena (Slika 5.B.). Navedeni obrazac metilacije DNA nalazimo u promotorima gena matičnosti i nekih pozitivnih regulatora staničnoga ciklusa u terminalno diferenciranim stanicama odnosno u promotorima diferencijacijskih gena tijekom embrionalnog razvoja (44, 45). Metilom tumorskih stanica izvrće navedene obrasce metilacije DNA. Naime, u tumorskim stanicama hipometiliranu DNA pronalazimo na promotorima gena matičnosti, protoonkogenima/onkogenima, genima staničnoga ciklusa i inhibitorima apoptoze. Hipermetilirana DNA u tumorskim stanicama tipična je u promotorima gena supresora tumora, proapoptotičkih gena, gena negativnih regulatora staničnog ciklusa i diferencijacijskih gena. Organizacijom izvrnutog metiloma stanica zapravo formira svoj neoplastični fenotip. Specifičnost tumorskih stanica je i globalna demetilacija postignuta demetilacijom uglavnom repetitivnih sekvenci, transpozona te ostalih nekodirajućih regija genoma. Gubitak metilacije DNA propagira organizaciju otvorene strukture kromatina što omogućuje aktivnost inače utišanih regija. Globalna demetilacija otvara ogromne fragmente kromatina koji postaje nestabilan i izložen stjecanju *de novo* genomskih mutacija i kromosomskih aberacija (46).



Slika 5. Prikaz utjecaja metilacije promotora na ekspresiju gena. A: Demetilirani odnosno hipometilirani promotor gena. B: Hipermetilirani promotor gena.

Metilacija DNA, odnosno CpG dinukleotida, biokemijski je proces kataliziran skupinom enzima, DNA-metil-transferaza (DNMT) (36). Disfunkcija glavnih pripadnika obitelji DNMT rezultira globalnom demetilacijom DNA te posljedičnim letalnim ishodom tijekom ili neposredno nakon embriogeneze (47, 48). Ovi enzimski sustavi istovremeno osiguravaju epigenetičko nasljeđivanje DNA metilacijskih obrazaca (metiloma) i dinamičke izmjene obrazaca sukladno staničnim potrebama.

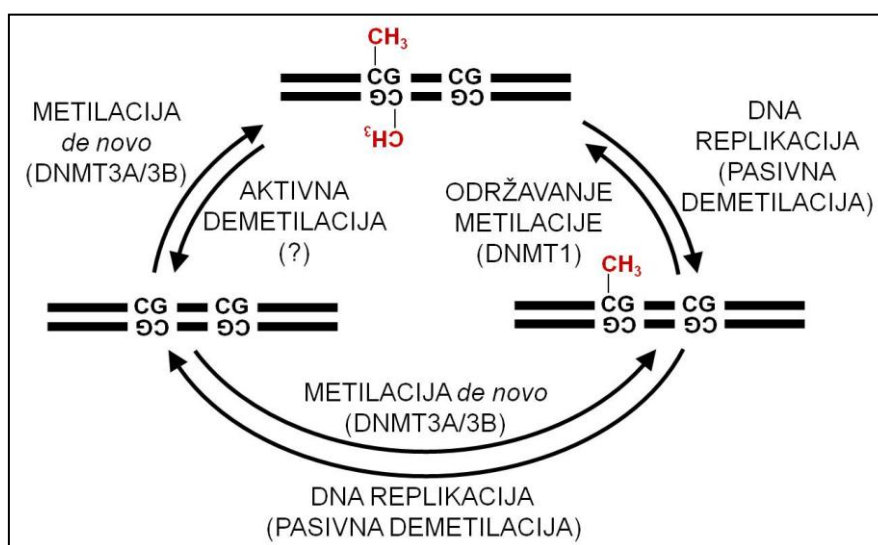
Epigenetičko nasljeđivanje metiloma stanicama kćerima osigurava DNMT1 koja pokazuje afinitet isključivo prema hemimetiliranoj DNA odnosno molekuli DNA čiji samo jedan lanac sadrži 5mC. Postoje dokazi da je navedeni vertikalni prijenos sklon pogreškama. Primjerice, praćenjem CpG dinukleotida u fragmentu DNA dokazana je adicija metilne skupine na prvotno nemetilirani CpG dinukleotid, ali i gubitak metilne skupine na metiliranom CpG dinukleotidu tijekom replikacije. Stopa promjene metiloma pogrešnim vertikalnim prijenosom procijenjena je na otprilike 4% po replikaciji (49). Ipak, dokazano je da se transkripcijski status transgena, unatoč greškama kopiranja metilacijskog obrasca, vjerno prenosi kroz stotinjak staničnih generacija (50). Također, dokazano je da DNMT3 enzimi imaju sposobnost obnoviti metilaciju procesom *de novo* metilacije CpG dinukleotida kojemu greškom enzima DNMT1 nije prenesena metilacijska modifikacija tijekom replikacije (41). Svakako, neovisno o mehanizmu, ukupni metilacijski status DNA vjerno se prenosi na stanice kćeri (51) u kontekstu regulacije genske aktivnosti i strukturne organizacije kromatina, u čemu zasigurno ključnu ulogu ima enzim DNMT1 (Slika 6.).



Slika 6. DNMT1 katalizira prijenos metilne skupine kopiranjem metilacijskog obrasca lanca kalupa na novosintetizirani lanac čime se osigurava vjeran prijenos obrasca metilacije DNA na stanice kćeri. Topoizomeraza (T), helikaza (H), *single strand binding proteins* (SSBP), DNA replikacijski kompleks (RK), donor metilne skupine (Dmet), metilna skupina (●).

Dinamičke reorganizacije metilacijskog statusa DNA kao i njegovog obrasca osiguravaju enzimi DNMT3A i DNMT3B čijom se aktivnošću ostvaruje *de novo* metilacija (52). Ova skupina DNA-metiltransferaza izrazito je eksprimirana tijekom ranog embrionalnog razvoja što odgovara periodu najintenzivnijeg metilacijskog reprogramiranja DNA. Enzim DNMT3A ima, čini se, izrazit afinitet prema metiliranju ne-CpG (engl. *non-CpG*) dinukleotida kao što je primjerice CpA (53). Pojedini autori naglašavaju mogućnost da upravo ne-CpG metilacija DNA prethodi CpG metilaciji (53). Ne-CpG

metilacija opisana je u regulacijskim regijama gena kao što su pojačivači, ali i unutar pojedinih gena (39). Ne-CpG metilacija DNA istražena je prvenstveno u embrionalnim matičnim stanicama i čini se da ima bitnu ulogu regulatora stanične diferencijacije i pluripotentnosti matičnih stanica (39). Istraživanjem neembrionalnih stanica postavljena je hipoteza prema kojoj ne-CpG metilacija ima neizostavnu ulogu u mutagenezi humanih stanica (54). Stoga će daljnja istraživanja ne-CpG metilacije i DNMT3A zasigurno dovesti do zanimljivih otkrića, a moguće i doprinijeti novim dijagnostičkim i terapijskim pristupima. DNMT3B poznata je po *de novo* metilaciji CpG dinukleotida specifičnih regija genoma, osobito pericentromerično smještenih repetitivnih sekvenci i regija bogatih CpG dinukleotidima na inaktivnom X kromosomu (52, 55-57). Stoga se pretpostavlja da DNMT3B sudjeluje u metilaciji regija genoma u tzv. tihom, ekspresijski inaktivnom, kromatinu. Danas prevladava stav da DNMT3 nisu sposobne samostalno određivati koji će fragment DNA biti metilirani *de novo*. Postoje dokazi da su im za to potrebni dodatni faktori koji svojom selektivnošću prema specifičnom fragmentu DNA i sposobnošću regrutacije DNMT3 zapravo reguliraju proces *de novo* metilacije (58, 59). Za selektivnost *de novo* metilacije važnu ulogu ima svakako i sekvenca DNA. Naime, DNA metilacijski sustav privlače lokusi bogati repetitivnim sekvencama, tzv. centri DNA metilacije. Pokretanjem procesa metilacija se širi duž DNA sekvence dok ne naiđe na prepreku. Tada DNA metilacijski val zamire. Te prepreke, pretpostavlja se, čine CpG otoci (vidi kasnije) (57). Koji je točan mehanizam održavanja metilacijskog obrasca kao i *de novo* metilacije DNA ostat će i dalje predmet istraživanja. Osobito se to odnosi na razotkrivanje funkcije DNMT2 čija je uloga u metilacijskoj mašineriji puna kontroverzi. Kako bilo, suradnja metilacijskih enzima s faktorima različitih afiniteta prema sekvencama i statusima kromatina pruža iznimnu mogućnost usklađivanja metilacije DNA s ostalim epigenetičkim modifikacijama te na posljepku precizno ugađanje strukture kromatina na specifičnom lokalitetu neke sekvence.



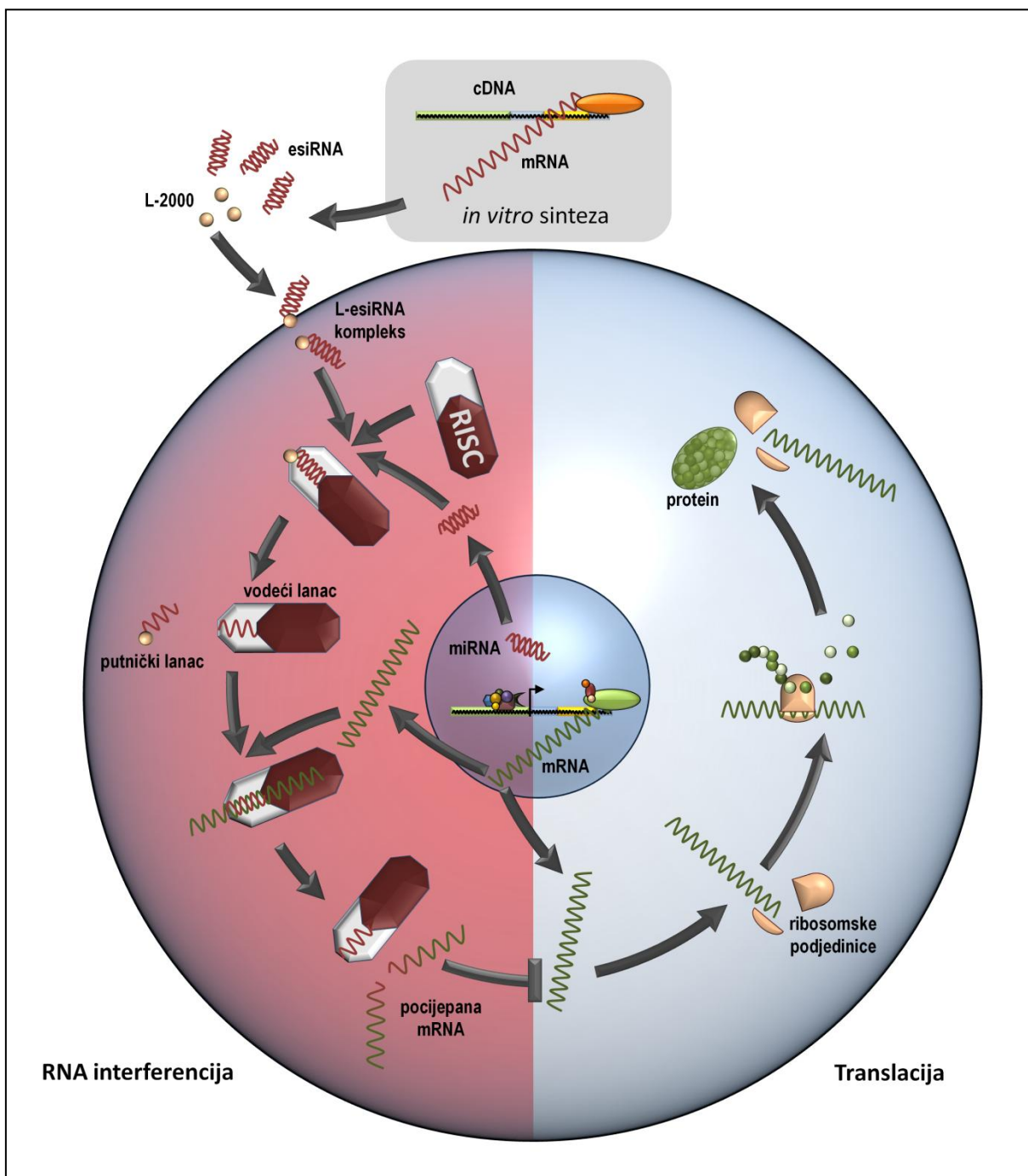
Slika 7. Proces stvaranja i održavanja metilacijskih obrazaca DNA.

Metilacija DNA zasigurno je aktivan proces posredovan enzimatskom mašinerijom, suprotno demetilaciji DNA koja može osim aktivnim procesom biti ostvarena i pasivnim gubitkom metilne skupine (Slika 7.). Oba demetilacijska puta epigenetičarima su i danas velika nepoznanica. Pretpostavlja se da je jedan oblik pasivne demetilacije zapravo slučajan događaj pogrešnog kopiranja metilacijskog obrasca DNA enzimom DNMT1 tijekom replikacije (60) i ne plijeni prevelik interes istraživača. Ipak, pasivna je demetilacija obilježila razvoj epigenetike kao znanosti i predstavlja prvu translaciju bazične epigenetike u medicinsku praksu. Naime, oblik pasivne demetilacije je i ugradnja citozinskih analoga u sekvencu DNA, analoga koji nemaju mogućnost primanja metilne skupine. DNMT tada ne mogu prenijeti metilacijski obrazac niti ostvariti *de novo* metilaciju čime se postiže relativno trajno demetilacijsko stanje sekvence, otvaranje kromatina i ekspresijska aktivnost prvotno heterokromatičnih gena. Jedan od analoga citozina čija se demetilacijska aktivnost iskorištava u terapijske svrhe u onkologiji je 5azaC (vidi kasnije). Aktivna demetilacija naprotiv, intenzivno se istražuje u posljednje vrijeme budući da nagovještuje mogućnost selektivnog aktiviranja kromatina. Danas je poznato da se aktivna demetilacija događa u zigoti (10, 61), zametnim stanicama (62) ali i u somatskim diferenciranim stanicama, primjerice neuronima (63). Također se pretpostavlja da je ovaj enzimatski sustav uključen u održavanje demetiliranog statusa DNA u području CpG otoka (60). Mnogi su mehanizmi enzimatskog uklanjanja metilne skupine, baze 5mC i nukleotida 5mC predloženi, ali do danas nijedan nije neosporno dokazan ili razjašnjen.

1.1.3.2. RNA interferencija

Iako se od perioda otkrića gena dogmatizirala hipoteza prema kojoj složeniji organizmi imaju veći broj gena od jednostavnijih, danas je jasno da broj kodirajućih regija u genomu ne korelira s kompleksnošću stanice odnosno organizma. Primjerice, čovjek nema značajno veći broj gena od nekih mikroskopskih organizama. Dapače, zapanjujuće je otkriće po kojem svi višestanični organizmi čiji je genom do danas sekvencioniran imaju manji broj gena koji kodiraju za proteine od nekih jednostaničnih eukariota (64). Mnoga istraživanja koja su uslijedila pokazala su da složenost organizma korelira s veličinom dijela genoma koji ne kodira za proteine (64). Nekodirajući dio genoma čovjeka obuhvaća gotovo 98% cjelokupnog genoma i iako se do jučer nazivao pojmovima poput DNA smeće (engl. *junk-DNA*) danas postaje jasno da je upravo taj dio genoma pogodovao razvoju složenijih organizama. Nekodirajući dio genoma se prepisuje u RNA molekule koje nazivamo nekodirajuće RNA (engl. *non-protein-coding RNAs*, ncRNAs) koje se razlikuju od mRNA molekula prvenstveno jer ne podliježu translaciji u proteine. Prema dosadašnjim spoznajama, ncRNA molekule sudjeluju u svim najvažnijim staničnim procesima poput transkripcijske i posttranskripcijske regulacije ekspresije gena, inaktivacije X kromosoma (65), reprogramiranja u zametnim stanicama (66) i paramutacija (67). Jednakim mehanizmima ncRNA potiču represiju transpozona te inhibiciju i degradaciju viralnih genoma (68) čime preuzimaju ulogu svojevrsnog staničnog imunološkog sustava.

Molekule ncRNA sudjeluju u mnogim staničnim procesima regulacije ekspresije gena te regulacije strukture kromatina bez zadiranja u DNA sekvencu. Upravo su stoga ncRNA molekule ubrojene u epigenetički sustav pod nazivom RNA interferencija (engl. *RNA interference*, RNAi). Do danas je diferencirano preko 13 skupina ncRNA molekula prema specifičnim svojstvima poput veličine molekule ili mehanizma djelovanja. Među istaknutijima su male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNAs* ili *short interfering RNAs*, siRNAs) i mikro RNA (engl. *microRNAs*, miRNAs) (69, 70).



Slika 8. Inhibicija ekspresije gena egzogenom i endogenom indukcijom RNA interferencije.

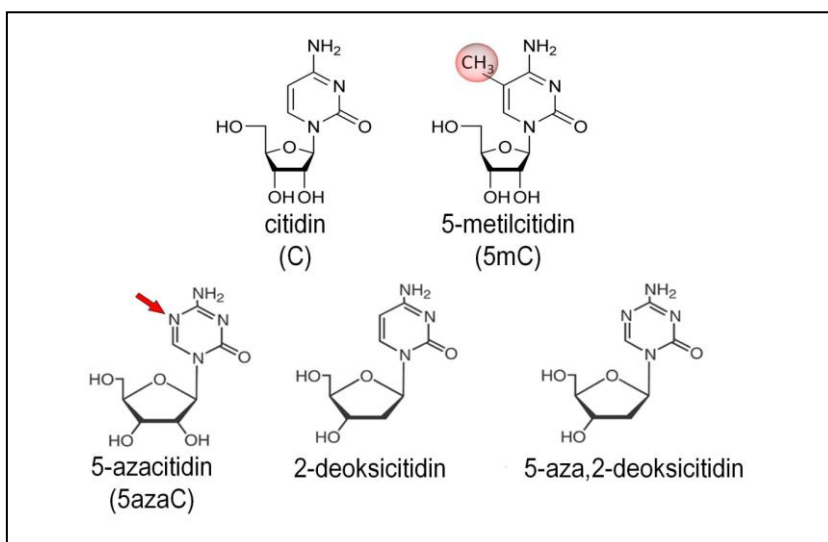
Oba oblika ncRNA pokazuju izrazitu specifičnost prema lokusu čiju inhibiciju potiču. Ta je specifičnost određena komplementarnošću sekvenci ncRNA i lokusa. Dok miRNAs potiču lokus specifičnu inhibiciju ekspresije određenih gena unutar genoma, rijetko vlastitog lokusa, specifičnost siRNAs je da iznimno često potiču inhibiciju te degradaciju i vlastitih lokusa (70). Također, siRNA imaju dvojako podrijetlo; egzogeno (RNA molekula iz okoliša, virus) i endogeno (stanični genom). Upravo navedena svojstva čine RNAi pomoću siRNAs izrazito dinamičnim sustavom.

MiRNA i siRNA dvolančane su molekule (engl. *double-stranded RNA*, dsRNA) i induktori RNAi. U citoplazmi je dsRNA podložna obradi proteinom Rezačem (engl. *Dicer*), enzimom s endoribonukleaznom aktivnošću i izrazitim afinitetom prema dsRNA. Molekula dsRNA vezana za Rezač PAZ domenom i omotana oko tijela enzima dolazi u kontakt s RNAazaIII domenom koja cijepa omotani fragment u dsRNA veličine 20-30 nukleotida i ljepljivih krajeva. Upravo udaljenost između PAZ i RNAazaIII domene uvjetuje veličinu fragmenta. Rezač otpušta obrađeni fragment i katalizira daljnju obradu preostale dsRNA. Otpušteni dvolančani fragment prepoznaje RNA inducirani kompleks utišavanja (RISC) (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC). RISC veže dsRNA fragment preko proteina Argonauta. Argonaut nadalje odmata dsRNA i integrira jedan od lanaca u kompleks. Taj se lanac naziva vodećim i određuje selektivnost daljnjeg procesa RNAi. Nakon uspostave stabilnog kompleksa RISC/ssRNA, komplementarni lanac postaje prvi supstrat aktivnog RISC-a te biva razgrađen (70-73). Izloženi jednolančani RNA lanac u sklopu RISC-a spreman je vezati se za bilo koju komplementarnu RNA molekulu u blizini RISC-a, najčešće mRNA. Ponovnom uspostavom dvolančane RNA, PIWI domena katalizira endonukleazno cijepanje parnog lanca. Vezani se RNA lanac naposljetku destabilizira i degradira čime je onemogućena eventualna translacija uhvaćene RNA (70, 74) (Slika 8.).

Navedeni mehanizam RNA interferencije samo je jedan od do danas opisanih mehanizama kojima se postiže specifična represija ili inhibicija ekspresije pojedinog gena pomoću ncRNA. Mogućnost industrijske sinteze odnosno proizvodnje siRNA molekula koje zadržavaju specifičnost i sposobnost degradacije mRNA ili barem translacijske supresije, potaknula je eksplozivni rast istraživanja koja koriste siRNA. Ulaskom sintetizirane siRNA u stanicu postiže se reverzibilno utišavanje bilo kojeg gena od interesa, poput primjerice onkogenog, gena supresora tumora, pozitivnih i negativnih regulatora staničnog ciklusa i apoptoze, diferencijacije, ili gena poznatih sekvenci ali nepoznatih funkcija. Na taj jednostavan način dobivaju se privremeni *knock-down* sustavi *in vitro* ili *in vivo* koji osim otkrivanja ili potvrđivanja funkcija gena te određivanja važnosti kodiranog proteina od interesa u staničnim procesima, omogućuju otkrivanje uključenosti gena od interesa u pojedine patološke procese (75). Iako postoje mnogi izazovi u području istraživanja i razvoja siRNA tehnologije, siRNA predstavlja novo iznimno moćno oruđe moderne biomedicinske znanosti u otkrivanju i razjašnjavanju molekularne osnove humanih bolesti, kao i terapijsko sredstvo.

1.2. 5-azacitidin

Polovicom 20. stoljeća otkriven je analog citozina nazvan 5-azacitidin (5azaC). Rana istraživanja 5azaC-a pokazala su njegov izniman utjecaj na biološke sustave bez pretjeranog razumijevanja pozadinskih molekularnih procesa. Uskoro je postalo jasno da je 5azaC demetilacijska tvar iznimne snage. Stoga je smatran jednim od glavnih oruđa razvojne, stanične i molekularne biologije druge polovice prošloga stoljeća. Pored toga 5azaC prva je epigenetički aktivna tvar translirana u kliničku praksu odnosno terapiju onkoloških bolesti. U znanost se koristi već preko pola stoljeća, a i danas je 5azaC neizostavan alat u modernoj biologiji za istraživanja u razvojnoj biologiji i tumorskoj biologiji. Širenje primjene 5azaC-a i njemu sličnih spojeva (Slika 9.) u terapiji onkoloških bolesti intenzivno se istražuje.



Slika 9. Kemijske strukture citozina i njegovih analoga.

Iako je 5azaC nestabilan u vodenim otopinama, osobito kiselim i bazičnim, u pH neutralnim vodenim otopinama poluživot 5azaC-a je 21 dan na +4°C, 37 sati na +20°C te 7 sati na 37°C (76). Istraživanja na staničnim linijama pokazala su da je aktivnost 5azaC-a dugotrajna iako je bio izložen nepovoljnim uvjetima. Naime, 5azaC izložen različitim temperaturama tijekom 24 sata i dalje je bio sposoban inhibirati metilaciju DNA u kulturi humanih karcinomskih stanica (77).

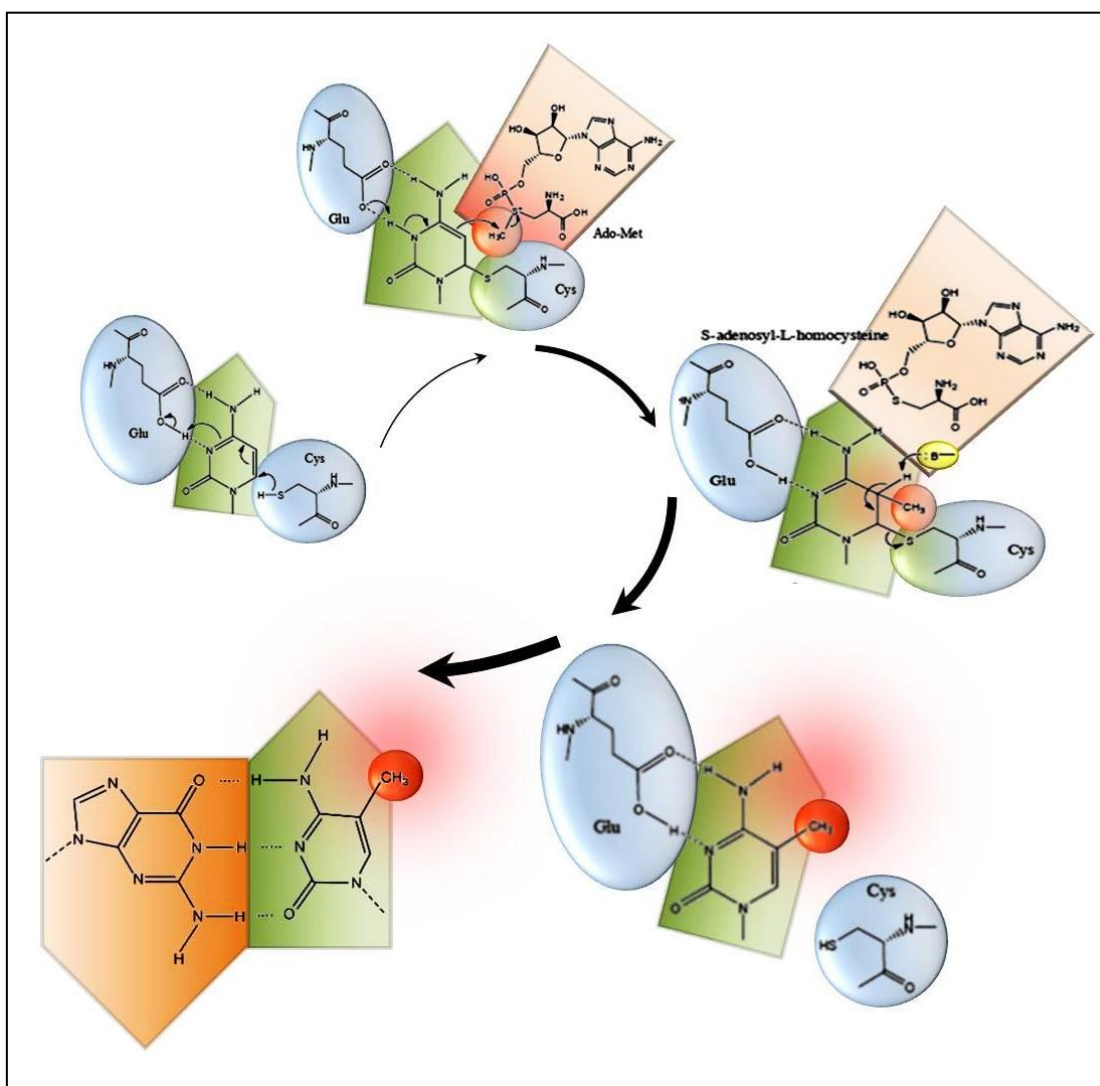
Farmakokinetička istraživanja pokazala su brzu apsorpciju 5azaC-a u tijelu. Vršna koncentracija u plazmi postiže se 30 minuta nakon supkutane (s.c.) odnosno 11 minuta nakon intravenske (i.v.) primjene u trajanju od deset minuta (78). I.v. primjenom postiže se četiri puta veća koncentracija u plazmi u usporedbi sa s.c. primjenom, ali mu je trajanje poluživota gotovo dvostruko kraće, odnosno 22 minute. Nakon administracije 5azaC se distribuira po većini tkiva i organa u tijelu. 5azaC eliminira se iz tijela putem bubrega (85%) s vremenom poluizlučivanja od četiri sata (78).

1.2.1. Molekularni mehanizmi djelovanja 5-azacitidina

Nedugo nakon administracije, osobito i.v. odnosno intraperitonealnim (i.p.) putem, 5azaC postiže vršnu koncentraciju u većini tkiva i organa. Ipak, iako je opisana povezanost nukleozidnih membranskih transportera i biološkog učinka 5azaC-a, molekularni mehanizam transporta 5azaC u stanicu još uvijek nije objašnjen (79). Jednako su nerazjašnjeni i prvi enzimatski procesi koji zahvaćaju 5azaC nakon ulaska u stanicu. Poznato je da se 5azaC po ulasku u citoplazmu fosforilira u 5azaC-monofosfat. Pretpostavljalo se da je u taj proces uključen enzim uridin-citidin kinaza (80) iako su kasnija istraživanja negirala ovu pretpostavku pronalaskom da rekombinantna humana uridin-citidin kinaza nema nikakva učinka na 5azaC (81). Kako bilo, pirimidin-monofosfat kinaza i difosfat kinaza nadalje mogu fosforilirati 5azaC do 5azaC-difosfata odnosno 5azaC-trifosfata koji svaki zasebno mogu ostvarivati različite biološke učinke.

Jedan od najistraženijih učinaka 5azaC-a svakako je njegova ugradnja u molekulu DNA. 5azaC-difosfat može se reducirati pomoću ribonukleotid-reduktaze u 5-azadeoksicitidin-difosfat koji enzim nukleozid-difosfat kinaza fosforilira u 5-azadeoksicitidin-trifosfat. U ovakvom obliku 5azaC konkurrira citidinu za ugradnju u lanac DNA. Biološki učinak 5azaC najuočljiviji je ukoliko se u stanici nalazi tijekom S faze staničnog ciklusa. Razlog tomu je masovna ugradnja analoga u novosintetizirane lance DNA tijekom replikacije. Dakle, jačina učinka 5azaC na biološki sustav ovisi o staničnim procesima koji mu omogućavaju ulazak u te sustave. Budući da je potražnja za citidinom, kao i za ostalim nukleotidima, intenzivna tijekom replikacije DNA, replikacijska mašinerija ostvaruje nekritičnu ugradnju analoga. Rezultat takove replikacije je iznimno visoka količina ugrađenog 5azaC zarobljenog u molekuli DNA (82).

Ugrađen u molekulu DNA 5azaC interagira s proteinima koji provode metilaciju DNA te dovodi do inhibicije njihove aktivnosti (83). Naime, u stanici u kojoj se ne nalaze molekule 5azaC, katalitički mehanizam DNMT uključuje nukleofilni napad na protein-tiolnu grupu što dovodi do formiranja kovalentne veze između Cys aminokiselinskog ostatka DNMT i atoma C6 citozinskog prstena. Novoformirana kemijska veza usmjerava elektrone prema C5 atomu citozinskog prstena s posljedičnim prihvaćanjem CH_3 skupine od donora metilne skupine S-adenozin-L-metionina. U tom procesu metilna skupina ostaje adirana na petom ugljikovu atomu citozina unutar CpG dinukleotida, odnosno ostvarena je metilacija DNA na jednoj točki sekvence (84, 85). Procesom β -eliminacije stvara se C5-C6 dvostruka veza što oslobađa DNMT enzim od molekule DNA (Slika 10.). Ukoliko u stanici postoje molekule 5azaC-a, njegovom ugradnjom na mjesto citozina iza kojeg slijedi gvanin formira se dinukleotid azaCpG koji je, poput klasičnog CpG dinukleotida, supstrat DNMT1 enzimu. Po principu opisanog procesa metilacije ostvaruje se kovalentno vezivanje 5azaC-a u azaCpG dinukleotidu i DNMT enzima. Međutim, novoostvorenu kovalentnu vezu između enzima i C6 atoma 5azaC-a nije moguće raskinuti procesom β -eliminacije budući da 5azaC na petom mjestu prstena umjesto C5 ima atom dušika, N5. Dušik ne može stvoriti četvrtu vezu prstena te ne dolazi do prijenosa metilne skupine s donora na analog. Stoga dolazi do prekida započetog procesa metilacije DNA.

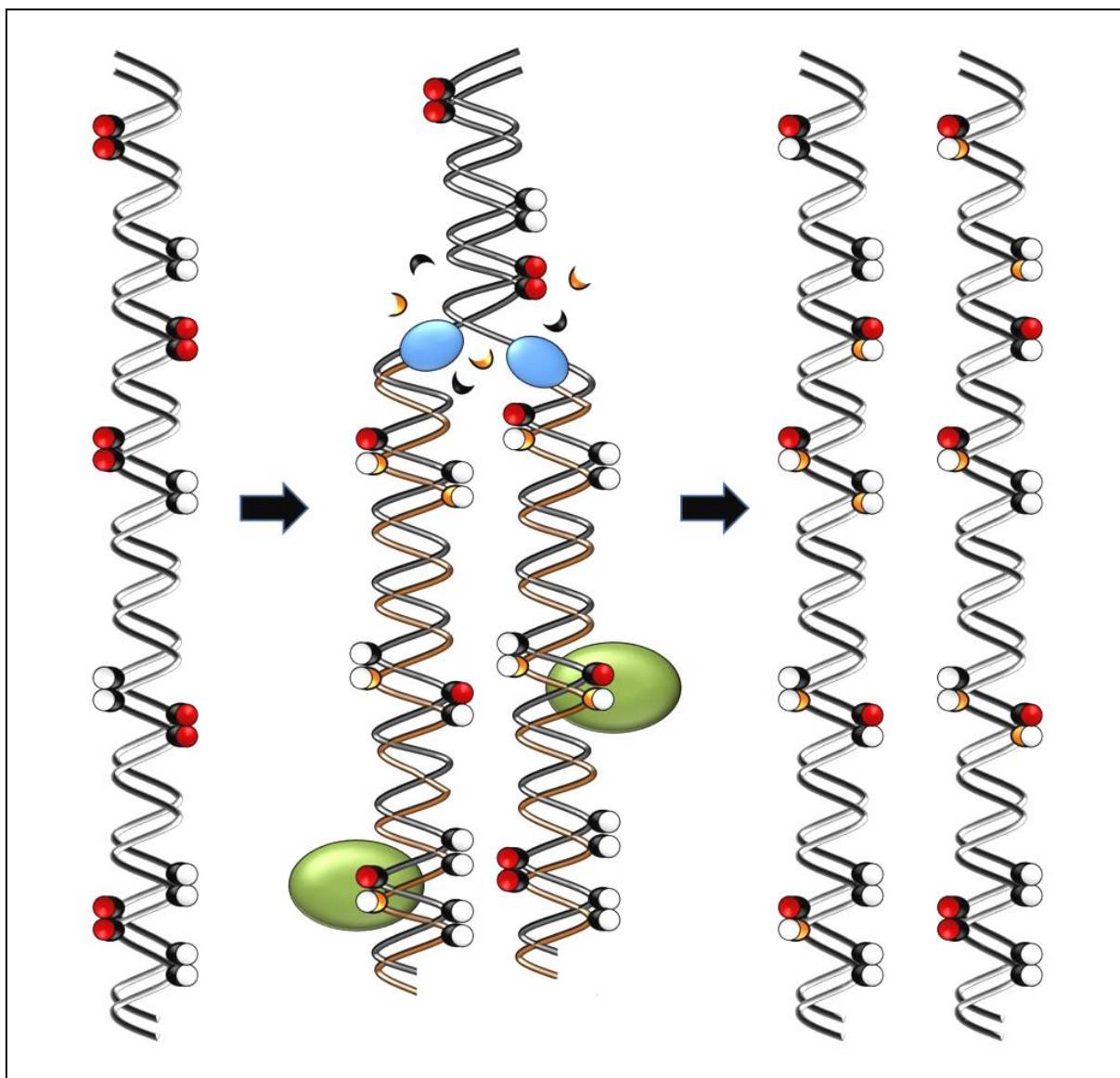


Slika 10. Enzimaska reakcija prijenosa metilne skupine na citozin.

Navedeno je samo lokalni demetilacijski učinak 5azaC-a. Naime, zarobljenu DNMT unutar 5azaC-enzim kompleksa prepoznaje mašinerija popravka DNA. Enzimatskim procesima DNMT biva iščupana iz kompleksa s DNA molekulom i degradirana (86, 87). Neki autori navode da sama DNMT aktivno potiče aktivnost mašinerije popravka DNA (88). Također su opisani reverzibilni dvostruki lomovi molekule DNA, ugradnjom 5azaC analoga 5-aza-2-deoksicitidina (5azaDC), što zasigurno dodatno potiče mobilizaciju mašinerije popravka DNA (89). Neovisno o mehanizmu, potičući razgradnju DNMT, 5azaC dovodi do smanjenja koncentracije DNMT u stanici odnosno do globalnog učinka demetilacije DNA tijekom replikacije. Stari lanac zadržava metilacijske biljege, ali je prijenos metilacijskog obrasca na novosintetizirani lanac poremećen ili potpuno odsutan u dijelovima genoma (Slika 11.).

Opisani su i drugi mehanizmi kojima analozi citozina inhibiraju aktivnost DNMT i metilacije DNA. Na temelju nalaza da laboratorijski izazvane mutacije Cys ostatka nisu smanjile razgradnju DNMT-5azaDC kompleksa, predložena je hipoteza proteosomalne degradacije zarobljene DNMT u G2 ili M fazi

staničnoga ciklusa. Autori su naveli druge regije DNMT osim Cys ostatka kao bitnije u procesu degradacije enzima kao i degradaciju DNMT u stanicama inhibirane sinteze DNA (90, 91).



Slika 11. Nasumična ugradnja analoga citozina u novosintetizirani lanac DNA rezultira različitim novonastalim metilomima stanica kćeri. Lanac DNA (crno), novosintetizirani lanac DNA (smeđe), citozin (crni polumjesec), analog citozina (žuti polumjesec), nemetilirani citozin (crni polumjesec s bijelim krugom), metilirani citozin (crni polumjesec s crvenim krugom), nemetilirani analog citozina (žuti polumjesec s bijelim krugom), DNMT1 (zeleno), DNA replikacijski kompleks (plavo).

Iako je ugradnja 5azaC-a u DNA i posljedični demetilacijski učinak vjerojatno najbolje istražen demetilacijski proces, činjenica je da se izrazito mali postotak 5azaC integrira u molekulu DNA. Dokazano je da se 80-90% 5azaC-a u stanici ugrađuje u molekule RNA (92). Na razini mRNA 5azaC utječe na samu

sintezu i posttranskripcijsku obradu mRNA (93). 5azaC ima sposobnost ugradnje i u tRNA gdje zapravo ima sličan učinak kao i u molekuli DNA. Naime, tRNA tijekom svog života prolazi kroz modifikacije koje joj omogućuju ostvarenje funkcije. Jedna od tih modifikacija je i metilacija. Ugrađeni 5azaC inhibira tRNA-metiltransferazu čime tRNA gubi svojstvo akceptora (93). Neovisno u koji se tip molekule RNA ugradio 5azaC, posljedice ugradnje su izmijenjeni predtranslacijski i translacijski procesi, što dodatno smanjuje ekspresiju pojedinih gena.

1.2.2. Biološki učinci 5-azacitidina

U *in vivo* sustavima, 5azaC je poznat po svom letalnom učinku tijekom embrionalnog razvoja i izrazitoj toksičnosti na odrasle jedinke izložene visokim dozama. Primjerice, pokazano je da doza od 4-5 mg/kg u gravidnoj ženki štakora potiče intrauterinu smrt zametaka primjenom agensa u postimplantacijskom periodu. Primjenom nižih doza zamci preživljavaju u većem broju, ali razvijaju malformacije različitih sustava (94, 95). Teratogeni učinak 5azaC-a dokazan je mnogim istraživanjima u kojima je primijenjen u različitim periodima organogeneze. U pravilu svi su eksperimenti opisivali malformacije organskih sustava koji su se u tom periodu gestacije intenzivno razvijali. Prihvaćeno je da se teratogeni učinak 5azaC temelji prvenstveno na poticanju zastoja u rastu i razvoju koji se nakon poroda manifestiraju zastojem rasta i širokom paletom malformacija (95), primjerice udova (96), očiju (mikrooftalmija) i ostalih kraniofacijalnih struktura (97), skeletnog sustava s naglaskom na strukture glave, kralježnice i prsnoga koša (98, 99), te središnjeg živčanog sustava (100). Jedan od najuočljivijih teratogenih učinaka 5azaC-a opisan je na testisu. U fetalnom testisu opisano je smanjenje broja i dezintegracija spermatocita u sjemenim kanalićima. Pronađene su citoplazmatske vakuole, oštećenja bazalne membrane i apoptoza (100). Pored organskog oštećenja testisa čini se da 5azaC ostvaruje negativan učinak i na spolno ponašanje mužjaka. Pokazano je da mužjaci izloženi djelovanju 5azaC-a *in utero* u reproduktivnoj dobi pokazuju drastično smanjenje reproduktivne sposobnosti, ali i smanjenje interesa za spolni čin (101). 5azaC izrazito je toksičan i za muški reproduktivni sustav odrasle jedinke (102, 103). Potiče smanjenje mase testisa, histološke promjene poput multinuklearnih gigantskih stanica, dezorganizacije i apoptoze spermatocita i spermatida s proklizavanjem zametnih stanica u lumen sjemenih kanalića, atrofiju tubula i vakuolizaciju (103). Reproductivna je sposobnost 5azaC-om tretiranih mužjaka također smanjena s porastom preimplantacijskih intrauterinih smrti i razvojem malformacija u njihovih potomaka (104).

Demetilacijski agens 5azaC je desetljećima korišten u *in vitro* sustavima eksperimentalne biologije sa zapanjujućim rezultatima. Nerijetko su rezultati takvih istraživanja bili i kontroverzni te otvarali više pitanja negoli poticali razumijevanje bioloških učinaka 5azaC-a. Primjerice, skupina autora opisala je dediferencijacijske učinke 5azaC-a u embrionalnim matičnim stanicama (105). Druga je pak skupina dvije godine kasnije opisala upravo diferencijacijski učinak 5azaC na embrionalne matične stanice u smjeru kardiomiocita (106). Usprkos istraživanjima koja upozoravaju na 5azaC-om induciranu neoplastičnu

transformaciju diferenciranih staničnih linija (107) i aktivaciju ekspresije gena matičnosti poput *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2 in vitro* (108), u literaturi prevladavaju istraživanja koja opisuju diferencijacijske učinke 5azaC-a. Od mnogih su istraživanja za biomedicinu zasigurno najatraktivniji eksperimenti koji su dokazali indukciju diferencijacije nediferenciranih matičnih stanica (109, 110) te rediferencijacije dediferenciranih ili tumorskih staničnih linija (111-113). Izrazito obećavajuće čini se i svojstvo 5azaC-a da smanji tumorski potencijal neoplastičnih stanica, čak i neovisno o postojanju diferencijacijskog učinka (113). Dakle, 5azaC se danas smatra demetilacijskim agensom koji potiče diferencijaciju tumorskih stanica i smanjuje potencijal tumorskih matičnih stanica. Upravo su ta iznimna svojstva 5azaC-a iskorištena u medicinskoj praksi odnosno terapiji neoplastičnih stanja. Naime, 5azaC je prva epigenetički aktivna tvar translirana u biomedicinu kao epigenetički lijek. Klinička je primjena 5azaC-a potaknula istraživanja primjene postojećih epigenetički aktivnih supstanci u liječenju ostalih posebice solidnih tumora te intenzivan razvoj novih tzv. pametnih epigenetičkih lijekova. Spoj kliničkih i bazičnih istraživanja 5azaC-a imao je iznimno velik utjecaj na razvoj cijele epigenetike i njen prodor u medicinsku praksu. Danas epigenetika, na platformi razumijevanja staničnih procesa i utjecaja okoliša, strelovitom brzinom razvija dijagnostičke i terapijske mogućnosti te kuca na velika vrata onkologije i ostalih medicinskih specijalnosti (7, 28, 114).

1.2.3. 5-azacitidin u terapiji neoplastičnih bolesti

5azaC je u kliničkoj uporabi kao demetilacijski lijek koji potiče reaktivaciju patološki utišanih gena supresora tumora, indukciju ekspresije diferencijacijskih gena s posljedičnom uspostavom diferenciranih staničnih fenotipova, inhibiciju proliferacije i malignog rasta te gubitka tumorskog klonaliteta (115-117). Prvo korištenje 5azaC-a u terapijske svrhe objavljeno je prije desetak godina. U tim ranim fazama kliničkog istraživanja u *National Cancer Institute*, SAD, 5azaC je bio korišten u terapijskom protokolu akutne mijeloidne leukemije (AML) i mijelodisplastičnog sindroma (MDS). Ubrzo se pokazalo da 5azaC pridonosi liječenju MDS-a. Stoga je 2004. godine Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, SAD) odobrila korištenje 5azaC-a u liječenju nekoliko oblika MDS-a, AML-a i kronične mijelomonocitne leukemije (KMML) (78, 118, 119). Lijek je registrirala farmaceutska kompanija Pharmion (Boulder, CO, USA) pod komercijalnim nazivom Vidaza. Europska je komisija 2008. godine Vidazino odobrenje FDA-e prenijela i na Europsku Uniju (EU) po preporuci Europske medicinske agencije. Upravo je iz EU 2010. godine stigla posljednja opširna revizija kliničke primjene 5azaC-a kao protutumorskog lijeka u terapiji MDS-a, AML-a i KMML-a. Usporedbom skupine bolesnika liječene Vidazom i skupine pod konvencionalnom terapijom uočeno je da 5azaC produljuje preživljenje pacijenata, usporava progresiju tumora i potiče obnovu koštane srži pacijenata (119). Samo par mjeseci kasnije objavljeno je istraživanje koje je upozorilo na ograničeni učinak Vidaze, poboljšanje kliničke slike slabijeg intenziteta i kraćeg vremena trajanja od prezentiranih ranije navedenom studijom (120). Kontroverze vezane uz primjenu 5azaC-a kao protutumorskog lijeka nisu potaknute isključivo suprotnim iskustvima u kliničkoj praksi. Iako je u kliničkoj upotrebi već nekoliko

godina, pravi se mehanizam djelovanja Vidaze u tijelu pacijenta samo pretpostavlja. Nije još jasno dokazano jesu li protutumorski učinci 5azaC-a u pacijenata inducirani demetilacijskom aktivnošću i pokretanjem epigenetičkog reprogramiranja ili jednostavnijim citotoksičnim efektom. U prilog potonjeg govore istraživanja globalnog metilacijskog statusa liječenih pacijenata. Određivanjem razina metilacije *LINE-1* dokazan je pad razine globalne metilacije DNA u bolesnika, ali ne u svih s pozitivnim odgovorom na terapiju (121).

Neovisno o otvorenim diskusijama o korisnosti Vidaze u liječenju hematoloških neoplazija intenzivno se istražuje učinak 5azaC-a na ostale neoplastične bolesti, osobito solidne tumore. Najnovije objavljeno istraživanje prve faze kliničkog istraživanja terapijskog potencijala 5azaC-a u pacijenata sa solidnim tumorima opisuje ohrabrujuće rezultate i najavljuje nastavak istraživanja terapijskog potencijala u drugoj fazi kliničkog istraživanja u pacijenata s karcinomima pluća, jajnika, glave i vrata (122).

Mnogo se očekuje od epigenetičke terapije u budućnosti osobito u korištenju 5azaC-a i njegovih analoga poput Decitabina. Ipak, kod promišljanja o korisnosti Vidaze i ostalih demetilacijskih sredstava treba imati na umu da je njihova primjena započela prije svega nekoliko godina i da je njihov mehanizam djelovanja iznimno širok i kompleksan. Stoga očekujemo još mnoga otkrića o učinku 5azaC-a u terapiji malignih bolesti.

1.3. Tumori zametnih stanica

Tumori testisa predstavljaju oko 1% svih novo dijagnosticiranih tumora čovjeka. Ipak, u gotovo svim razvijenim zemljama tumori su testisa najčešće dijagnosticirani tumori u muškaraca u dvadesetim i tridesetim godinama života. Upravo je dobna distribucija pojavnosti kliničke slike tumora testisa u dobnim skupinama između 15-35 godina života specifičnost tumora testisa. Uistinu, testikularni tumori najčešća su neoplazija mladih muškaraca diljem svijeta (123-127) pa tako i u Hrvatskoj.

Zabilježena je značajna varijacija u dobno standardiziranim stopama incidencije, od 12,1/100000 u Norveškoj do manje od 0,3/100000 u afričkim zemljama. Stoga se tumori testisa tradicionalno smatraju tumorima populacija indoeuropskog podrijetla s najčešće najvišim zabilježenim incidencijama u skandinavskim zemljama. Najniže incidencije zabilježene su u afričkim zemljama ali i, iako nešto više, u populaciji afroamerikanaca. Povezanost rizika od tumora testisa s rasom i etničkom pripadnošću uočena je u homogenim populacijama, što nagovještava povezanost tumora testisa s nasljeđem (123, 128, 129). Nadalje, incidencija testikularnih tumora kontinuirano raste od druge polovice 20. stoljeća u gotovo svim industrijaliziranim populacijama, osobito Europe i europskog podrijetla (124, 125). Iako epidemiološki podaci sve više zabrinjavaju biomedicinsku javnost i potiču znanstvena istraživanja u području razotkrivanja faktora rizika i molekularnih osnova razvoja testikularnih tumora, smrtnost od tumora testisa u blagom je, ali kontinuiranom padu u većini razvijenih zemalja (125, 130, 131).

Tablica 1. Klasifikacija tumora testisa prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (132). Skupina tumora za koje se smatra da vuku zajedničko podrijetlo iz zametnih stanica , lezija za koju se smatra da prethodi ostalim oblicima tumora ove skupine , seminomska skupina , neseminomska skupina u koju spada i teratokarcinom , ostali tumori testisa za koje se smatra da ne vuku podrijetlo iz zametnih stanica .

1. Tumori zametnih stanica (engl. <i>germ cell tumours</i> , GCT)
• Intratubularna neoplazija zametnih stanica, neklasificirani tip (IGCNU)
• Seminom (uključujući slučajeve sa sinciotrofoblastičnim stanicama)
• Spermatocitni seminom
• Embrionalni karcinom
• Tumor žumanjčane vreće
• Koriokarcinom
• Teratom
• Tumor s više od jednog histološkog tipa
2. Tumori zametnog tračka / stromalni tumori gonada
• Tumor Leydigovih stanica
• Zloćudni tumor Leydigovih stanica
• Tumor Sertolijevih stanica
• Zloćudni tumor Sertolijevih stanica
• Tumor granuloznih stanica
• Tekom
• Drugi tumor zametnog tračka / stromalni tumori gonada (gonadoblastom)
3. Miješani nespecificirani stromalni tumori
• Epitelni tumor ovarija
• Tumor sabirnih cijevi i rete testis
• Tumor nespecifične strome

Ove smo godine objavili studiju u kojoj smo iznijeli sustavno obrađene epidemiološke trendove incidencije i mortaliteta tumora testisa u populaciji Republike Hrvatske. Prema objavljenim podacima i u Republici Hrvatskoj u proteklih 25 godina tumori testisa obuhvaćaju oko 1% novodijagnosticiranih tumora muške populacije. Čak 90% registriranih tumora testisa zabilježeno je u muškaraca između 15-54 godina života. Stopa incidencije u hrvatskoj muškoj populaciji iznosi 7/100000 što odgovara prosječnoj

stopi zabilježenoj na europskom kontinentu. Ono što zabrinjava je porast stope incidencije. Naime dok pojedine razvijene zemlje prijavljuju usporavanje ili čak zaustavljanje trenda porasta stope incidencije tijekom zadnja dva desetljeća, stopa incidencije u Republici Hrvatskoj u generacijama rođenima od sredine 1930-ih godina do danas kontinuirano raste bez točke promijene trenda rasta. Otkriveni porast iznosi 7% godišnje i predstavlja najviši porast stope ikad opisan u Europi i većini zemalja svijeta za koje su podaci dostupni. Ohrabruju podaci mortaliteta koji bilježe statistički neznatčan porast od 1,6% tijekom prikazana perioda (133).

Iako se provode intenzivna istraživanja faktora rizika, etiologija i biološki mehanizmi razvoja tumora testisa još su uvijek nerazjašnjeni. Među mnogim postuliranim faktorima rizika ističe se kriptorhizam (134). U nespuštena testisa vjerojatnost razvoja neoplazije je 30-50 puta veća nego u fiziološki pozicionirana organa. Povezanost je pronađena s izloženosti majke različitim faktorima okoliša u prenatalnom i perinatalnom razdoblju poput izloženosti povišenim razinama estrogena i njegovih analoga poput dietilstilbestrola (134). Povezanost je pronađena i s, primjerice, hipospadijom, ingvinalnom hernijom, testikularnim traumama i izloženosti pesticidima (134, 135). Valja napomenuti da dosad povezani faktori predstavljaju faktore rizika niske vrijednosti budući da asocijacije ne dokazuju uzročnu povezanost s kancerogenezom.

Usprkos porastu broja znanstvenih radova koji pokušavaju rasvijetliti čimbenike rizika i mehanizme nastanka tumora testisa, do danas nije predstavljena hipoteza razvoja tumora testisa koja bi obuhvatila i objasnila sve elemente neoplastične transformacije stanica testisa. Istraživanje tumora testisa značajno komplicira njihova izrazita heterogenost. (Tablica 1.). Pojednostavljeno, patohistološka klasifikacija tumora testisa razlikuje skupinu stromalnih tumora, kojoj pripada oko 2% novodijagnosticiranih tumora testisa, te skupinu tumora zametnih stanica testisa (engl. *testicular germ cell tumours*, TGCTs) koja čini i do 98% novodijagnosticiranih tumora testisa (127, 129, 136). Skupina se testikularnih tumora zametnih stanica dalje dijeli, ali čak 98% TGCT pripada ili skupini seminoma ili skupini neseminoma koji u rijetko kojoj zemlji prevagnu u učestalosti jedan nad drugim (129). Dakle, možemo reći da s iznimnim postotkom u skupini tumora testisa prevladavaju seminomi i neseminomi (Tablica 1.). Sukladno prevazi u epidemiološkim podacima, većina je istraživanja tumora testisa fokusirana na TGCT ili upravo seminome i neseminome.

Za seminome se smatra da pripadaju liniji zametnih stanica, a neseminomi liniji embrionalnih matičnih stanica (engl. *embryonal stem cells*, ES cells) (23). Neseminomi se dalje klasificiraju prema diferencijacijskim značajkama tumorskih stanica (Tablica 1.). Kao međusobni kontrapunkti, svakako su zanimljivi embrionalni karcinom i teratom. Embrionalni je karcinom građen od izrazito nediferenciranih stanica za koje se smatra da su maligna varijanta ES stanica. Stanice embrionalnog karcinoma (engl. *embryonal carcinoma cells*, EC cells) smatraju se pluripotentnima i dokazano mogu potaknuti razvoj mnogih staničnih tipova različitog stupnja diferenciranosti (135). Budući da EC stanice svojom pluripotentnošću imitiraju pluripotentnost ES stanica, stanica embrioblasta, iz kojih se razvija čitav zametak, uspostavljene su

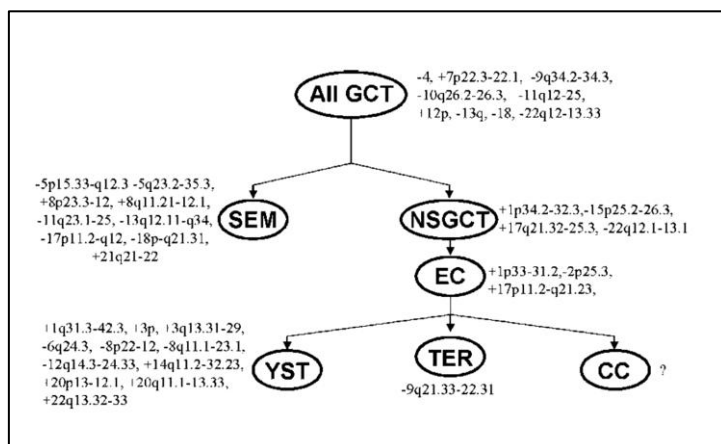
stanične EC linije koje su se dugo upotrebljavale kao pandan ES stanicama u *in vitro* istraživanjima potentnosti, diferencijacije i razvoja zametka (137). Kada su uspostavljene linije ES stanica, bliskost ES i EC stanica potvrđena je i suvremenim metodama molekularne biologije (138). Teratom je građen prvenstveno od somatskih stanica određenog stupnja diferenciranosti (139). Tkiva pronađena u teratomu predstavljaju neorganiziranu mješavinu derivata svih triju zametnih listića (ektoderma, mezoderma i endoderma) poput epidermalnog, moždanog, mišićnog, koštanog, hrskavičnog i žljezdanog tkiva (135). Opisane su i organotipične strukture u teratomu koje oponašaju histološku arhitekturu struktura poput zuba i članaka prstiju (135).

Iako je embrionalni karcinom primjer nediferenciranog, a teratom diferenciranog TGCT, oba tumora mogu koegzistirati u jedinstvenoj tumorskoj formi, teratokarcinomu. Teratokarcinom je najčešće dijagnosticiran TGCT s dva ili više histološka tipa (136) te prema definiciji objedinjuje diferenciranu komponentu teratoma i nediferenciranu embrionalnog karcinoma. Somatska teratomska komponenta građena je od derivata triju zametnih listića različitog stupnja diferencijacije. Pored mišićnog, oroženi i neoroženi pločasti epitel, te neuralno i žljezdano tkivo najzastupljenija su tkiva. Osnovu malignosti teratokarcinoma čine elementi embrionalnog karcinoma kojeg u teratokarcinomu karakteriziraju gnijezda nediferenciranih pluripotentnih matičnih EC stanica. Diferencirani derivati EC stanica gube svojstvo malignosti i postaju sastavni dio diferencirane teratomske komponente (140). Upravo navedena svojstva čine teratokarcinom jedinim poznatim pluripotentnim solidnim tumorom s elementima somatske diferencijacije odnosno paradigmatiskim primjerom tumora matičnih stanica (23, 141).

1.3.1. Genetika i epigenetika tumora zametnih stanica testisa

Usprkos intenzivnom istraživanju biologije i tumorigeneze TGCT-a, točan mehanizam nastajanja TGCT-a, pa tako i teratokarcinoma, ostaje nerazjašnjen. Poznato je da većina ljudskih teratokarcinoma pokazuje kromosomske aberacije hipotriploidnog tipa, u skladu s ostalim neseminomima (142). Opisane su mnoge aberacije (143) za koje je komparativnom genomskom hibridizacijom ustanovljeno da nisu posljedica selekcije određenog specifičnog subklona. Na temelju navedenog, pretpostavljeno je da kromosomske aberacije zahvaćaju (proto) onkogene ili gene supresore tumora što bi poticalo razvoj TGCT-a. Jedina konzistentna od mnogih opisanih aberacija čini se da je dobitak regije 12p (144, 145). Predloženo je da bi amplifikacija genske nakupine 12p13.31, koji uključuje gene matičnosti *NANOG* i *STELLA*, mogla pridonijeti proliferativnosti i uspostavi fenotipa tumorskih matičnih stanica (146). Iako su kromosomske aberacije neosporan element kancerogeneze TGCT-a te su prema njima izrađeni i modeli molekularne evolucije TGCT-a (Slika 12.), mnogi znanstvenici osporavaju veliki značaj kromosomskih aberacija u samoj indukciji kancerogeneze TGCT-a, a i ostalih humanih tumora. Mnogi ih znanstvenici smatraju manifestacijom progresije tumora odnosno sekundarnim promjenama genoma nastalih tijekom razvoja tumora (141). U prilog ovoj hipotezi idu rezultati istraživanja u kojima su dodatni 12p fragmenti

pronađeni u razvijenim stadijima TGCT-a, ali su gotovo uvijek odsutni u ranom stadiju *carcinoma in situ* (147). Sve je više istraživanja koja povezuju poremećaje metilacije DNA i indukcije mutacija DNA. Prema jednoj od postavljenih hipoteza mutacije DNA i kromosomske aberacije posljedice su hipermetilacije gena koji kodiraju za proteine popravka DNA (148). Dakle, u tumorigenezi se primarnom lezijom smatra poremećena metilacija DNA koja propagira daljnja oštećenja odnosno razvoj ireverzibilnih mutacija DNA i eventualno kromosomskih aberacija čestih u neoplastičnim stanicama.

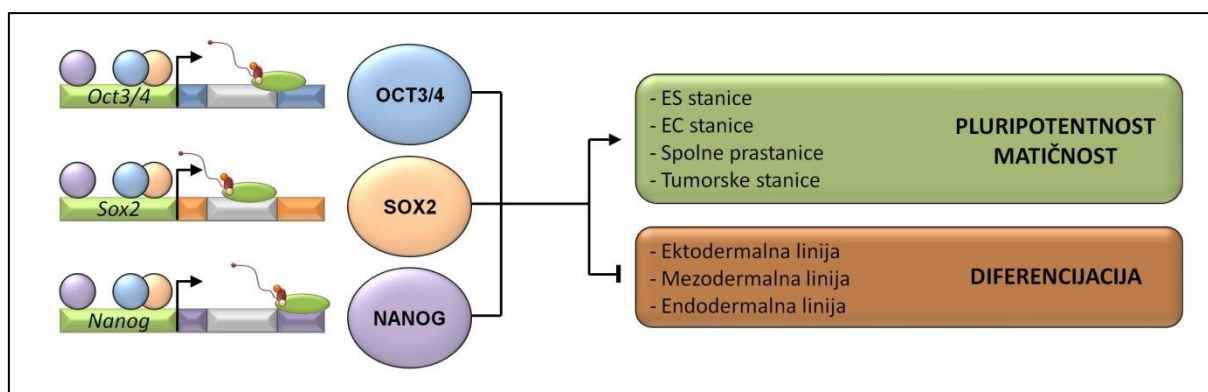


Slika 12. Model razvoja TGCT temeljen na rezultatima dobivenima tehnologijom mikropostroja (143). seminom (SEM), neseminomski tumori testisa zametnih stanica (NSGCT), embrionalni karcinom (EC), tumor žumanjčane vreće (YST), teratom (TER), koriokarcinom (CC).

Upravo zbog navedenih i sličnih opažanja, u posljednjem se desetljeću kao potencijalni induktor tumorigeneze TGCT naglašavaju poremećaji epigenetike, osobito promjene metilacije DNA. Naime, dokazana je izrazita hipermetilacija promotora gena supresora tumora poput *BRCA1*, *RASSF1A*, *APC*, *HIC1* u oba ili jednom teratokarcinomskom elementu (149). Nadalje, u istraživanjima humanih TGCT-a otkrivena je hipermetilacija gena povezanih s tkivom testisa poput gena *SCGB3A1* koji kodira za Sekretoglobulin i *PRSS21* koji kodira za Testisin (150, 151). U teratokarcinomima je dokazana hipermetilacija i gena supresora tumora *RASSF1A* koji je dokazano hipermetilirani u mnogim humanim karcinomima (152). Zbog tumorigenog potencijala, hipermetilacija gena *RASSF1A* je svojedobno predložena kao rana lezija razvoja TGCT-a (153). Značajan stupanj hipermetilacije DNA pronađen je i u promotorskoj regiji gena *MGMT* koji kodira za enzim uključen u mašineriju popravka DNA. Upravo je taj nalaz izrazito indikativan i podržava trend preispitivanja uključenosti kromosomskih aberacija u indukciji razvoja TGCT-a (151). Geni *HOXA9* i *HOXA5* hipermetilirani su u diferenciranoj teratomskoj dok je *CDH13* pokazao laganu metilaciju u embrionalno karcinomskoj komponenti teratokarcinoma (151).

Posljednjih godina intenzivno se istražuje i hipometilacija gena *OCT3/4*, *SOX2* i *NANOG*. Naime, fenotip matičnosti EC stanica, ali i ES stanica, uvjetovan je ekspresijom mreže transkripcijskih faktora

(TF) u kojoj ključnu ulogu imaju upravo navedeni geni. OCT3/4, SOX2 i NANOG proteinski su produkti gena jezgre matičnosti (engl. *core transcription factors of stem cells*) i predstavljaju ključne transkripcijske čimbenike matičnih stanica (Slika 13.). Pozitivno reguliraju vlastitu transkripciju i transkripciju ostalih gena jezgre matičnosti (154). Potiču samoobnovu, proliferaciju te inhibiraju diferencijaciju stanica (154, 155). Transfekcijom inducirana hiperekspresija gena *OCT3/4* u diferenciranim stanicama aktivirala je i ekspresiju gena *SOX2* i *NANOG*. Reekspresija gena matičnosti potaknula je promjenu fenotipa diferenciranih stanica u smjeru pluripotentnosti. Zbog mogućnosti aktivacije jezgre matičnosti, gen *OCT3/4* se često naziva i nadzornikom pluripotentnosti (156). U teratokarcinomima je dokazana hipermetilacija gena *OCT3/4* u diferenciranoj teratomskej komponenti dok je u nediferenciranim mikrodisektiranim embrionalnim karcinomima opisana hipometilacija promotora (157). Iako sami autori diskutiraju protiv hipoteze u kojoj bi poremećaj metilacije gena *OCT3/4* bio vodeći onkogeni induktor TGCT-a, prikazani su rezultati sukladni nalazima povišene ekspresije gena *OCT3/4* u TGCT-u (158). Protein OCT3/4 danas je prihvaćen kao najinformativniji biljeg u dijagnostici TGCT-a budući da njegova povišena ekspresija otkriva prisutnost frakcije matičnih stanica u teratokarcinomu (159). Osim što se geni *OCT3/4*, *NANOG* i *SOX2* međusobno reguliraju po principu pozitivne povratne sprege, više od 90% promotorskih regija za koje *OCT3/4* pokazuje afinitet sadrži vezna mjesta i za *NANOG* odnosno *SOX2*. U nediferenciranim ES stanicama dosad je ukupno opisano 353 gena reguliranih simultanim vezivanjem proteinskih produkata gena jezgre matičnosti. Udružena hipometilacija promotora gena jezgre matičnosti koja pokreće navedenu regulacijsku mrežu održava potentnost matičnih stanica tijekom razvoja, ali može inducirati i reverziju diferenciranih u matične karcinomske stanice (160, 161). Stoga ne čudi da su jednaki metilacijski obrasci i posljedične promjene ekspresije pronađeni istraživanjima ostalih gena jezgre matičnosti *NANOG* i *SOX2*. Oba naime pokazuju hipometilaciju promotora u komponenti embrionalnog karcinoma te hipermetilaciju u diferenciranoj teratomskej komponenti (158, 162).

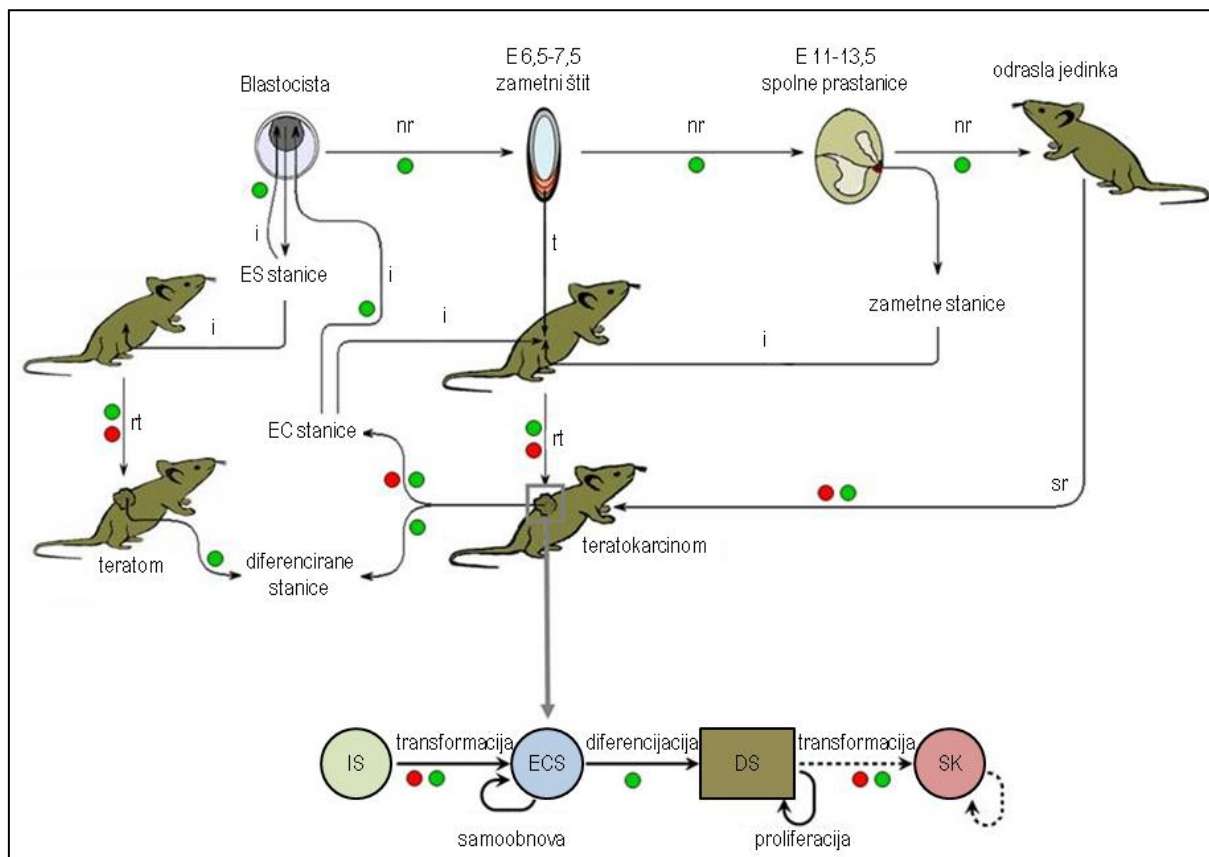


Slika 13. Geni *Oct3/4*, *Sox2* i *Nanog* međusobno reguliraju svoju ekspresiju i tvore jezgru gena matičnosti koja nadalje regulira gotovo 2000 gena uključenih u određivanje staničnog fenotipa.

1.3.2. Eksperimentalni teratokarcinom u miša

Iako u posljednjem desetljeću svjedočimo iznimnom napretku u otkrivanju epigenetičkih mutacija tumora testisa, smislen algoritam molekularnih lezija tijekom neoplastične transformacije stanica u TGCT još uvijek nije predstavljen. Većina poznatih lezija opisana je na humanom tumorskom materijalu i staničnim linijama. Iako su ta istraživanja obnovila zanimanje znanosti za razvoj TGCT-a i postavila suvremene smjernice u patogenezi tumora testisa, ograničena su budući da ne mogu obuhvatiti i reproducirati molekularne poremećaje indukcije i progresije tumora u vremenu. Stoga istraživači u ovom području postaju svjesni da su za formiranje cjelovite slike razvoja tumora testisa potrebni animalni modeli koji u kontroliranim uvjetima mogu objasniti induksijske i progresijske poremećaje i mehanizme tijekom neoplastične transformacije spolnih prastanica u tumore zametnih stanica testisa. Iz navedenog proizlazi iznimna vrijednost eksperimentalnog modela postavljenog na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Solter, Škreb i Damjanov su 1970. godine transplantacijom zametnog štita zametka miša u stadiju gastrulacije pod čahuru bubrega singenične životinje postigli razvoj retransplantabilnog teratokarcinoma (163). Tumor istih karakteristika dobiven je i transplantacijom zametka pod čahuru testisa no s daleko manjim uspjehom formiranja teratokarcinomskog tkiva. Sukladno Pierceovoj hipotezi kako svi tumori podsjećaju na karikaturu tkiva od kojeg potječu (164), eksperimentalni je mišji teratokarcinom, kao uostalom i primarni humani, uistinu karikatura samog embrija koji se razvija u krivo vrijeme na krivom mjestu. Eksperimentalni teratokarcinom miša građen je od dobro diferenciranih tkiva teratomske komponente te nediferenciranih stanica embrionalnog karcinoma. EC stanice smatramo karcinomskim matičnim stanicama teratokarcinoma (140, 163). Ranije navedena sličnost embrionalnih matičnih (ES) stanica i embrionalnih karcinomskih (EC) matičnih stanica samo je djelomično potvrđena i ovim animalnim modelom. Naime eksperimentalni teratokarcinom miša nastaje iz embrionalnih pluripotentnih stanica te i sam sadrži pluripotentne EC matične stanice koje su dugi niz godina bile platforma za istraživanje ES stanica. Ipak, transplantacijom ES stanica dobiva se diferencirani teratom bez malignog potencijala karakterističnog za teratokarcinom (165). Navedeno dokazuje iznimnu osjetljivost ovog modela na fenotipske karakteristike odnosno epigenom ishodišnih stanica. Izolacijom malignih matičnih EC stanica iz eksperimentalnog teratokarcinoma i njihovom naknadnom injekcijom u embrioblast singenične blastociste, EC stanice inhibiraju svoj maligni potencijal i postaju dobroćudne. Reprogramirane EC stanice sudjeluju u normalnom razvoju zametka do vijabilne kimerne jedinice (166). Stanična plastičnost, temeljena na činjenici da ES stanice mogu biti platforma za razvoj diferenciranog tumora u diferenciranom tkivu dočim tumorske EC matične stanice u blastocisti mogu aktivno doprinijeti fiziološkom embrionalnom razvoju, ukazuje na iznimnu dinamiku i potencijal epigenetičkih modifikacija i reorganizaciju epigenoma na stimulanse iz staničnog okoliša. Eksperimentalni teratokarcinom miša s ostalim klasičnim eksperimentima nameće epigenetiku i epimutacije kao primarne induktivne čimbenike razvoja teratokarcinoma i ostalih tumora zametnih stanica (Slika 14.). Eksperimentalni teratokarcinom miša dobro je poznat i konzistentan

animalni model za otkrivanje i praćenje induktivnih epigenetičkih lezija tijekom razvoja tumora zametnih stanica.



Slika 14. Klasični biološki eksperimenti koji ukazuju na epigenetičku osnovu razvoja tumora zametnih stanica. Klasični eksperimenti i biološki putovi koji se mogu objasniti na osnovi epigenetičkih procesa (●), klasični eksperimenti i biološki putovi koji se mogu objasniti na osnovi genetskih mutacija i kromosomskih aberacija (●), stanice karcinoma podrijetlom iz neoplastičko transformiranih somatskih stanica (SK), diferencirane stanice (DS), stanice embrionalnog karcinoma (ECS), embrionalne matične stanice (ES), injekcija (i), transplantacija (t), retransplantacija (rt), normalan razvoj (nr), spontani razvoj (sr), razvoj tumora (rt), ishodišna stanica (IS).

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Obrazac metilacije DNA ključan je za razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma u miša pa 5-azacitidin sprječava razvoj tumora iz zametka i smanjuje rast već razvijenog teratokarcinoma.

2.2. Cilj istraživanja

Opći cilj istraživanja je ustanoviti ulogu metilacije DNA i učinak 5-azacitidina na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma u miša.

Specifični ciljevi:

1. Suvremenim molekularnim metodama ispitati udio teratokarcinoma odnosno teratoma koji se razvijaju ektopičnom transplantacijom zametka miša u stadiju gastrulacije pod čahuru bubrega.
2. Ispitati učinak spola zametka na njegov tumorigeni potencijal.
3. Odrediti rast eksperimentalnog teratokarcinoma i proliferacijski potencijal tijekom osmotjednog razvoja.
4. Odrediti važnost ekspresije gena matičnosti pomoću esiNanog i esiOct3/4 u razvoju zametka *in vitro*.
5. Odrediti razinu metilacije promotorskih regija gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2* te gena *Scgb3a1*, *Prss21*, *Stat3*, *Brca1*, *Mgmt*, *c-Myc*, *Trrap* i *Rassf1* u zametku i tumorima tijekom cijelog perioda razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša te u kontrolnim tkivima testisa i jetre.
6. Odrediti razinu globalne metilacije DNA analizom metilacije repetitivnih sekvenci *Mml*, *Mmetnltr* i *B1* u zametku i tumorima tijekom cijelog perioda razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša te u kontrolnim tkivima testisa i jetre.
7. Odrediti utjecaj 5-azacitidina primijenjenog neposredno nakon transplantacije zametka na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma miša.
8. Odrediti utjecaj 5-azacitidina na daljnji razvoj dva tjedna i četiri tjedna starog eksperimentalnog teratokarcinoma miša.

9. Odrediti razinu metilacije promotorskih regija gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2* te gena *Scgb3a1*, *Prss21*, *Stat3*, *Brca1*, *Mgmt*, *c-Myc*, *Trrap* i *Rassf1* u zametku i tumorima tijekom cijelog perioda razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša te u kontrolnim tkivima testisa i jetre pod utjecajem 5-azacitidina.
10. Odrediti razinu globalne metilacije DNA analizom metilacije repetitivnih sekvenci *Mml*, *Mmetnltr* i *B1* u zametku i tumorima tijekom cijelog perioda razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša te u kontrolnim tkivima testisa i jetre pod utjecajem 5-azacitidina.
11. Odrediti ekspresiju gena *Oct3/4* i *Nanog* u eksperimentalnom teratokarcinomu miša tretiranog 5-azacitidinom.
12. Ustanoviti razinu biljega oksidacijskog stresa i upale u eksperimentalnom teratokarcinomu miša tretiranog 5-azacitidinom.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo je istraživanje izvršeno na eksperimentalnom teratokarcinomu miša soja C3H dobivenog ektopičnom transplantacijom zametnoga štita zametka u stadiju gastrulacije. Ispitivan je učinak demetilacijskog agensa 5azaC-a na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma tretiranjem životinja nakon transplantacije. Fiziološki razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma i učinci 5azaC-a istraženi su analizom tumorskoga tkiva histološkim, biokemijskim i molekularnim metodama. Dobiveni rezultati obrađeni su statističkim metodama kako bi se identificirali značajni metilacijski reprogrami tijekom razvoja teratokarcinoma, te kako je na njih utjecao 5azaC.

3.1. Eksperimentalni teratokarcinom *in vivo*

Eksperimentalni teratokarcinom miša dobiva se transplantacijom zametka miša u fazi gastrulacije pod bubrežnu čahuru odraslog miša.

U eksperimentima su korišteni laboratorijski miševi soja C3H u dobi od 3 mjeseca uzgojeni na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ukupno je korišteno 305 miševa (Tablica 12.). Svi eksperimenti su provedeni uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta i Ministarstva poljoprivrede.

3.1.1. Izolacija zametaka

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. 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 aseptičnim uvjetima pod binokularnom lupom. Urarskim pincetama otvoren je uterus i izolirani su deciduomi. 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 zdjelicu s čistim PBS-om. Nadalje, zametak je prerezan wolframovim iglicama na razini amniona čime je odvojen ekstraembrionalni dio od zametnog štita. Zametni su štitovi pomoću *braking* pipete prebačeni u zdjelicu s čistim PBS-om. Određeni broj zametnih štitova pohranjen je bez dodavanja krio-prezervativa u krio-tubice u tekući dušik za potrebe daljnjih analiza.

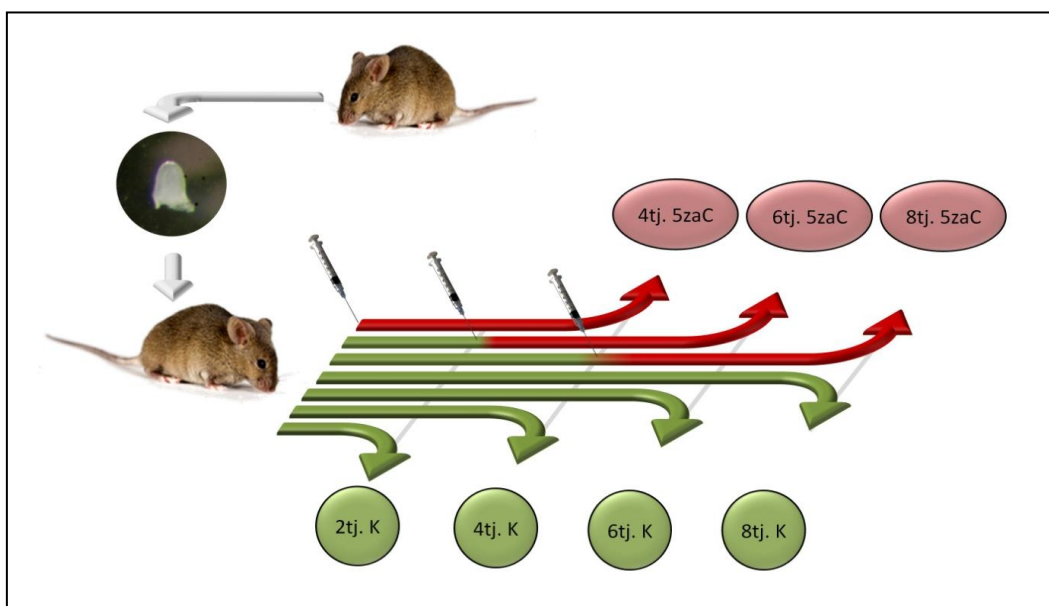
U ovom istraživanju upotrijebljen je zametni štit, no u daljnjem se tekstu koristi riječ zametak.

3.1.2. Transplantacija zametaka pod čahuru bubrega

Odrasli su mužjaci uvedeni u anesteziju jednokratnom intraperitonealnom injekcijom kombinacije injekcionih otopina Xylapan (sedativno, miorelaksativno i analgetsko djelovanje, 4 mg/kg) i Narketan 10 (narkotik, 5 mg/kg). U radu s anesteziranim životinjama, predoperativno i postoperativno, korišten je zagrijani jastuk radi sprječavanja gubitka tjelesne temperature te zaštita očiju od dehidracije rožnice premazivanjem kloramfenikol masti. Daljnji postupak transplantacije izveden je u aseptičnim uvjetima pod binokularnom lupom. U desnom lumbalnom području, škarama je napravljena incizija kože duljine 0,5-0,7 cm paralelna s kralježnicom. Drugom okomitom incizijom jednake duljine otvorena je bubrežna loža. Vrh pincete podvučen je pod bubreg u području hilusa te je bubreg atraumatski fiksiran izvan lože. Skalpelom je incizirana čahura bubrega u duljini 3 mm. Vrh urarske pincete podvučen je pod čahuru bubrega kako bi se stvorio džep. Prethodno izoliran gore navedenom metodom, zametak je *braking* pipetom postavljen u džep ispod čahure bubrega. Nakon provjere uspješnosti postupka transplantacije nalazom zametka u džepu ispod bubrežne čahure, bubreg je otpušten od fiksacije te se samostalno reponira. Kožna je rana zatvorena Michel kopčom. Anestezirane životinje su postoperativno položene na zagrijani jastuk. Prema ovom protokolu nije potrebna dodatna specifična postoperativna njega. Životinje su nakon buđenja iz anestezije nasumično raspoređene u pokusne skupine.

3.1.3. Eksperimentalni dizajn i tretiranje životinja 5-azacitidinom

Nakon što su životinje nasumično raspoređene u pokusne skupine, započeo je period tretiranja životinja prema eksperimentalnom dizajnu (Slika 15., Tablica 2.).



Slika 15. Eksperimentalni dizajn.

Eksperimentalna skupina tretirana je dva puta tjedno kroz 4 tjedna i.p. injekcijom 5azaC-a (5 mg/kg) otopljenog u 0,5 mL izotonične otopine NaCl-a (0,9%, Braun, otopina za infuziju) po životinji. Kontrolna skupina tretirana je isključivo izotoničnom otopinom NaCl-a, po identičnom protokolu odgovarajuće eksperimentalne skupine. Početak tretmana pojedine skupine definiran je eksperimentalnim dizajnom (Tablica 2.). Tri dana po dovršetku perioda tretiranja, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom te je uslijedila inspekcija bubrežne lože, izolacija tumora, jetre i testisa. Tumorima i testisima izmjerene su mase na analitičkoj vagi. Sva izolirana tkiva pohranjena su bez upotrebe krio-prezervativa u krio-tubicama u tekući dušik do daljnje obrade.

Tablica 2. Pokusne skupine i njihove oznake, početak, način i trajanje tretmana pojedinih skupina. Kontrolna skupina (K), skupina životinja tretiranih 5azaC-om (5azaC).

SKUPINA	OZNAKA POKUSNE SKUPINE	TRETMAN	POČETAK TRETMANA [tjedan nakon transplantacije]	TRAJANJE TRETMANA [tjedan]	TRAJANJE POKUSA [tjedan]
1.	2tj. K	Fiziološka otopina	0	2	2
2.	4tj. K	Fiziološka otopina	0	4	4
3.	4tj. 5azaC	5-azacitidin	0	4	4
4.	6tj. K	Fiziološka otopina	2	4	6
5.	6tj. 5azaC	5-azacitidin	2	4	6
6.	8tj. K	Fiziološka otopina	4	4	8
7.	8tj. 5azaC	5-azacitidin	4	4	8

3.1.4. Determinacija spola eksperimentalnog teratokarcinoma

Za određivanje spola tumorskog tkiva korišten je brzi protokol determinacije spola multipleks PCR metodom (167). Budući da multipleks protokol sadrži unutarnju kontrolu efikasnosti nije potrebno određivati koncentraciju DNA uzorka koja ulazi u PCR reakciju. U PCR reakciji umnažaju se fragment *Sry* gena, specifičnog za muški spol, i fragment autosomalnog *I/3* gena u istoj PCR tubici prema sljedećem protokolu: DNA pojedinog uzorka tumora, kontrolnog uzorka testisa i kontrolnog uzorka jetre ženke, u volumenu od 2 μ L koristi se u ukupnom volumenu pojedine reakcije od 50 μ L. PCR otopina sadrži 0,2 μ L GoTaq polimerazu (5 U/ μ L, Invitrogen) otopljenu u PCR puferu dostavljenog od proizvođača, 0,2 mM pojedinog dNTPa (10 mM, Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen), 0,2 mM početnica za gen *Sry* i 0,12 mM početnica za gen *I/3*. Korišten je Biorad PVR stroj s navedenim programom: početna

denaturacija na 95°C u trajanju od 4,5 min, umnažanje u 33 ciklusa pod uvjetima 95°C 35 sek - 51,8°C 60 sek - 72°C 60 sek, te završno produljivanje na 72°C u trajanju od 60 sek.

PCR produkti analizirani su elektroforezom na 3% agaroznom gelu koji sadrži 0,2 µg/mL etidijum bromida. U prvu jažicu gela stavljeno je 3 µL biljega (TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), a u ostale uzorci PCR produkata. Elektroforeza je provedena u 1xTAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA) u električnom polju jakosti 90 V u trajanju od 20 min, nakon čega je jačina polja podignuta na 120 V sljedećih 60 min. Po dovršetku elektroforeze, agarozni je gel analiziran na UV transiluminatoru i snimljen kamerom.

3.2. Eksperimentalni teratom miša *in vitro*

Izolirani zameci stari 7,5 dana kultivirani su u sterilnim uvjetima modificiranom metodom kultivacije organa prema Škrebu (168). Tijekom kultivacije stanice zametka proliferiraju i doživljavaju određeni stupanj diferencijacije u derivate svih triju zametnih listića.

3.2.1. Kultiviranje zametaka *in vitro*

Za kultiviranje zametaka *in vitro* upotrijebljene su jednokratne sterilne plastične Petrijeve zdjelice za kulturu organa (Falcon 3037) promjera 60x15 mm sa zdencom u sredini. U udubinu zdenca postavljen je nazubljeni čelični prsten na koji je položena čelična mrežica trokutastog oblika. Mrežica je čeličnim prstenom odignuta 5 mm od dna podloge. Na mrežicu se polaže trokutasti komadić odmašćenog poroznog lećnog papira čiji vrhovi slobodno padaju preko rubova mrežice u medij. U zdenac se ulijeva 250 µL esiRNA-obogaćenog medija čiji je sastav određen niže navedenim eksperimentalnim dizajnom. Na papir se *braking* pipetom polažu 3 zametka. Dan postavljanja zametaka u *in vitro* sustav označava se 0. danom kulture. U prstenastu udubinu oko zdenca ulijeva se sterilna destilirana voda (dH₂O) koja smanjuje isparavanje kultivacijskog medija tijekom kultiviranja. Eksplantati se zatim inkubiraju 7 dana u termostatu na 37°C u atmosferi koja sadrži 5% CO₂ i 95% zraka uz maksimalnu zasićenost vlagom. esiRNA-obogaćen medij zamjenjuje se nakon 24 sata kultiviranja s 250 µL optimalnog medija za kulturu. Tijekom preostalih 6 dana, optimalni se medij zamjenjuje svježim svakih 48 sati. Rast pojedinog eksplantata prati se mjerenjem njegovog većeg (d_v) i manjeg (d_m) promjera pomoću okularnog mikrometra u binokularnoj lupi. Promjeri su mjereni neposredno nakon postavljanja u *in vitro* sustav te svakodnevno tijekom kultiviranja. Nakon 7 dana eksplantati su izolirani. Jedan dio eksplantata iste pokusne skupine zbirno je pohranjen u krio-tubice u tekućem dušiku za potrebe daljih analiza na molekularnoj razini. Određen broj eksplantata podvrgnut je specifičnoj obradi za potrebe histološke analize.

3.2.2. Mediji za kultivaciju

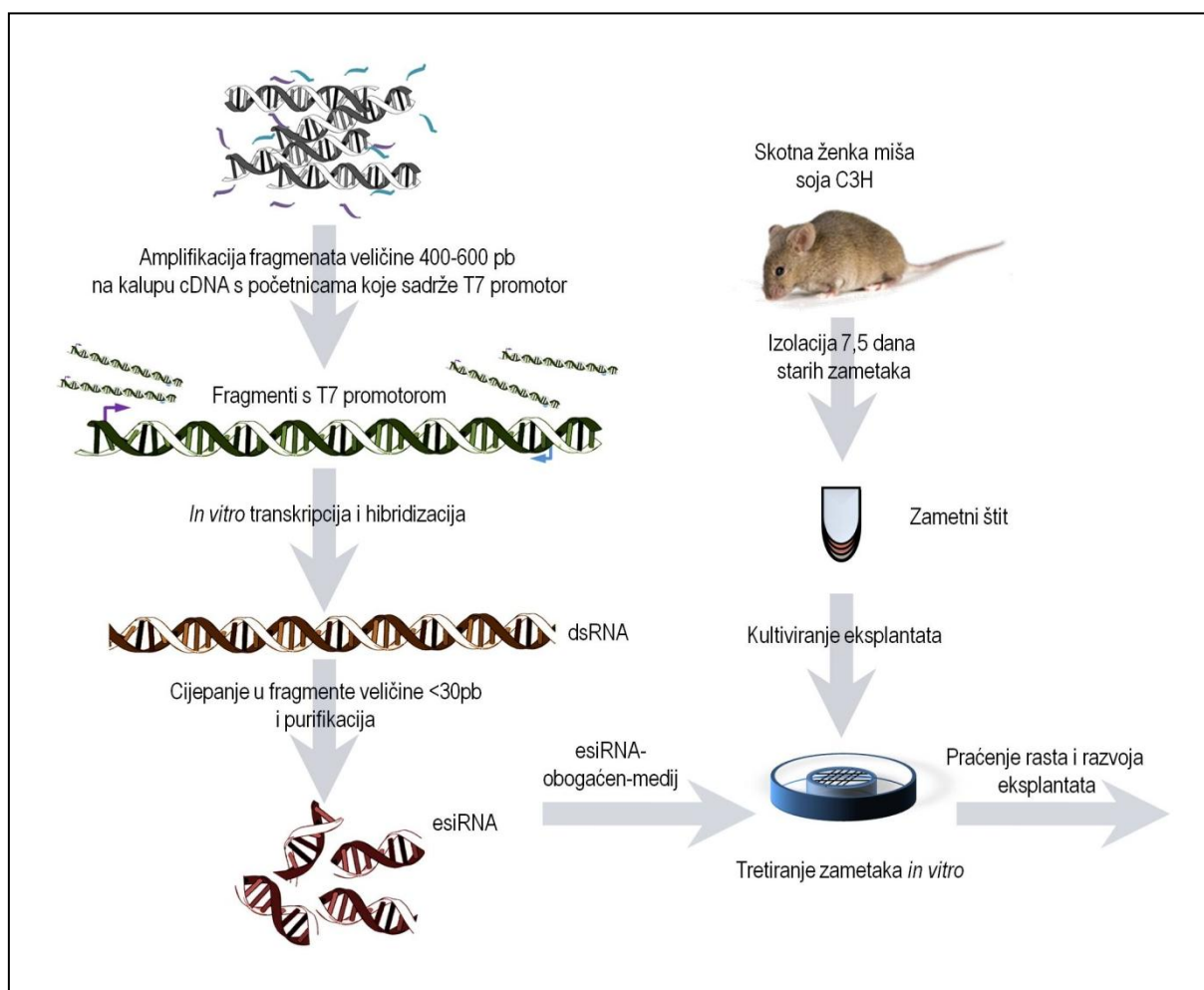
Tijekom kultiviranja eksplantata korištena su dva medija, optimalni medij i esiRNA-obogaćen-medij. Optimalni medij sadrži Eagleov Minimalni esencijalni medij (MEM) i štakorski serum u omjeru 1:1. MEM s Hanksovim solima jest kemijski definirani medij bez bjelancevina, koji sadržava 13 aminokiselina, 8 vitamina, glukozu, penicilin, streptomycin i fenolsko crvenilo (indikator pH), te Hanksove soli koje održavaju konstantan pH. Čuva se na +5°C, a svaka 3 tjedna mu se dodaje L-glutamin u koncentraciji od 29,2 mg/100 mL MEM-a budući da se L-glutamin s vremenom raspada. Štakorski se serum dobiva od 3 mjeseca starih štakorskih mužjaka soja Fisher slijedećim postupkom: Životinja se anestezira inhalacijom para etera. U sterilnim uvjetima otvori se trbušna šupljina, preparira se abdominalna aorta te se iz njene bifurkacije izvadi krv. Krv se odmah centrifugira na 4000 rpm 15 minuta. Nakon centrifugiranja serum se inaktivira zagrijavanjem na 56°C kroz 30 minuta te se sterilizira filtriranjem kroz 0,22 µm Milipore filter, alikvotira i čuva na -20°C.

Tablica 3. Tablica prikazuje koncentracije i volumene otopina za pripremu medija za tretiranje eksplantata *in vitro*.

esiRNA					esiRNA-MEM		L-MEM		esiRNA-MEM	S-MEM		
esiRNA SKUPINA	C esiRNA [ng/ µL]	1 ng=X pmol	C esiRNA [pmol/ µL]	Zadana koncentracija esiRNA za tretiranje [pmol]	V esiRNA [µL]	V MEM [µL]	V Lipofectamine (0,25%/V esiRNA-L-S-MEM) [µL]	V MEM [µL]	V esiRNA-MEM [µL]	V ŠS [µL]	V MEM [µL]	V esiRNA-L-S-MEM [µL]
kontrola	-	-	-	0	0	50,00	0,00	50,00	100,00	125,0	25,0	250,0
esiGfp	109	0,059	6,431	12,5	1,92	48,06	0,63	49,34	100,00	125,0	25,0	250,0
esiTtrap	313	0,059	18,467	12,5	0,68	49,32	0,63	49,34	100,00	125,0	25,0	250,0
esiOct3/4	118	0,059	6,962	12,5	1,80	48,20	0,63	49,34	100,00	125,0	25,0	250,0
esiNanog	126	0,059	7,434	12,5	1,68	48,32	0,63	49,34	100,00	125,0	25,0	250,0

Medij obogaćen s esiRNA koristi se za tretiranje zametaka molekulama esiRNA. Zbog potencijalnog toksičnog efekta ne preporuča se kultiviranje u esiRNA obogaćenom mediju dulje od 24 sata. Osnova esiRNA obogaćenom mediju je optimalni medij u koji se dodaje određena koncentracija esiRNA (Slika 16., Tablica 3.) i transfekcijski agens Lipofectamin 20000 (L2000) (Invitogen, Cat. No. 11668-019) prema sljedećem protokolu: L2000 (0.25%/ukupni volumen po Petrijevoj zdjelici) i svježi sterilni MEM (49,4 µL

po Petrijevoj zdjeli) zamiješaju se u L-MEM otopinu koja se inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. U međuvremenu priprema se esiRNA-MEM otopina. Volumen esiRNA (12,5 pmol) miješa se s MEM-om do ukupnog volumena 50 μ L esiRNA-MEM otopine (Tablica 3.). Otopine L-MEM i esiRNA-MEM moraju se međusobno zamiješati unutar 25 min od pripreme otopine L-MEM. Miješanjem navedenih otopina dobiva se esiRNA-L-MEM (100 μ L po Petrijevoj zdjeli) koji se inkubira 20 min na sobnoj temperaturi uz povremenu laganu trešnju. Prije nasađivanja zametaka na mrežicu, priprema se treća komponenta medija za tretman, S-MEM (150 μ L po Petrijevoj zdjeli), miješanjem MEM-a i svježeg štakorskog seruma u omjeru 5:1. 150 μ L S-MEM-a ulijeva se u zdenac sustava za kultiviranje. Nakon polaganja zametaka na lećni papir dodaje se ogovarajući esiRNA-L-MEM, te se nastavlja s protokolom za kultiviranje eksplantata. Nakon 24 sata esiRNA-L-MEM medij mijenja se optimalnim medijem.



Slika 16. Eksperimentalni dizajn tretiranja zametka s esiRNA *in vitro*.

3.2.3. 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 (169) (Tablica 4.).

EsiRNA molekule sintetizirane su prema opisanom protokolu (170, 171). 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 4.) pod opisanim uvjetima; 5 ciklusa na temperaturi prijanjanja 60°C, 5 ciklusa na temperaturi prijanjanja 62°C i 25 ciklusa na temperaturi prijanjanja 65°C. Sljedeća PCR reakcija učinjena je korištenjem uobičajenih početnica za dovršenje T7 promotorske sekvencije; F 5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGAGAG, R 5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGAGAC pod opisanim uvjetima: 40 ciklusa na temperaturi prijanjanja (engl. *annealing*) 60°C. Dobiveni amplikoni korišteni su u postupku *in vitro* transkripcije čime su dobivene dvolančane RNA molekule. Uslijedio je korak cijepanja 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.

Tablica 4. Popis gena i početnica korištenih u PCR reakcijama sinteze esiRNA komplementarnih ciljnim regijama mRNA gena od interesa. Koso ispisani segmenti početnica pripadaju sekvenciji T7 promotora, dok masno ispisani dijelovi odgovaraju sekvencijama specifičnih za gene od interesa.

BROJ ESEJA	GEN	POČETNICE	
1.	<i>Oct3/4</i>	F	5'- <i>tcactatagggagagagaggg</i> aacctcctctgagc -3'
		R	5'- <i>tcactatagggagagact</i> gattggc <i>gatgtgagtgat</i> -3'
2.	<i>Nanog</i>	F	5'- <i>tcactatagggagagagatgcctgcag</i> ttttcatcc -3'
		R	5'- <i>tcactatagggagagacgtgctgagc</i> ccttctgaatc -3'
3.	<i>Trrap</i>	F	5'- <i>tcactatagggagagagggtcatctacgaagg</i> cctca -3'
		R	5'- <i>tcactatagggagagactgggcatttagt</i> tcgaggtc -3'
4.	<i>Gfp</i>	F	5'- <i>tcactatagggagagcctgaagttcatctgcacca-3'</i>
		R	5'- <i>tcactatagggagactgctcaggtagtggttgcg</i> -3'

3.2.4. Mjerenje rasta teratoma *in vitro*

Korištenjem vrijednosti promjera eksplantata, dobivenih pomoću okularnog mikrometra u binokularnoj lupi, izračunate su površine eksplantata prema formuli:

$$P_E = d_V \times d_M \times 28^2 \times \pi / 4$$

Vrijednosti površina tijekom rasta eksplantata normirane su na vrijednost površine dotičnog eksplantata dobivene 0. dana kultiviranja prema formuli:

$$P_{EX}^n = P_{EX} / P_{E0}$$

pri čemu P_{EX}^n označava normiranu vrijednost površine eksplantata X. dana kultiviranja, P_{EX} označava vrijednost površine eksplantata X. dana kultiviranja, a P_{E0} vrijednost površine dotičnog eksplantata 0. dana kultiviranja.

3.3. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA korišten je uhodani protokol laboratorija *Epigenetics Group LARC*, Lyon, Francuska (172). Tumorska tkiva, prethodno uklopljena su u Tissue freezing Medium® (Jung). Slučajnim odabirom izabrano je 6 tumora po pokusnoj skupini. Na kriomikrotomu (Leica) je od svakog tumora pripremljeno po 10 rezova debljine 10 µm te pohranjeno na -20°C. Neposredno prije nastavka izolacije DNA, s rezova je odstranjen Tissuteck ispiranjem stakala u pothlađenom sterilnom PBS-u (+8°C) u trajanju od 5 min. Rezovi tumorskog tkiva pažljivo su sastrugani oštricom skalpela i premješteni u tubice zapremine 1,5 mL u koje je prethodno stavljeno 300 µL pufera za izolaciju DNA (TE pH 9 s 0,1 µg/µL Proteinaza K i 0,25% Nonidet P40). Tkiva jetre i testisa, prethodno pohranjena u tekućem dušiku mehanički su homogenizirana u tarioniku. U njih je stavljen jednak volumen pufera za izolaciju DNA. Svi uzorci inkubirani su na 56°C najkraće 24 sata. Uzorci su nakon inkubacije zagrijani na 95°C u trajanju 10 min kako bi se inaktivirala Proteinaza K. Uzorci su centrifugirani na 1000 rpm 30 sek. Supernatant je izdvojen za daljnje korištenje. Nakon izmjerene koncentracija DNA u supernatantima na spektrofotometru Ependorf, koncentracija DNA u supernatantima je ujednačena u svih uzoraka na 25 ng/µL. Supernatanti i talozi pohranjeni su na -20°C do daljnje upotrebe.

3.4. Izolacija RNA

Iz tumorskih tkiva, prethodno uklopljenih u Tissue freezing Medium® (Jung), izolirana je ukupna RNA pomoću GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep kita (Sigma) prema uputi proizvođača. Izolacija RNA provedena je pri sobnoj temperaturi i uz centrifugiranje pri 14000 g. Tkivo je lizirano u lizirajućem puferu koji je sadržavao 1% β-merkaptetanola. Lizati su centrifugirani 2 min kroz kolonicu za homogeniziranje uzorka (GenElute Filtration Column), dodan im je isti volumen 70% etanola u deioniziranoj vodi tretiranoj dietil pirokarbonatom (DEPC), te su prebačeni na kolonicu za izolaciju

ukupne RNA i centrifugirani 15 sek. Opisano nanošenje uzoraka na kolonu obavljeno je u dva navrata. Kolonice su potom, uz centrifugiranje pri istim uvjetima, isprane s po 500 μ L pufera za ispiranje 1 i potom dva puta s po 500 μ L pufera za ispiranje 2, s time da je posljednje centrifugiranje trajalo 2 min. Kolona je potom potpuno isušena dodatnim centrifugiranjem u trajanju od 1 min. Ukupna RNA isprana je s kolone s 50 μ L pufera za ispiranje tijekom 1 min centrifugiranja. 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/ μ L DNaze1 i 7 μ L izolata RNA. Smjese su inkubirane 15 min pri sobnoj temperaturi, a potom je DNaza inaktivirana dodatkom 1 μ L 25 mM EDTA i inkubacijom 10 min pri 65°C. Izolati RNA pohranjeni su na -70°C do daljnje uporabe.

3.5. Homogenizacija tkiva

Tkiva teratokarcinoma prethodno uklopljena u Tissue freezing Medium® (Jung). Uklopljena tkiva rezana su na kriomikrotomu Leica CM 1850. Rezovi tkiva debljine 10 μ m skalpelom su odvojeni od medija za uklapanje smrznutog tkiva. Između 10 i 15 rezova jednog bloka, ovisno o veličini tkiva u rezu, zbirno je pohranjeno u 1,5 mL tubicu na -20°C.

Ukupno 40 zametaka, izoliranih 7,5 dana graviditeta, zbirno je pohranjeno u 1,5 mL tubicu na -20°C u minimalnom volumenu PBS-a.

Sakupljena tkiva kao i zamci lizirani su dodavanjem 150 μ L pufera za radioimunoprecipitacijsku analizu (RIPA) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Na Deoxycholate 0,5%, [Merck] X-100 1%, pH 8,0) uz dodatak 1% 0,5 M EDTA pH 8,0 i 4% koktela inhibitora proteaza (Complete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). Lizirana tkiva sonicirana su ultrazvučnim sonikatorom (Soniprep 150, MSE Scientific Instruments) 4 x 15 sek uz amplitudu 5 μ m i frekvenciju 22 kHz na ledu. Nakon centrifugiranja 10 min pri 600 g homogenati su odvojeni od netopljivih taloga.

Odmah nakon homogenizacije određena je koncentracija proteina u homogenatima metodom s bicinkoniničnom kiselinom (BCA, Sigma) (173). U tu svrhu po 2 μ L homogenata razrijeđeno s dH_2O do konačnog volumena 100 μ L (razrjeđenje 1:50). Uzorci su inkubirani 30 min pri 37°C s 1 mL otopine dobivene miješanjem BCA s 4% otopinom $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Sigma) u volumnom omjeru 50:1. 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 0,01 – 0,1 mg/mL, odnosno 0,01 – 1,0 mg/mL). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u duplikatu. Manji volumen pojedinih uzoraka odvojen je i pohranjen na -20°C za potrebe analize biljega oksidacijskoga stresa.

Za potrebe bugaćenja po Westernu (engl. *Western blotting*), odgovarajućim volumenima uzoraka homogenata koji su sadržavali 300 µg proteina dodano je 100 µL pufera za nanošenje uzoraka na SDS-PAG (Tris HCl 0,1875 M, glicerol 20%, β-merkaptoetanol 5%, SDS 6%, bromfenol plavo [Sigma] 0,1%, u dH₂O, pH 6,8) te dH₂O do konačnog volumena od 300 µL (odnosno konačne koncentracije proteina 1 mg/µL). Tako priređeni uzorci prokuhani su 5 min na 96°C i pohranjeni na -20°C do daljnje upotrebe.

3.6. Analiza metilacije DNA pirosekvenciranjem

Metilacijski statusi promotora pojedinog gena analizirani su metodom pirosekvenciranja koji izražava postotak stanica s metiliranim odnosno demetiliranim genom u analiziranom uzorku tkiva. Metoda analize metilacije DNA zahtjeva izolaciju DNA iz uzoraka tkiva, bisulfitnu konverziju DNA, dizajniranje početnica za umnažanje DNA PCR-om i sekvenciranje, umnažanje fragmenata DNA predviđenih za analizu, pirosekvenciranje te obradu rezultata dobivenih sekvenciranjem.

3.6.1. Bisulfitna konverzija DNA

Za potrebe analize metilacije DNA, genomska DNA je modificirana 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, teratokarcinoma, testisa i jetre pomoću EZ DNA Methylation-Gold™ Kita (Zymo Research, Catalog No. D5005) prema uputama proizvođača. Po 20 µL uzorka DNA (supernatanti koncentracije DNA 25 ng/µL) odnosno 500 ng stavljeno je u PCR tubicu. Dodano je 130 µL CT Conversion Reagent-a. PCR tubice su položene u PCR stroj te je pokrenut sljedeći program: 98°C 10 min, 64°C 2,5 sati, 4°C do 20 sati. Nakon navedenog koraka, ukupan volumen svakog uzorka iz PCR tubice prebačen je u zasebnu Zymo-Spin™ IC Column kolonicu položenu u sabirnu kolonicu. U svaki je uzorak dodano 600 µL M-Binding pufera. Slijedilo je centrifugiranje na 10000 g kroz 30 sek. Tekućina iz sabirnih kolonica je bačena. U Zymo-Spin™ IC Column kolonice dodano je po 100 µL M-Desulphonation pufera. Uzorci su inkubirani 15-20 min na sobnoj temperaturi. Slijedilo je centrifugiranje na maksimalnim okretajima kroz 30 sek. U Zymo-Spin™ IC Column kolonice dodalo se po 200 µL M-Wash pufera nakon čega je slijedilo centrifugiranje na maksimalnoj brzini okretaja kroz 30 sek. Ovaj korak se ponavlja. Zymo-Spin™ IC Column kolonice se prebacuju u sterilne 1,5 mL tubice. Dodaje se 10 µL M-Elution pufera direktno na filtre pojedine Zymo-Spin™ IC Column kolonice te centrifugira na maksimalnim okretajima 30 sek. Time je završena bisulfitna konverzija DNA te su uzorci bili spremni za daljnju analizu ili su pohranjeni na -20°C.

3.6.2. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje

Sve sekvence početnica za HotStart PCR, sekvencijske početnice i sekvence analizirane pirosekvenciranjem dizajnirane su na temelju podataka dobivenih iz baze podataka UCSC Genome Bioinformatics Genome Browser Gateway. Postupak dizajniranja započinje određivanjem fragmenta sekvence promotora od interesa neposredno proksimalno od starta transkripcije. Neki od gena u tom području mogu imati CpG otok. Na fragmentu promotorske sekvence svi CpG dinukleotidi se izmjene u YpG. Sljedeći je korak računalna simulacija bisulfitne konverzije u kojoj se svi citozini pretvaraju u timine. Time se u potpunosti gube C nukleotidi iz sekvence dok su potencijalno metilirani CpG označeni kao YpG dinukleotidi. Slijedi identifikacija regije od 20-40 nukleotida bogate YpG dinukleotidima odnosno sekvence koju se želi analizirati pirosekvenciranjem.

```
gtgttaggacaccacggtccccagacaatccttgggcctaggattggcgtcttctcagagtgggcgcgggcctggcgtagcaggaagtaagaggggtG
CCAGGTGGCAGGAGAGGTGGCCATGGGCGCGCGGGGCAAGACGTTGGTGGCACTGCTG
GTGGTTGTGGCGACTGCGGCGATGGCCTTACAGTCAACCTATTTGCAGGTGGATCCTGAG
AAACCCGgtgagctgctctgggggtactgtgtgagactgggggc
```

```
gtgttaggacaccaYGgtccccagacaatccttgggcctaggattggYGtcttctcagagtgggYGYGggcctggYGtagcaggaagtaagag
ggggtIGCCAGGTGGCAGGAGAGGTGGCCATGGGYYGYGGGGCAAGAYGTTGGTGGCAC
TGCTGGTGGTTGTGGYGA CTGYGGYGATGGCCTTACAGTCAACCTATTTGCAGGTGGATC
CTGAGAAACCYGgtgagctgctctgggggtactgtgtgagactgggggc
```

```
gtgttaggatattaYGgttttagataattttgggttagggattggYGtttttttagagtgggYGYGggtttggYGtagtaggaagtaagaggggtI
GTTAGGTGGTAGGAGAGGTGGTTATGGGYGYGYGGGGTAAGA YGTTGGTGTATTGTT
GGTGGTTGTGGYGA TTGYGGYGATGGTTTATAGTTAATTTATTTGTAGGTGGATTTGA
GAAATTYGgtgagttgtttgggggtattgtgtgagattgggggt
```

```
gtgttaggatattaYGgttttagataattttgggttagggattggYGtttttttagagtgggYGYGggtttggYGtagtaggaagtaagag
ggggtIGTTAGGTGGTAGGAGAGGTGGTTATGGGYGYGYGGGGTAAGA YGTTGGTGTATTGTTGGTGGTTGT
GGYGATTGYGGYGATGGTTTATAGTTAATTTATTTGTAGGTGGATTTGAGAAATTYGgtgagttgtttgggggtatt
gtgtgagattgggggt
```

Slika 17. Ogledni primjerak obrada sekvence gena (*Prx21*) za pirosekvenciranje na temelju podataka iz UCSC Genome Bioinformatics Genome Browser Gateway. xxxxx – F početnica HotStart PCRa, xxxxx – komplementarna sekvencija R početnice HotStart PCRa, xxxxx – Sekvencijska početnica broj 1, xxxxx – Sekvencijska početnica broj 2, YG – CpG dinukleotid (potencijalno mjesto DNA metilacije), xxxxx – sekvence koje se analiziraju na postojanje 5mC u CpG (YpG) dinukleotidima, XXXXXX – 1. ekson, xxxxx – 1. intron, xxxxx – promotor, I – transkripcijski start.

Nakon identifikacije slijedi određivanje sekvence F i R početnica veličine oko 12b prema uobičajenim pravilima dizajna s naglaskom da početnice ne smiju sadržavati YpG dinukleotid. Slijedi određivanje sekvence sekvencijske početnice koja će osiguravati početak pirosekvenciranja. Sekvencijska početnica

također ne smije sadržavati YpG dinukleotid te smije biti nešto kraća, otprilike 8 nukleotida. Kao sekvencijska početnica može se koristiti i F početnica s napomenom da sve sekvencijske početnice moraju biti konjugirane biotinom. Također, HotStart PCR-om umnoženi fragment promotora može se analizirati s više sekvencijskih početnica. Sekvenca promotora između sekvencijskih početnica i R početnice može se analizirati pirosekvenciranjem te se upisuje u računalni program pirosekvencera (Slika 17.).

3.6.3. Umnažanje promotorskih regija gena i repetitivnih sekvenci

Klasičnom HotStartPCR reakcijom amplificirane su promotorske regije gena odnosno repetitivni elementi od interesa. Ukupno je korišteno 14 eseja, sedam već uspostavljenih u laboratoriju Epigenetics Group (IARC, Lyon) i sedam eseja novouspostavljenih za potrebe ovog istraživanja. Početnice su osmišljene na temelju podataka UCSC Genome Bioinformatics Genome Browser Gateway kao što je opisano. U svim reakcijama korišten je HotStarTaq Master Mix kit (Qiagen, cat. no. 203205) prema uputama proizvođača. Svi eseji provedeni su prema temeljnom obrascu PCR reakcije: 95°C 15 min/ 95°C 30 sek – prijanjanje 30 sek – 72°C 30 sek / 72°C 30 sek / +18°C ∞. Sekvence početnica i specifične temperature elongacije prikazane su u Tablici 5. Elektroforezom na 2% agaroznom gelu u 1xTAE puferu identificirani su uzorci s uspješnom amplifikacijom DNA. Uspješno amplificirani uzorci pohranjeni su na +4°C do postupka pirosekvenciranja.

Tablica 5. Popis gena, početnica i elongacijskih uvjeta korištenih u HotStart PCR reakcijama amplifikacije promotorskih regija gena od interesa kao priprema za pirosekvenciranje.

BROJ ESEJA	GEN		POČETNICE	TEMPERATURA PRIJANJANJA	BROJ CIKLUSA	KONSTRUKTOR
1.	<i>Oct3/4</i>	F	5'-TGTTAATAGGTTTTGTGGT-3'	50,0°C	50	PROLIGO
		R	5'-BIOTIN-ATCTACCTATATCTTCCAA-3'			
2.	<i>Nanog</i>	F	5'-AATTATAGGGTTGGTGG-3'	50,0°C	50	PROLIGO
		R	5'-BIOTIN-AACCCACACTCATATCAA-3'			
3.	<i>Sox2</i>	F	5'-GTTTGGGTTTGTGGTG-3'	54,0°C	50	PROLIGO
		R	5'-BIOTIN-AACCTCCTAACATCCAC-3'			
4.	<i>c-Myc</i>	F	5'-GAGGTGTATGGGGTGTAGA-3'	58,0 °C	50	PROLIGO
		R	5'-BIOTIN-CACACACACTCCAAACCT-3'			
5.	<i>Bra1</i>	F	5'-GAGAAGTTTTAAGAGAGG-3'	48,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AAACAATTTCAACACCCC-3'			
6.	<i>Stat3</i>	F	5'-GTAGTGTAGATAGGGAGG-3'	52,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AATAACCCACCCATACAC-3'			
7.	<i>Mgmt</i>	F	5'-TTTAGGGAGGAAGTATAGAG-3'	51,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-CCTAAACACCAAAATCT-3'			
8.	<i>Scgb3a1</i>	F	5'-GGGTATTTTGGGTGTGGTAG-3'	51,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AATCCCACCTATTTCCA-3'			
9.	<i>Prss21</i>	F	5'-TTTTTGGGTTTAGGGATTGG-3'	51,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-CAATACCCCAAAAACAA-3'			
10.	<i>Trapp</i>	F	5'-GAGTTTAGTTTGGTGGG-3'	55,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AACCTTCTCCACTTCTCC-3'			
11.	<i>Rassf1a</i>	F	5'-GGTTGGAGAAAAGGTTAGTG-3'	46,1°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AATTAACCCCTACACACCTCC-3'			
BROJ ESEJA	REPETITIVNI ELEMENT		POČETNICE	TEMPERATURA PRIJANJANJA	BROJ CIKLUSA	KONSTRUKTOR
12.	<i>Mml</i>	F	5'-GGTTTGATTTGGGGTATAAGT-3'	61,8°C	55	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-CTCACCACCAAAATCTTAAAATCC-3'			
13.	<i>Mmetnlr</i>	F	5'-GGGTGGAGTTTTTGTAT-3'	48,0°C	57	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-CTCCRCAAAATCCAACAATA-3'			
14.	<i>B1</i>	F	5'-GGTGGTGGTGGTGGTTGAGATAG-3'	56,0°C	50	SIGMA-ALDRICH
		R	5'-BIOTIN-AATAACACACACCTTTAATCCCAACACT-3'			

* Budući da početnica obuhvaća CpG dinukleotid u komplementarnoj sekvenciji DNA, na mjestu R nukleotida u 50% početnica nalazi se G, a u 50% A.

3.6.4. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je provedeno korištenjem PSQ™96MA System platforme (Biotage) prema uputama proizvođača i niže navedenom protokolu. Korišteno je ukupno 18 eseja, sedam već uspostavljenih u laboratoriju Epigenetics Group i jedanaest eseja uspostavljenih za potrebe ovog istraživanja

Tablica 6. Popis sekvencijskih početnica i analiziranih sekvenci promotorskih regija gena od interesa korištenih u postupku pirosekvenciranja.

BROJ ESEJA	GEN/ REPETITIVNI ELEMENT	SEKVENCIJSKA POČETNICA	ANALIZIRANA SEKVENCIJA
1.	<i>Oct3/4</i>	5'-TGAAGGTTTTTTGGGGT-3'	5'-TTCGTTTTTAAGGGTTGTTTTGTTTAGACGTTTTTAATTTTCGT-3'
2.	<i>Nanog</i>	5'-GGAGGAGTAGGATTTATT-3'	5'-TTTTAAATTTATCGTTTTGAGTCGT-3'
3.	<i>Sox2</i>	5'-TGTATTTGTATTTTGG-3'	5'-ATTTTCGCGCGTTTTTAGGTTTCGGCGTTTTTCGGTCG-3'
4.	<i>c-Myc</i>	5'-GAGATTTATAGGGGAAAGAG-3'	5'-TCGTTTTTATATTTATTCGTCGGGTGGAAGTTCGAATCGG-3'
5.	<i>Bra1</i>	5'-GATTTTTTGGTTGTA-3'	5'-CGGGTAGCGGTCGCGTAGTCGT-3'
6.	<i>Stat3</i>	5'-GGAATTTGGGGTT-3'	5'-TCGACGTCGCGCGGAGGGAACGAGTTTTAATCG-3'
7.	<i>Mgmt</i>	5'-GTAGTTTTTAGAG-3'	5'-TTACGTTTCGCGTATTAGGTTTCGTTTTATATTTTCG-3'
8.		5'-TGTTAGGTTT-3'	5'-CGTTTTTATTTTCGTGTACGCGTTTGCGGTTCGT-3'
9.	<i>Sgbb3a1</i>	5'-AGGTAGAGATAA-3'	5'-CGTTAGTATGTTCTGAAGTTACG-3'
10.	<i>Prss21</i>	5'-TTTTTTTAGAGTGG-3'	5'-GCGCGGGTTTGGCG-3'
11.		5'-GAGAGGTGGTTATG-3'	5'-GGCGCGCGGGGTAAGACGT-3'
12.	<i>Trapp</i>	5'-GGATGTTGGGGTTAGT-3'	5'-CGGTAGGTTTCGGTAAGCGTAAGGAGGGCGGGTGAACGGT TTTCG-3'
13.	<i>Rassf1a</i>	5'-TTATTTGTTATTAT-3'	5'-CGTTGTCGCGCGTTCGTTTGTGTTGGATTGTTGCGGGTTTCG-3'
14.		5'-GATTTTGTATTAGAG-3'	5'-CGGGATACGAACGTGGTGAGCGCGGGGTCG-3'
15.	<i>Mml</i>	5'-GGTTTGATTGGGGTATAAGT-3'	5'-TTTTTTCGTTTCGATTCGAGATTCGAGTTTCGGG-3'
16.		5'-GTTAGTAGAGTTTG-3'	5'-TTTAATATTCGTAAGGGTTTATACGGGATTTTTCAG-3'
17.	<i>Mmetnlr</i>	5'-GGGTGGAGTTTTTGTATTAT-3'	5'-TCGTTTTGTTACGTT-3'
18.	<i>B1</i>	5'-TTTGTAGATTAGGTTGGTTT-3'	5'-CGAATTTAGA-3'

Za analizu obrasca metilacije DNA pojedinog gena u pojedinu jažicu PCR pločice (s 96 jažica) prebačeno je 10 µL HotStart PCR produkta pojedinog uzorka. Pločica je kratko centrifugirana kako bi se volumeni PCR produkta spustili na dno jažica. U svaku jažicu dodano je 3 µL zrnaca gela (GE Healthcare, k.b.: 17-5113-01) i 37 µL otopine za vezivanje (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween-20). PCR pločica postavljena je na termomikser na 1400 rpm minimalno 10 min na sobnoj temperaturi. U međuvremenu pripremljena je pločica za pirosekvenciranje (s 96 jažica). U svaku jažicu pločice za pirosekvenciranje stavljeno je 40 µL otopine sekvencijske početnice za pojedini gen odnosno repetitivni element (Tablica 6.) (1 µL sekvencijske početnice početne koncentracije 100 mM na 270 µL otopine za prijanjanje [20 mM Tris-acetat pH 7,6 i 2 mM magnezijev acetat]). PCR pločica fiksirana je na vakuumsku radnu stanicu (Biotage). Nastavci s filtrima vakuumske četke umetnuti su u jažice PCR pločice

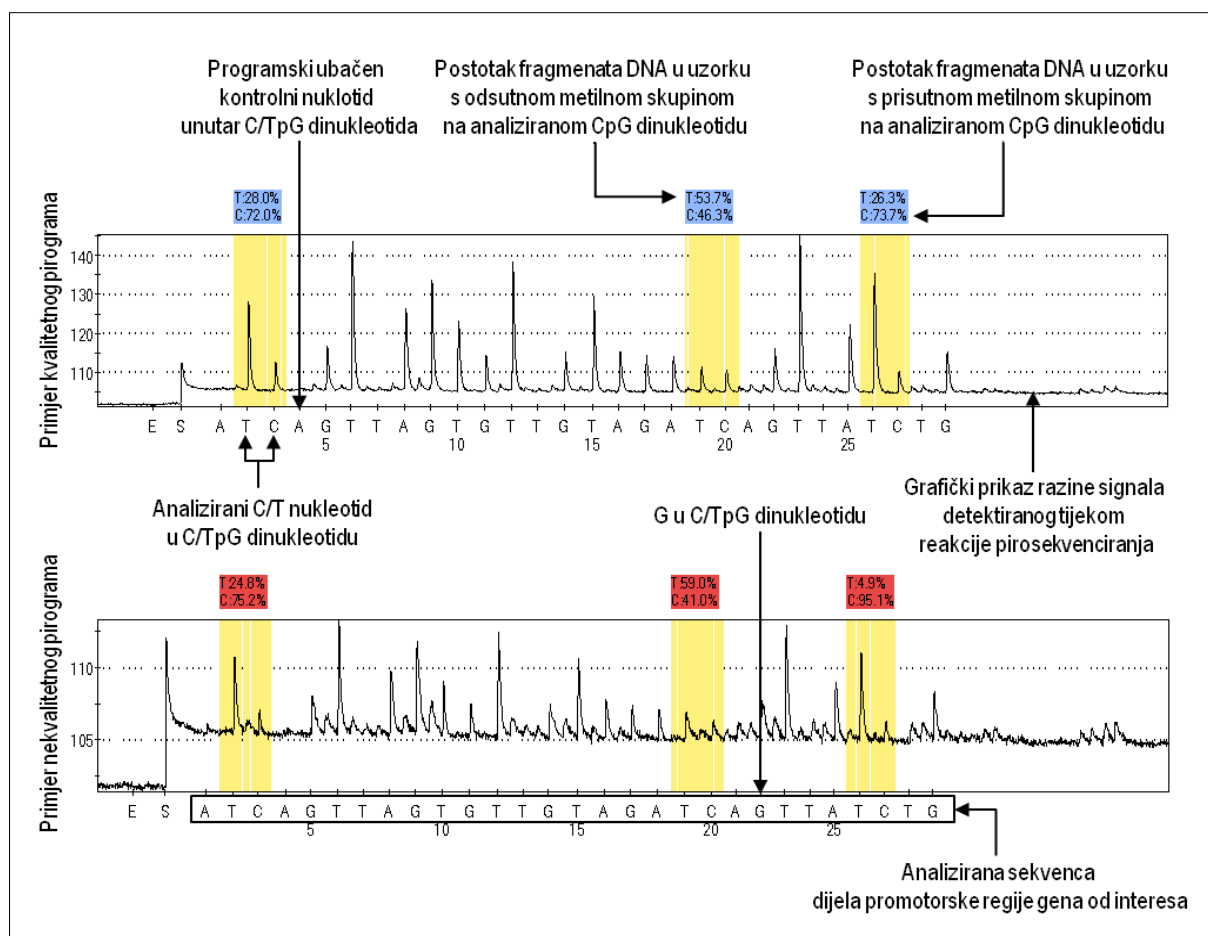
na 30 sek. Pod uključenim vakuumom, četka vakuumske pumpe umočena je u 70% etanol na 5 sekundi, 0,2 M NaOH na 5 sek te u pufer za ispiranje na 10 sek. Nakon ispiranja, četka vakuumske pumpe postavljena je neposredno iznad prethodno pripremljene pločice za pirosekvenciranje te je isključen vakuum. Četka vakuumske pumpe umočena je u jažice pločice za pirosekvenciranje s blagom trešnjom kako bi se zrnca gela s vezanim PCR fragmentima otpustili u otopine sekvencijskih početnica za pojedini gen. Nakon zagrijavanja na termomikseru (2 min na 80°C bez trešnje) pločica je ostavljena da se ohladi. Uslijedilo je pirosekvenciranje na PSQ™96MA susatvu unutar 20 min.

U međuvremenu, pirosekvencer je priređen korištenjem PSQ 96 SNP Reagent Kit (Biotage), a u program PSQ™96MA sustava uneseni su potrebni podaci (Tablica 6.) prema uputama proizvođača. Nakon navedenog pokrenuto je pirosekvenciranje uzoraka (Slika 19.).

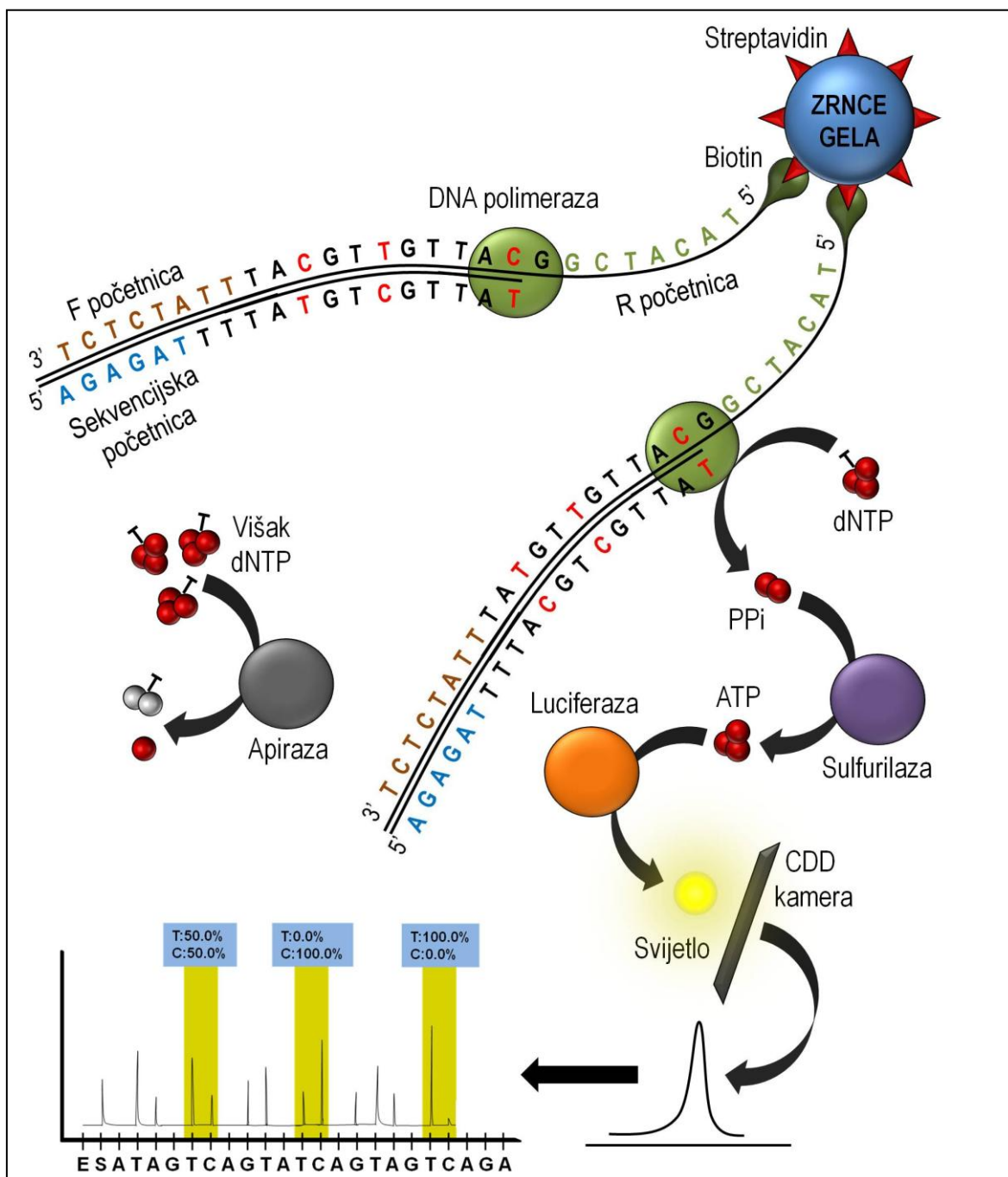
Nakon pirosekvenciranja, analizirani su pirogrami (Slika 18.) te je uslijedio izračun prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva prema prikazanoj jednadžbi:

$$M_X = M_U / N_{CpG}$$

pri čemu M_X označava prosječne razine metilacije određenog analiziranog uzorka tkiva, M_U ukupan zbroj razina metilacije DNA analiziranih CpG točaka, dok N_{CpG} broj analiziranih CpG točaka.



Slika 18. Prikaz pirografa.



Slika 19. Prikaz kemijskih reakcija tijekom pirosekvenciranja i stvaranja signala.

3.7. Analiza ekspresije gena

Kvantitativnu analizu ekspresije gena proveli smo na razini mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, q-PCR) i na razini proteina metodom bugaćenja po Westernu.

3.7.1. Analiza ekspresije gena na razini mRNA

Reverzna transkripcija provedena je pomoću M-MLV reverzne transkriptaze (Invitrogen) prema uputama proizvođača. Konačna reakcijska smjesa volumena 20 μ L sadržavala je ~ 1 μ g ukupne RNA (odnosno, 10 μ L izolata RNA nakon tretmana Dnazom1), 100 ng nasumičnih heksamernih početnica, 1 mM deoksinukleozid-trifosfate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 50 mM Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 U/ μ L rekombinantog inhibitora RNaze i 10 U/ μ L reverzne transkriptaze M-MLV. Uzorci su inkubirani 50 min pri 37°C i zatim 5 min na 70°C kako bi se reakcija okončala. Uzorci cDNA su pohranjeni na -20°C, a prije postupka kvantitativnog PCR su razrijeđeni DEPC-vodom 5x.

Ekspresija mišjih gena *Nanog*, *Trrap* i *Oct3/4* analizirana je q-PCR-om na instrumentu ABI PRISM 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems), uz korištenje metode TaqMan, s *Gapdh* kao kontrolnim genom.

Smjese početnica i fluorescentnom bojom FAM obilježenih proba komercijalno su dostupne i pribavljene su od tvrtke Applied Biosystems. Konačne reakcijske smjese za kvantitativni PCR ukupnog volumena 25 μ L otpipetirane su u pločicu s 96 jažica za kvantitativni PCR (Applied Biosystems). Svaki je uzorak sadržavao reagens TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; sadrži: AmpliTaq Gold® DNA-polimerazu, dNTP s dUTP u adekvatnom puferu), „forward“ (naprijed, iz engl.) i „reverse“ (obratno, unatrag, iz engl.) početnice za odabrani gen u odgovarajućim koncentracijama te probu TaqMan (koja je na 5' kraju bila obilježena fluorescentnom bojom FAM koja je služila kao izvještač (engl. *reporter*), a na 3' kraju fluorescentnom bojom TAMRA koja je služila kao prigušivač [engl. Quencher]) te 5 μ L otopine cDNA. Kvantitativni PCR odvijao se pri sljedećim uvjetima: 2 min na 50°C, zatim 10 min na 95°C (aktivacija DNA-polimeraze) i potom 45 ciklusa od po 15 sek na 95°C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 min 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.

Svaki uzorak analiziran je kvantitativnim PCR-om u triplicatu. U svrhu procjene jačine ekspresije svakog gena, vrijednosti C_T (engl. *threshold cycle*), dobivene za testirani gen normirane su na vrijednosti dobivene za kontrolni gen *Gapdh* 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 formuli:

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

pri čemu je $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ testirani gen}} - C_{T \text{ kontrolni gen}})_{\text{tretirani uzorak}} - (C_{T \text{ testirani gen}} - C_{T \text{ kontrolni gen}})_{\text{kontrolni uzorak}}$.

3.7.2. Analiza ekspresije gena na razini proteina

Priređeni uzorci homogenata tkiva podvrgnuti su diskontinuiranoj denaturirajućoj gel-elektroforezi proteina provedenoj u 5% sabijajućem i 15% razdvajajućem poliakrilamidnog gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju (175). U pojedinu je jažicu unijeto po 15 μL uzorka. Uzorci proteina poznatih molekulskih masa (Sigma) nanešeni su u količini od 3 μL .

Elektroforezom razdvojeni proteini prenešeni su na PVDF Immobilon membranu (Millipore) u uređaju za polusuh elektroforetski prijenos (LKB, Bromma, *Pharmacia*) pri 0,8 mAcm^{-2} (176). 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 (BSA [Sigma] 3%, Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Tween-20 [Roth], u dH_2O , pH 7,5), u svrhu sprečavanja nespecifičnog vezanja proteina na slobodna vezna mjesta na membrani. Potom su trake membrana izložene specifičnim primarnim poliklonalnim protutijelima u određenim koncentracijama (Tablica 7.) na $+4^\circ\text{C}$ uz kontinuirano gibanje na mućkalici preko noći. Sva primarna protutijela priređena su u otopini 3% BSA/TBS. Membrane su zatim isprane (3 puta po 10 min) u puferu TBST, pH 7,5, te potom izložene vezanju odgovarajućeg sekundarnog protutijela (Tablica 8.) na sobnoj temperaturi uz kontinuirano gibanje tijekom jednog sata. Po ispiranju membrane 3 puta po 10 min u puferu TBST, pH 7,5, iste su inkubirane s reagensom za pojačanu kemiluminiscenciju prema uputama proizvođača, a zatim je na njih u mraku postavljen film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche), pri čemu vrijeme izlaganje filma membrani ovisilo o intenzitetu signala. Film je potom razvijen uporabom razvijача (GBX Developer/Replanisher, Sigma) i fiksativa (GBX Fixer/Replanisher, Sigma). Intenzitet signala izmjeren je denzitometrijskom analizom filma korištenjem programa UN-SCAN-IT gel - Gel Analysis Software (Silk Scientific). Dobivena denzitometrijska vrijednost razine pojedinog analiziranog proteina u uzorku normirana je na relativnu vrijednost razine histona. Dobivena vrijednost normirana je na standardni uzorak prema jednadžbi:

$$C^U_X = D^U_X \times D^{S_H}/D^{U_H} \times D^{S_X}$$

pri čemu C^U_X označava razinu proteina od interesa u analiziranom tkivu, D^U_X denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u analiziranom uzorku, D^{S_H} denzitometrijsku vrijednost razine histona u standardnom uzorku, D^{U_H} denzitometrijsku vrijednost razine histona u analiziranom uzorku, a D^{S_X} denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u standardnom uzorku.

Tablica 7. Popis primarnih protutijela.

Antigen	Biljeg	Podrijetlo (izotip) protutijela	Razrijeđenje	Kataloška oznaka	Proizvođač
PCNA	proliferacije	koza (poliklonalno)	1:1000	sc-9857	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
OCT3/4	EC stanica i matičnosti	zec (poliklonalno)	1:200	ab18976	Abcam, Cambridge, UK
H2B	histona	zec (poliklonalno)	1:500	ab18977	Abcam, Cambridge, UK

Tablica 8. Popis sekundarnih protutijela.

Antigen	Konjugat	Podrijetlo (izotip) protutijela	Razrijeđenje	Kataloška oznaka	Proizvođač
kozja protutijela	HRP	zec (poliklonalno)	1:2000	ab6741	Abcam, Cambridge, UK
zečja protutijela	HRP	koza (poliklonalno)	1:1000 (na OCT3/4) 1:2000 (na H2B)	ab6721	Abcam, Cambridge, UK

3.8. Histološke metode

Uzorci dobiveni iz svih pokusa ovog istraživanja obrađeni su metodama klasične histologije, a odabrani dodatno obrađeni metodama imunohistokemije odnosno imunofluorescencije.

3.8.1. Priprema tkiva

Izolirana tkiva čuvana u tekućem dušiku uklopljena su u medij za uklapanje smrznutog tkiva (Tissue freezing Medium®, Jung) i čuvana na -80°C. Histološki preparati izrađeni su na kriomikrotomu Leica CM 1850. Rezovi tkiva debljine 5-60 µm polagani su na silanizirana stakla ([3-Aminopropyl] triethoxy-silane, Sigma-Aldrich) te pohranjeni na -20°C.

Eksplantati dobiveni kultivacijom zametaka *in vitro* su posljednjeg 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 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 min) i benzol (1 x 30 min), ksilol (1 x 30 min) te uklopljeni u parafin na 56°C. Parafinski su blokovi potom čuvani na +4°C. Rezanjem parafinskih blokova na rotacionom 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 imunološke metode bojanja čuvani na +4°C. Prema istom postupku priređeni su i testisi izolirani u eksperimentu *in vivo*.

3.8.2. Izrada klasičnih histoloških preparata

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 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, 50,0 g Cloral hidrat, 1,0g acidum citricum) 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 min, ksilol II. (99%) 5 – 10 min, etanol (100%) I. 4 – 5 min, etanol (100%) II. 4 – 5 min, etanol (96%) I. 4 – 5 min, etanol (96%) II. 4 – 5 min, etanol 70% I. 4 – 5 min, dH_2O 4 – 5 min, hemalaun 3 min, isprati u dH_2O , isprati u vodovodnoj vodi (vH_2O), vH_2O 20 – 30 min, dH_2O 5 min, eozin 0,5 – 1 min, isprati u etanolu (70%) I., isprati u etanolu (70%) II., isprati u etanolu (96%) I., isprati u etanolu (96%) II., etanolu (100%) I. 0,5 – 1 min, etanolu (100%) II. 0,5 – 1 min, ksilol (99%) I. 0,5 min, ksilol (99%) II. 0,5 min, ksilol (99%) III. 10 min, ksilol (99%) IV. 20 min. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u Kanada balzam te sušeni u termostatu na 37°C kroz 48 sati.

Histološki preparati tkiva uklopljenih u medij za uklapanje smrznutog tkiva izrađeni su prema sljedećem protokolu: PBS 5 min., metanol i aceton u omjeru 1:1 10 min., dH_2O 5 min, hemalaun 2 min, isprati u dH_2O , vH_2O 5 min, isprati u dH_2O , eozin 0,5 min., isprati u etanolu (70%), isprati u etanolu (96%), etanol (100%) 1 min, etanol (100%) i Histo-Clear TM (National Diagnostics) u omjeru 1:1 1 min, Histo-Clear TM 5 min. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u Histomount (National Diagnostics) te sušeni na sobnoj temperaturi 5 min.

Bojanje po Massonu tkiva uklopljenih u parafin provedeno je korištenjem boja hemalaun (The British Drug Houses), Light Green SF Yellowish (Sigma) i kiseli fuksin (Rubin S, Merck) prema sljedećem protokolu: Rezovi tkiva su deparafinizirani u ksilolu te hidrirani provlačenjem kroz padajuću seriju etanola (100%, 96%, 70%) do dH_2O . Nakon toga, stakalca s rezovima uranjana su 20 sek u hemalaun, isprana u dH_2O i diferencirana stopiranjem reakcije u vH_2O 20 min. Nakon kratkog ponovnog ispiranja u dH_2O , rezovi su uranjani u otopinu kiselog fuksina 1 min te isprani i diferencirani 1 min u fosformolibdenskoj kiselini (Kemika) u mraku. Potom su rezovi isprani u dH_2O i 70% etanolu te uranjani dva do tri puta brzo u otopinu Light Green (Sigma). Reakcija je zaustavljena provlačenjem stakalaca kroz vodenu otopinu kiselog etanola (1% octena kiselina u 100% etanolu). Uslijedila je dehidracija tkiva uranjanjem dva puta u 100% etanolu na 1 min, potom u otopinu 100% etanola i ksilola u omjeru 1:1 1 min, te u ksilol (2 puta 10 min), nakon čega su rezovi pokriveni kanada balzomom. Nakon obrade uzoraka ovim bojama, jezgre se oboje plavo-ljubičasto/tamno crveno, citoplazma i njeni elementi se oboje ružičasto/crveno, mišićna vlakna crveno, crvena krvna zrnca narančasto, a kolagena vlakna i mucin se oboje zeleno ili plavo.

3.8.3. Imunohistokemija

Na histološkim preparatima detektirani su proteinski produkti pomoću specifičnih protutijela (Tablica 9.) upotrebom metode peroksidaza–anti-peroksidaza uz vizualizaciju DAB kromogenom (diamino benzidin tetraklorid) (Dako).

Imunohistokemijski preparati tkiva uklopljenih u parafin izrađeni su prema sljedećem protokolu: ksilol I. (99%) 5 -10 min, ksilol II. (99%) 5 – 10 min, etanol (100%) I. 4 – 5 min, etanol (100%) II. 4 – 5 min, etanol (96%) I. 4 – 5 min, etanol (96%) II. 4 – 5 min, etanol (70%) I. 4 – 5 min, dH₂O 4 – 5 min, PBS 10 min, vodikov peroksid (3%) 5 min u mraku, PBS 5 min, serum (10%) 30 min (Tablica 11.), isprati u PBS-u, BSA (Sigma) (4%) 30 min, primarno protutijelo (Tablica 9.) u otopini BSA (1%) 75 min na sobnoj temperaturi, PBS 5 min tri puta, odgovarajuće biotinilirano sekundarno protutijelo (Tablica 10.) 20 min na sobnoj temperaturi, PBS 5 min tri puta, streptavidin konjugiran s peroksidazom iz repe (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (Dako) (0,33%) 15 min, PBS 5 min tri puta, DAB kromogen 1 min, dH₂O 10 min, hemalaun 3 min, isprati u dH₂O, isprati u vH₂O, vH₂O 20 – 30 min, dH₂O 5 min, isprati u etanolu (70%) I., isprati u etanolu (70%) II., isprati u etanolu (96%) I., isprati u etanolu (96%) II., etanol (100%) I. 0,5 – 1 min, etanol (100%) II. 0,5 – 1 min, ksilol (99%) I. 0,5 min, ksilol (99%) II. 0,5 min, ksilol (99%) III. 10 min, ksilol (99%) IV. 20 min. Obojeni imunohistokemijski preparati uklopljeni su u Kanada balzam te sušeni u termostatu na 37°C 48 sati.

Imunohistokemijski preparati tkiva uklopljenih u medij za uklapanje smrznutog tkiva izrađeni su prema sljedećem protokolu: ledeni metanol i aceton u omjeru 1:1 10 min, sušenje na zraku 30 min na sobnoj temperaturi, PBS 5 min, vodikov peroksid (0,3% u metanol) 10 min u mraku, PBS 5 min, serum (10%) 30 min (Tablica 11.), isprati u PBS-u, fetalni goveđi serum (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma) (4%) 30 min, primarno protutijelo (Tablica 9.) u otopini BSA (1%) 75 min na sobnoj temperaturi, PBS 5 min tri puta, odgovarajuće biotinilirano sekundarno protutijelo (Tablica 10.) 15 min na sobnoj temperaturi, PBS 5 min tri puta, HRP (0,33%) 15 min, PBS 5 min tri puta, DAB kromogen (1 min, dH₂O 10 min, hemalaun 2 min, isprati u dH₂O, vH₂O 5 min, isprati u etanolu (70%), isprati u etanolu (96%), etanol (100%) 1 min., etanol (100%) i Histo-ClearTM (National Diagnostics) u omjeru 1:1 1 min, Histo-ClearTM 5 min. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u Histo-mount (National Diagnostics) te sušeni na sobnoj temperaturi 5 min.

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

Tablica 9. Popis primarnih protutijela.

Antigen	Biljeg	Podrijetlo (izotip) protutijela	Razrijeđenje	Kataloška oznaka	Proizvođač
Ki-67	proliferacije	štakor (monoklonalno)	1:50	M7249	Dako, Kopenhagen, Danska
EMA-1	PGC, ECC	miš (poliklonalno)	- (supernatant)	EMA-1	DSHB, Iowa City, SAD
AFP	TCa	zec (poliklonalno)	1:300	A008	Dako, Kopenhagen, Danska
SSEA-3	matičnih stanica humanog TCa	miš (poliklonalno)	- (supernatant)	MC-631	DSHB, Iowa City, SAD
OCT3/4	EC stanica i matičnosti	zec (poliklonalno)	1:100	ab18976	Abcam, Cambridge, UK
Kaspaza-3	apoptoze	zec (poliklonalno)	1:400	#9661	Cell Signaling, Danvers, SAD

Tablica 10. Popis sekundarnih protutijela.

Antigen	Konjugat	Podrijetlo (izotip) protutijela	Razrijeđenje	Kataloška oznaka	Proizvođač
štakorska protutijela	Biotin	zec (poliklonalno)	1:500	E0468	Dako, Kopenhagen, Danska
	Cy5	koza (poliklonalno)	1:500	ab6565	Abcam, Cambridge, UK
mišja protutijela	Biotin	zec (poliklonalno)	1:500	E0354	Dako, Kopenhagen, Danska
	FITC	koza (poliklonalno)	1:500	ab47830	Abcam, Cambridge, UK
zečja protutijela	Biotin	koza (poliklonalno)	1:500	ab64256	Abcam, Cambridge, UK
	FITC	magarac (poliklonalno)	1:100	ab6798	Abcam, Cambridge, UK

Tablica 11. Popis seruma.

Podrijetlo korištenog sekundarnog protutijela	Podrijetlo odgovarajućeg seruma	Proizvođač
zec	zec	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska
koza	koza	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska
magarac	magarac	Gibco, Grand Island, SAD

* Radi sprječavanja križnih reakcija, tkiva su inkubirana sa serumima istog životinjskog podrijetla kao i sekundarna antitijela. Kod imunofluorescencijskih metoda u kojima su korištena dva primarna protutijela istovremeno, križne reakcije spriječene su dvostrukom inkubacijom tkiva u odgovarajućim serumima ovisno o sekundarnim protutijelima (u tekstu označeno „serum I.“ i „serum II.“).

3.8.4. Imunofluorescencija

Na imunofluorescencijskim preparatima detektirani su proteinski produkti pomoću specifičnih primarnih protutijela, a vizualizirani sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorescein izotiocijanatom (FITC) ili cijaninom 5 (Cy5).

Imunofluorescencijski preparati tkiva uklopljenih u parafin izrađeni su prema slijedećem protokolu: ksilol I. (99%) 5 -10 min, ksilol II. (99%) 5 – 10 min, etanol (100%) I. 4 – 5 min, etanol (100%) II. 4 – 5 min, etanol (96%) I. 4 – 5 min, etanol (96%) II. 4 – 5 min, etanol (70%) I. 4 – 5 min, dH₂O 4 – 5 min, PBST (0,1% Tween 20 ili 0,1% Triton X100, PBS Ph7,4) 10 min, permeabilizator (0,25% Triton X100, PBS) 10 min, PBST 5 min, serum I. (10%) 30 min (Tablica 11.), isprati u PBST-u, serum II. (10%) 30 min (Tablica 11.)*, isprati u PBST-u, BSA (4%) 30 min, isprati u PBST-u, primarna protutijela (Tablica 9.) u otopini BSA (1%) preko noći na +4°C, PBST 90 min, PBST 90 min, odgovarajuća sekundarna protutijela (Tablica 11.) u otopini za razrjeđivanje sekundarnih protutijela (0,05% Tween 20, PBS pH 7,2) 90 min na sobnoj temperaturi u mraku, PBST 90 min u mraku, McIlvaine otopina (0,2M Na₂HPO₄ i 0,1M limunska kiselina, u omjeru 4:1) 5 min u mraku, DAPI (Sigma) (600 nM 4',6-Diamidin—2-fenilindol, McIlvaine otopina) 5 min u mraku, PBST 10 min u mraku. Obojeni imunofluorescencijski preparati uklopljeni su u Fluorescence Mounting Medium (Dako) te čuvani na +4°C u mraku.

Imunofluorescencijski preparati tkiva uklopljenih u medij za uklapanje smrznutog tkiva izrađeni su prema slijedećem protokolu: ledeni aceton 15 min, sušenje na zraku 90 min na sobnoj temperaturi, PBST 10 min, permeabilizator 10 min, PBST 5 min, serum I. (10%) 30 min (Tablica 11.), isprati u PBST-u, serum II. (10%) 30 min (Tablica 11.), isprati u PBST-u, BSA (4%) 30 min, isprati u PBST-u, primarna protutijela (Tablica 9.) u otopini BSA (1%) preko noći na +4°C, PBST 90 min, PBST 90 min, odgovarajuća sekundarna protutijela (Tablica 10.) u otopini za razrjeđivanje sekundarnih protutijela 90 min na sobnoj temperaturi u mraku, PBST 90 min u mraku, McIlvaine otopina 5 min u mraku, DAPI 5 min u mraku, PBST 10 min u mraku. Obojeni imunofluorescencijski preparati uklopljeni su u Fluorescence Mounting Medium (Dako) te čuvani na +4°C u mraku.

Histološki preparat koji tijekom imunofluorescencijskog protokola nije inkubiran s primarnim protutijelima korišten je kao negativna kontrola metode.

Imunofluorescencijska bojanja analizirana su na fluorescencijskom mikroskopu Olympus AX80 s ugrađenom kamerom Nikon DXM1200, Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga.

3.8.5. TUNEL

TUNEL metodom (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling*) obilježene su apoptotične stanice (177). Ova metoda detektira fragmetiranu DNA u apoptotičkim stanicama putem katalizirane ugradnje fluoresceina-12-dUTP na 3'-OH krajeve DNA uz korištenje enzima terminalne deoksinukleotidil-transferaze. Za detekciju je korišten In Situ Cell Death Kit (Roche Pharmaceuticals) prema uputama proizvođača. U negativnoj kontroli izostavljen je enzim terminalna deoksinukleotidil-transferaza koja je zamijenjena TUNEL puferom. Za kontrastiranje jezgara korištena je DAPI boja (1:2000). Rezovi su uklopljeni u Prolong® Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) medij za pokrivanje. Stakalca su ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi u tamnoj komori, a sutradan prebačena na +4°C. Analiza signala rađena je na fluorescencijskom mikroskopu Olympus AX80 s ugrađenom kamerom Nikon DXM1200, Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga.

3.9. Analiza biljega oksidacijskog stresa i upale

Za potrebe analize biljega oksidacijskog stresa i upale, uzorci eksperimentalnog teratokarcinoma miša pripremljeni su prema gore navedenom protokolu. Ukratko, nakon homogenizacije tkiva i izmjerene koncentracije proteina u uzorcima, uzorci su pohranjeni na -20°C do daljnje analize. U mjerenju biljega oksidacijskog stresa i upale Glutaciona (GSH) (178), Glutacion S-transferaze (GST) (179), kisikovog superoksida (O_2^*) (180), proteinskih produkata uznapredovale oksidacije (engl. *Advanced oxidation protein products*, AOPP) (181), Katalaze (182) i Lipidne peroksidaze (183) korištene su biokemijske metode. U zagradaama su navedeni objavljeni protokoli.

3.10. Broj uzoraka po skupinama i pojedinim metodama

Tablica 12. Prikaz broja analiziranih uzoraka određene pokusne skupine po metodama.

EKSPERIMENTI	<i>In vivo</i>												<i>In vitro</i>				
	KONTROLA								5azaC TRETMAN				Kontrola	Esi-GFP	Esi-Oct3/4	Esi-Nanog	Esi-Ttrap
POKUSNE SKUPINE	Zametak	2 tj.	4 tj.	6 tj.	8 tj.	Testis	Jetra	4 tj.	6 tj.	8 tj.	Testis	Jetra					
MASA (<i>in vivo</i>)	-	16	7	12	12	28	-	0	13	17	32	-	-	-	-	-	-
RAST (<i>in vitro</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	19	23	24	24
DETERMINACIJA SPOLA	-	4	4	4	4	-	-	0	4	4	-	-	-	-	-	-	-
PIROSEKVENCIJANJE																	
<i>Oct3/4</i>	20*	3	6	4	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Sox2</i>	20*	3	7	5	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Nanog</i>	20*	3	7	3	6	3	3	0	3	4	3	3	-	-	-	-	-
<i>Scgb3a1</i>	20*	3	6	3	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Prxs21</i>	20*	3	5	3	6	3	3	0	3	4	3	3	-	-	-	-	-
<i>Stat3</i>	20*	3	7	4	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Bra1</i>	20*	3	7	4	6	3	3	0	3	4	3	3	-	-	-	-	-
<i>Mgmt</i>	20*	3	6	4	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>c-Myc</i>	20*	3	7	4	6	3	3	0	3	5	3	3	-	-	-	-	-
<i>Ttrap</i>	20*	3	7	3	6	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Rasf1</i>	20*	3	4	3	4	3	3	0	3	4	3	3	-	-	-	-	-
<i>Mmetnltr</i>	20*	3	7	6	7	3	3	0	3	6	3	3	-	-	-	-	-
<i>Mml</i>	20*	3	7	6	6	3	3	0	3	5	3	3	-	-	-	-	-
<i>B1</i>	20*	3	7	3	6	3	3	0	3	5	3	3	-	-	-	-	-
q-PCR																	
<i>Oct3/4</i>	25*	5	5	4	6	-	-	0	4	5	-	-	12*	12*	12*	12*	12*
<i>Nanog</i>	25*	5	5	5	6	-	-	0	4	5	-	-	12*	12*	12*	12*	12*
<i>Ttrap</i>	25*	3	3	3	3	-	-	0	2	3	-	-	12*	12*	12*	12*	12*
SEMIKVANTITATIVNI WESTERN BLOTTING																	
PCNA	50*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
OCT3/4	50*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
BIOKEMIJSKA ANALIZA																	
GSH	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
GST	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
O2*	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
AOPP	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
Katalaza	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-
Lipidna peroksidaza	20*	3	3	3	3	-	-	0	3	3	-	-	-	-	-	-	-

* Broj sabranih zametaka ili eksplantata u jedinstven uzorak.

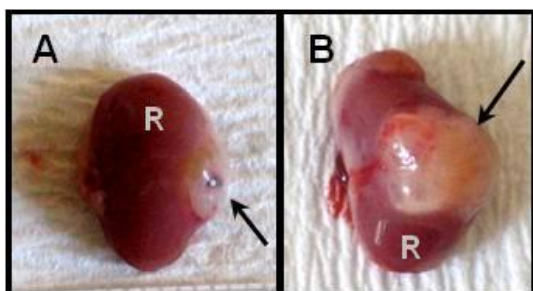
3.11. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni u programu GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) za Windows operativni sustav. Mjere centralne tendencije (aritmetička sredina) kao i mjere disperzije (standardna pogreška) opisane su koristeći deskriptivnu statistiku. Budući da rezultati eksperimenata nisu bili normalno raspoređeni, za njihovu analizu koristili smo neparametrijske testove. Za ocjenu rasta tumora *in vivo* i ocjenu značajnosti promjena biokemijskih parametara koristili smo 1way ANOVA Kruskal-Wallisov test. Za analizu statističke značajnosti u usporedbama dviju skupina koristili smo Mann-Whitney U test. Za analizu statističke značajnosti broja razvijenih teratokarcinoma koristili smo Fisherov egzaktni test. Korelacija između dva mjerena parametra provjeravana je pomoću linearne regresijske analize Spearmanovim testom. Za određivanje statističke značajnosti razlika u rastu *in vitro* koristili smo One-sample t test. Statistički značajni rezultati smatrani su oni čija je $p < 0,05$ (dvostrani test).

4. REZULTATI

4.1. Razvoj zametka u eksperimentalni teratokarcinom

Tijekom istraživanja, pod čahuru bubrega singeničnih životinja transplantirano je ukupno 187 zametaka raspoređenih u 7 pokusnih skupina, a izolirano 77 tumora (Tablica 13.) (Slika 20.). U kontrolnim skupinama od 115 transplantiranih zametaka razvilo se 47 tumora što čini 41%. Sličan postotak izoliranih tumora, preciznije 42%, dobiven je i u 5azaC tretiranim skupinama u kojima je transplantirano ukupno 72 zametka, a izolirano 30 tumora. Značajna razlika u broju razvijenih tumora prema broju transplantiranih zametaka dobivena je u skupini 4tj. 5azaC odnosno skupini u kojoj su životinje primateljci zametka tretirane s 5azaC neposredno nakon transplantacije te do trenutka žrtvovanja životinja. U navedenoj skupini nije se razvio niti jedan tumor od 16 transplantiranih zametaka već je na čahurama bubrega svugdje bio vidljiv samo ožiljak preostao nakon uspješne transplantacije. U odgovarajućoj kontrolnoj skupini, 4tj. K, uspješnost razvoja tumora prema broju transplantiranih zametaka bila je 50%.

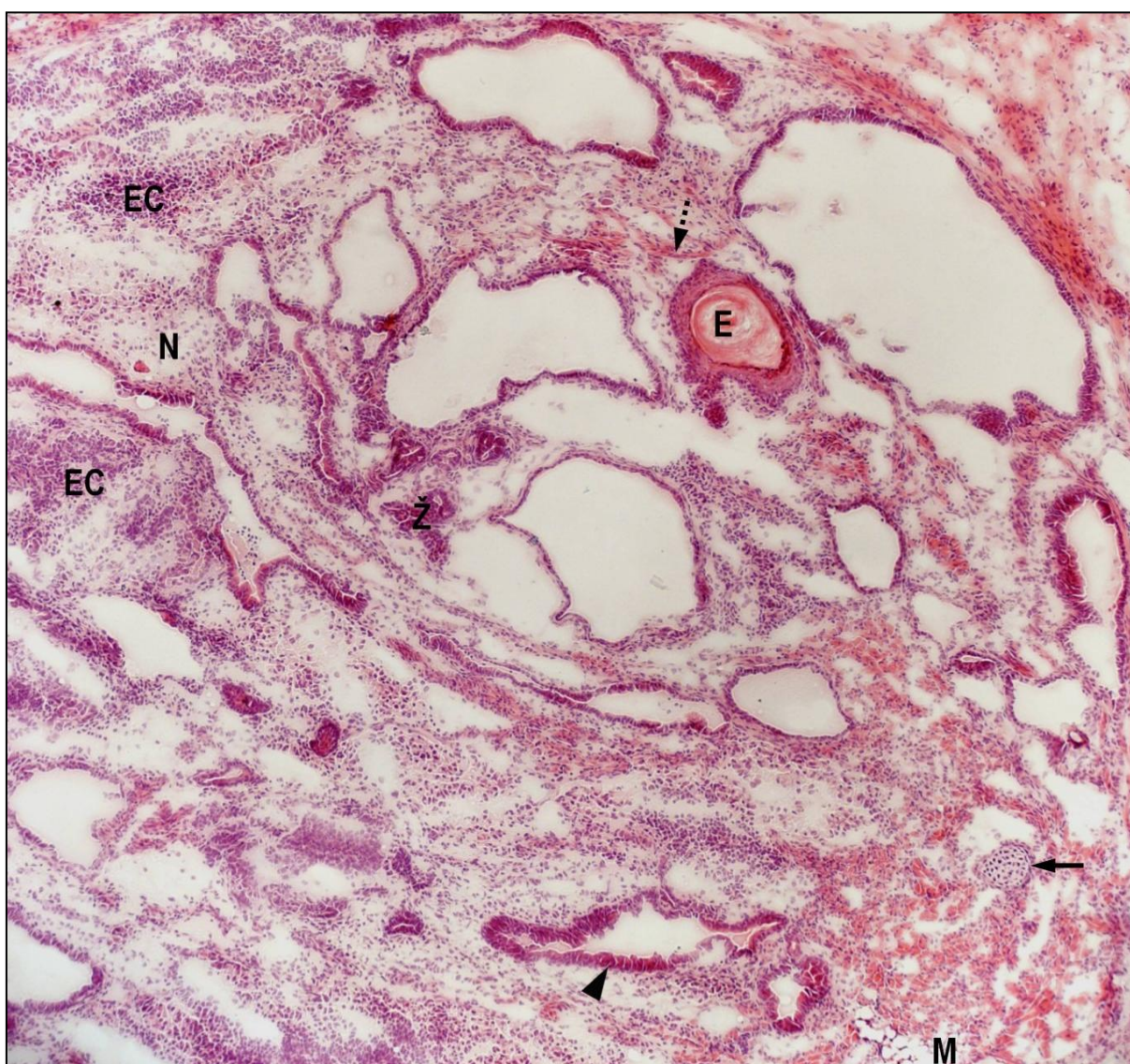


Slika 20. Makroskopski prikaz razvijenog eksperimentalnog tumora. A: Tumor (strelica) dva tjedna nakon transplantacije zametka pod čahuru bubrega (R). B: Tumor (strelica) četiri tjedna nakon transplantacije zametka.

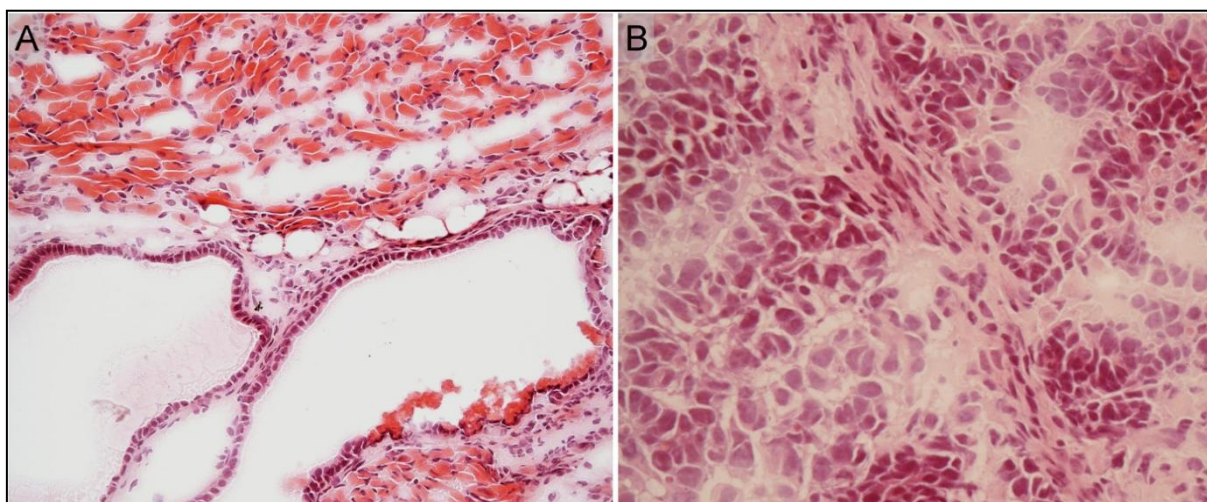
Tablica 13. Broj transplantiranih zametaka i broj razvijenih tumora po pokusnim skupinama.

TRAJANJE RAZVOJA TRANSPLANTATA (POKUSNE SKUPINE)	KONTROLA				5azaC		
	2 tj.	4 tj.	6 tj.	8 tj.	4 tj.	6 tj.	8 tj.
BROJ TRANSPLANTIRANIH ZAMETAKA	44	14	25	32	16	24	32
BROJ RAZVIJENIH TUMORA	16	7	12	12	0	13	17
UDIO TUMORA	36,3%	50,0%	48,0%	37,5%	0,0%	54,2%	53,1%

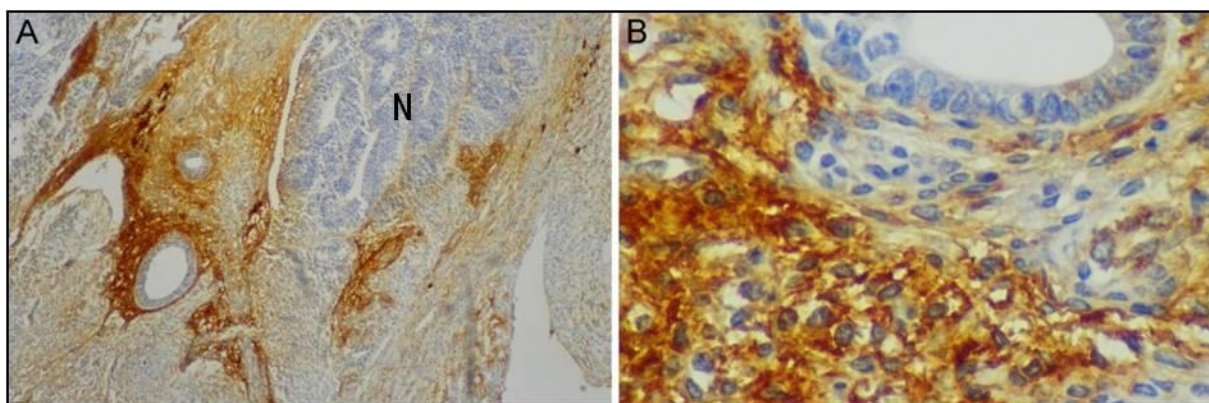
Nakon različitog perioda rasta ispod čahure bubrega izolirani su tumori histološki identificirani kao teratokarcinomi koji uz nezrele nediferencirane EC stanice sadrže i diferencirane derivate triju zametnih listića (Slike 21., 22. i 23.). Imunohistokemijskim određivanjem tipičnih biljega potvrđeno je da se zameci razvijaju u teratokarcinom. Dokazan je Alfa-1-fetoprotein (AFP) (Slika 23.), OCT3/4 (Slika 24.) i EMA-1 (Slika 25.). EMA-1 imunofluorescencijski signal kolokalizirao je s ekspresijom biljega proliferacije Ki-67 (Slika 26.). SSEA-3 biljeg, koji normalno nije eksprimiran u mišjem zametku već se sporadično javlja u diferenciranom tkivu, bio je negativan u tkivu teratokarcinoma sa sporadičnim pozitivnim signalom. Izrazito jak signal pronađen je u tkivu bubrega koji normalno eksprimira SSEA-3 (Slika 27.).



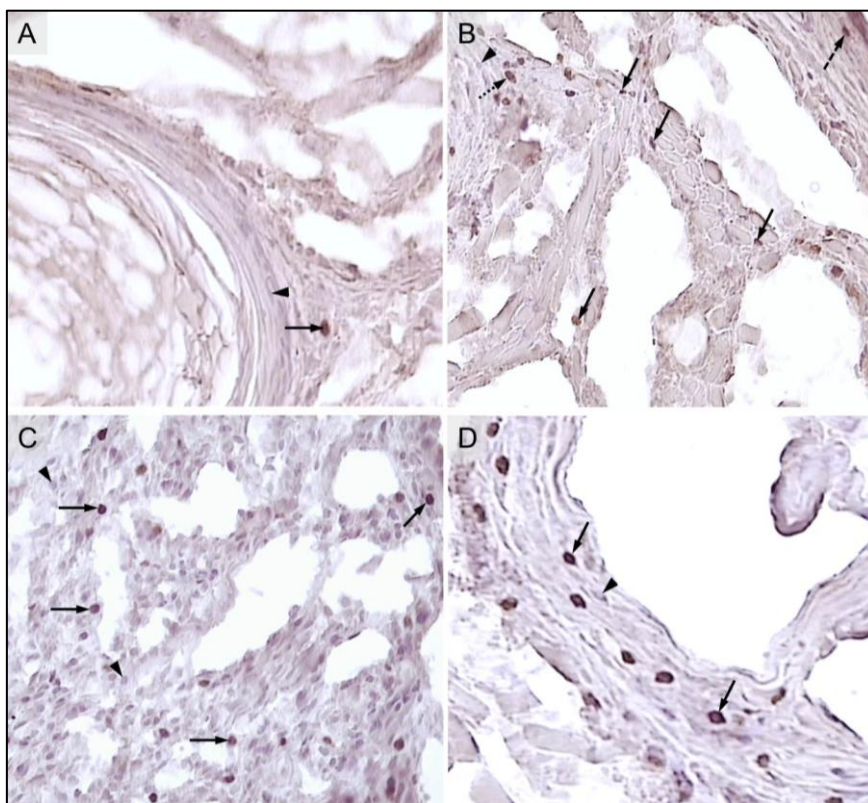
Slika 21. Histološki prikaz razvijenog eksperimentalnog teratokarcinoma miša nakon 8 tjedana. Uz nediferencirane stanice embrionalnog karcinoma (EC) vidljiva su i diferencirana tkiva: epidermis (E), hrskavica (strelica), cilindrični epitel (glava strelice) masne stanice (M), neuralno tkivo (N), žljezdani epitel (Ž) i skeletni mišić (iscrtkana strelica) (HE, x40).



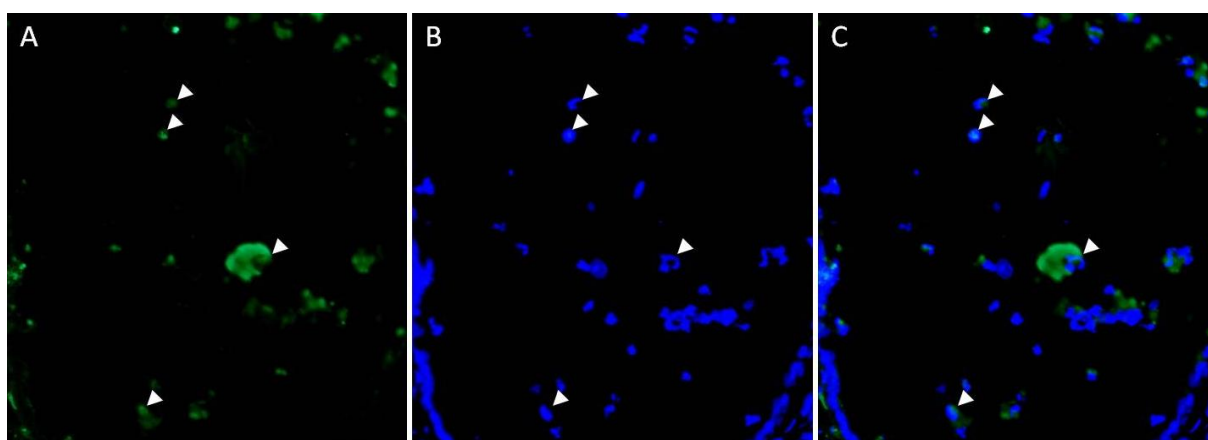
Slika 22. Histološki prikaz razvijenog eksperimentalnog teratokarcinoma miša nakon 8 tjedana. A: Diferencirana teratomska komponenta s poprečno prugastim mišićima, masnim i epitelnim stanicama (HE, x100). B: Stanice embrionalnog karcinoma (EC stanice) nediferencirane komponente teratokarcinoma (HE, x200).



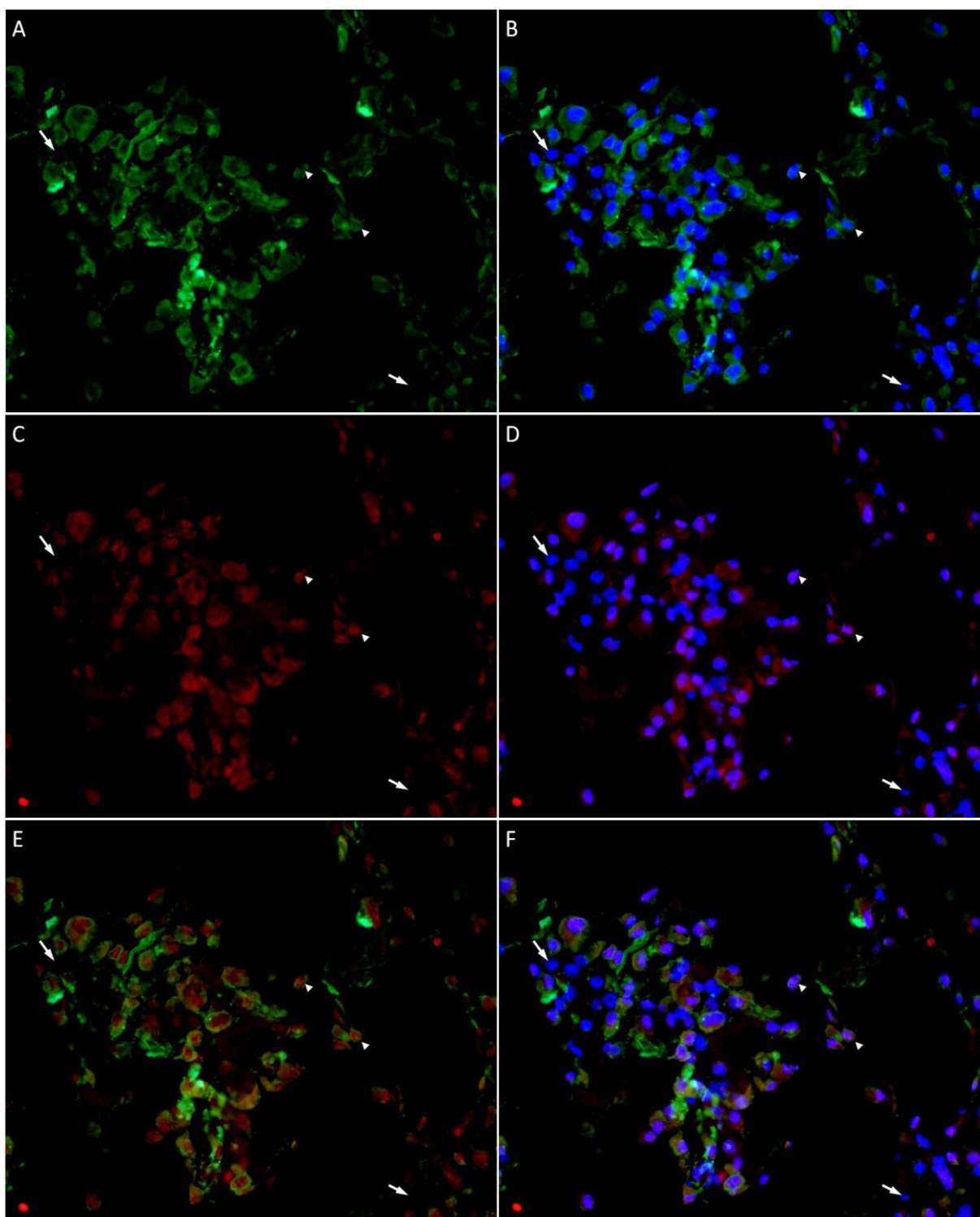
Slika 23. Ekspresija AFP-a kao biljega teratokarcinoma u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (DAB, kontrastirano hemalaunom). A: Pozitivni signal u tumorskom tkivu pokraj nezrelog neuralnog tkiva (N) koje formira strukture slične neuralnoj cijevi (x40). B: Detalj prethodne slike (x200).



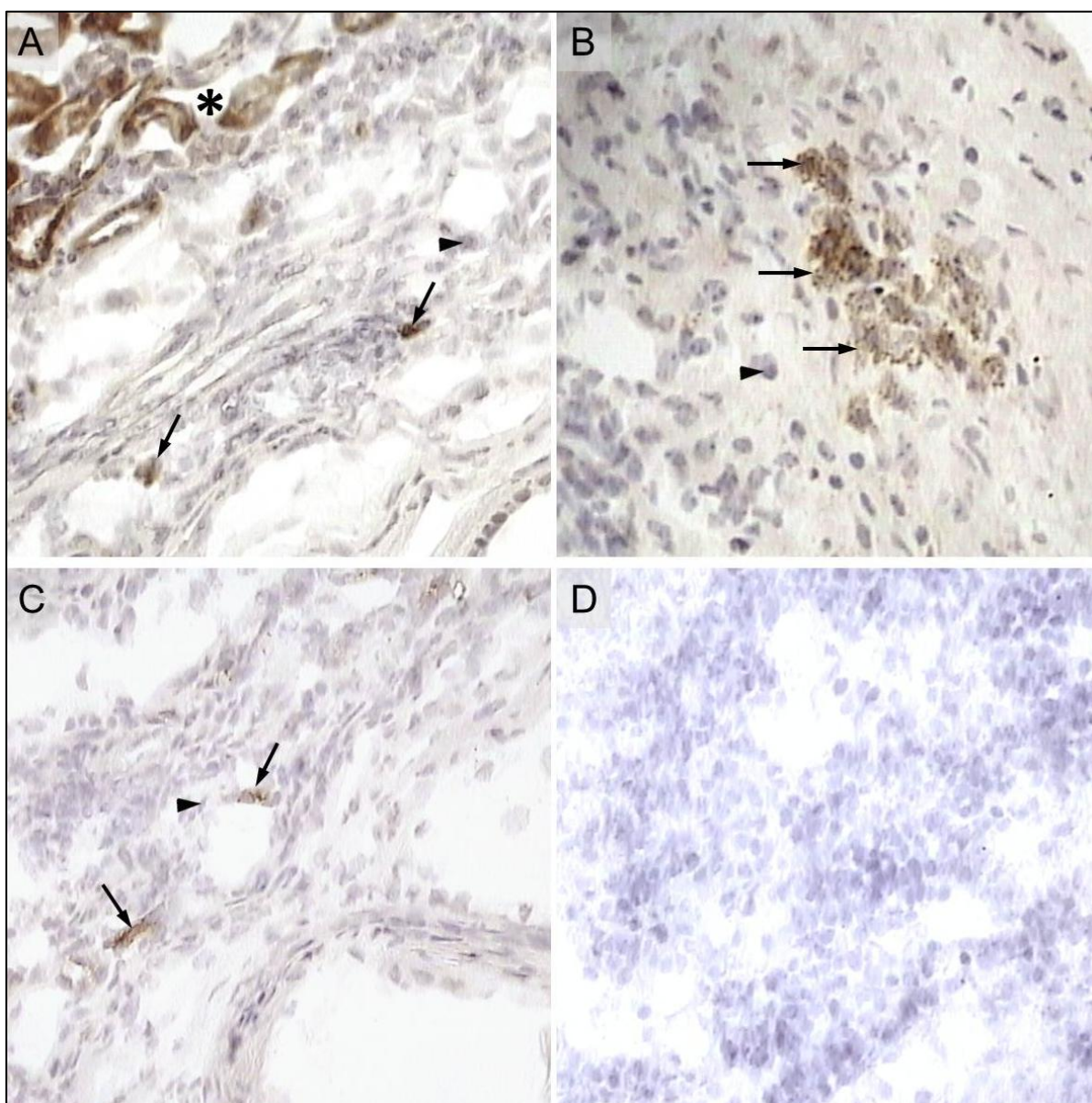
Slika 24. Ekspresija gena *Oct3/4* u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (DAB, kontrastirano hemalaunom). A: Pojedinačna pozitivna stanica uz epidermis (strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x100). B: Pojedinačne pozitivne stanice u vezivu između mišićnih vlakana (strelica), pozitivna stanica u vezivu čahure bubrega (iscrtkana strelica), nakupina pozitivnih stanica u vezivu (istočkana strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x100). C: Difuzno raspoređene pozitivne stanice u nediferenciranoj komponenti TCa (strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x100). D: Difuzno raspoređene pozitivne stanice u vezivu TCa (strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x200).



Slika 25. Prikaz stanica eksperimentalnog teratokarcinoma miša koje ispoljavaju EMA-1 protein (x200). A: Citoplazmatski EMA-1 signal (strelica) (FITC), B: DAPI, C. integrirana slika.



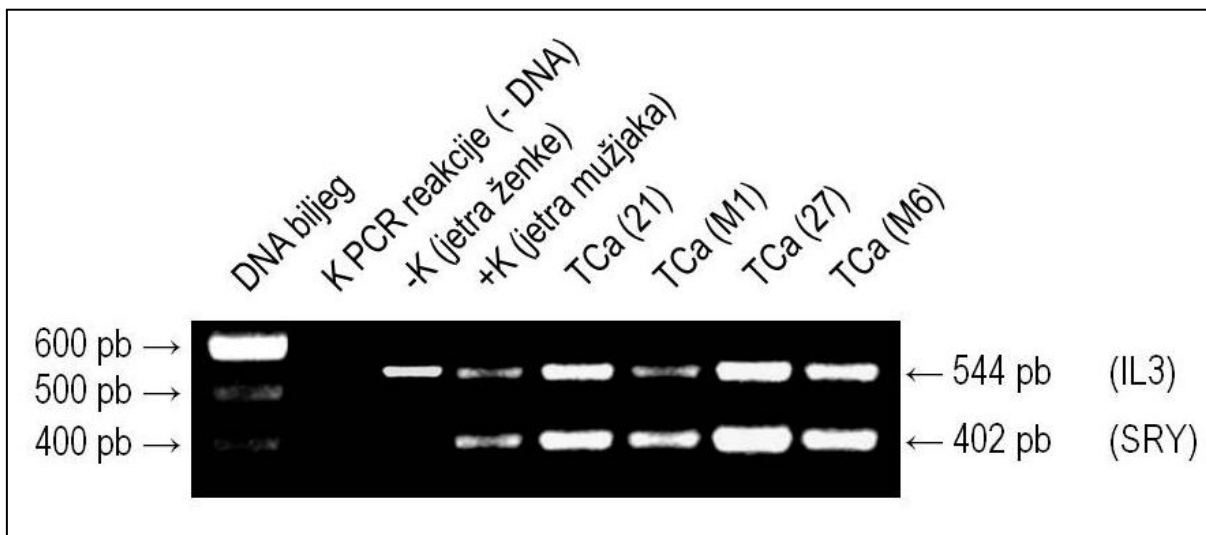
Slika 26. Prikaz EMA-1 i Ki-67 pozitivnih stanica eksperimentalnog teratokarcinoma (x200). A: EMA-1 (FITC), B: Integrirana slika EMA-1 i DAPI, C: Ki-67 (Cy5), D: Integrirana slika Ki-67 i DAPI, E: Integrirana slika kolokalizacije EMA-1 i Ki-67, F: Integrirana slika EMA-1, Ki-67 i DAPI. Stanice koje ispoljavaju oba biljega (vrh strelice), stanice koje ne ispoljavaju niti jedan biljeg (strelica).



Slika 27. SSEA-3 pozitivne stanice u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (DAB, kontrastirano hemalaunom). A: Granično područje između pozitivnog bubrega (*) i teratokarcinoma s pojedinačnim pozitivnim (strelica) i prevladavajućim negativnim stanicama (vrh strelice) (x100). B: Nakupina pozitivnih stanica u TCa (strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x200). C: Pojedinačne pozitivne stanice u teratokarcinomu (strelica), negativna stanica (vrh strelice) (x100). D: Područje SSEA-3 negativnih stanica TCa (x100).

4.2. Determinacija spola eksperimentalnog teratokarcinoma

Određivanje spola teratokarcinoma multipleks-PCR-om (Slika 28.) pokazalo je da su svi eksperimentalni teratokarcinomi miša muškoga spola (Tablica 14.) odnosno da isključivo zamci muškog spola imaju potencijal transformacije u teratokarcinom.



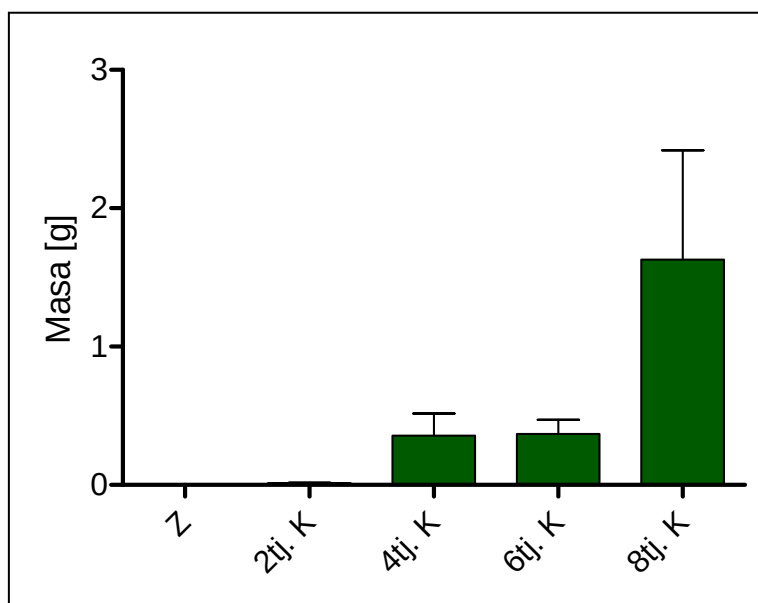
Slika 28. Ogledni primjerak elektroforetskog gela dobivenog u postupku određivanja spola teratokarcinoma nakon PCR analize.

Tablica 14. Broj analiziranih teratokarcinoma i rezultati determinacije spola.

	KONTROLA				5azaC			UKUPNO
	2tj.	4tj.	6tj.	8tj.	4tj.	6tj.	8tj.	
Broj analiziranih uzoraka	4	4	4	4	-	4	4	24
Broj uzoraka IL3+	4	4	4	4	-	4	4	24
Broj uzoraka SRY+	4	4	4	4	-	4	4	24
Udio kariotipa XX	0%	0%	0%	0%	-	0%	0%	0%
Udio kariotipa XY	100%	100%	100%	100%	-	100%	100%	100%

4.3. Rast eksperimentalnog teratokarcinoma

Tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalni teratokarcinomi miša pokazuju statistički značajan rast ($p < 0,0001$, 1way ANOVA) koji nije linearan (Slika 29.). Naime, kontrolne skupine teratokarcinoma pokazuju dva perioda statistički značajnoga rasta, između drugog i četvrtog te šestog i osmog tjedna razvoja tumora (Tablica 15.). U među periodu, između četvrtog i šestog tjedna razvoja, prisutan je plato rasta u kojem nema promjene tumorske mase.



Slika 29. Rast TCa u kontrolnim skupinama tijekom 8 tjedana razvoja.

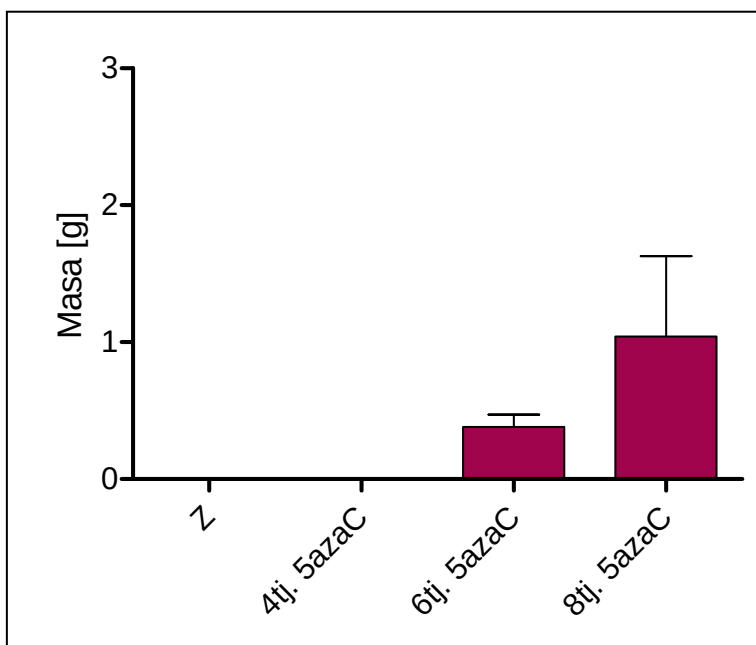
Tablica 15. Rast TCa u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,0005$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
4tj. K		$p=0,4329$	$p=0,0346$
6tj. K			$p=0,0345$

Mann Whitneyev test.

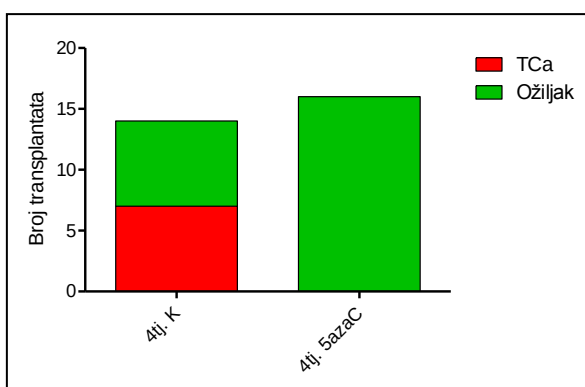
4.4. Učinak 5-azacitidina na rast eksperimentalnog teratokarcinoma

Analizom rasta teratokarcinoma otkriveno je da je 5azaC primijenjen neposredno po transplantaciji spriječio razvoj teratokarcinoma iz zametka te značajno smanjio rast teratokarcinoma ako je bio tretiran već razvijeni tumor (Slika 30.)



Slika 30. Rast teratokarcinoma u 5azaC tretiranim skupinama.

Drastičan učinak 5azaC-a uočen je u skupini 4tj. 5azaC odnosno skupini u kojoj su životinje primatelji zametka tretirane s 5azaC-om neposredno nakon transplantacije. Naime, 5azaC je uzrokovao potpunu resorpciju zametka s izostankom razvoja tumora (Slika 30.). Dobivena je statistički značajna razlika u usporedbi s brojem dobivenih tumora u kontrolnoj 4tj. K skupini ($\chi^2 < 0.0017$, Fisher's exact test) (Slika 31.)



Slika 31. Broj transplantiranih zametaka i broj razvijenih tumora nakon četiri tjedna razvoja.

U rastu teratokarcinoma u 6tj. 5azaC skupini, u kojoj je tretiranje s 5azaC započeto dva tjedna nakon transplantacije odnosno neposredno pred prvi period intenzivnog rasta, nije zabilježen zastoj u usporedbi s kontrolnom 6tj. K skupinom. Teratokarcinomi 6tj. 5azaC skupine statistički su značajno veći od teratokarcinoma 2tj. K skupine (Tablica 16.) što ukazuje da 5azaC nije utjecao na prvi period intenzivnog rasta tumora.

Drastičan učinak 5azaC na rast razvijenog teratokarcinoma uočen je u 8tj. 5azaC skupini u kojoj je 5azaC tretman započet u četvrtom tjednu razvoja teratokarcinoma odnosno dva tjedna pred drugi period intenzivnog rasta. Mase tumora 8tj. 5azaC skupine pokazale su se statistički značajno manjima od masa tumora kontrolne 8tj. K skupine ($p=0,0070$). Izostao je također statistički značajan rast tumora 8tj. 5azaC skupine naspram 4tj. K skupine ($p=0,5000$) (Tablica 16.). Teratokarcinomi 8tj. 5azaC skupine se tumorskom masom ne razlikuju od 6tj. 5azaC skupine ($p=0,1477$) dočim u kontrolama postoji statistički značajna razlika između teratokarcinoma 6tj. K i 8tj. K skupina (Tablica 15.).

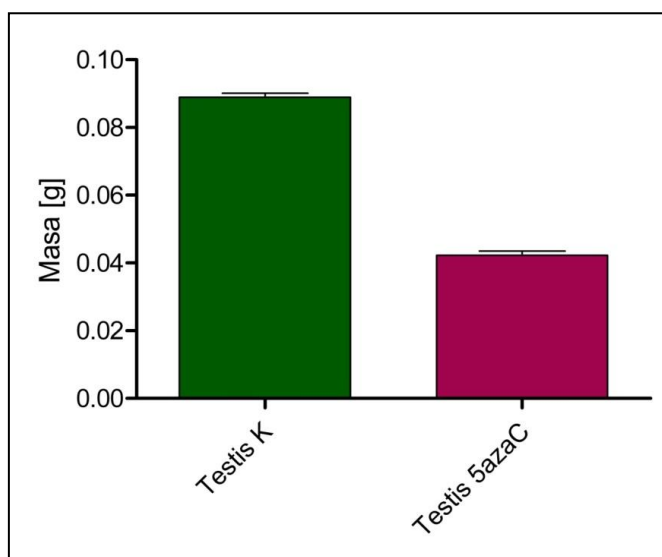
Tablica 16. Usporedbe rasta TCa u kontrolnih i 5azaC tretiranih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	$p<0,0001$	$p=0,1708$	$p=0,3317$	
8tj. 5azaC		$p=0,5000$	$p=0,2462$	$p=0,0070$

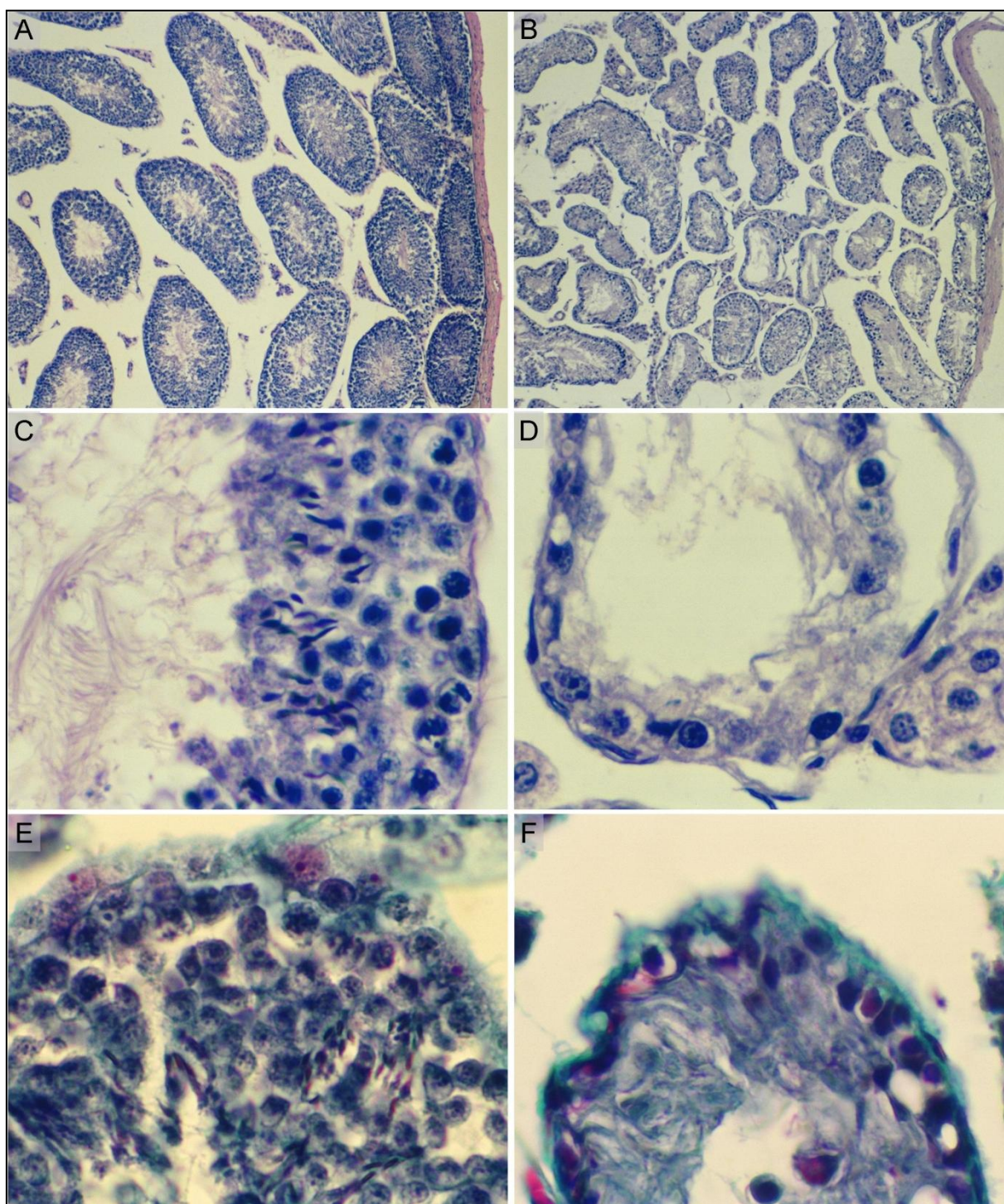
Mann Whitneyev test.

4.5. Učinak 5-azacitidina na testis

Budući da je poznato da 5azaC potiče drastičan gubitak mase testikularnog tkiva odrasle jedinke, mase testisa tretiranih životinja korištene su kao kontrole 5azaC tretmana. Nakon tretmana s 5azaC, u svih je životinja zabilježen statistički značajan pad mase testisa u usporedbi s testisima životinja kontrolnih skupina ($p < 0,0001$, Mann Whitney test) (Slika 32.). Nadalje, analizom histoloških preparata utvrđena je drastično poremećena arhitektura testikularnog tkiva tretiranih životinja (Slika 33.). Time je potvrđena biološka djelotvornost doze 5 mg/kg 5azaC te učinkovitost i.p. administracije agensa.



Slika 32. Mase testisa životinja kontrolne skupine i životinja tretiranih 5-azacitidinom.

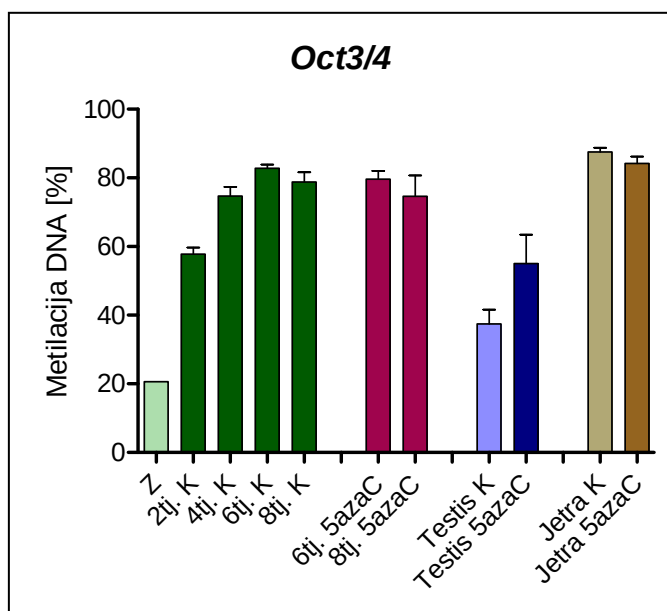


Slika 33. Testis životinja kontrolne (A, C i E) i 5azaC-om tretirane (B, D i F) skupine. A i B: Sjemeni kanalići (HE, x40). C: Vidljivi svi stadiji spermatogeneze (HE, x400). D: Poremećena arhitektura testikularnog tkiva bez vidljivih stadija razvoja spermija (HE, x400). E i F: Detalj sjemenih kanalića (Masson, x400).

4.6. Metilacija DNA u eksperimentalnom teratokarcinomu

Metilacijski statusi analizirani su metodom pirosekvenciranja koji izražava postotak stanica s metiliranom odnosno demetiliranom analiziranom sekvencom u ispitanom uzorku tkiva. Istražen je metilacijski status promotora gena kao i status globalne metilacije DNA (Tablica 6.). Analiza metilacije DNA provedena je u stanicama zametka, tkivima teratokarcinoma na različitom stupnju razvoja i tkivima teratokarcinoma 5azaC-om tretiranih životinja. Analizirani su i 5azaC osjetljivo tkivo testisa te 5azaC neosjetljivo tkivo jetre.

4.6.1. Metilacija DNA promotora gena *Oct3/4*



Slika 34. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Oct3/4*.

Stupanj metilacije DNA promotorske regije gena matičnosti *Oct3/4* u konstantnom je statistički značajnom porastu tijekom razvoja teratokarcinoma ($p=0,0134$, 1way ANOVA) (Slika 34.). U zametku su izmjerene najniže vrijednosti, najintenzivniji porast metilacije u prva dva tjedna razvoja te maksimalna dostignuta vrijednost hipermetilacije u šestom tjednu razvoja. Kontinuirana hipermetilacija preklapa se s prvim periodom rasta tumora te zastojem u rastu teratokarcinoma do šestog tjedna razvoja tumora. Postizanje maksimalne hipermetiliranosti u šestom tjednu, uvjetuje stabilizaciju razine metilacije DNA s formiranjem metilacijskog platoa (Tablica 17.). Stupanj metiliranosti DNA na kojem se uspostavlja metilacijski plato preklapa se s drugim periodom intenzivnog rasta teratokarcinoma (Slika 30.).

Tablica 17. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,0333$	$p=0,0571$	$p=0,0238$
4tj. K		$p=0,0121$	$p=0,3660$
6tj. K			$p=0,3524$

Mann Whitneyev test.

Dostignute razine metiliranosti DNA u pojedinom periodu razvoja tumora u kompleksnom su korelacijskom odnosu s porastom tumorske mase. Naime, negativne korelacije stupnja hipermetilacije DNA i tumorske mase zabilježene su nakon oba perioda intenzivnog rasta upućujući na ovisnost intenziteta rasta tumora o stupnju postignute hipermetiliranosti u promotorskoj regiji gena matičnosti *Oct3/4* (Slika 35.).

Tumorsko tkivo pokazuje intenzivnu hipermetilacijsku aktivnost naspram testisu već u najranijoj fazi razvoja sa statistički značajnom hipermetilacijom od četvrtog tjedna nadalje (Tablica 18.). Uspostavom metilacijskog platoa, promotor gena *Oct3/4* pokazuje jednak stupanj hipermetiliranosti kao i jetreno tkivo.

Tablica 18. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	$p=1,000$	$p=0,0167$	$p=0,0571$	$p=0,0238$

Mann Whitneyev test.

Razlika stupnja metiliranosti promotorske regije gena matičnosti *Oct3/4* u teratokarcinoma skupine 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC ne pokazuje statističku značajnost ($p=1,0000$). U usporedbi s obrascem promjene metilacije DNA promotorske regija gena matičnosti *Oct3/4* zabilježenog u kontrolnim skupinama, 5azaC je ublažio porast metilacije DNA iako nije pronađena statistički značajna razlika (Slika 34., Tablica 19.). Promjena stupnja metilacije u tumorima 5azaC tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K *vs.* 6tj. 5azaC, 4tj. K *vs.* 8tj. 5azaC).

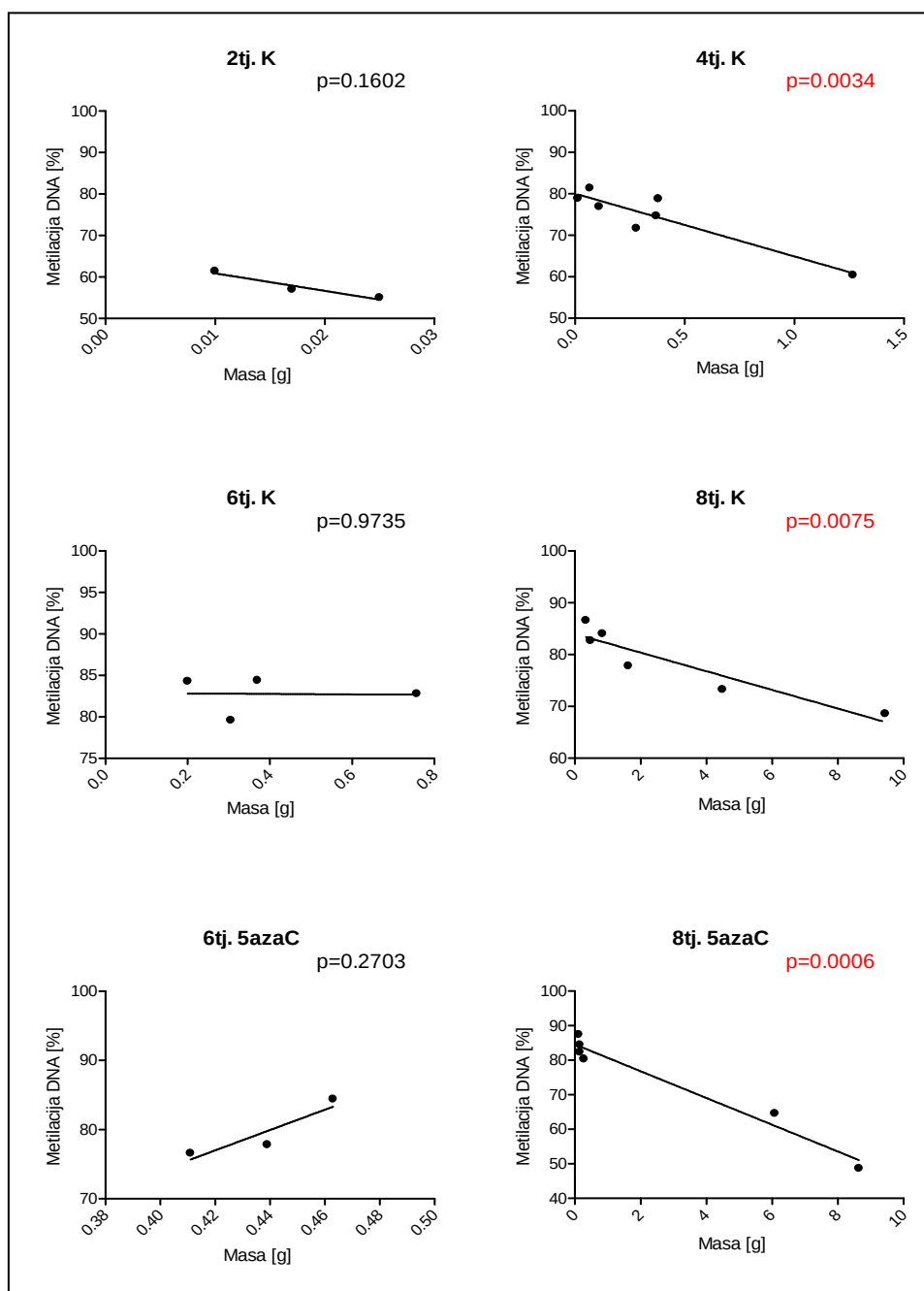
Tablica 19. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	$p=0,1000$	$p=0,5167$	$p=0,4755$	
8tj. 5azaC		$p=0,3660$	$p=0,6689$	$p=0,9372$

Mann Whitneyev test.

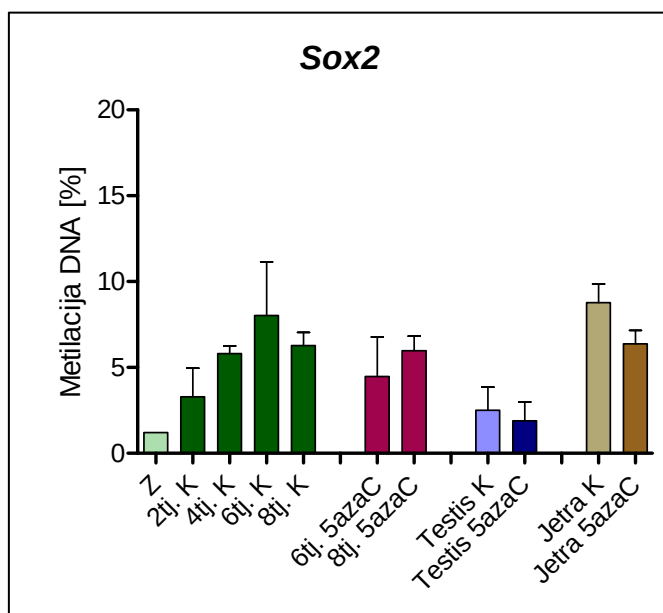
Tretman s 5azaC dodatno je statistički učvrstio navedenu povezanost tumorskoga rasta i postignute hipermetiliranosti gena matičnosti *Oct3/4* budući da je uspostavljeni metilacijski plato pod 5azaC tretmanom ponovno korelirao s tumorskim rastom (Slika 35.).

Testikularno tkivo osjetljivo na 5azaC reagiralo je statistički značajnom hipermetilacijom gena matičnosti *Oct3/4* na tretman ($p=0,0238$), dok je proliferacijski mirno tkivo jetre, uz blagi pad metilacije, ostalo hipermetilirano kao i u kontrolnim skupinama.



Slika 35. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.2. Metilacija DNA promotora gena *Sox2*



Slika 36. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Sox2*.

Gen jezgre matičnosti *Sox2* u uskoj je vezi s genom *Oct3/4*. Stoga ne začuđuje da je obrazac promjene metilacije DNA promotorske regije gena *Sox2* tijekom razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša istovjetan ranije opisanom obrascu promjene metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4*. Naime, iako statistički nije pronađena značajnost tijekom osmotjednog razvoja tumora ($p=0,2704$, 1way ANOVA), prisutna je konstantna hipermetilacijska aktivnost na promotoru *Sox2* do šestog tjedna razvoja tumora kada se uspostavlja metilacijski plato (Slika 36., Tablica 20.).

Tablica 20. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Sox2* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,1373$	$p=0,1771$	$p=0,2619$
4tj. K		$p=0,4318$	$p=0,8299$
6tj. K			$p=0,3662$

Mann Whitneyev test.

Analizom korelacija tumorske mase i stupnja metilacije DNA gena *Sox2* također nisu pronađene statistički značajne povezanosti iako tumori pokazuju negativnu korelaciju stupnja metiliranosti promotora *Sox2* i mase teratokarcinoma (Slika 37.). Navedeni obrazac korelacije također je uočen kod promotora *Oct3/4*.

Odnos metilacijskog statusa gena matičnosti *Sox2* testikularnog tkiva i teratokarcinoma tijekom razvoja također oponaša obrazac opisan u promotora gena *Oct3/4*. Naime, testikularno tkivo pokazuje viši stupanj metilacije DNA prema zametku, dok tumorsko tkivo pokazuje intenzivnu hipermetilacijsku aktivnost

prema testisu već u najranijoj fazi razvoja sa statistički značajnom hipermetilacijom od četvrtog tjedna nadalje (Tablica 21.). Također, u periodu najvišeg stupnja metilacije, promotorska regija gena jezgre matičnosti β 2 pokazuje jednak stupanj metiliranosti kao i jetreno tkivo.

Tablica 21. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena β 2 u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,6531	p=0,0299	p=0,1771	p=0,0476

Mann Whitneyev test.

Razlika stupnja metiliranosti promotorske regije gena matičnosti β 2 u teratokarcinoma skupine 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC ne pokazuje statističku značajnost (p=0,7143). Nadalje, 5azaC ublažio je poraste metilacije gena β 2 iako nije pronađena statistički značajna razlika u odnosu na promjene metilacije DNA zabilježe u kontrolnim skupinama (Slika 36., Tablica 22.). Ipak, porast stupnja metilacije u tumorima 5azaC tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K vs. 6tj. 5azaC, 4tj. K vs. 8tj. 5azaC).

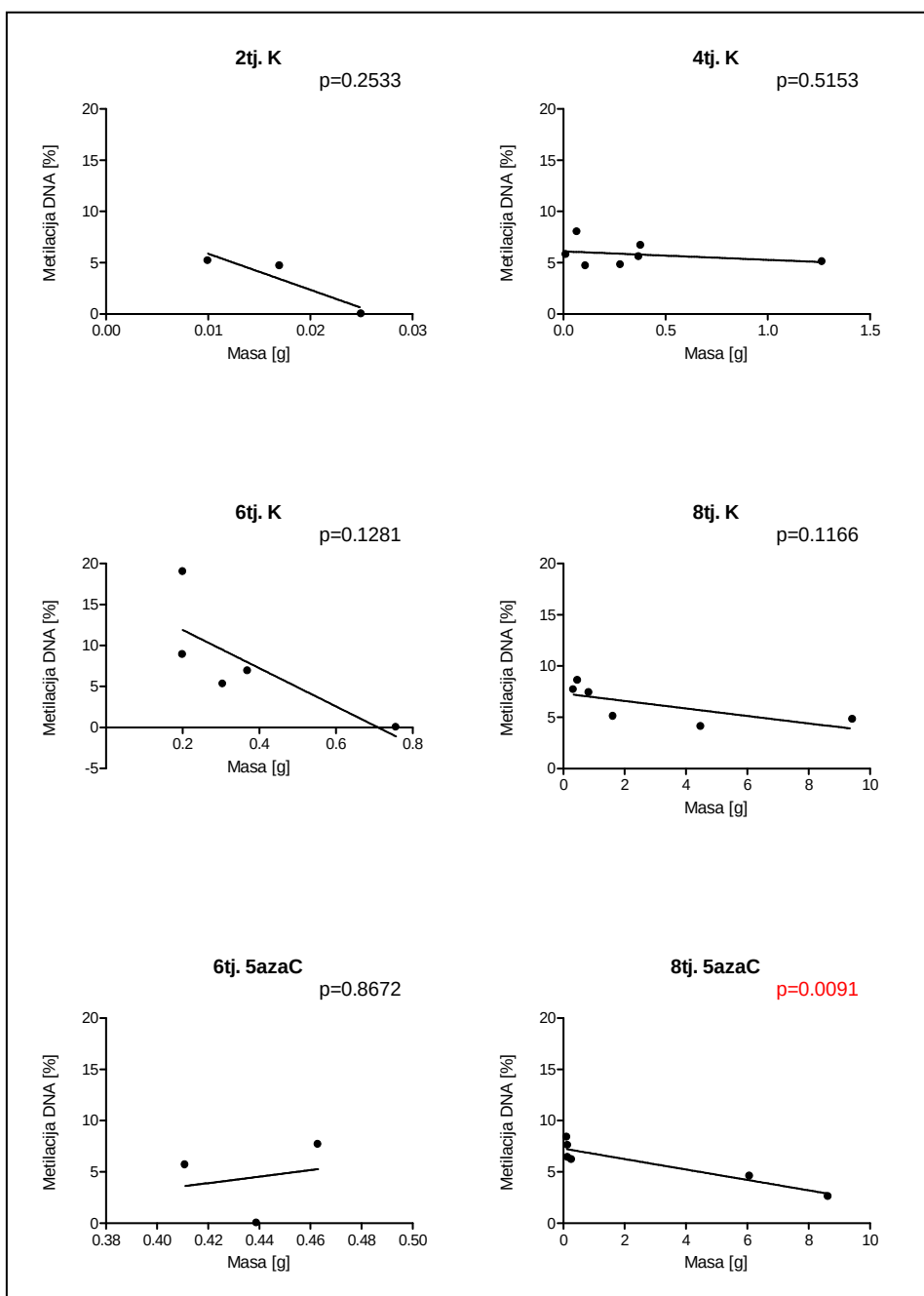
Tablica 22. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena β 2 u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,5066	p=1,0000	p=0,6528	
8tj. 5azaC		p=0,8357	p=0,6623	p=0,8182

Mann Whitneyev test.

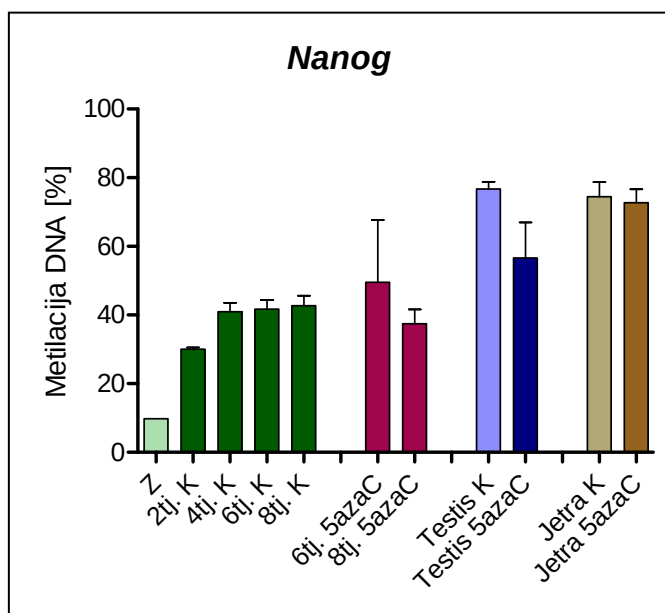
Tretman s 5azaC naglašava negativnu korelaciju tumorskoga rasta i postignute hipermetiliranosti gena matičnosti β 2 budući da je uspostavljeni metilacijski plato pod 5azaC tretmanom korelirao s tumorskim rastom u osmom tjednu razvoja tumora (Slika 37.).

5azaC osjetljivo testikularno tkivo reagiralo je blagom hipometilacijom gena matičnosti β 2 (p=0,8248). Proliferacijski mirno tkivo jetre također pokazuje blagi stupanj hipometilacije naspram jetre u kontrolnim skupinama.



Slika 37. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Sox2* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.3. Metilacija DNA promotora gena *Nanog*



Slika 38. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Nanog*.

Tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša prisutna je blaga i statistički neznčajna metilacijska aktivnost na promotorskoj regiji gena jezgre matičnosti *Nanog* ($p=0,0828$, 1way ANOVA) (Slika 38.). Statistička analiza podataka opisuje metilacijski plato tijekom cijelog razvoja teratokarcinoma s jedinom značajnom razlikom između metilacijskog statusa DNA promotora *Nanog* u teratokarcinoma s početka (2tj. K) i kraja (8tj. K) razvoja tumora (Tablica 23.).

Tablica 23. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Nanog* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,0667$	$p=0,1000$	$p=0,0238$
4tj. K		$p=1,0000$	$p=0,8357$
6tj. K			$p=1,0000$

Mann Whitneyev test.

Negativne korelacije stupnja metilacije DNA i tumorske mase zabilježene su u najranijem periodu razvoja tumora odnosno u četvrtom tjednu razvoja. Navedeno upućuje na ovisnost intenziteta ranog rasta tumora o stupnju hipometilacije promotorske regije gena matičnosti *Nanog* u najranijoj fazi tumorigeneze teratokarcinoma (Slika 39.).

Zametak pokazuje izrazito niži stupanj metiliranosti DNA prema testikularnom tkivu. Teratokarcinomi su tijekom cijelog razvoja također u izrazitoj hipometilaciji promotora gena *Nanog* u usporedbi s testikularnom tkivu. Tumorska hipometilacija statistički je značajna neposredno nakon oba perioda intenzivnog rasta tumora (Tablica 24.). Kontrolni testisi pokazuju izrazito visok stupanj metilacije

promotorske regije gena jezgre matičnosti *Nanog* te im je razina hipermetilacije jednaka stupnju metiliranosti u kontrolnom jetrenom tkivu.

Tablica 24. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Nanog* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,1000	p=0,0167	p=0,1000	p=0,0238

Mann Whitneyev test.

5azaC potaknuo je blagi porast stupnja metilacije promotorske regije gena matičnosti *Nanog* u tumora skupine 6tj. 5azaC ali s izmjerenom velikom varijacijom među tumorima iste skupine. Teratokarcinomi životinja skupine 8tj. 5azaC pokazuju blagi pad metilacije naspram kontrolnoj skupini sa stabilnijom varijacijom. Kako bilo, nije pronađena statistički značajna razlika u metilacijskom statusu teratokarcinoma skupine 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC (p=0,9048) kao ni 5azaC tretiranih tumora i kontrolnih skupina (Tablica 25.). Statistička značajnost nije pronađena ni usporedbom stupnja metilacije u tumorima 5azaC tretiranih životinja i razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K *vs.* 6tj. 5azaC, 4tj. K *vs.* 8tj. 5azaC).

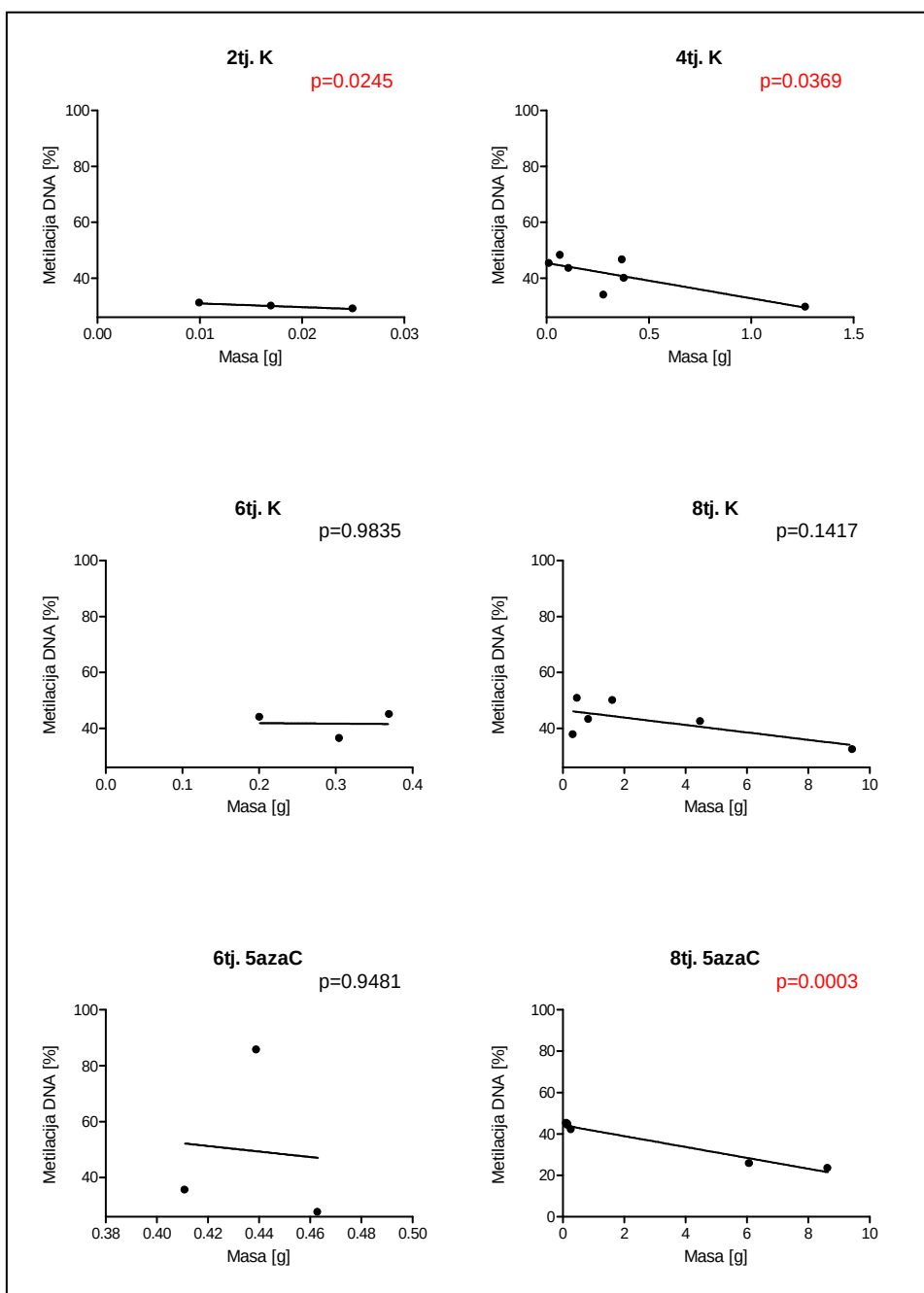
Tablica 25. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Nanog* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,7000	p=0,8333	p=0,7000	
8tj. 5azaC		p=0,4452	p=0,9048	p=0,5887

Mann Whitneyev test.

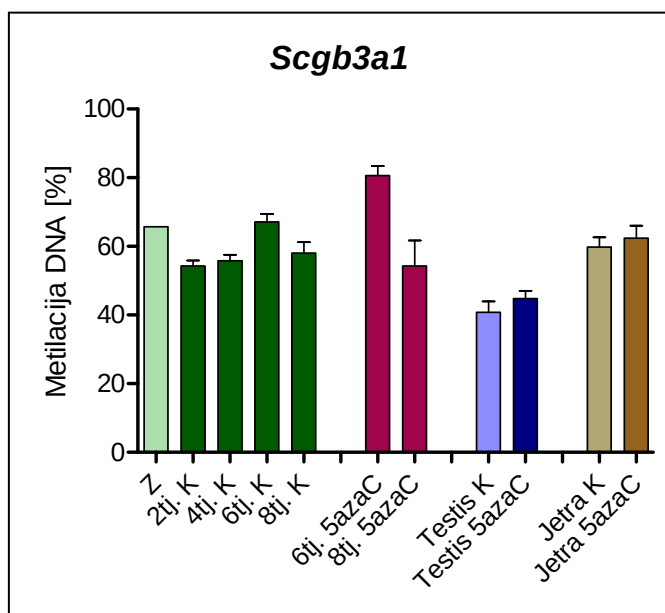
Opisana blaga 5azaC izazvana hipometilacija promotora *Nanog* u teratokarcinoma skupine 8tj. 5azaC čini se statistički značajno negativno korelira s tumorskom masom (Slika 39.).

5azaC osjetljivo testikularno tkivo reagiralo je blagom statistički neznačajnom hipometilacijom gena matičnosti *Nanog* na tretman (p=0,4000), dok je proliferacijski mirno tkivo jetre, ostalo hipermetilirano kao i u kontrolnim skupinama.



Slika 39. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Nanog* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.4. Metilacija DNA promotora gena *Scgb3a1*



Slika 40. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Scgb3a1*.

Pregledom izmjerenih razina metilacije DNA promotorske regije gena *Scgb3a1* primjetna je, u usporedbi s razinom metilacije zametka, početna hipometilacija promotorske regije do drugog tjedna razvoja teratokarcinoma s blagim porastom metilacije tijekom većine osmotjednog razvoja. Ipak, nije utvrđena statistički značajna promjena razine metilacije DNA promotora gena *Scgb3a1* tijekom razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša ($p=0,1538$, 1way ANOVA) (Slika 40., Tablica 26.).

Tablica 26. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Scgb3a1* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p= 0,8333$	$p= 0,1000$	$p= 0,5476$
4tj. K		$p= 0,0167$	$p= 0,9452$
6tj. K			$p= 0,2619$

Mann Whitneyev test.

Budući da se tijekom razvoja teratokarcinoma ne odvija statistički značajna promjena metilacije promotorske regije gena *Scgb3a1*, korelacija se stupnja metilacije DNA i tumorske mase gubi u najranijoj fazi razvoja nakon drugog tjedna (Slika 41.).

Zametak pokazuje izrazito viši stupanj metiliranosti DNA prema testikularnom tkivu. Tumori također pokazuju hipermetilaciju promotora *Scgb3a1* tijekom cijelog razvoja u usporedbi s testikularnim tkivom (Tablica 27.). Tumorska hipermetilacija statistički je značajna neposredno nakon oba perioda intenzivnog rasta tumora (Tablica 23.). U usporedbi testikularnog i jetrenog tkiva kontrolni testisi pokazuju hipometilaciju promotorske regije gena.

Tablica 27. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Scgb3a1* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,1000	p=0,0167	p=0,1000	p=0,0238

Mann Whitneyev test.

Iako razvijeni teratokarcinomi dviju skupina životinja tretiranih 5azaC-om pokazuju statistički značajnu razliku u metilacijskom statusu (p=0,0238) (Slika 40.), ne postoji statistički značajna razlika statusa metilacije DNA naspram odgovarajućih kontrolnih skupina (Tablica 28.). Statistička značajnost nije pronađena ni usporedbom stupnja metilacije u tumorima 5azaC-om tretiranih životinja i razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K vs. 6tj. 5azaC, 4tj. K vs. 8tj. 5azaC).

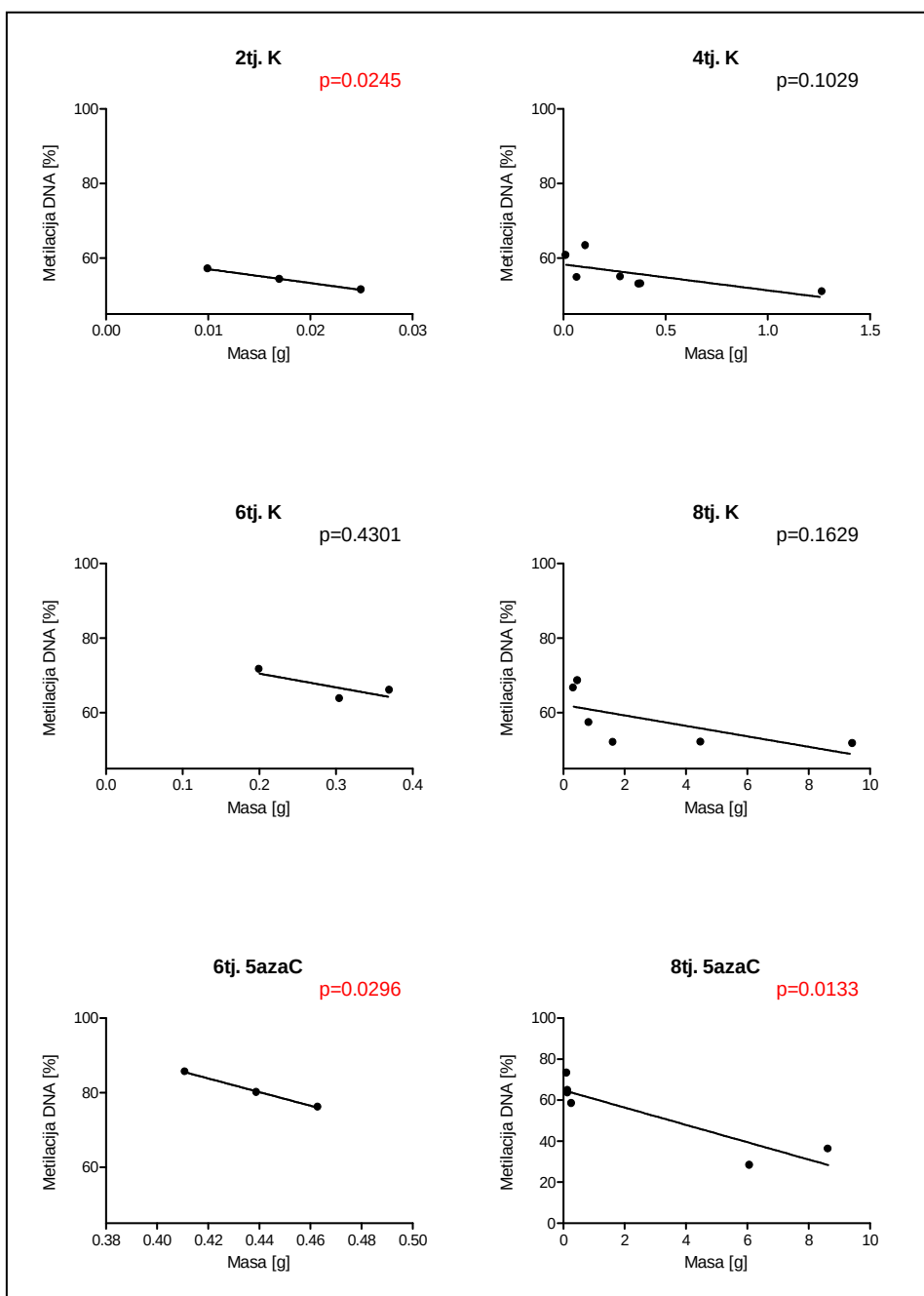
Tablica 28. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Scgb3a1* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,1000	p=0,0167	p=0,1000	
8tj. 5azaC		p=0,5338	p=0,3810	p=1,0000

Mann Whitneyev test.

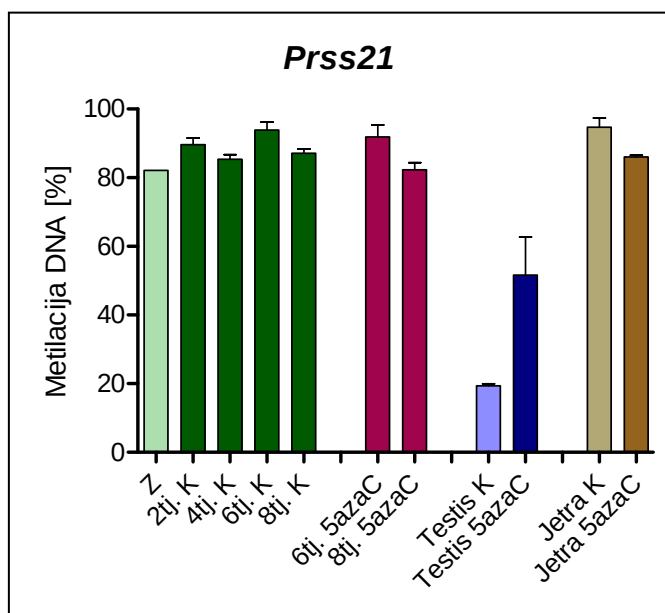
Kontroverzan učinak 5azaC-a na razinu metilacije promotorske regije gena *Scgb3a1* čini se uzrokom ponovne uspostave statistički značajne negativne korelacije razine metilacije DNA i tumorske mase. Naime, hipermetilacija teratokarcinoma statistički značajno negativno korelira tumorskoj masi teratokarcinoma skupina 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC (Slika 41.).

5azaC osjetljivo testikularno tkivo reagiralo je blagom statistički neznačajnom hipermetilacijom gena *Scgb3a1* na tretman (p=0,4000). Jednako blag odgovor zabilježen je i u proliferacijski mirnom tkivu jetre.



Slika 41. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Scgb3a1* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.5. Metilacija DNA promotora gena *Prss21*



Slika 42. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Prss21*.

Promotorska regija gena *Prss21* koji kodira za protein Testisin pokazuje izrazito visok stupanj metilacije DNA u tkivu zametka. Embrionalna hipermetilacija gena *Prss21* zadržana je tijekom čitavog osmotjednog razvoja teratokarcinoma ($p=0,0622$, 1way ANOVA) bez statistički značajnih razlika među pojedinim kontrolnim skupinama, kao i korelacijskih odnosa prema masi tumora (Slika 42. i 43., Tablica 29.).

Tablica 29. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Prss21* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,1429$	$p=0,4000$	$p=0,2788$
4tj. K		$p=0,0357$	$p=0,3543$
6tj. K			$p=0,0848$

Mann Whitneyev test.

Teratokarcinom pokazuje značajno viši stupanj metiliranosti odnosno hipermetilaciju promotorske regije gena *Prss21* u usporedbi s testikularnim tkivom (Tablica 30.). Hipermetilacija gena *Prss21* naspram testikularnom pronađena je i u jetrenom tkivu.

Tablica 30. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Prss21* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	$p=0,1000$	$p=0,0357$	$p=0,1000$	$p=0,0121$

Mann Whitneyev test.

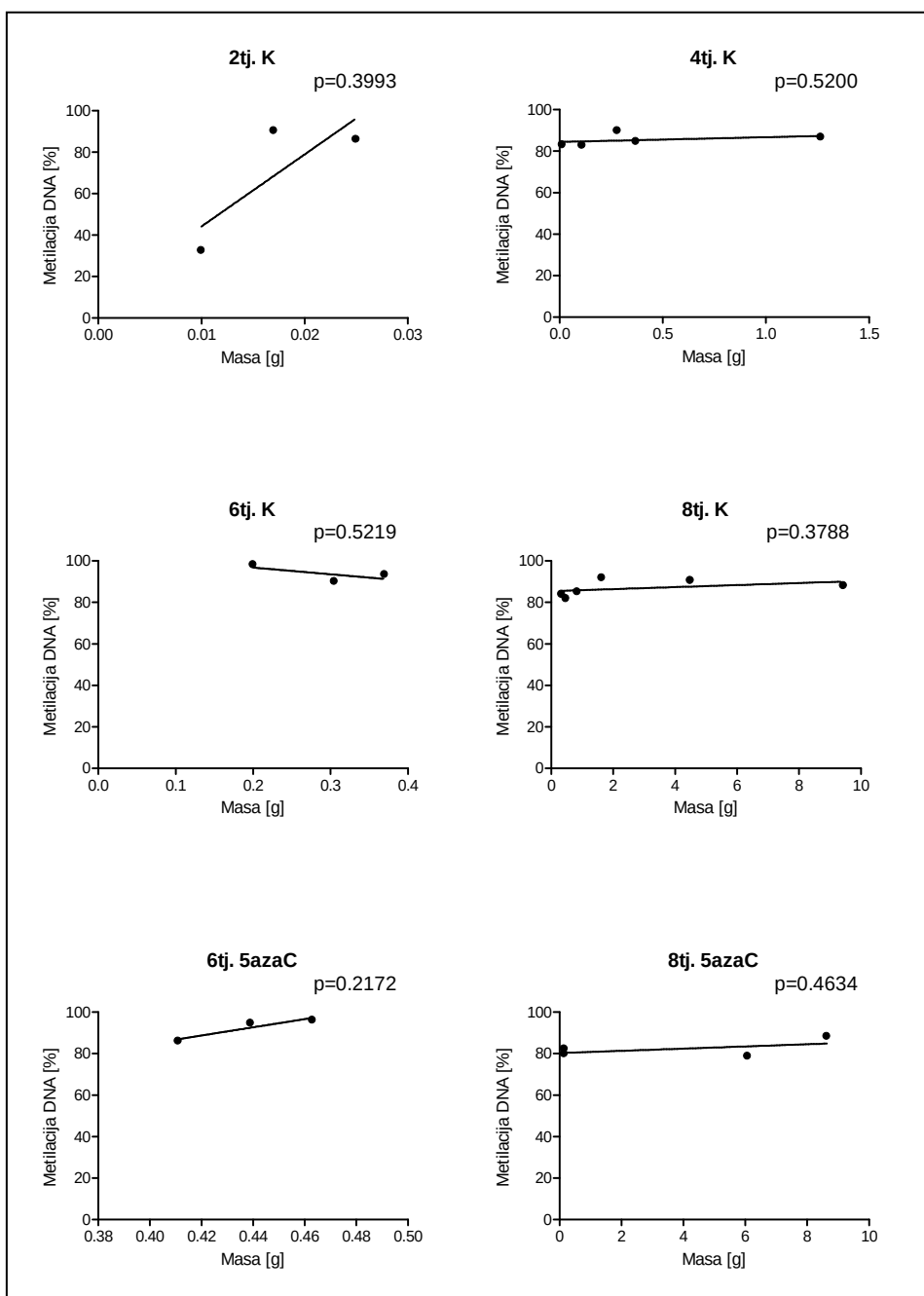
Analizom tumorskih tkiva životinja tretiranih 5azaC-om, uočeno je da razlika stupnja metiliranosti promotorske regije gena *Prss21* u teratokarcinoma skupine 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC ne pokazuje statističku značajnost ($p=0,1143$). Također, 5azaC nije inducirao nikakve promjene metilacijskog statusa gena *Prss21* u usporedbi s kontrolnim skupinama (Slika 42.). Promjena stupnja metilacije u tumorima 5azaC-om tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K vs. 6tj. 5azaC, 4tj. K vs. 8tj. 5azaC) (Tablica 31.). Suglasno kontrolnim skupinama, nije pronađen značajan korelacijski odnos stupnja metilacije gena *Prss21* i mase odnosno intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 43.).

Tablica 31. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Prss21* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	$p=0,7000$	$p=0,1429$	$p=0,1000$	
8tj. 5azaC		$p=0,1905$	$p=0,0571$	$p=0,1091$

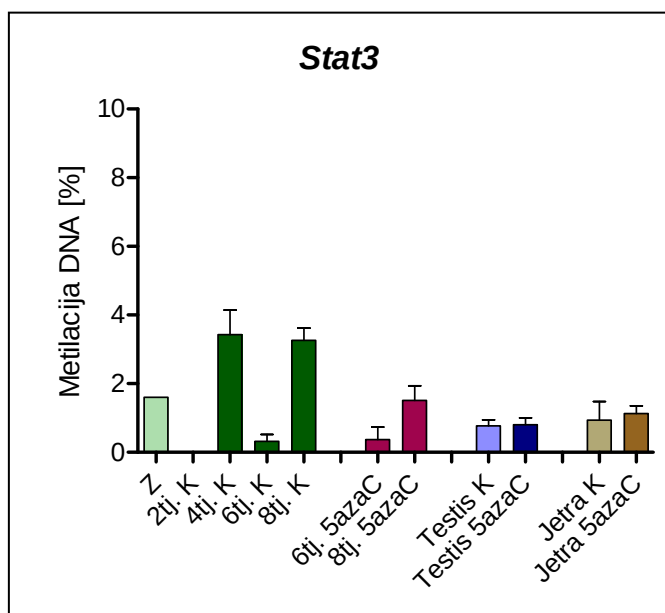
Mann Whitneyev test.

Iako je hipermetilacijski status gena *Prss21* održan u 5azaC-om tretiranom teratokarcinomu, testikularno tkivo 5azaC-om tretiranih životinja pokazuje porast metilacije promotora gena *Prss21*, iako statistički nije značajan ($p=0,1000$). Jetreno tkivo 5azaC-om tretiranih životinja pokazuje blagi pad stupnja metilacije DNA promotorske regije gena *Prss21* u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 43. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Prxs21* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.6. Metilacija DNA promotora gena *Stat3*



Slika 44. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Stat3*.

Iako je metilacija DNA promotorske regije gena *Stat3* prisutna u izrazito niskom postotku stanica analiziranih tkiva, od 0 do 4%, tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma pojavljuje se kompleksan obrazac statistički značajne promjene statusa metilacije DNA ($p=0,0052$, 1way ANOVA) (Slika 44.). Naime, iako je u zametku prisutan nizak stupanj metiliranosti promotora, teratokarcinom u drugom tjednu razvoja pokazuje demetilaciju gena *Stat3*. U skupinama 4tj. K i 8tj. K pronađene su najviše vrijednosti metilacije gena *Stat3*, dakle u periodima nakon oba razdoblja intenzivnog rasta, sa statistički značajnim padom metilacije u međuperiodu odnosno skupini 6tj.K (Tablica 32.).

Tablica 32. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Stat3* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	-	-	-
4tj. K		$p=0,0061$	$p=0,8299$
6tj. K			$p=0,0139$

Mann Whitneyev test

Korelacijske analize nisu pronašle povezanost statusa metilacije DNA promotorske regije gena *Stat3* i intenziteta rasta tumora (Slika 45.).

Uspoređujući metilacijski status gena *Stat3* teratokarcinoma i testikularnog tkiva, koje također pokazuje izrazito niske vrijednosti metilacije DNA, uočena je statistički značajna hipermetilacijska aktivnost ponovno u skupinama nakon intenzivnog rasta tumora odnosno 4tj. K i 8tj. K (Tablica 33.). Jetreno tkivo pokazuje niski stupanj metilacije promotorske regije gena *Stat3* poput testikularnog.

Tablica 33. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Stat3* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	-	$p=0,0167$	$p=0,2118$	$p=0,0238$

Mann Whitneyev test.

Razlika stupnja metiliranosti promotorske regije gena *Stat3* u teratokarcinoma skupine 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC ne pokazuje statističku značajnost ($p=0,0919$). 5azaC, čini se, nije imao značajne učinke na promjene metilacije DNA u prvom periodu rasta (Slika 44.). Naime, skupina 6tj. 5azaC pokazuje jednake odnose prema ostalim skupinama kao i kontrolna skupina 6tj. K. Tijekom drugog perioda rasta odnosno u skupini 8tj. 5azaC, teratokarcinom pokazuje demetilacijsku aktivnost na promotorskoj regiji gena *Stat3*. 5azaC statistički je značajno smanjio stupanj metilacije DNA u usporedbi s kontrolnom 8tj. K skupinom kao i skupinom koja odgovara tumorima s početka tretmana (4tj. K) (Tablica 34.).

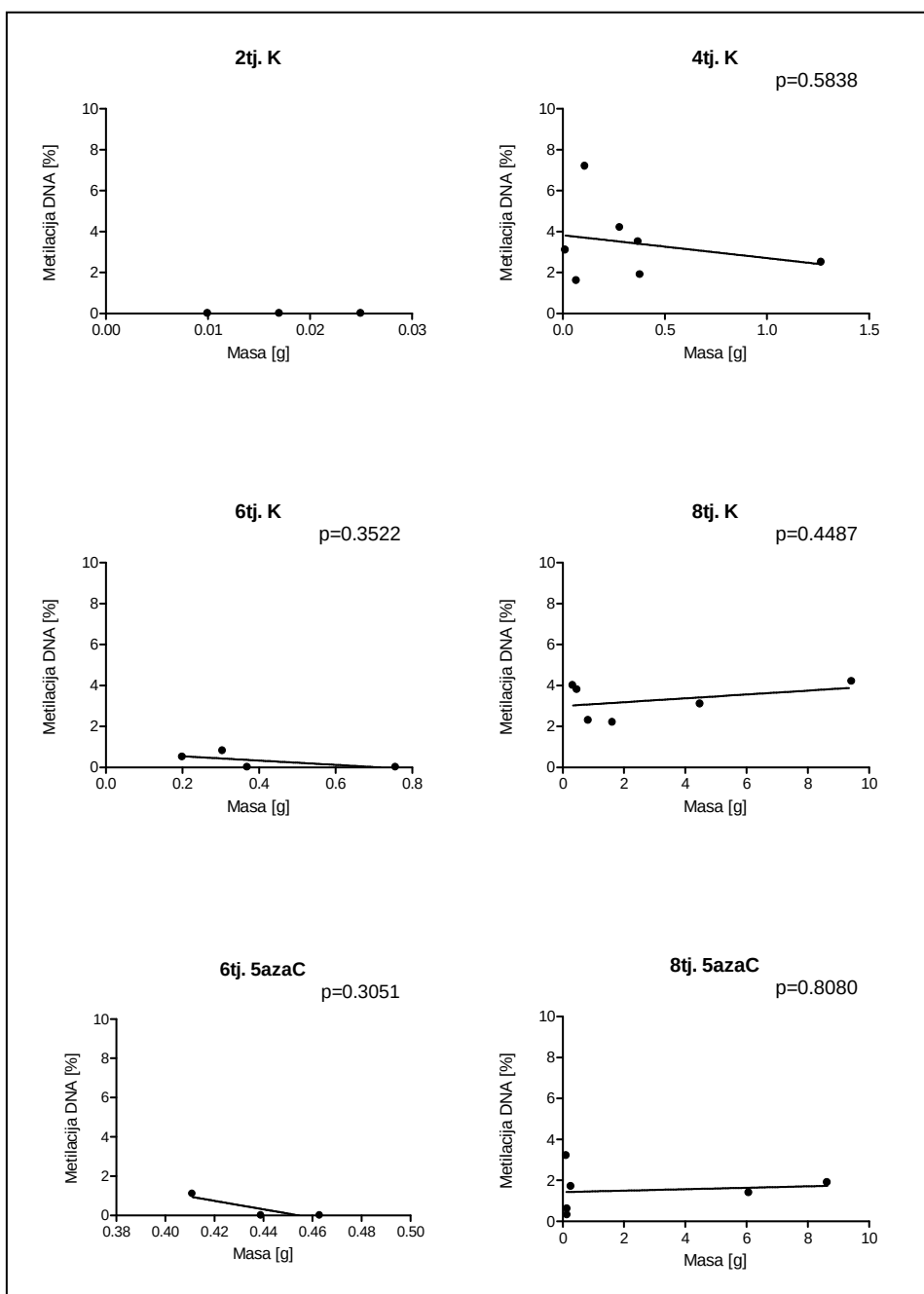
Tablica 34. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Stat3* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	-	$p=0,0167$	$p=0,8454$	
8tj. 5azaC		$p=0,0452$	$p=0,0691$	$p=0,0152$

Mann Whitneyev test.

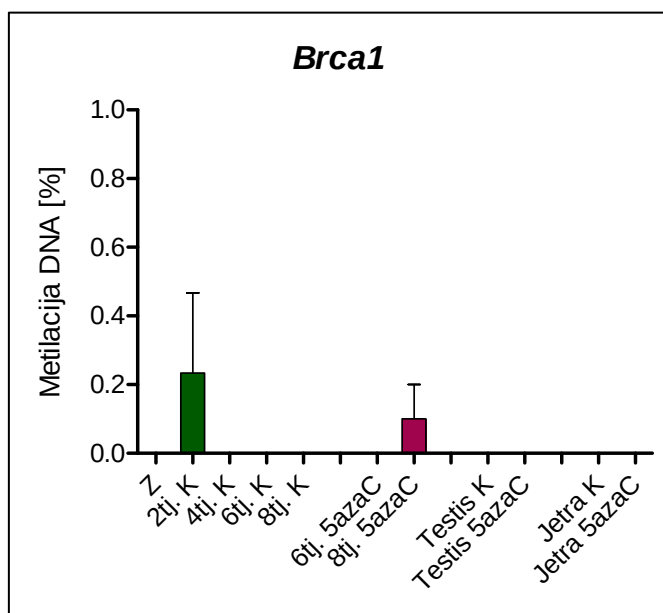
Ipak, nije pronađena značajna korelacija stupnja metiliranosti gena *Stat3* u 5azaC tretiranim tumorima i intenziteta tumorskog rasta (Slika 45.).

5azaC osjetljivo testikularno tkivo, kao ni jetreno tkivo, nije reagiralo promjenom stupnja metilacije DNA gena *Stat3* ($p=0,1000$).



Slika 45. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Stat3* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.7. Metilacija DNA promotora gena *Brca1*



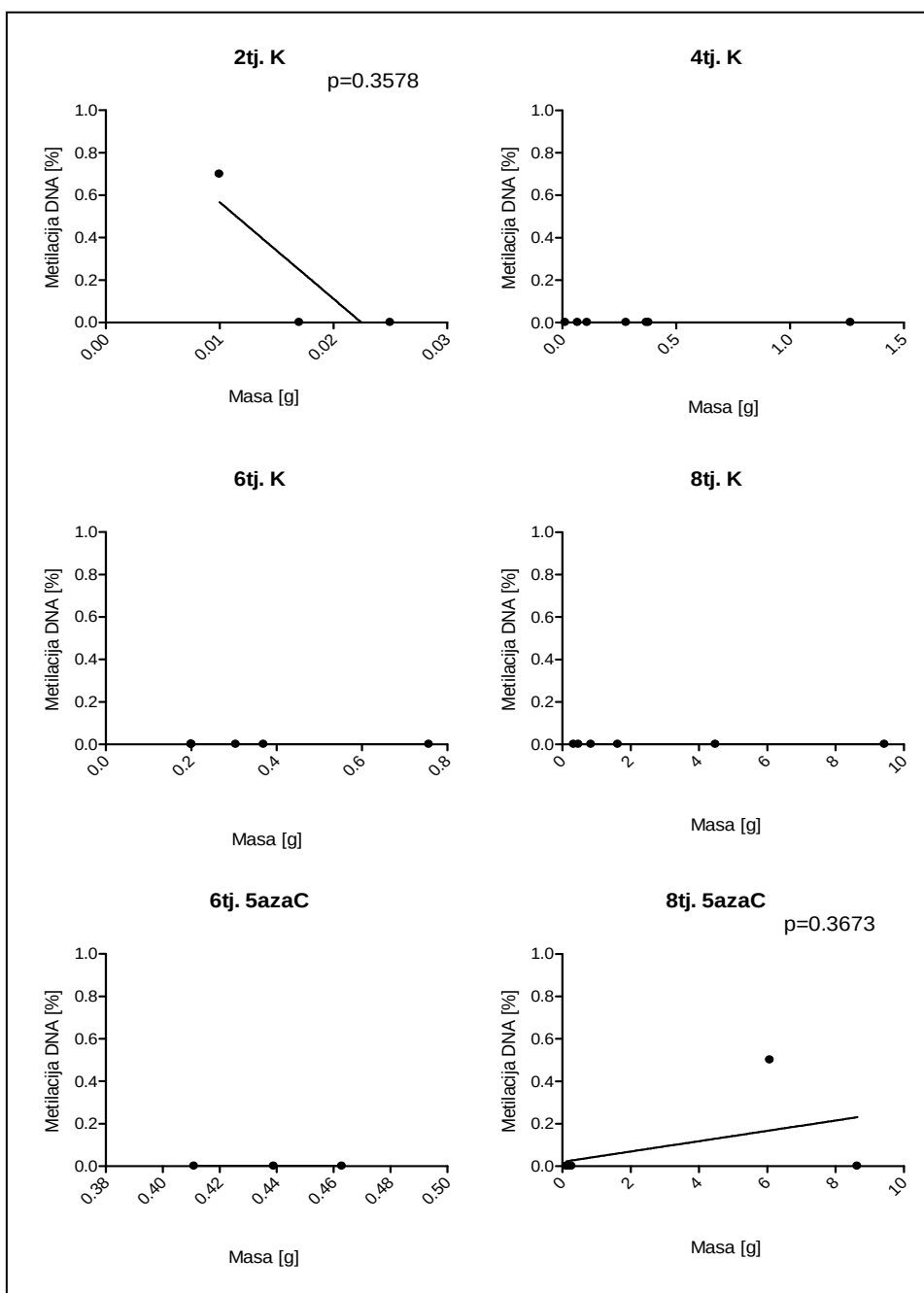
Slika 46. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Brca1*.

Tijekom cjelokupnog osmotjednog razvoja teratokarcinoma prisutna je potpuna demetilacija promotorske regije gena *Brca1*, s iznimkom jednog uzorka u skupini 2tj. K (Slika 46.). S obzirom na stabilnu demetiliranost tumorskog tkiva, nije pronađen korelacijski odnos metilacije DNA i intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 47.).

Testikularno i jetreno tkivo također pokazuju potpunu demetiliranost promotorske regije gena *Brca1* (Slika 46.).

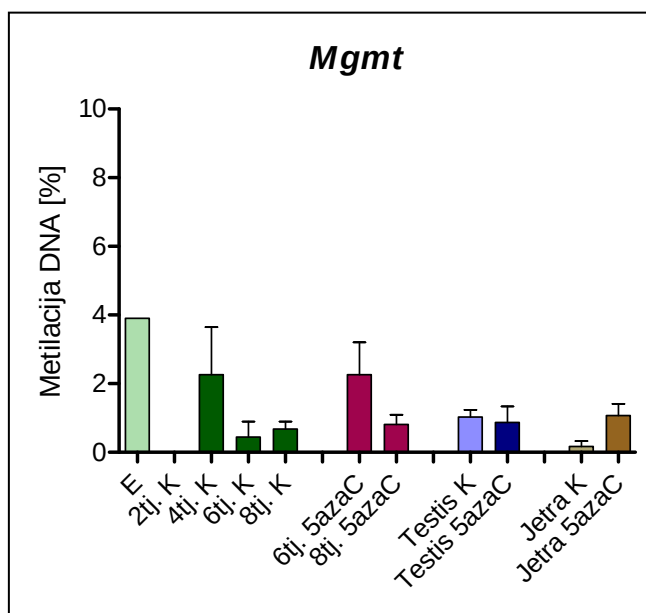
5azaC nije inducirao promjenu metilacijskog statusa promotora gena *Brca1*. Naime, i u 5azaC tretiranim tumorima pronađena je potpuna demetiliranost gena *Brca1*, s iznimkom jednog uzorka u skupini 8tj. 5azaC. S obzirom na stabilnu demetiliranost tumorskog tkiva, ponovno nije pronađen korelacijski odnos metilacije DNA i intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 46. i 47.).

5azaC nije inducirao promjenu metilacijskog statusa promotora gena *Brca1* ni u osjetljivom testikularnom tkivu niti u jetri (Slika 46.).



Slika 47. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Brca1* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.8. Metilacija DNA promotora gena *Mgmt*



Slika 48. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Mgmt*.

Metilacija DNA promotorske regije gena *Mgmt* prisutna je u izrazito niskom postotku stanica analiziranih tkiva, od 0 do 4% (Slika 48.). Tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma uočljiv je trend kontinuiranog pada metilacije DNA naspram embrionalnog tkiva iako opisani trend ne pokazuje statističku značajnost ($p=0,1084$, 1way ANOVA). Također nije pronađena statistički značajna promjena među pojedinim kontrolnim skupinama (Tablica 35.).

Tablica 35. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Mgmt* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	-	-	-
4tj. K		$p=0,1855$	$p=0,7119$
6tj. K			$p=0,4428$

Mann Whitneyev test.

Iako su korelacijski odnosi razine metilacije gena *Mgmt* i intenziteta rasta negativni u gotovo svim kontrolnim skupinama, opisane korelacije nisu statistički značajne (Slika 49.).

U usporedbi stupnja metiliranosti promotorske regije gena *Mgmt* teratokarcinomskog i testikularnog tkiva nisu pronađene statistički značajne razlike (Tablica 36.). Nadalje, dok je u zametku izmjeren najviši stupanj metiliranosti, jetreno tkivo pokazuje najnižu izmjerenu razinu metilacije gena *Mgmt*.

Tablica 36. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Mgmt* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	-	p=0,7946	p=0,3590	p=0,2938

Mann Whitneyev test.

Analizom tumorskih tkiva životinja tretiranih 5azaC-om uočeno je da 5azaC nije inducirao nikakve promjene metilacijskog statusa promotorske regije gena *Mgmt* među 5azaC-om tretiranim skupinama (p=0,2619), ali ni između 5azaC i kontrolnih skupina (Tablica 37.). Naime, stupanj metilacije u tumorima 5azaC-om tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K *vs.* 6tj. 5azaC, 4tj. K *vs.* 8tj. 5azaC).

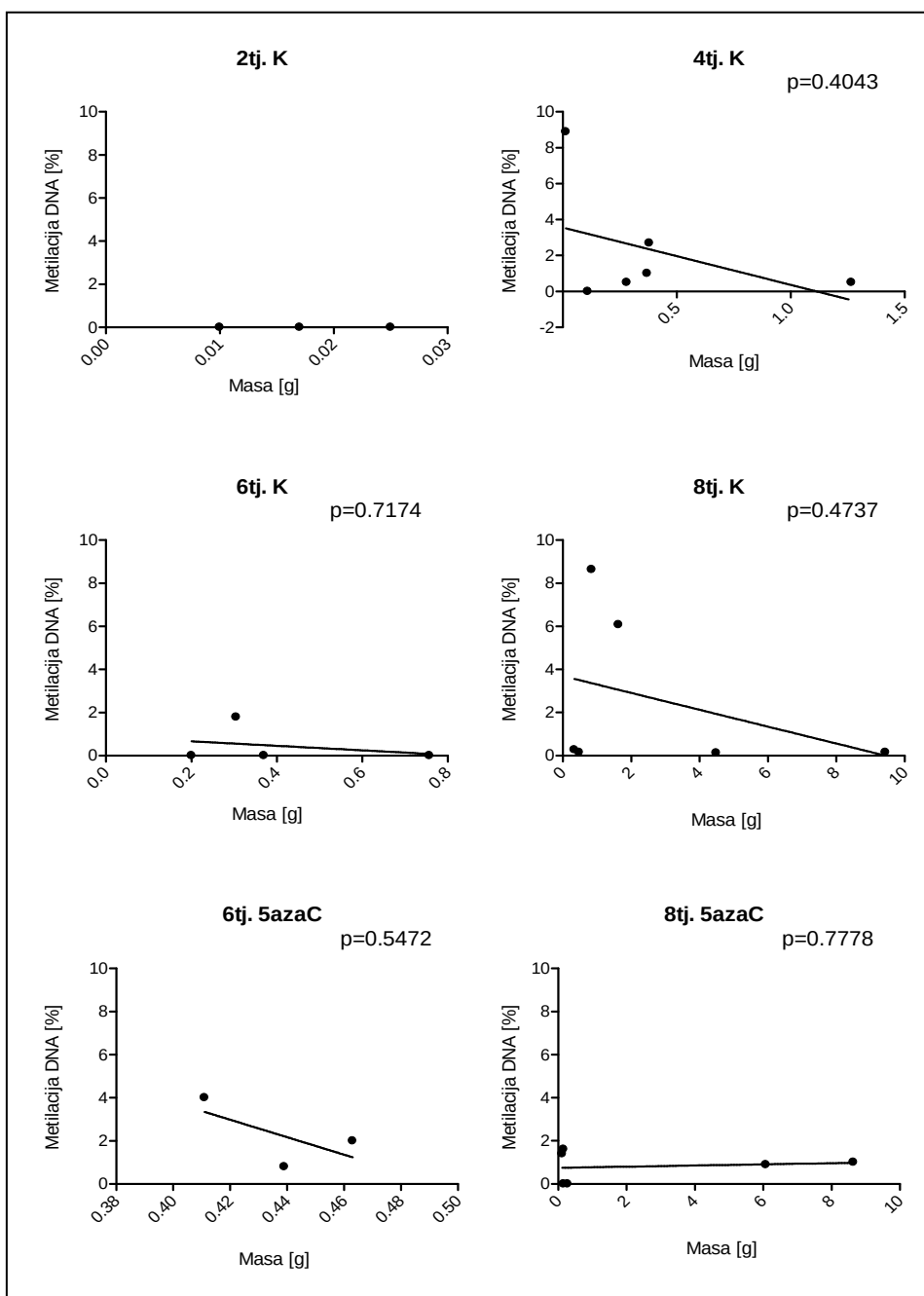
Tablica 37. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Mgmt* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	-	p=0,5169	p=0,0987	
8tj. 5azaC		p=0,7462	p=0,5696	p=0,5795

Mann Whitneyev test.

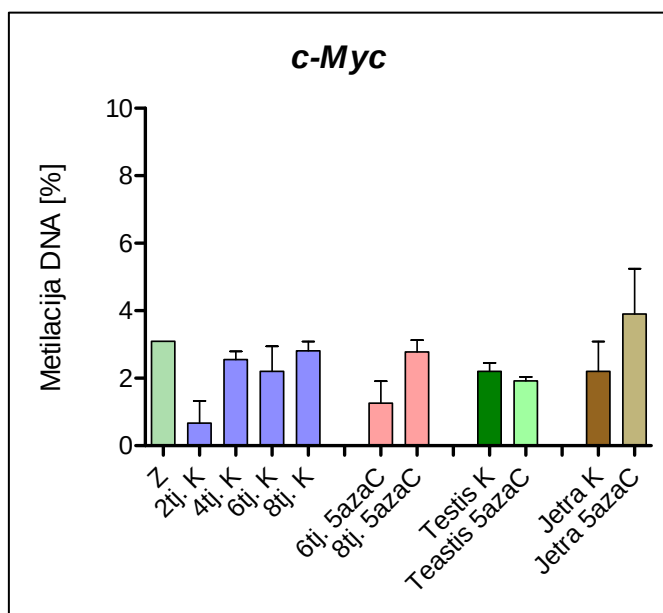
Analogno kontrolnim skupinama, nije pronađen značajan korelacijski odnos stupnja metilacije gena *Mgmt* i mase odnosno intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 49.).

Iako 5azaC-om tretirano jetreno tkivo pokazuje blagi porast metilacije, 5azaC osjetljivo testikularno tkivo pokazuje jednak stupanj metilacije promotorske regije gena *Mgmt* kao i testisi kontrolne skupine (p=0,8248).



Slika 49. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Mgmt* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.9. Metilacija DNA promotora gena *c-Myc*



Slika 50. Razine metilacije DNA u promotoru gena *c-Myc*.

Metilacija DNA promotorske regije gena *c-Myc* prisutna je u izrazito niskom postotku stanica analiziranih tkiva, od 0 do 6% (Slika 50.). Iako je primijećena statistički značajna razlika u metilaciji gena *c-Myc* nakon prvog perioda rasta (2tj. K *vs.* 4tj. K) (Tablica 38.), tijekom cjelokupnog osmotjednog razvoja teratokarcinoma metilacija gena *c-Myc* pokazuje izrazitu stabilnost bez statistički značajnih promjena ($p=0,1444$, 1way ANOVA).

Tablica 38. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *c-Myc* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,0396$	$p=0,1991$	$p=0,0518$
4tj. K		$p=0,6335$	$p=0,4314$
6tj. K			$p=0,4762$

Mann Whitneyev test.

Iako je opisana statistički značajna negativna korelacija mase teratokarcinoma i stupnja metilacije gena *c-Myc* u skupini 6tj. K, ostale kontrolne skupine pokazuju da ne postoji nikakav odnos intenziteta tumorskog rasta i metilacije promotora gena *c-Myc* tijekom razvoja teratokarcinoma (Slika 51.).

Teratokarcinom kontrolnih skupina ne pokazuje značajnu razliku stupnja metiliranosti promotorske regije gena *c-Myc* u usporedbi s testikularnim tkivom (Tablica 39.).

Tablica 39. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *c-Myc* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,2612	p=0,4888	p=0,4755	p=0,2619

Mann Whitneyev test.

Usporedbom tumorskih tkiva životinja tretiranih 5azaC-om uočeno je da 5azaC nije inducirao nikakve promjene metilacijskog statusa promotorske regije gena *c-Myc* (p=0,0952). Također, 5azaC nije izazvao promjene metiliranosti gena *c-Myc* tijekom razvoja teratokarcinoma tretiranih životinja u usporedbi s kontrolnim skupinama (Slika 50.). Stupanj metilacije u tumorima 5azaC-om tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K *vs.* 6tj. 5azaC, 4tj. K *vs.* 8tj. 5azaC) (Tablica 40.).

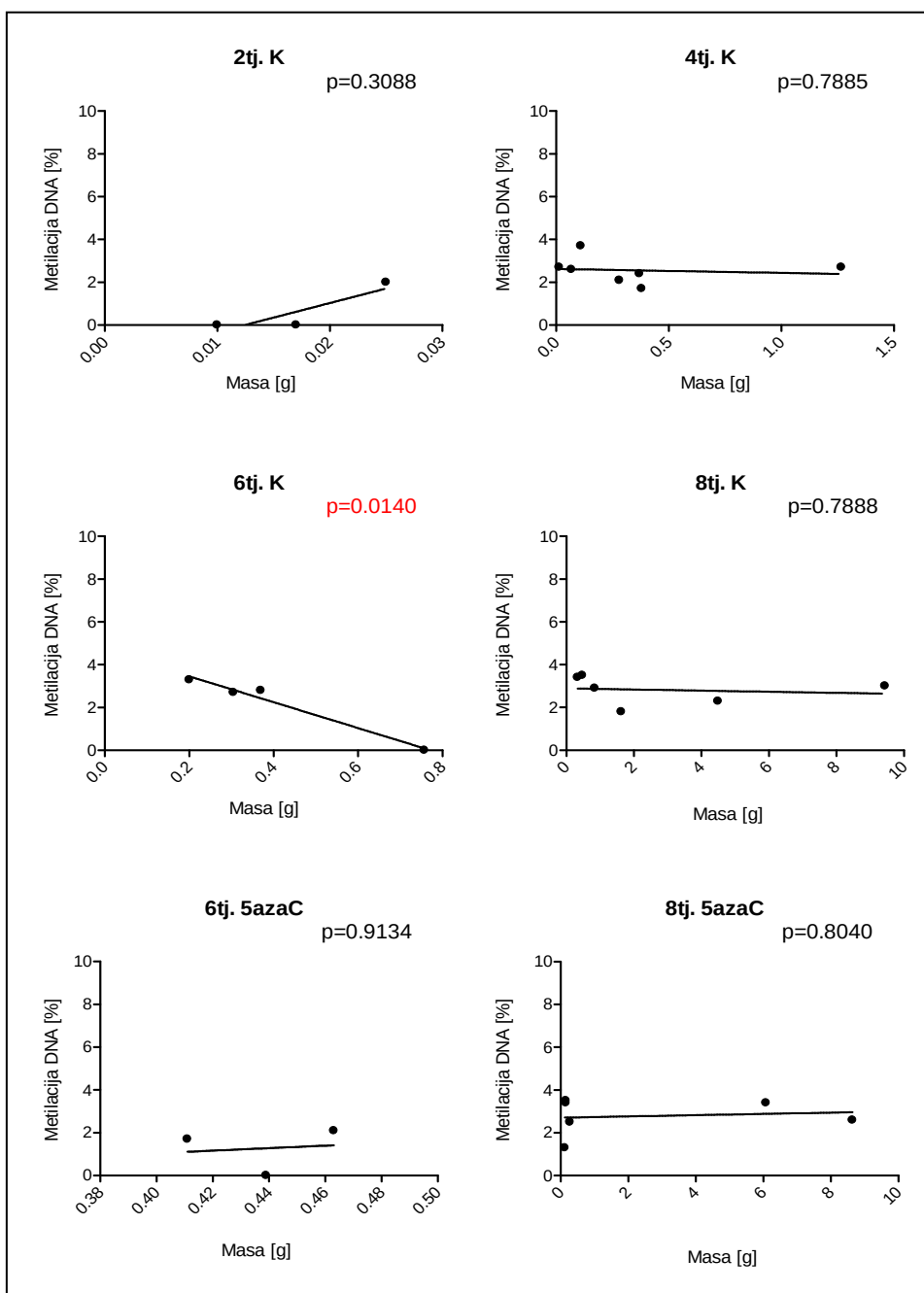
Tablica 40. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *c-Myc* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,6428	p=0,0657	p=0,2845	
8tj. 5azaC		p=0,6674	p=0,6095	p=1,0000

Mann Whitneyev test.

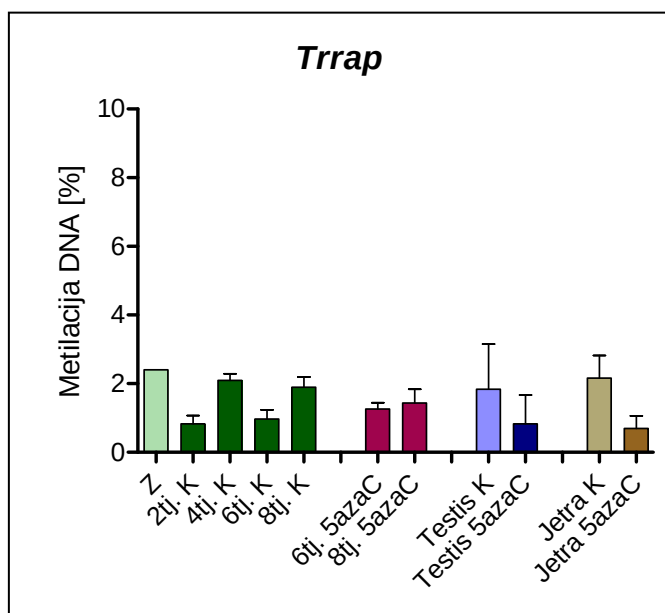
Također, nije pronađen značajan korelacijski odnos stupnja metilacije gena *c-Myc* i mase odnosno intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 51.).

Iako 5azaC-om tretirano jetreno tkivo pokazuje blagi porast metilacije, 5azaC osjetljivo testikularno tkivo pokazuje jednak stupanj metilacije promotorske regije gena *c-Myc* kao i testisi kontrolne skupine (p=0,8248).



Slika 51. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *c-Myc* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.10. Metilacija DNA promotora gena *Trrap*



Slika 52. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Trrap*.

Metilacija DNA promotorske regije gena *Trrap* prisutna je u izrazito niskom postotku stanica analiziranih tkiva, od 0 do <4% (Slika 52.). Ipak, tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma, metilacija promotorske regije gena *Trrap* pokazuje statistički značajne promjene ($p=0,0312$, 1way ANOVA) u specifičnom obrascu rasta i pada vrijednosti metilacije DNA. Metilacija gena *Trrap* nalazi se na gotovo najvišim izmjeranim vrijednostima u tkivu zametka. Nakon transplantacije, na početku razvoja teratokarcinoma u drugom tjednu razvoja, zabilježen je pad metilacije DNA s ponovnim statistički značajnim porastom u skupini 4tj. K neposredno nakon prvog perioda intenzivnog rasta tumora. Uslijedio je ponovni statistički značajan pad metilacije gena *Trrap* u šestom tjednu razvoja te naposljetku ponovni rast metilacije u osmom tjednu razvoja, neposredno nakon drugog perioda rasta (Tablica 41.)

Tablica 41. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Trrap* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,0167$	$p=0,7000$	$p=0,0476$
4tj. K		$p=0,0333$	$p=0,5672$
6tj. K			$p=0,0878$

Mann Whitneyev test.

Ipak, nisu pronađeni nikakvi korelacijski odnosi metilacijskog statusa promotorske regije gena *Trrap* i mase teratokarcinoma odnosno intenziteta rasta tumora (Slika 53.).

Teratokarcinom kontrolnih skupina ne pokazuje značajnu razliku stupnja metiliranosti promotorske regije gena *Trrap* u usporedbi s testikularnim tkivom (Tablica 42.) koje pokazuje jednak stupanj metiliranosti jetrenog tkiva.

Tablica 42. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Trrap* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=1,0000	p=0,5167	p=1,0000	p=0,6025

Mann Whitneyev test.

5azaC nije inducirao nikakve promjene metilacijskog statusa promotorske regije gena *Trrap* u usporedbi s kontrolnim skupinama (Slika 52.). Stupanj metilacije u tumorima 5azaC-om tretiranih životinja ne razlikuje se statistički značajno od razina metilacije tumora kontrolnih skupina koje odgovaraju tumorima s početka tretmana (2tj. K *vs.* 6tj. 5azaC, 4tj. K *vs.* 8tj. 5azaC) (Tablica 43.). Također, nije pronađena statistički značajan razlika stupnja metiliranosti gena *Trrap* između 5azaC-om tretiranih skupina (p=0,7143).

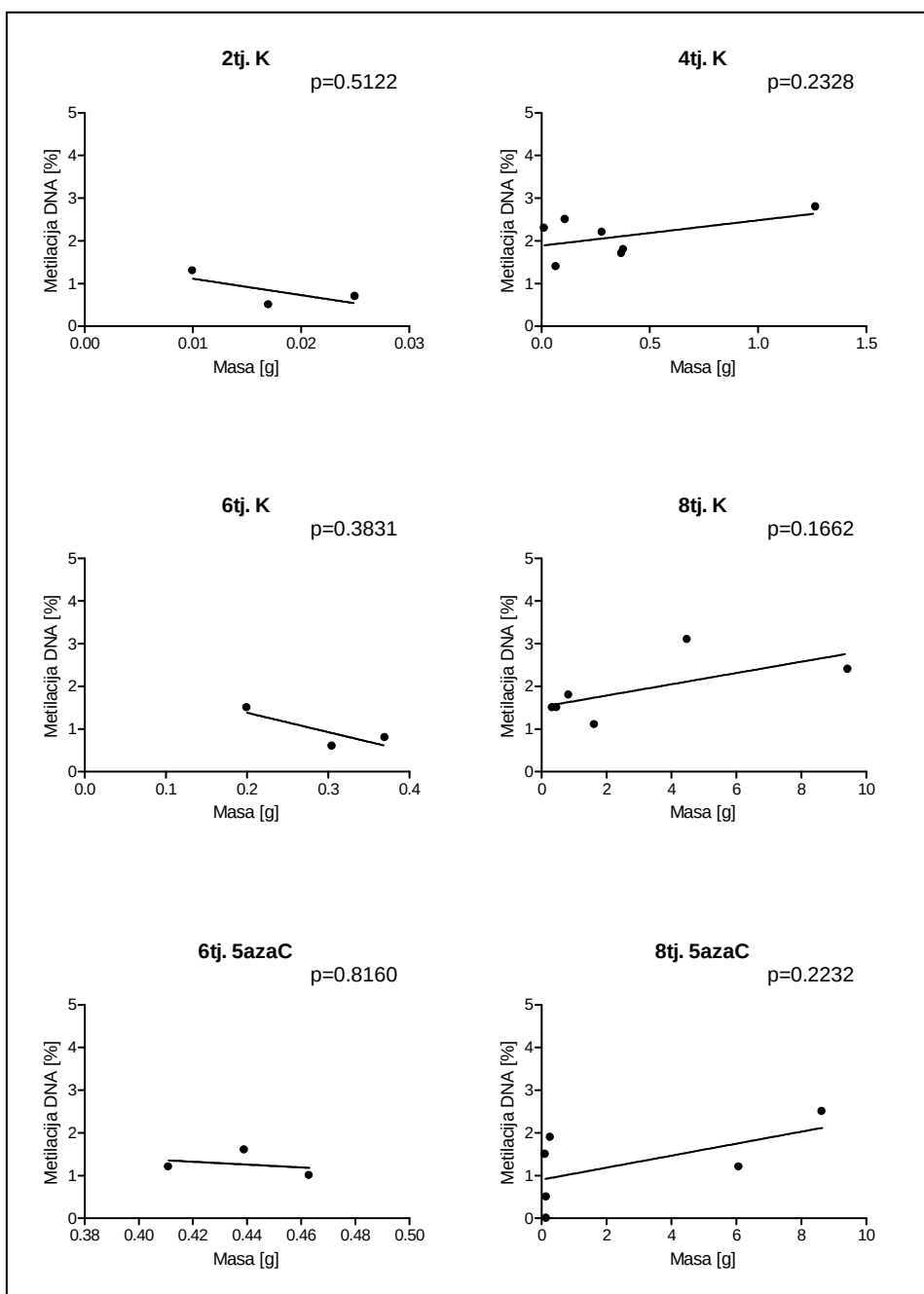
Tablica 43. Usporedbe razina metilacije DNA promotorske regije gena *Trrap* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,4000	p=0,0333	p=0,4000	
8tj. 5azaC		p=0,2827	p=0,6041	p=0,6868

Mann Whitneyev test.

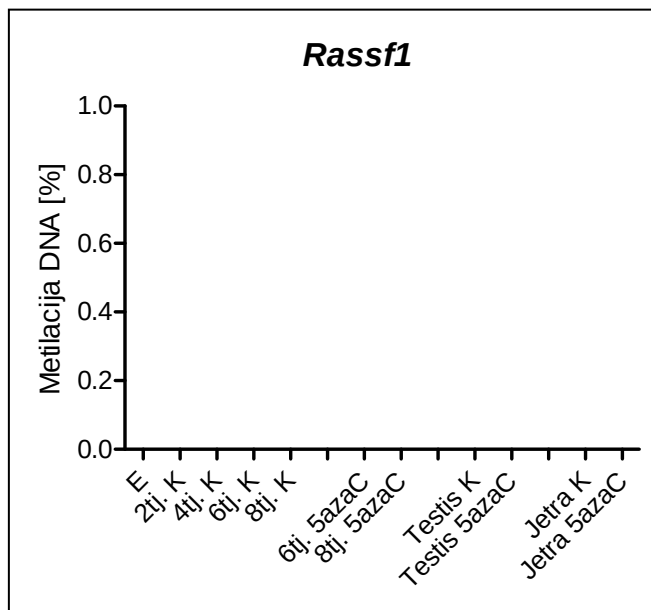
Također, nije pronađen značajan korelacijski odnos stupnja metilacije gena *Trrap* i mase odnosno intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 53.).

5azaC osjetljivo testikularno tkivo pokazuje blag pad stupnja metilacije promotorske regije gena *Trrap* (p=0,6428) kao i jetreno tkivo u životinja tretiranih s 5azaC-om.



Slika 53. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Trp7* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.11. Metilacija DNA promotora gena *Rassf1*



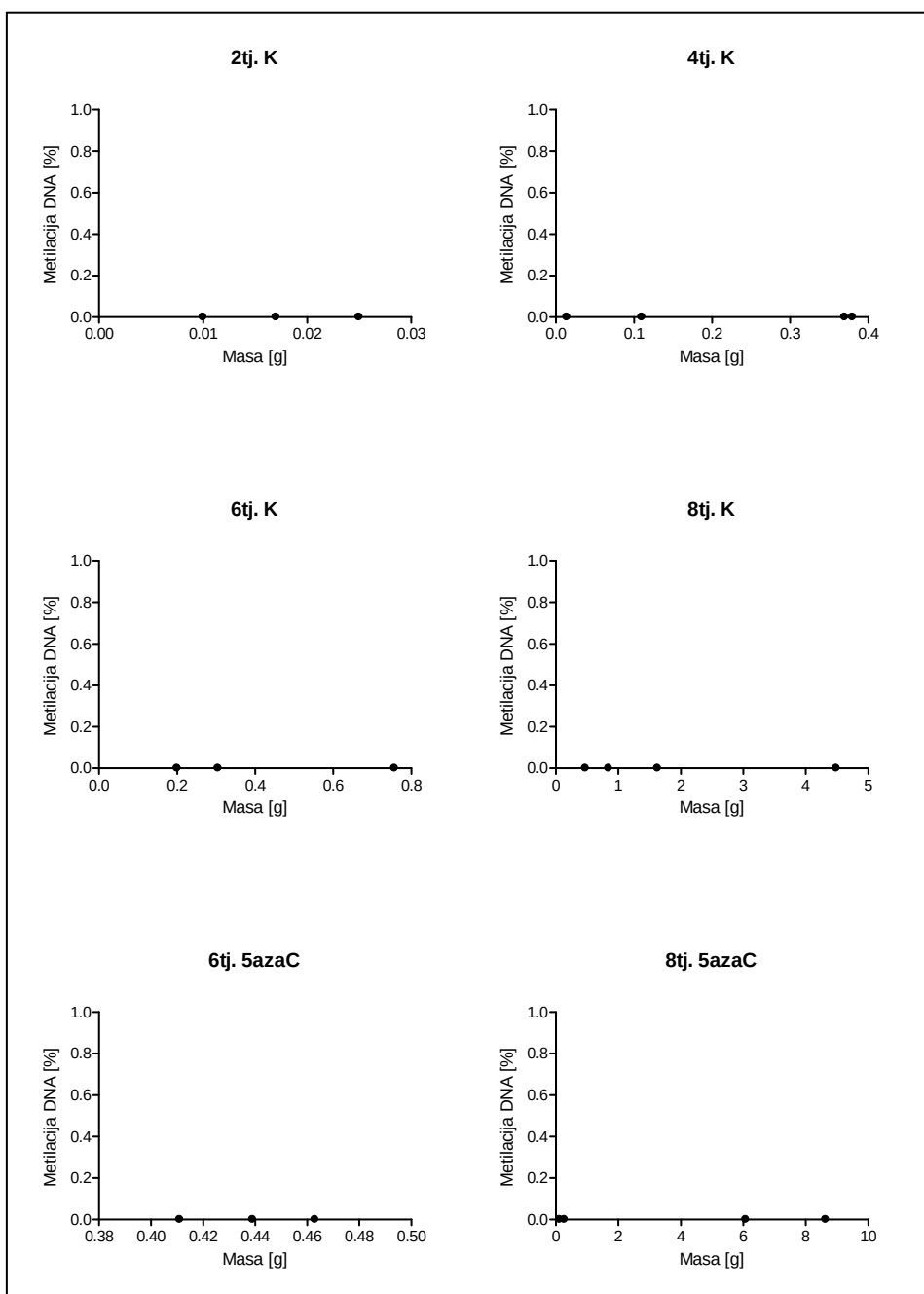
Slika 54. Razine metilacije DNA u promotoru gena *Rassf1*.

Tijekom cjelokupnog osmotjednog razvoja teratokarcinoma prisutna je potpuna demetilacija promotorske regije gena *Rassf1* (Slika 54.). S obzirom na stabilnu demetiliranost tumorskog tkiva, nije pronađen korelacijski odnos metilacije DNA i intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 55.).

Testikularno i jetreno tkivo također pokazuju potpunu demetiliranost promotorske regije gena *Rassf1* (Slika 54.).

5azaC nije inducirao promjenu metilacijskog statusa promotora gena *Rassf1*. Naime, i u 5azaC-om tretiranim tumorima pronađena je potpuna demetiliranost gena *Rassf1* (Slika 54.). S obzirom na stabilnu demetiliranost tumorskog tkiva, ponovno nije pronađen korelacijski odnos metilacije DNA i intenziteta rasta teratokarcinoma (Slika 55.).

5azaC nije inducirao promjenu metilacijskog statusa promotora gena *Rassf1* ni u osjetljivom testikularnom tkivu niti u jetri.

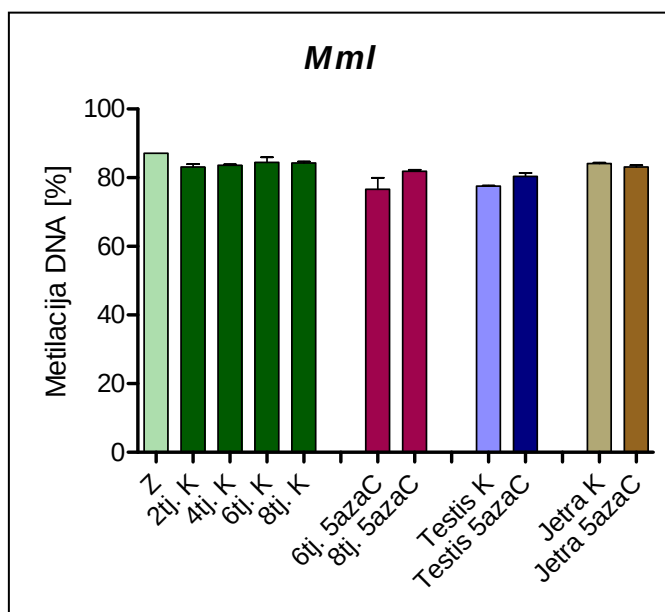


Slika 55. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina metilacije DNA promotorske regije gena *Rassf1* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.12. Globalna metilacija DNA

Razine globalne metilacije DNA dobivene su na temelju analize metilacije DNA repetitivnih sekvenci *Mml*, *Mmetnl* i *B1*.

4.6.12.1. Metilacija DNA repetitivne sekvence *Mml*



Slika 56. Razine globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mml*.

Mml repetitivna sekvenca pokazuje najviši izmjereni stupanj metilacije DNA među analiziranim repetitivnim sekvencama. Iako je uočljiv pad razine metilacije između zametka i teratokarcinoma u drugom tjednu razvoja te naknadni kontinuirani trend povratka razine metilacije *Mml* na početni stupanj (Slika 56.), tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma nije zabilježena statistički značajna promjena stupnja metilacije repetitivne sekvence *Mml* ($p=0,6235$, 1way ANOVA) kao ni među pojedinim kontrolnim skupinama (Tablica 44.).

Tablica 44. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mml* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,8186$	$p=0,7954$	$p=0,5476$
4tj. K		$p=0,8861$	$p=0,4314$
6tj. K			$p=1,0000$

Mann Whitney test.

Nisu pronađeni ni korelacijski odnosi mase teratokarcinoma i metilacijskog stupnja repetitivne sekvence *Mml* (Slika 57.).

Usporedbom stupnja metilacije testikularnog tkiva i pojedinih skupina teratokarcinoma, opaženo je da jednak stupanj metilacije repetitivne sekvence *Mml* testikularnom tkivu pokazuje teratokarcinom na početku razvoja, 2tj. K. Sve kasnije kontrolne skupine pokazuju statistički značajnu hipermetilacijsku aktivnost na repetitivnoj sekvenci *Mml* u usporedbi s testisom (Tablica 45.).

Tablica 45. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mml* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=1,0000	p=0,0222	p=0,0238	p=0,0238

Mann Whitneyev test.

Repetitivna sekvenca *Mml* pokazala se najosjetljivijom na demetilacijski učinak 5azaC-a. Zabilježena je i statistički značajna razlika među 5azaC-om tretiranim skupinama gdje 6tj. 5azaC pokazuje niži stupanj metilacije *Mml* repetitivne sekvence od 8tj. 5azaC (p=0,0238), razlika koja nije pronađena u kontrolnim skupinama (Tablica 44.). Analiza podataka pokazuje da je 5azaC inducirao aktivni pad stupnja metilacije repetitivne sekvence *Mml* u teratokarcinoma 5azaC-om tretiranih životinja (Slika 56.). Naime, stupanj metilacije repetitivne sekvence *Mml* 6tj. 5azaC skupine na razini je 2tj. K skupine koja odgovara tumoru s početka tretmana, a statistički značajno niža od ostalih kontrolnih skupina. Teratokarcinom skupine 8tj. 5azaC pokazuje još jači demetilacijski učinak 5azaC budući da je stupanj metilacije repetitivne sekvence *Mml* navedene skupine statistički značajno niži i od skupine koja odgovara tumoru s početka tretmana tj. 4tj. K (Tablica 46.).

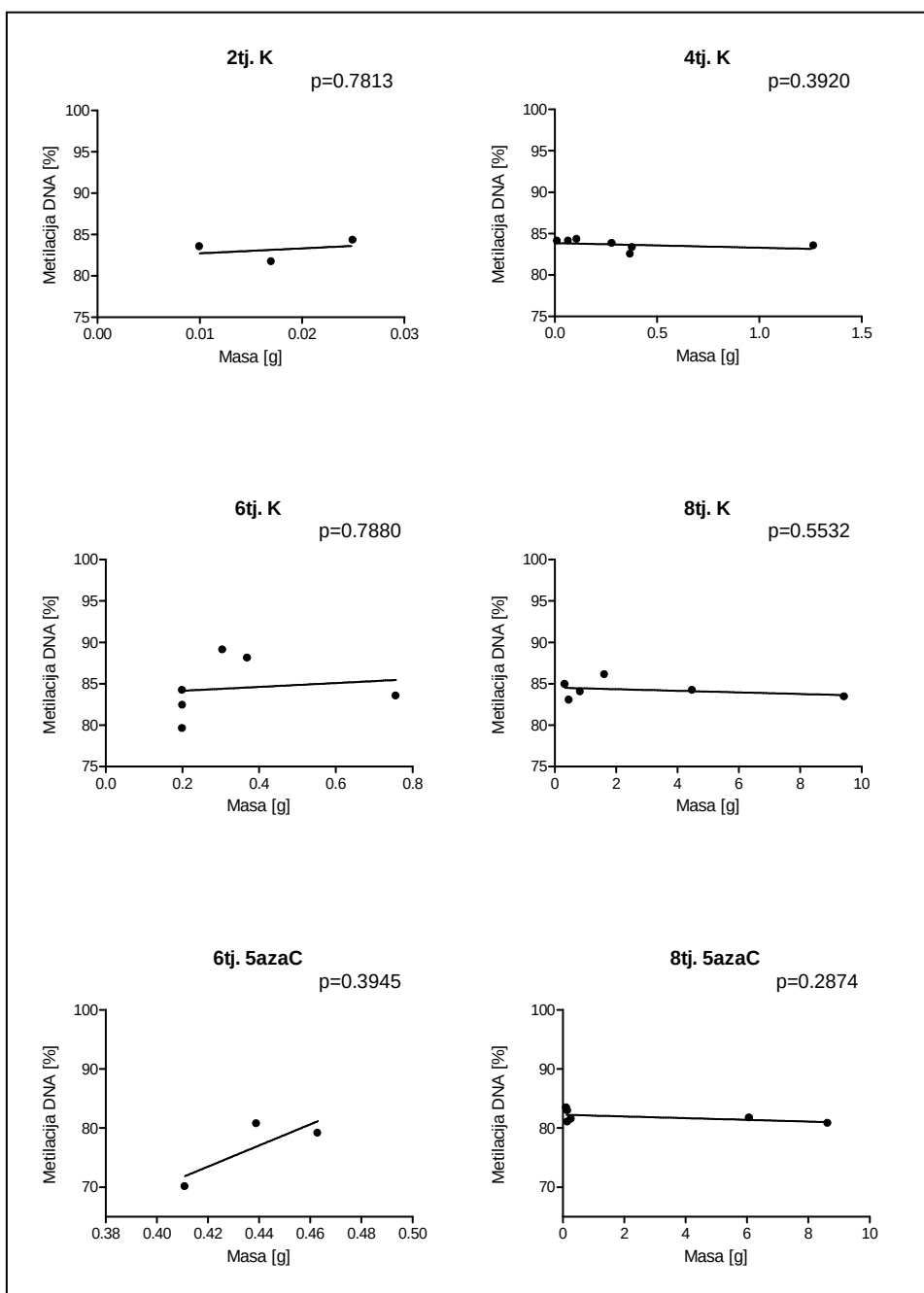
Tablica 46. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mml* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,1000	p=0,0222	p=0,0476	
8tj. 5azaC		p=0,0123	p=0,1320	p=0,0103

Mann Whitneyev test.

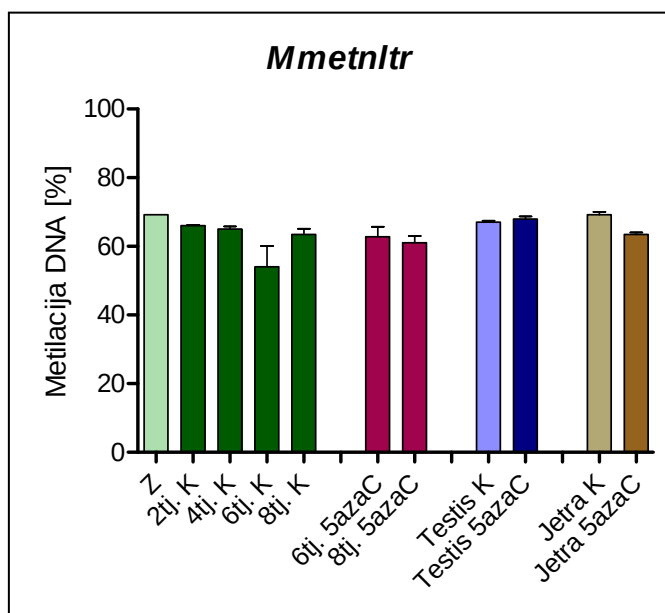
Ipak, kao i u kontrolnim skupinama, nije pronađen korelacijski odnos mase 5azaC-om tretiranih tumora i metilacijskog statusa repetitivne sekvence *Mml* (Slika 57.).

Kontradiktorno djelovanju na teratokarcinom, 5azaC potaknuo je blagi porast stupnja metilacije repetitivne sekvence *Mml* u testikularnom tkivu (p=0,1000) dok jetra ne pokazuje osjetljivost na 5azaC u kontekstu metilacije repetitivne sekvence *Mml*.



Slika 57. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mml* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.12.2. Metilacija DNA repetitivne sekvence *Mmetnltr*



Slika 58. Razine globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mmetnltr*.

Mmetnltr repetitivna sekvenca pokazuje srednje visoke vrijednosti metilacije DNA u analiziranim tkivima (Slika 58.). Analiza promjena metilacije DNA pokazuje da *Mmetnltr* održava stabilnu metilaciju DNA tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma ($p=0,1039$, 1way ANOVA). Uistinu nisu opisane nikakve statistički značajne promjene vrijednosti metilacije *Mmetnltr* među pojedinim kontrolnim skupinama (Tablica 47.).

Tablica 47. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mmetnltr* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,5665$	$p=0,0518$	$p=0,5169$
4tj. K		$p=0,0629$	$p=0,5338$
6tj. K			$p=0,3939$

Mann Whitney test.

Također nisu opisani nikakvi značajni korelacijski odnosi mase teratokarcinoma odnosno intenziteta rasta tumora s metilacijom repetitivne sekvence *Mmetnltr* (Slika 59.).

Testikularno tkivo ne razlikuje se po stupnju metiliranosti repetitivne sekvence *Mmetnltr* ni od zametka niti od tumorskoga tkiva (Tablica 48.), kao ni jetra.

Tablica 48. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mmetnltr* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,3758	p=0,0864	p=0,0381	p=0,5476

Mann Whitneyev test.

5azaC nije utjecao na stabilnost metilacije repetitivne sekvence *Mmetnltr* u tkivima 5azaC-om tretiranih životinja (Tablica 49.). Ne postoji statistički značajna razlika ni između skupina 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC (p=0,7143).

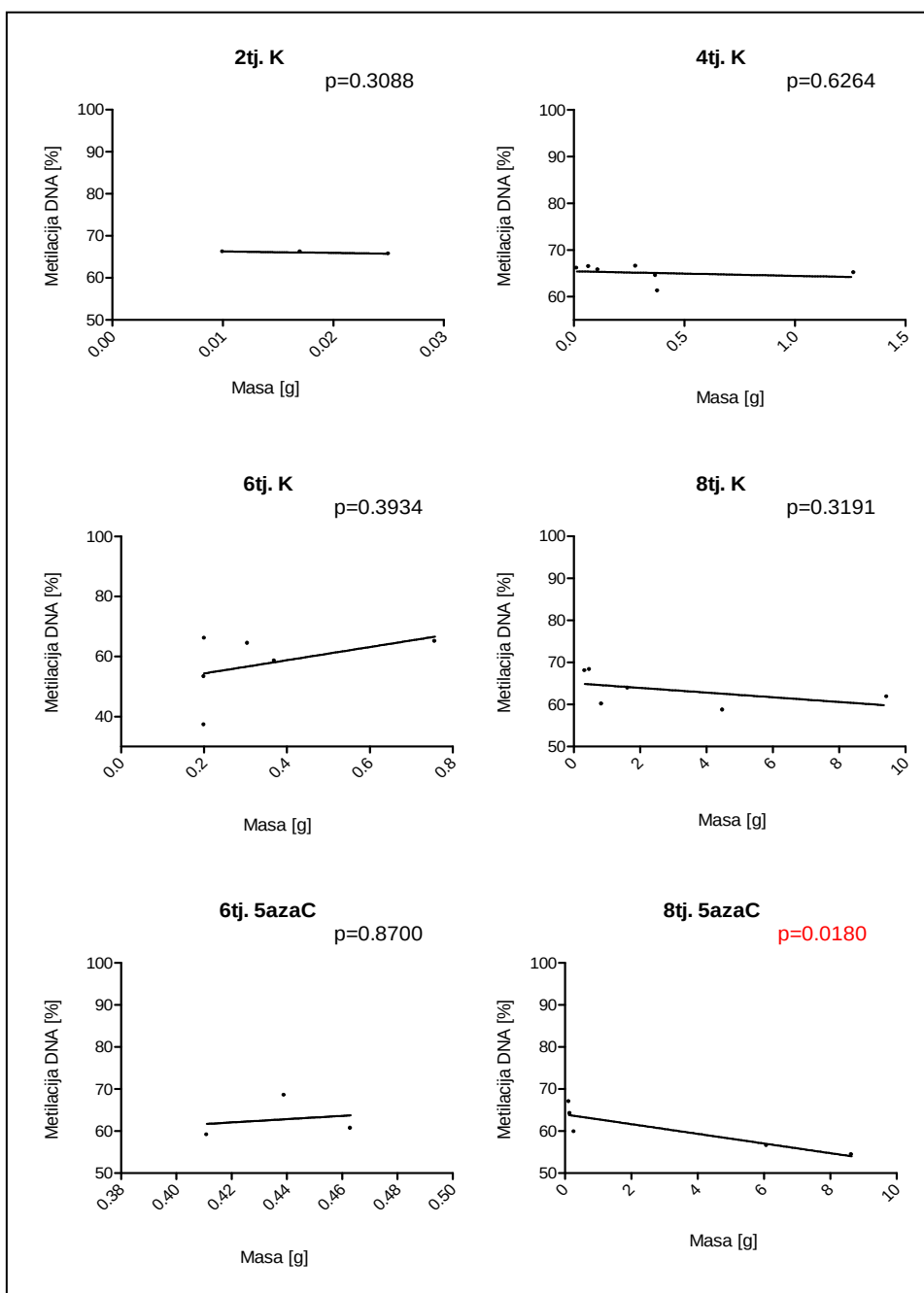
Tablica 49. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mmetnltr* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,6579	p=0,5167	p=0,5476	
8tj. 5azaC		p=0,1014	p=0,9372	p=0,4848

Mann Whitneyev test.

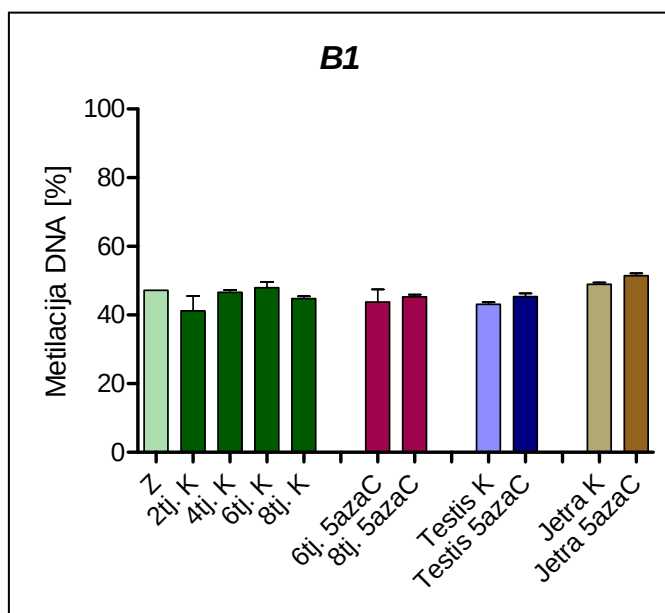
Ipak, pronađena je statistički značajna negativna korelacija mase tumora i stupnja metiliranosti repetitivne sekvence *Mmetnltr* u skupini 8tj. 5azaC (Slika 59.).

Ni jetreno niti 5azaC osjetljivo testikularno tkivo (p=0,4000) nisu značajno izmijenili stupanj metilacije repetitivne sekvence *Mmetnltr* tijekom 5azaC tretmana.



Slika 59. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *Mmetnlr* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.6.12.3. Metilacija DNA repetitivne sekvence *B1*



Slika 60. Razine globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *B1*.

B1 repetitivna sekvenca pokazuje najniže vrijednosti metilacije DNA u analiziranim tkivima (Slika 60.). Analiza promjena metilacije DNA pokazuje da repetitivna sekvenca *B1* održava stabilnu metilaciju DNA tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma ($p=0,0636$, 1way ANOVA). Uistinu nisu opisane nikakve statistički značajne promjene vrijednosti metilacije repetitivne sekvence *B1* među pojedinim kontrolnim skupinama (Tablica 50.).

Tablica 50. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *B1* u kontrolnim skupinama.

	4tj. K	6tj. K	8tj. K
2tj. K	$p=0,1167$	$p=0,2000$	$p=0,7143$
4tj. K		$p=0,4928$	$p=0,0525$
6tj. K			$p=0,0695$

Mann Whitneyev test.

Također nisu opisani nikakvi značajni korelacijski odnosi mase teratokarcinoma odnosno intenziteta rasta tumora s metilacijom repetitivne sekvence *B1* izuzev skupine 6tj. K koja pokazuje pozitivnu korelaciju mase tumora i metilacije repetitivne sekvence *B1* (Slika 61.).

Testikularno tkivo ne razlikuje se po stupnju metiliranosti repetitivne sekvence *B1* ni od zametka niti od tumorskoga tkiva (Tablica 51.).

Tablica 51. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *B1* u teratokarcinomu i testisu kontrolnih skupina.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
Testis K	p=0,7000	p=0,0294	p=0,1000	p=0,1948

Mann Whitneyev test.

5azaC nije utjecao na stabilnost metilacije repetitivne sekvence *B1* u tkivima teratokarcinoma 5azaC-om tretiranih životinja (Tablica 52.). Ne postoji statistički značajna razlika ni između skupina 6tj. 5azaC i 8tj. 5azaC (p=0,1000).

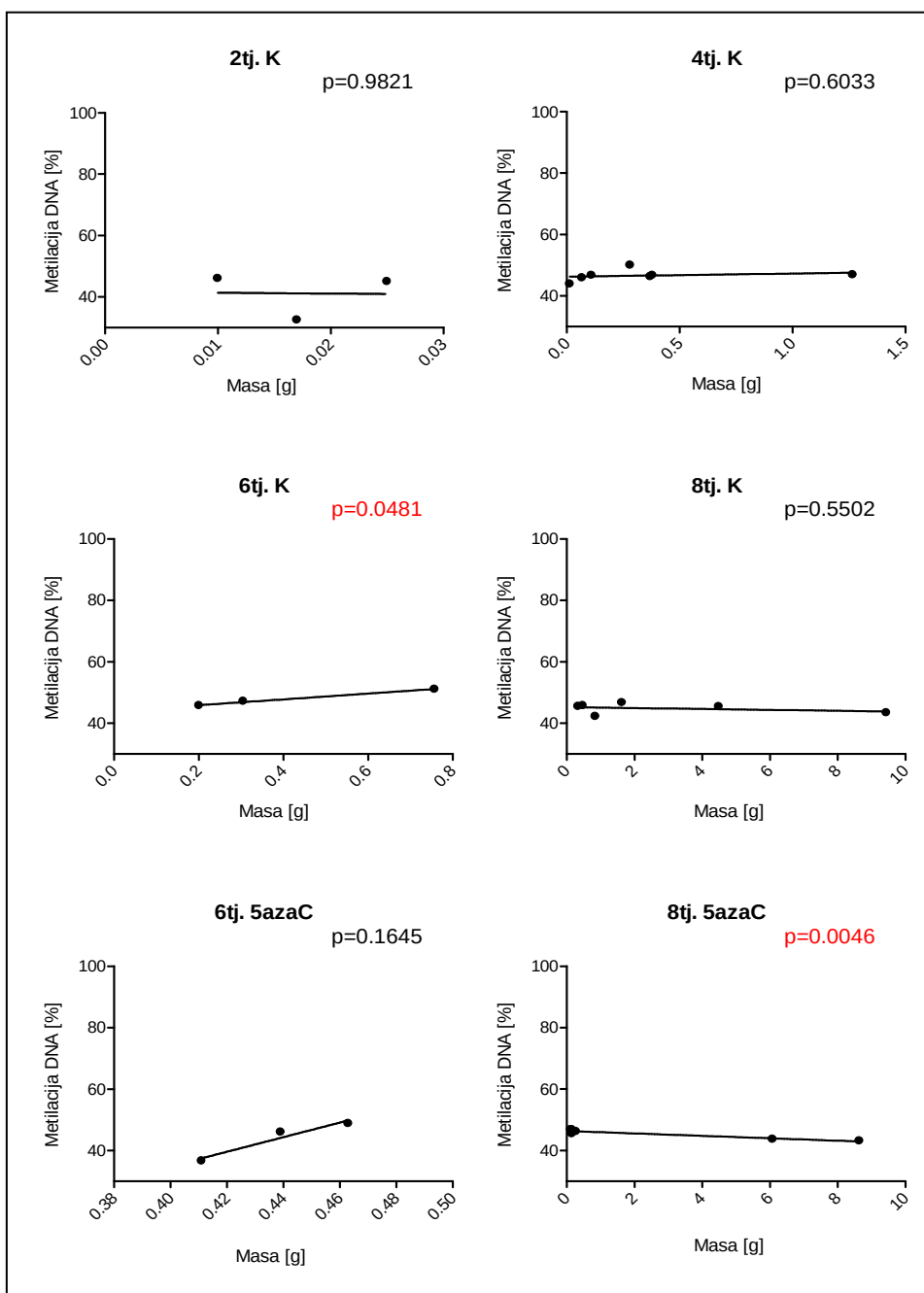
Tablica 52. Usporedbe razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *B1* u teratokarcinomima u kontrolnim i 5azaC-om tretiranim skupinama.

	2tj. K	4tj. K	6tj. K	8tj. K
6tj. 5azaC	p=0,5066	p=0,6475	p=0,7000	
8tj. 5azaC		p=0,2833	p=0,1667	p=0,5211

Mann Whitneyev test.

Ipak, pronađena je statistički značajna negativna korelacija mase tumora i stupnja metiliranosti repetitivne sekvence *B1* u skupini 8tj. 5azaC (Slika 61.).

Iako pokazuju blagi porast, ni jetreno niti 5azaC osjetljivo testikularno tkivo (p=0,1000) nisu značajno izmijenili stupanj metilacije repetitivne sekvence *B1* tijekom 5azaC tretmana.

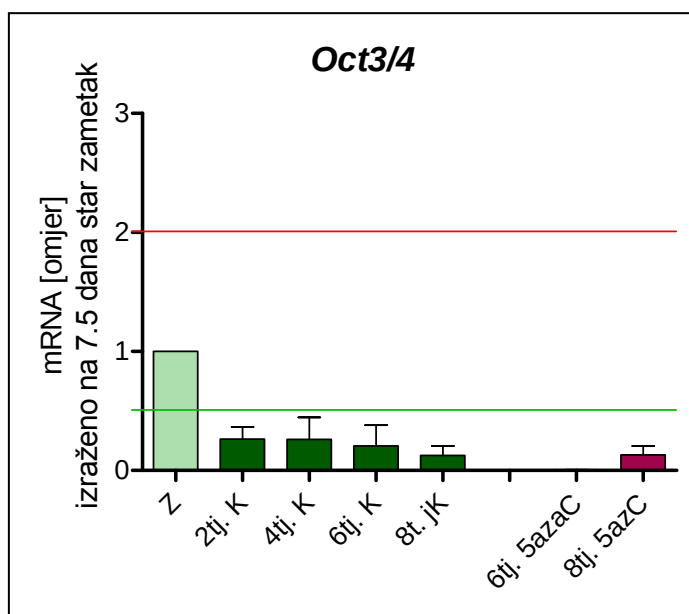


Slika 61. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i razina globalne metilacije DNA na temelju analize repetitivne sekvence *B1* u teratokarcinomima po pokusnim skupinama.

4.7. Ekspresija gena na razini mRNA u eksperimentalnom teratokarcinomu

Analiza ekspresije gena *Oct3/4*, *Nanog* i *Trrap* na razini mRNA provedena je metodom q-PCR-a. Dobivene rezultate ekspresije gena korelirali smo s tumorskom masom kako bi ustanovili jesu li navedeni geni uključeni u razvoj teratokarcinoma te posredno testirali rezultate dobivene analizom metilacije promotorskih regija istih gena. Također smo analizirali je li 5azaC imao učinak na ekspresiju gena neovisno o svom demetilacijskom djelovanju.

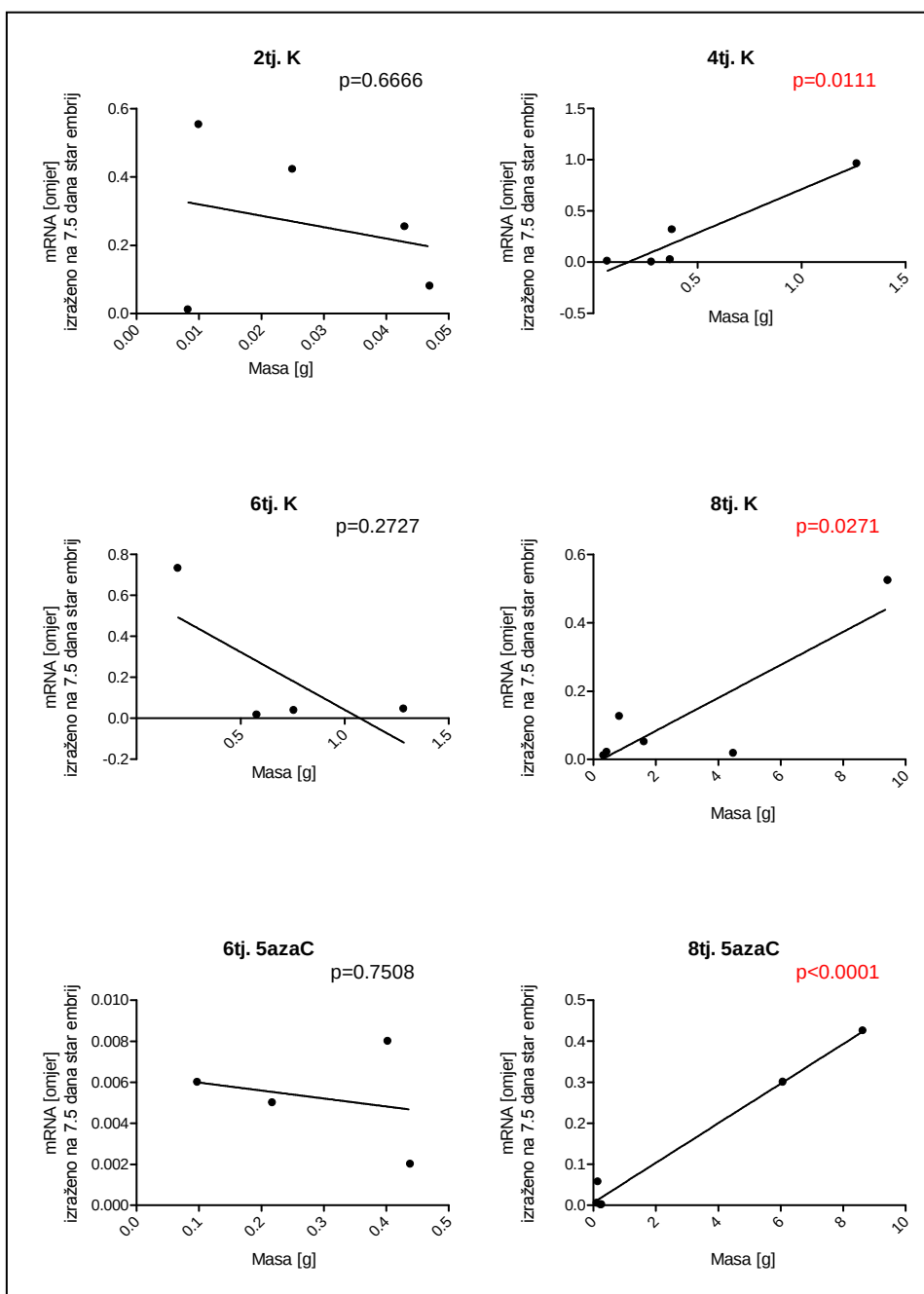
4.7.1. Ekspresija gena *Oct3/4* na razini mRNA



Slika 62. Ekspresija gena *Oct3/4* na razini mRNA u eksperimentalnom teratokarcinomu.

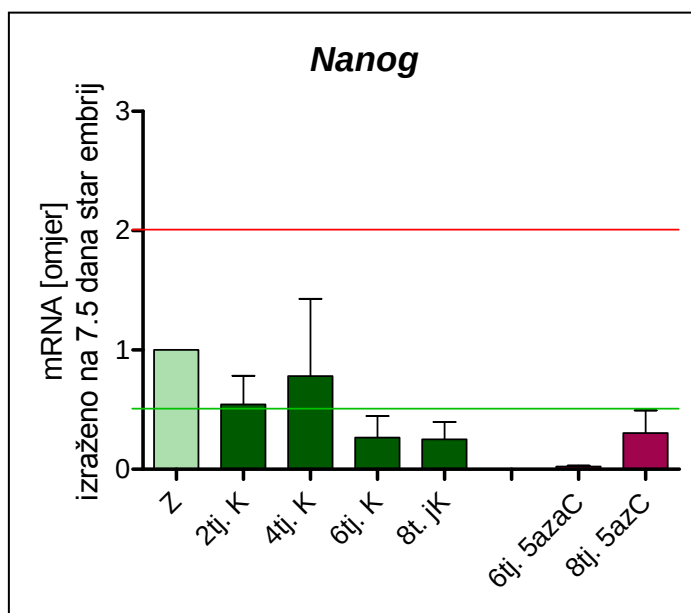
Analiza ekspresije gena na razini mRNA pokazuje najintenzivniju ekspresiju gena *Oct3/4* u tkivu zametka. U drugom tjednu razvoja teratokarcinoma zabilježen je pad ekspresije *Oct3/4* prema zametku. Trend pada ekspresije gena *Oct3/4* nastavlja se tijekom cijelog osmotjednog razvoja teratokarcinoma s najnižom zabilježenom ekspresijom u skupini 8tj. K (Slika 62.). Razina ekspresije gena *Oct3/4* statistički značajno pozitivno korelira s masom teratokarcinoma u četvrtom i osmom tjednu razvoja (Slika 63.), neposredno nakon perioda intenzivnog rasta tumora.

Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja također pokazuju nižu ekspresiju gena *Oct3/4* naspram tkivu zametka iako nižu (6tj. 5azaC) ili jednaku (8tj. 5azaC) u usporedbi s teratokarcinomima kontrolnih skupina. Uočljivo je da su tumori nižeg stupnja zrelosti osjetljiviji na 5azaC u kontekstu ekspresije gena *Oct3/4* (Slika 62.). Korelacijske analize potvrđuju pozitivnu korelaciju razine ekspresije gena *Oct3/4* i mase teratokarcinoma u osmom tjednu razvoja odnosno neposredno nakon drugog intenzivnog perioda rasta tumora (Slika 63.).



Slika 63. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i ekspresije gena *Oct3/4* na razini mRNA po pokusnim skupinama.

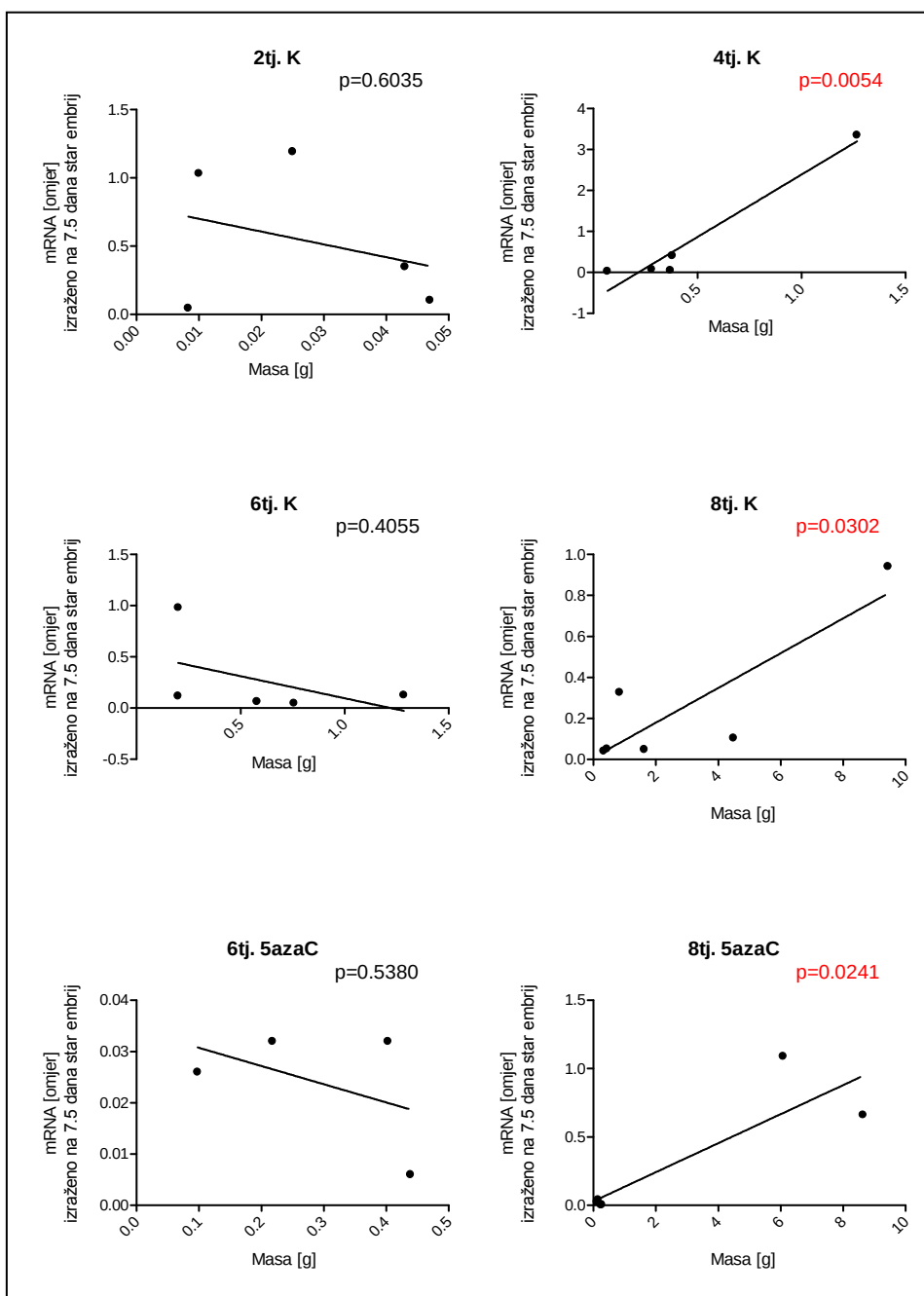
4.7.2. Ekspresija gena *Nanog* na razini mRNA



Slika 64. Ekspresija gena *Nanog* na razini mRNA u eksperimentalnom teratokarcinomu.

Analiza ekspresije gena na razini mRNA pokazuje najintenzivniju ekspresiju gena *Nanog* u tkivu zametka. U drugom tjednu razvoja teratokarcinoma zabilježen je pad ekspresije gena *Nanog* prema zametku nakon čega slijedi porast ekspresije u četvrtom tjednu razvoja. U šestom i osmom tjednu razvoja slijedi period stabilne i ujedno najniže razine ekspresije gena *Nanog* (Slika 64.). Razine ekspresije gena *Nanog* statistički značajno pozitivno koreliraju s masom teratokarcinoma u četvrtom i osmom tjednu razvoja (Slika 65.), neposredno nakon perioda intenzivnog rasta tumora.

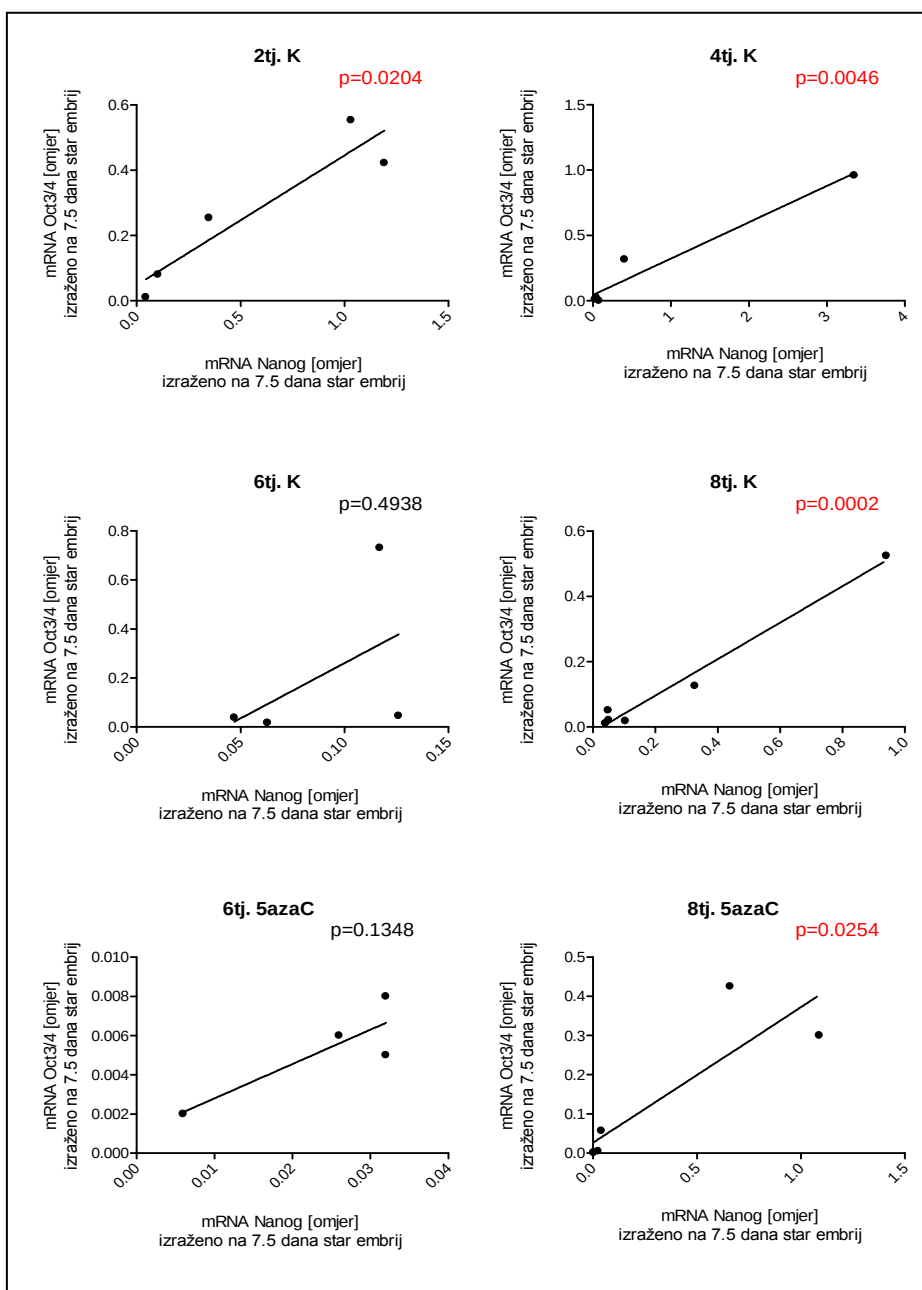
Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja također pokazuju nižu ekspresiju gena *Nanog* naspram tkivu zametka iako nižu (6tj. 5azaC) ili gotovo jednaku (8tj. 5azaC) u usporedbi s teratokarcinomima kontrolnih skupina. Uočljivo je da su tumori nižeg stupnja zrelosti osjetljiviji na 5azaC u kontekstu ekspresije gena *Nanog* (Slika 64.). Korelacijske analize potvrđuju pozitivnu korelaciju razine ekspresije gena *Nanog* i mase teratokarcinoma u osmom tjednu razvoja odnosno neposredno nakon drugog intenzivnog perioda rasta tumora (Slika 65.).



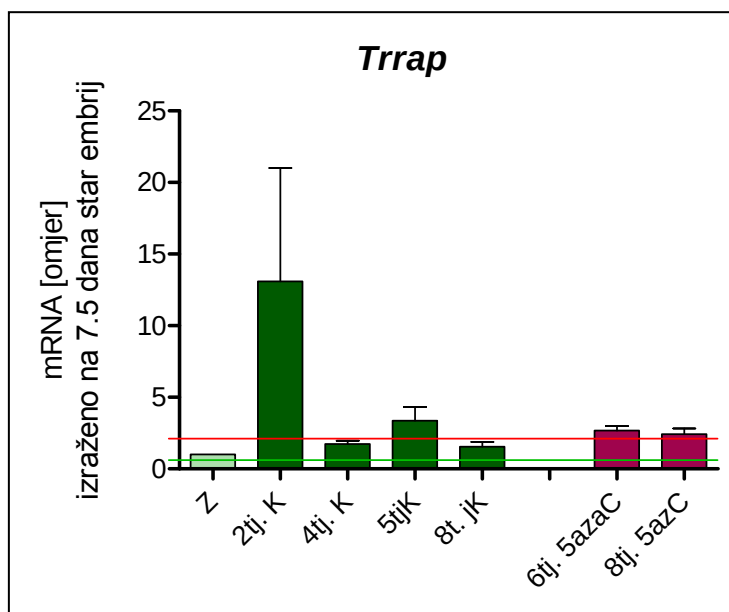
Slika 65. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i ekspresije gena *Nanog* na razini mRNA po pokusnim skupinama.

4.7.3. Usporedba ekspresije gena *Oct3/4* i *Nanog* na razini mRNA

Usporedba razina ekspresije gena jezgre matičnosti *Oct3/4* i *Nanog* pokazuje njihovu međuovisnost tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma. Naime, pozitivna korelacija razina ekspresije *Oct3/4* i *Nanog* gena pronađena je u svim analiziranim skupinama tumora, i to s visokom statističkom značajnošću (Slika 66.).



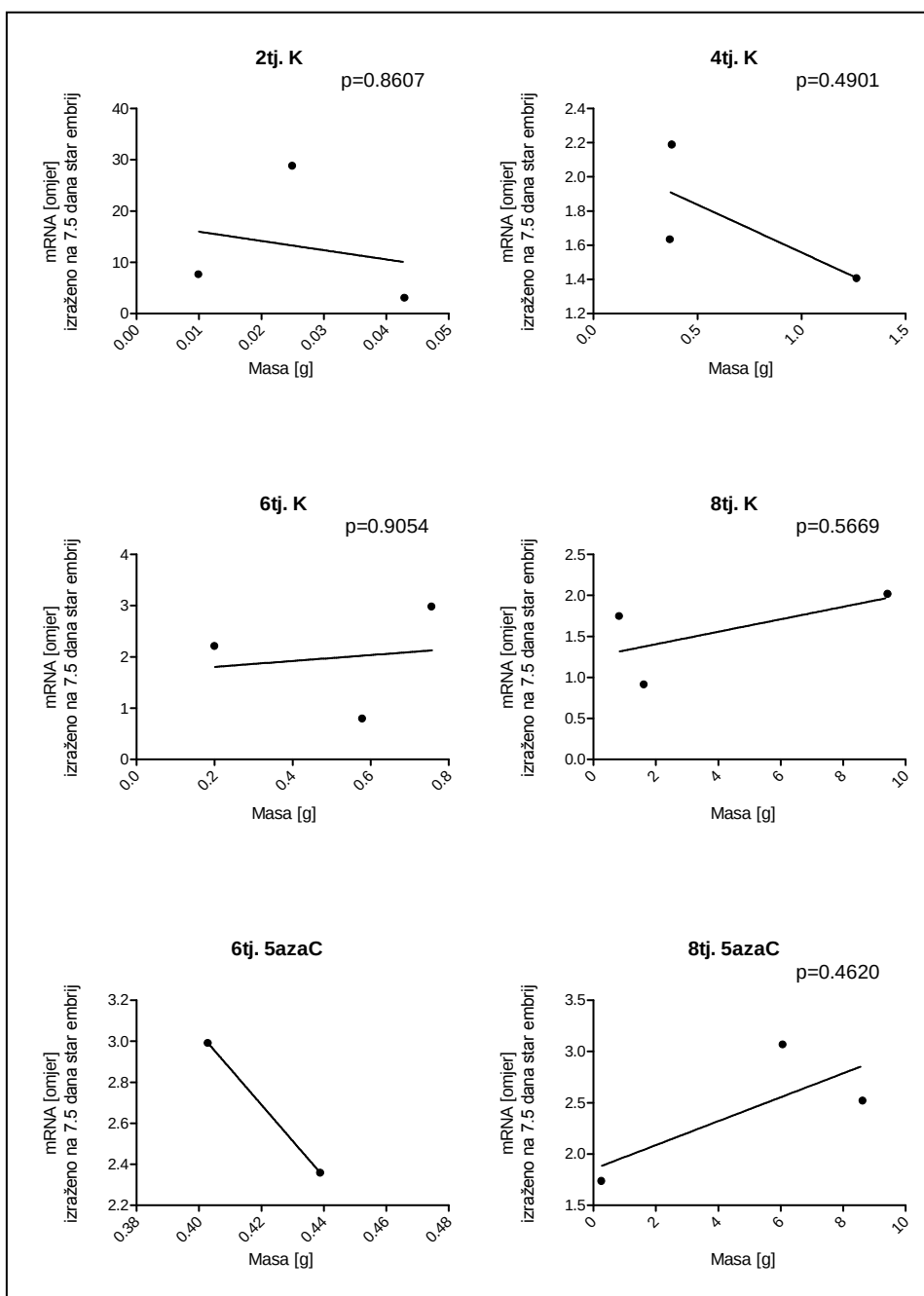
Slika 66. Korelacije i linearne regresije ekspresije gena *Oct3/4* i *Nanog* na razini mRNA po pokusnim skupinama u eksperimentalnom teratokarcinomu miša *in vivo*.

4.7.4 Ekspresija gena *Trrap* na razini mRNA

Slika 67. Ekspresija gena *Trrap* na razini mRNA u eksperimentalnom teratokarcinomu.

Analiza ekspresije gena na razini mRNA pokazuje drastičan rast ekspresije gena *Trrap* u drugom tjednu razvoja u usporedbi sa zametkom. Nakon pada u četvrtom, nastavlja se značaj pad s najnižim izmjerenim vrijednostima u šestom tjednu razvoja. U osmom tjednu razvoja, vrijednosti ekspresije gena *Trrap* vraćaju se na razinu izmjerenu u tkivu zametka (Slika 67.). Nadalje, ekspresija gena *Trrap* nema nikakav značajan korelacijski odnos s masom teratokarcinoma odnosno intenzitetom rasta tumora (Slika 68.).

Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja pokazuju značajno višu ekspresiju gena *Trrap* naspram tkivu zametka te nisu u skladu s izmjerenim razinama ekspresije u odgovarajućim kontrolnim skupinama teratokarcinoma (Slika 67.). Korelacijske analize potvrđuju nepostojanje korelacijskih odnosa razine ekspresije gena *Trrap* i mase teratokarcinoma odnosno intenziteta rasta tumora (Slika 68.).

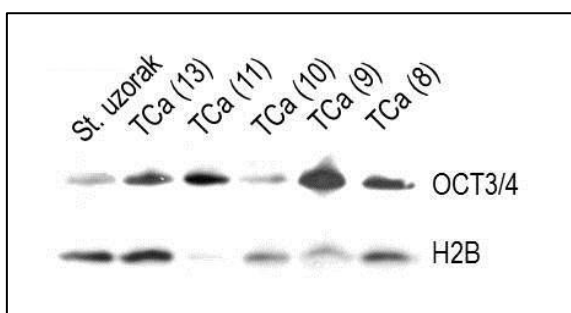


Slika 68. Korelacije i linearne regresije masa teratokarcinoma i ekspresije gena *Trnp* na razini mRNA po pokusnim skupinama.

4.8. Ekspresija gena na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu

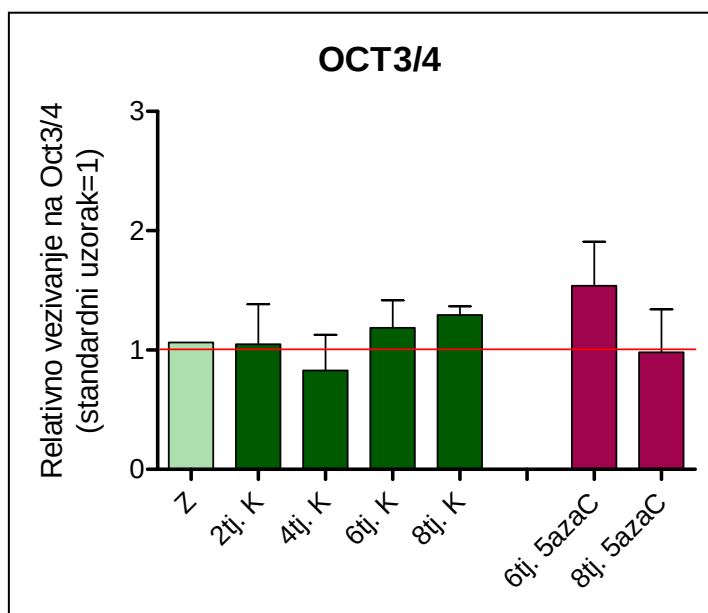
Kako bi ustanovili matični potencijal EC stanica i proliferacijski potencijal teratokarcinoma tijekom razvoja analizirali smo ekspresiju gena *Oct3/4* i *Pcna* na razini proteina. Analizirali smo i 5azaC-om tretirane teratokarcinome kako bi ustanovili je li 5azaC djelovao na matični i proliferacijski kapacitet teratokarcinoma. Imunohistokemijski smo istražili prisutnost proliferirajućih stanica u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti teratokarcinoma te učinak 5azaC-a na distribuciju proliferacijski aktivnih stanica.

4.8.1. Ekspresija gena *Oct3/4* na razini proteina



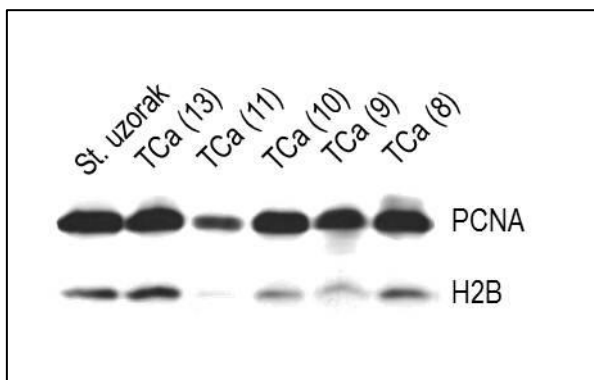
Slika 69. Ogledni primjerak analiziranog filma dobivenog postupkom Western blottinga u postupku određivanja ekspresije gena *Oct3/4* na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu miša.

Western blotting analiza pokazuje relativno stabilnu ekspresiju gena *Oct3/4* na razini proteina tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma. S izuzetkom skupine 4tj. K, ocrta se trend laganog porasta ekspresije gena *Oct3/4* od zametka do kraja promatranog perioda razvoja tumora. Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja pokazuju kontroverzno djelovanje 5azaC-a na razinu proteina Oct3/4 u tumoru. Naime, u 6tj. 5azaC skupini zabilježen je rast razine prisutnosti proteina Oct3/4 naspram kontrolnoj 6tj. K skupini, dok je, čini se 5azaC smanjio razinu ekspresije gena *Oct3/4* u 8tj. 5azaC skupini u usporedbi s kontrolnom 8tj. K skupinom (Slika 70.).



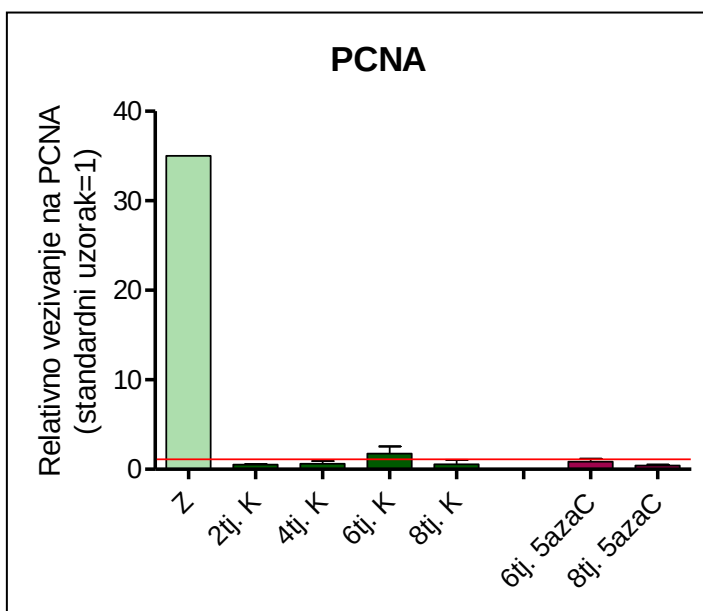
Slika 70. Ekspresija gena *Oct3/4* na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu.

4.8.2. Ekspresija gena *Pcna* na razini proteina



Slika 71. Ogledni primjerak analiziranog filma dobivenog postupkom Western blottinga u postupku određivanja ekspresije gena *Pcna* na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu miša.

Analiza ekspresije gena *Pcna*, biljega proliferacije, na razini proteina pokazuje najvišu razinu ekspresije u tkivu zametka. Postojana ekspresija gena *Pcna* prisutna je tijekom cijelog osmotjednog razvoja teratokarcinoma iako na drastično nižoj razini. Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja također pokazuju prisutnost proteina PCNA s drastičnim padom u usporedbi sa zametkom. Usporedba razina prisutnosti proliferacijskog proteina PCNA u 5azaC i kontrolnim skupinama pokazuje blago niže razine u 5azaC-om tretiranim tumorima (Slika 72.).

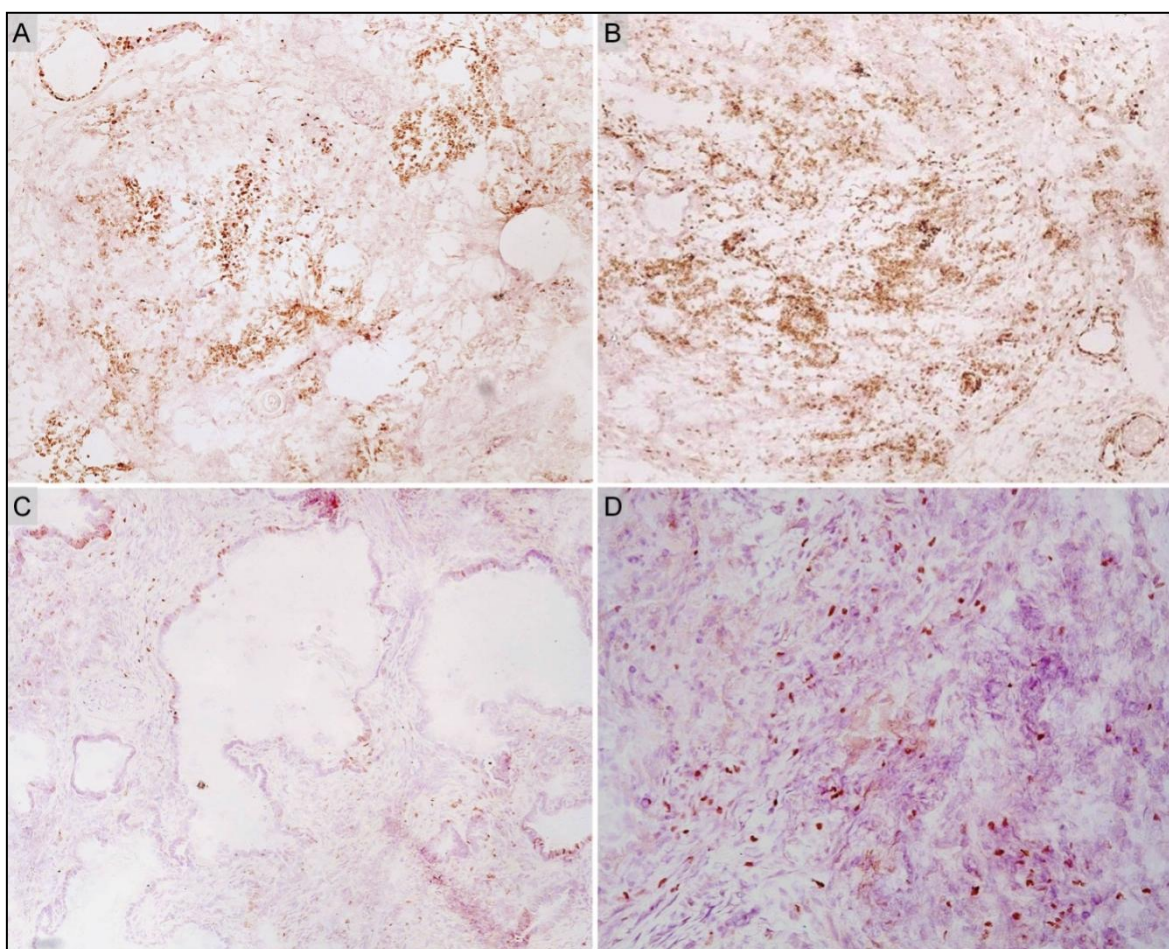


Slika 72. Ekspresija gena *Pcna* na razini proteina u eksperimentalnom teratokarcinomu.

4.8.3. Lokalizacija biljega proliferacije Ki-67

Pregledom tkiva kontrolnih skupina uočeno je da je ekspresija gena proliferacijskog biljega *Ki-67* prisutna u tkivima diferencirane i nediferencirane komponente tijekom cijelog osmotjednog razvoja. Signal je prisutan u nakupinama stanica (Slika 73. A i B).

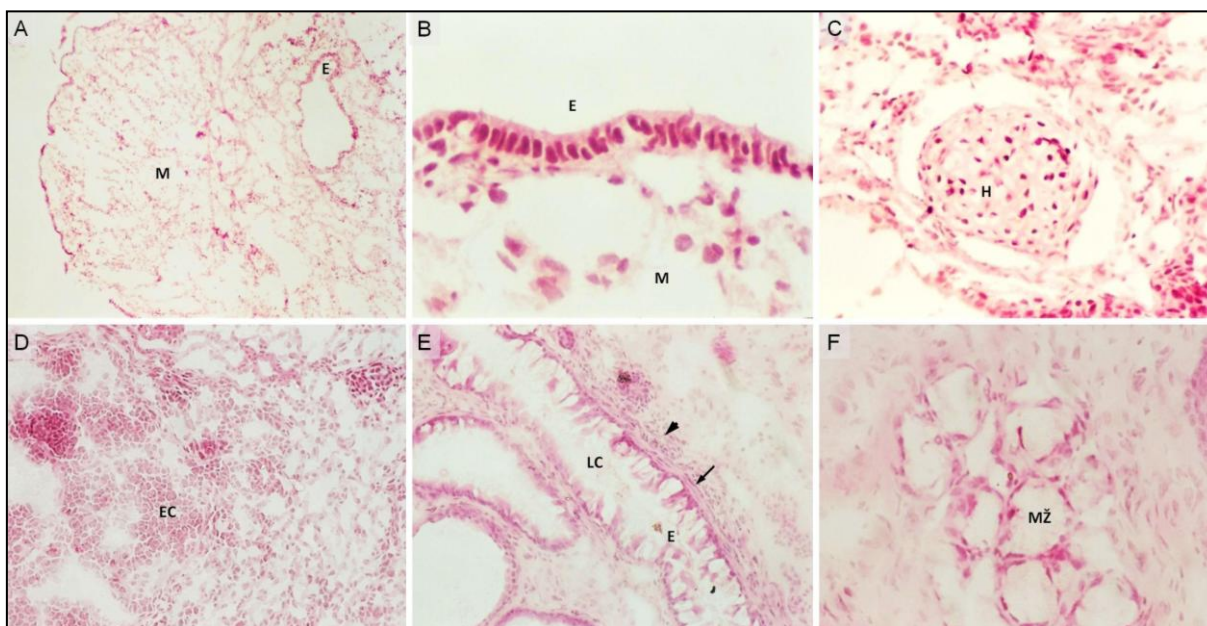
Teratokarcinomi 5azaC-om tretiranih životinja također pokazuju proliferacijsku aktivnost i u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti tumora. Ipak, uočljiv je različit obrazac distribucije signala. U 5azaC-om tretiranim tumorima Ki-67 pozitivne stanice raspoređene su difuzno u tkivu teratokarcinoma s iznimno rijetkim nalazom signala u nakupinama stanica (Slika 73. C i D).



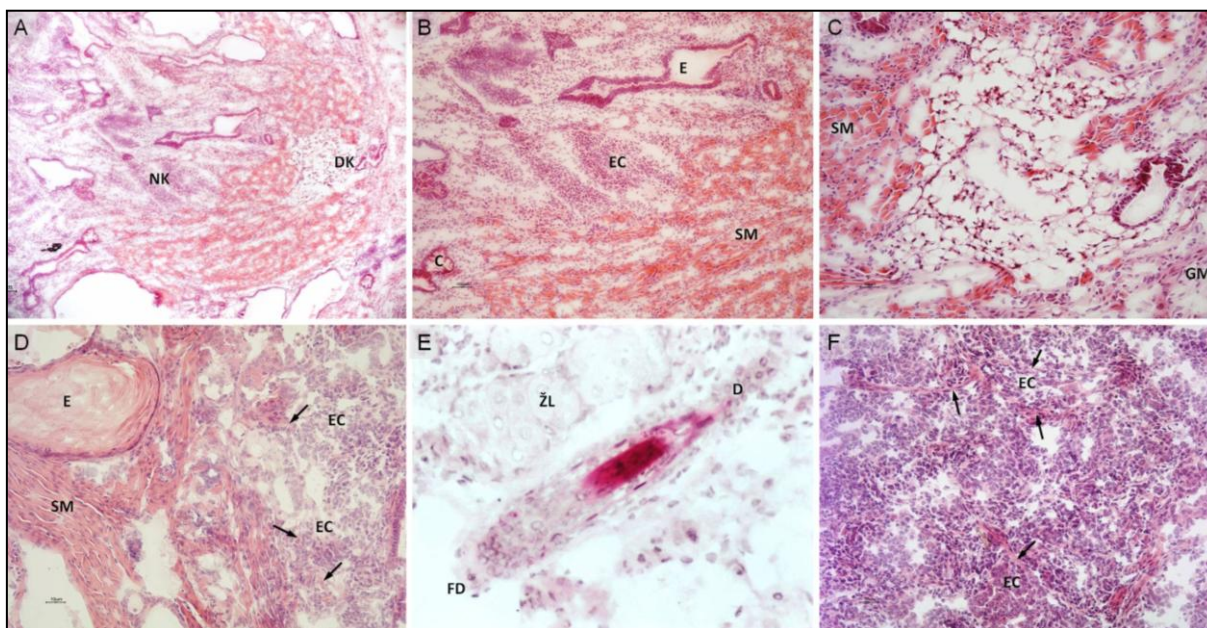
Slika 73. Ekspresija gena proliferacijskog biljega *Ki-67* u eksperimentalnom teratokarcinomu (DAB, kontrastirano hemalaunom). A i B: Kontrola (8tj. K) (x40). C i D: Teratokarcinom 5azaC-om tretirane životinje (8tj. 5azaC) (C x40, D x100).

4.9. Diferencijacija u eksperimentalnom teratokarcinomu

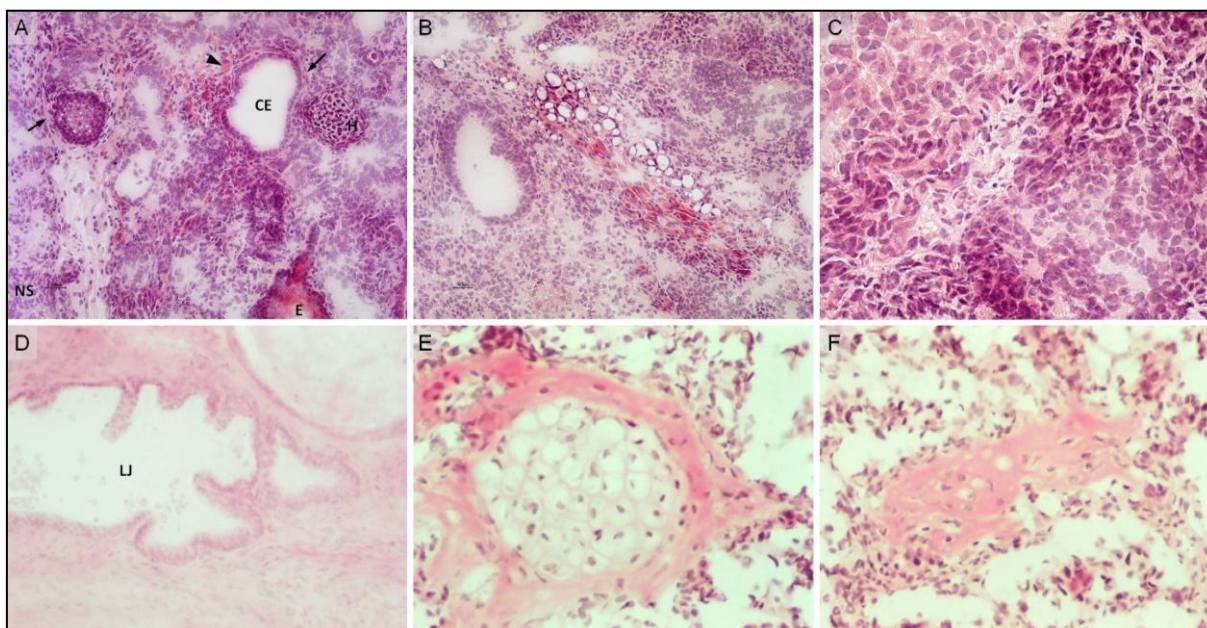
Analiza diferencijacije tkiva pokazuje postepeno sazrijevanje tkiva tijekom osam tjedana. Na početku razvoja, u teratokarcinomu starom 2 tjedna, vidljiva su slabo diferencirana tkiva prvenstveno mezenhim s rijetkim nalazom hrskavičnog i epitelnog tkiva (Slika 74.A-C). U četvrtom tjednu teratokarcinom smatramo razvijenim tumorom s vidljivom teratomskom komponentom i područjima embrionalnog karcinoma (Slika 74.D-F). U teratomskoj komponenti nalazimo uglavnom epidermalno tkivo, epitelno tkivo, neuroblaste, žljezdano tkivo, hrskavicu, koštano tkivo s osifikacijskim procesima, mišićne stanice i masne stanice. U šestom tjednu razvoja teratokarcinomi su građeni od embrionalnog karcinoma i diferenciranih tkiva teratomske komponente koja pokazuju viši stupanj zrelosti (Slika 75.A-C). Javlja se i organotipične strukture, folikul dlake primjerice (Slika 75.E). 5azaC je, čini se, potaknuo izrazitu miogenu diferencijaciju, budući da je nalaz miotuba između stanica embrionalnog karcinoma bio čest (Slika 75.D i F). U osmom tjednu razvoja organotipične strukture nalaze se češće i u kontroli i u 5azaC tretiranim tumorima (Slika 76.).



Slika 74. Eksperimentalni teratokarcinomi miša stari 2 tjedna (A-C) i 4 tjedna (D-E) (HE). A: Mezenhim (M), epidermis (E) (x40). B: Cilindrični epitel (E), mezenhim (M) (x200). C: Hrkavica (H) (x100). D: Stanice embrionalnog karcinoma (EC) (x40). E: Organizacija tkiva koja histološki odgovara probavnoj cijevi, lumen crijeva (LC), epitel (E), mišićne stanice (strelica), rahlo vezivo (vrh strelice) (x100). F: Mukozna žlijezda (MŽ) (x200).



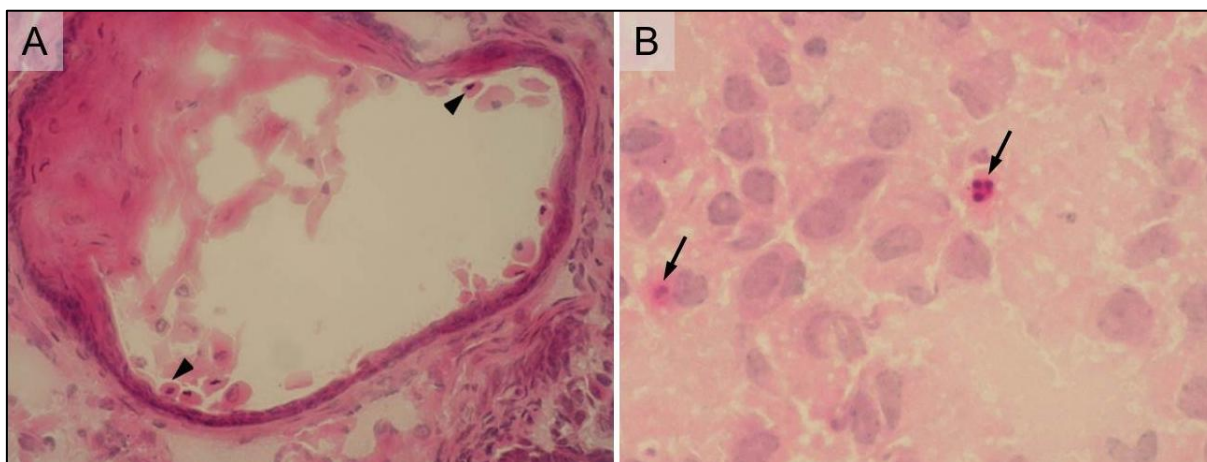
Slika 75. Eksperimentalni teratokarcinomi miša stari 6 tjedana (HE). Kontrolni tumori (A-C) i 5azaC-om tretirani (D-E). A: Nediferencirana komponenta (NK), diferencirana komponenta (DK) (x40). B: epidermis (E), embrionalni karcinom (EC), organizacija tkiva koja histološki odgovara probavnoj cijevi (C), skeletni mišić (SM) (x100). C: Skeletni mišić (SM), glatki mišić (GM) (x200). D: Epidermis (E), skeletni mišić (SM), embrionalni karcinom (EC), mišićna vlakna (strelica) (x200). E: Folikul dlake (FD), dlaka (D), žlijezda lojnica (ŽL) (x400). F: Stanice embrionalnog karcinoma (EC) prožete skeletnim mišićnim vlaknima (strelica) (x200).



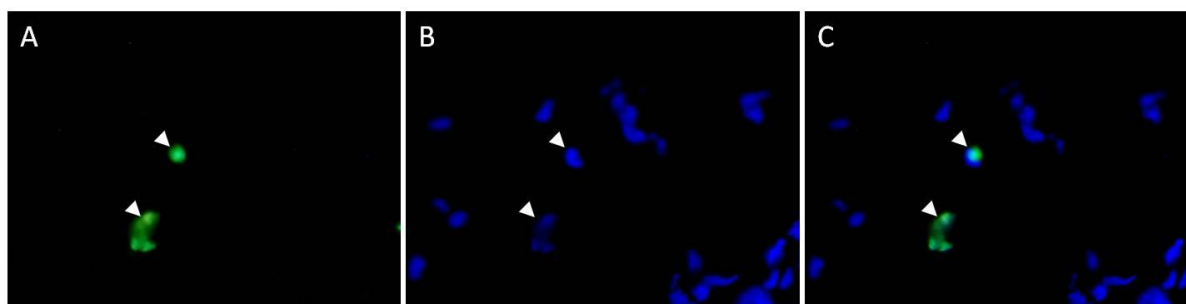
Slika 76. Eksperimentalni teratokarcinomi miša stari 8 tjedana (HE). Kontrolni tumori (A-C) i 5azaC-om tretirani (D-E) (HE). A: Epidermis (E), nediferencirane stanice (NS), hrskavica (H), epitel crijeva (CE), glatke mišićne stanice (strelica), stanice skeletnog mišića (glava strelice) (x100). B: Područje diferenciranih stanica u nediferenciranom tkivu teratokarcinoma (x200). C: Nediferencirane stanice (x400). D: organizacija tkiva koja histološki odgovara jajovodu s vidljivim naborima lamine proprije prekrivene jednoslojnim cilindričnim epitelom i obavijene snopovima glatkih mišićnih stanica, lumen jajovoda (L) (x40). E: Enhondralno okoštavanje (x400). F: Koštano tkivo (x400).

4.10. Apoptoza u eksperimentalnom teratokarcinomu

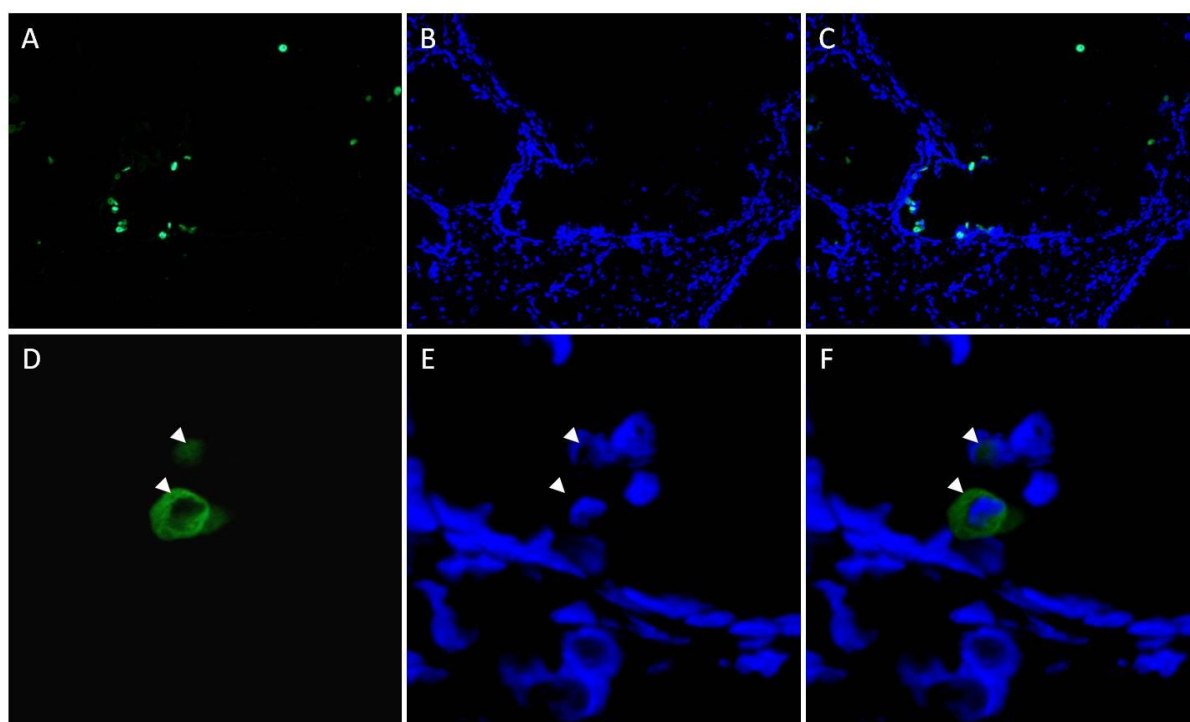
Prisutnost apoptotičkih stanica i apoptotičkih tjelešaca na HE obojanim staklima (Slika 77.) ekspresija apoptotičkog biljega Kaspaza-3 (Slika 78.) i TUNEL analiza (Slika 79.) pokazuju mjestimičnu prisutnost apoptotičkih stanica u cijelom tumoru podjednako u različitim tkivima. Brzim pregledima apoptotičkih stanica i apoptotičkih tjelešaca na HE obojanim staklima nije pronađen učinak 5azaC-a na apoptozu u teratokarcinomu.



Slika 77. Apoptotičke stanice i apoptotička tjelešca u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (HE). A: Apoptotičke stanice u lumenu keratinske ciste (glava strelice) (x400). B: Apoptotička tjelešca u nezrelom tkivu TCa (strelica) (x600).

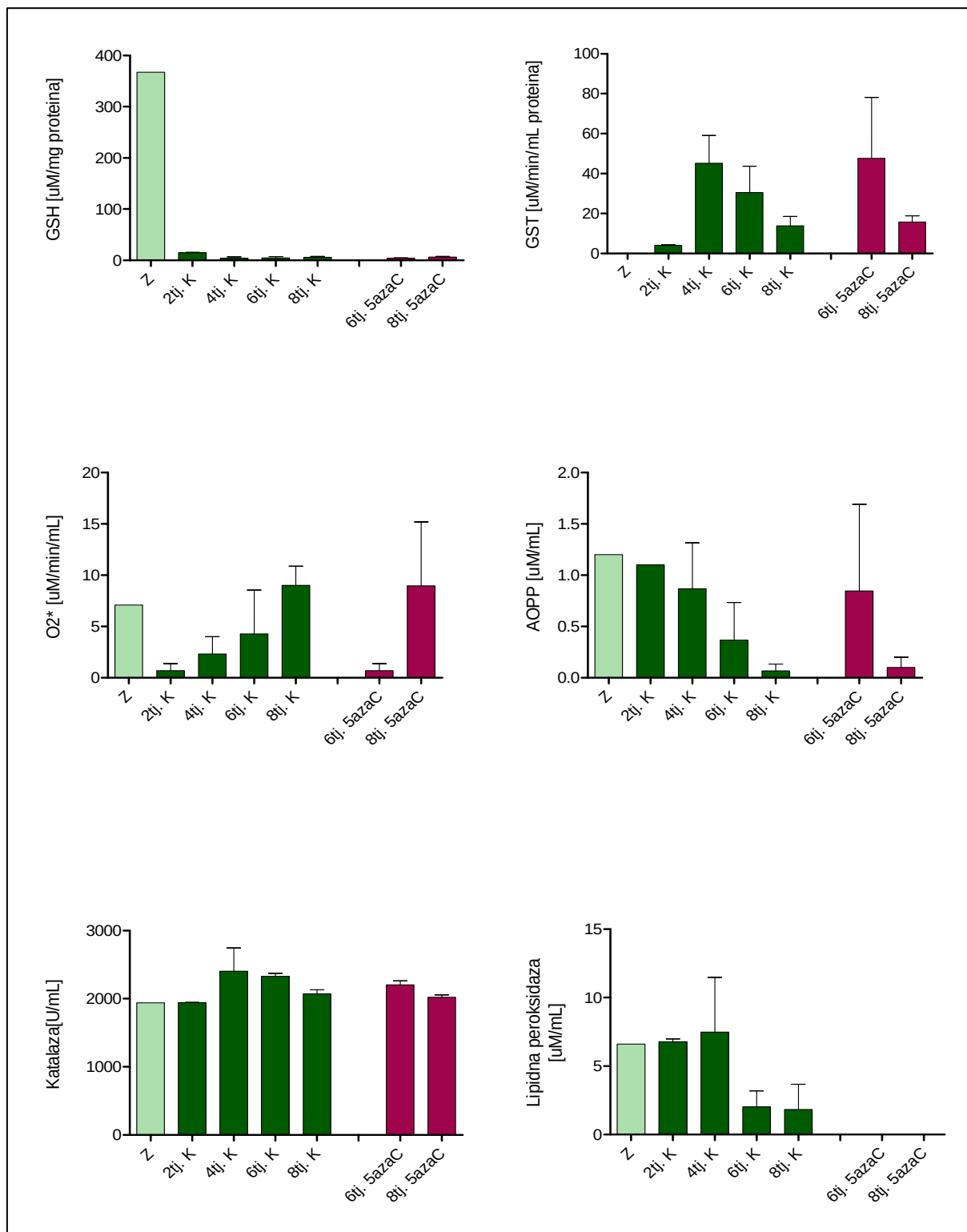


Slika 78. Prikaz apoptotičkih stanica u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (TUNEL, x100). A: Nuklearni signal apoptotičkih stanica (vrh strelice). B: DAPI. C: Integrirana slika.



Slika 79. Prikaz apoptotičkih Kaspaza-3 pozitivnih stanica u eksperimentalnom teratokarcinomu miša (FITC). A i D: Citoplazmatski signal apoptotičkih stanica (vrh strelice) (A x40, D x600). B i E: DAPI (B x40, E 600X). C i F: Integrirana slika (C x40, F x600).

4.11. Biljezi oksidacijskog stresa i upale u eksperimentalnom teratokarcinomu



Slika 80. Biljezi oksidacijskoga stresa i upale tijekom razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša.

Analiza izmjerenih koncentracija GSH pokazuje statistički značajnu promjenu tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša (Slika 80., Tablica 53.). Najviše vrijednosti GSH izmjerene su u zametku. Već nakon dva tjedna razvoja teratokarcinoma, vrijednosti GSH drastično padaju, te se trend smanjenja GSH nastavlja do kraja praćenog perioda razvoja tumora. 5azaC nije inducirao promjene koncentracije GSH u analiziranim tumorima (Tablica 54.).

Analiza aktivnosti GST također pokazuje statistički značajnu promjenu tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša (Slika 80., Tablica 53.). Za razliku od koncentracije GSH, izmjerena je aktivnost GST najniža u zametku te se postepeno tijekom prve polovice tumorskog razvoja diže na maksimalne izmjerene vrijednosti. Nakon četvrtog tjedna razvoja, aktivnost GST pokazuje silazni trend do kraja praćenog perioda razvoja tumora. 5azaC nije imao značajan učinak na promjenu aktivnosti GST tijekom razvoja teratokarcinoma (Tablica 54.).

Koncentracije superoksida ne pokazuju statistički značajne promijene tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša (Slika 80., Tablica 53.). Ipak, izmjerene koncentracije pokazuju jasan trend promjene. Naime, nakon drastičnog pada koncentracije superoksida u prva dva tjedna razvoja teratokarcinoma u usporedbi sa zametkom, pojavljuje se trend oporavka koncentracijskih vrijednosti O_2^* tijekom daljnjeg razvoja tumora. 5azaC nije imao značajan učinak na promjenu koncentracije superoksida tijekom razvoja teratokarcinoma (Tablica 54.).

Izmjerene koncentracije AOPP pokazuju trend kontinuiranog pada tijekom tumorskog razvoja (Slika 80.). Najviše vrijednosti izmjerene su u zametku, a najniže na kraju promatranog razvoja teratokarcinoma. Ipak, nije pronađena statistička značajnost promjena AOPP tijekom osmotjednog razvoja teratokarcinoma (Tablica 53.). 5azaC nije imao značajan učinak na promjenu koncentracije superoksida tijekom razvoja teratokarcinoma (Tablica 54.).

Izmjerene koncentracije Katalaze ne pokazuju značajnu promjenu tijekom razvoja tumora (Slika 80., Tablica 53.) ni nakon tretmana s 5azaC-om (Tablica 54.).

Koncentracije Lipidne peroksidaze pokazuju stabilne vrijednosti na početku te pad vrijednosti u drugoj polovici razvoja tumora (Slika 80.). Nije pronađena nikakva statistička značajnost u navedenim promjenama. Lipidne peroksidaze tijekom razvoja teratokarcinoma (Tablica 53.). Vrijednosti koncentracija Lipidne peroksidaze u tumorima životinja tretiranih s 5azaC jednake su nuli (Slika 80.).

Tablica 53. Prikaz promjena aktivnosti biljega oksidacijskog stresa tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša.

Biljeg	GSH	GST	O_2^*	AOPP	Katalaza	Lipidna peroksidaza
Statistička značajnost	$p=0,0461$	$p=0,0246$	$p=0,2834$	$p=0,2661$	$p=0,0984$	$p=0,1179$

1way ANOVA

Tablica 54. Usporedba aktivnosti biljega oksidacijskog stresa između 5azaC-om tretiranih i kontrolnih skupina eksperimentalnog teratokarcinoma miša.

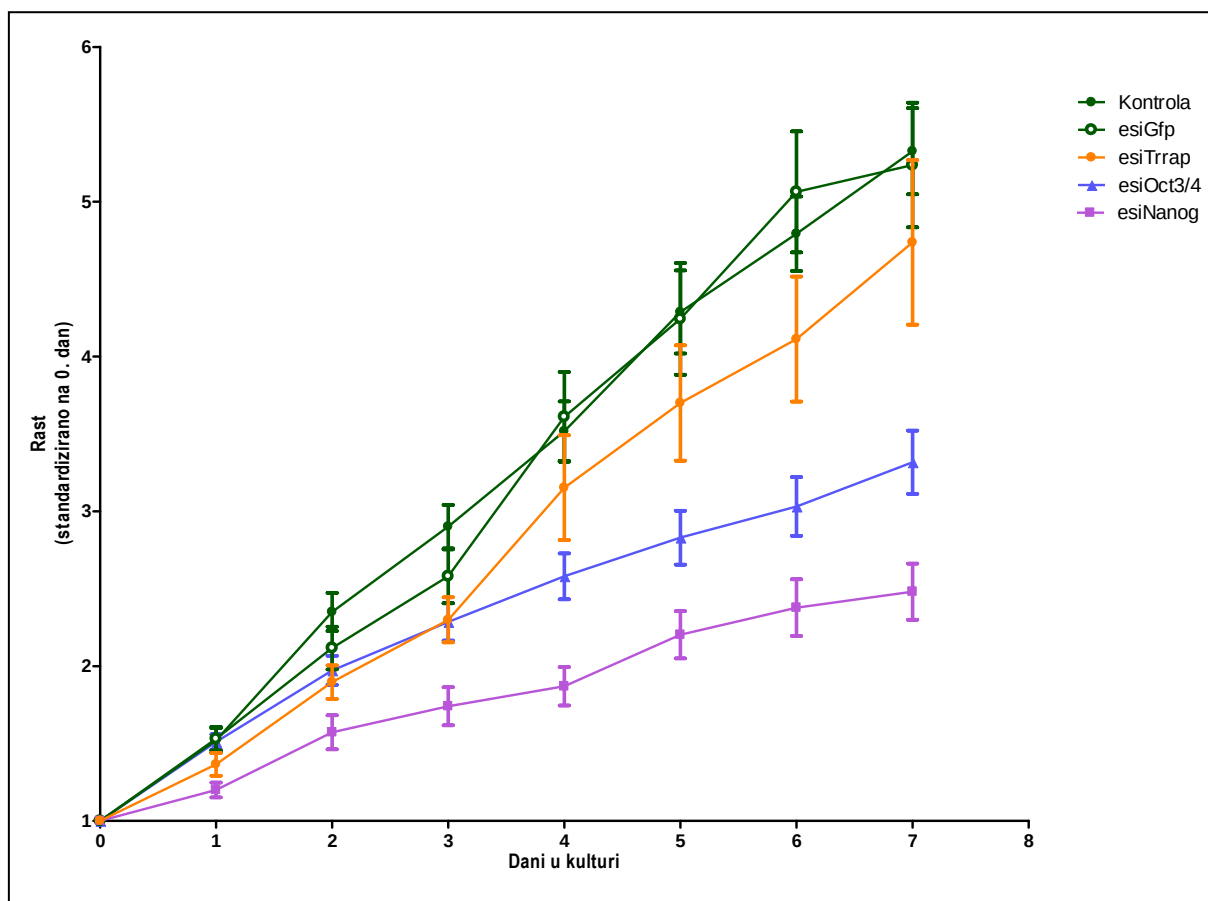
	GSH	GST	O2*	AOPP	Katalaza	Lipidna peroksidaza
6tj. K <i>vs.</i> 6tj. 5azaC	p=0,4000	p=1,0000	p=1,0000	p=0,6428	p=0,1000	*
8tj. K <i>vs.</i> 8tj. 5azaC	p=0,4857	p=1,0000	p=0,6579	p=1,0000	p=0,7000	*

Mann Whitneyev test.

* Izmjerene vrijednosti unutar skupina jednake su nuli.

4.12. Rast eksperimentalnog teratoma *in vitro* u medijima obogaćenima esiRNA

Kultiviranjem izoliranoga zametka u kulturi organa *in vitro* razvija se teratom. Tijekom sedmodnevnog perioda kultiviranja kontrolni zametak/teratom pokazuje stabilan linearan rast (Slika 81.). Zameetak/teratom koji je prvih 24 sata rastao u esiGFP obogaćenom mediju nije pokazao promjenu intenziteta rasta u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 55.).



Slika 81. Rast eksperimentalnog teratoma *in vitro* u različitim esiRNA obogaćenim medijima.

Kontinuirano niže vrijednosti rasta tijekom promatranog sedmodnevnog perioda pokazuje zameetak/teratom koji je rastao u esiTtrap obogaćenom mediju (Slika 81.). Iako je trend nižeg rasta stabilan tijekom čitave kulture, esiTtrap nije statistički značajno smanjio rast teratoma u usporedbi s kontrolom (Tablica 55.). EsiOct3/4 inducirao je statistički značajan pad rasta teratoma u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 55.). Iako je zameetak rastao u esiOct3/4 obogaćenom mediju isključivo prvih 24 sata kulture, smanjenje sposobnosti rasta teratoma inducirano s esiOct3/4 čini se stabilnim tijekom narednog perioda kulture organa s posljedičnom razlikom veličine tumora na kraju promatranog sedmodnevnog razdoblja (Slika 81.). Najdrastičniji učinak smanjenja sposobnosti tumorskoga rasta uočen je u skupini teratoma koji su prvih 24 sata rasli u mediju obogaćenim s esiNanog (Tablica 55.). Naime, esiNanog

pokazuje najjači negativan učinak na rast teratoma te su u esiNanog skupini izmjerene najniže vrijednosti rasta tumora (Slika 81.). Poput esiOct3/4, smanjenje sposobnosti rasta tumora inducirano s esiNanog čini se trajnim budući da je inhibicija rasta tumora zadržana tijekom narednog perioda kultiviranja.

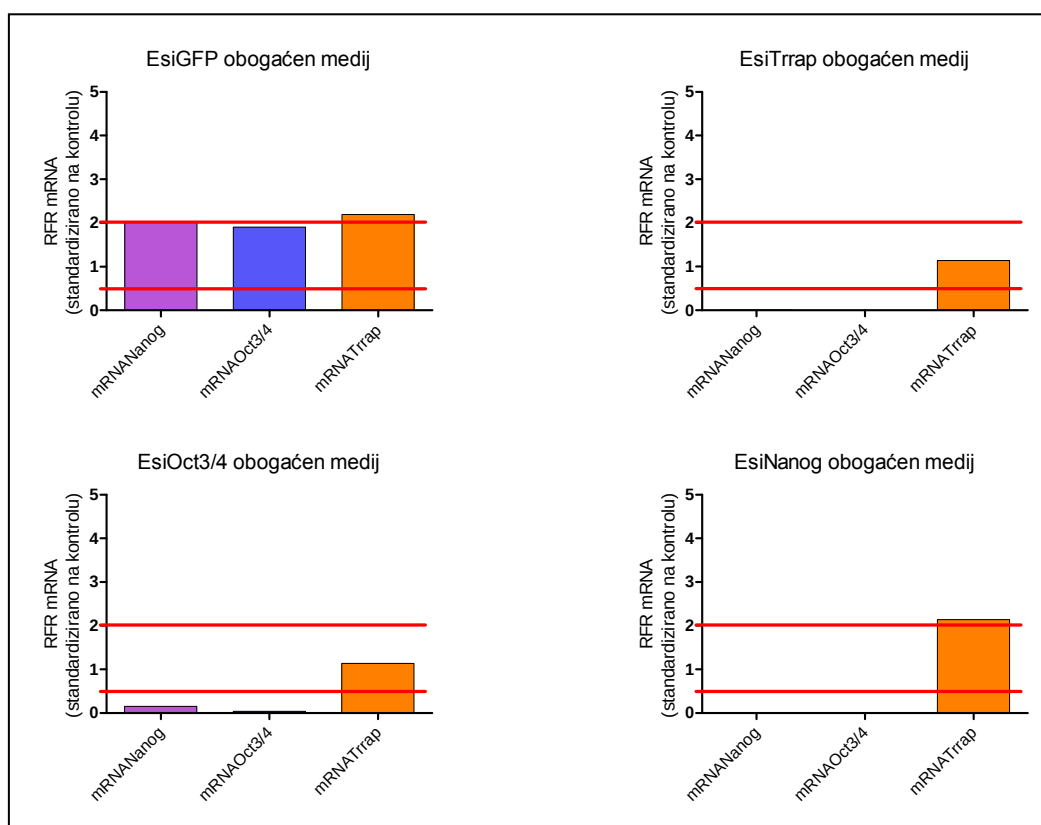
Tablica 55. Usporedba sedmodnevnog rasta zametka/teratoma u kulturi organa u pojedinom esiRNA obogaćenom mediju s kontrolom.

	esiGFP	esiTrrap	esiOct3/4	esiNanog
Kontrola	p=0,9472	p=0,3991	p=0,0147	p=0,0001

„Column statistics, One-sample t test“

4.13. Ekspresija gena na razini mRNA u eksperimentalnom teratomu *in vitro*

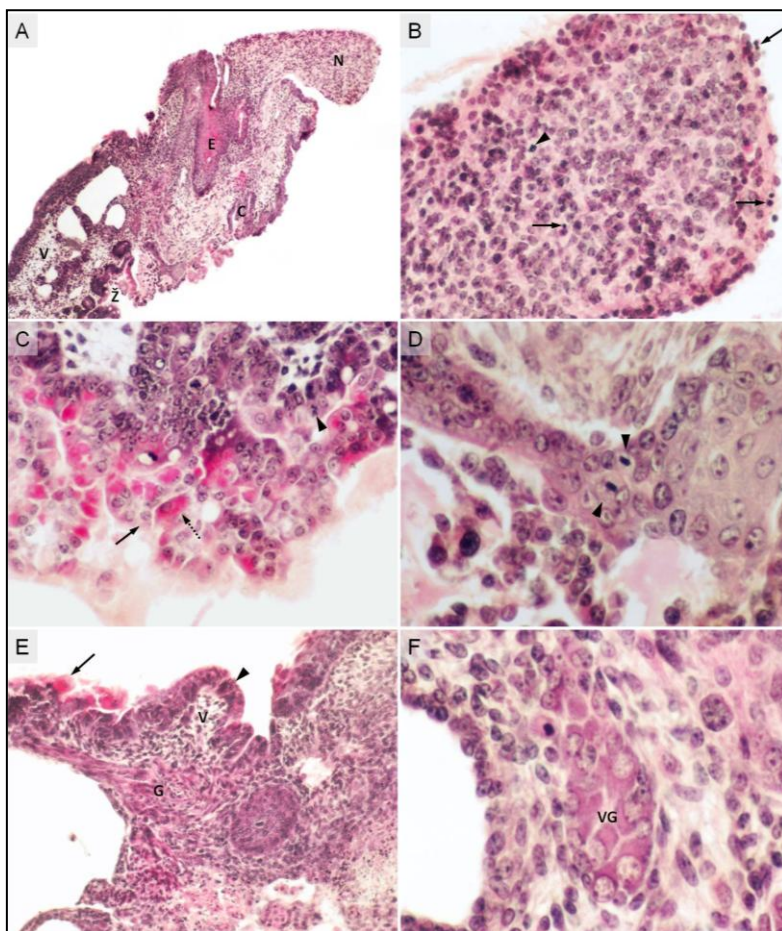
Analiza ekspresije na razini mRNA pokazuje da esiGFP nije značajno utjecao na promjenu ekspresije gena *Oct3/4*, *Nanog* i *Trrap* u usporedbi s njihovom ekspresijom u kontrolnoj skupini. EsiTrrap, esiOct3/4 i esiNanog drastično su smanjili ekspresiju matičnih gena *Oct3/4* i *Nanog* u pripadajućim eksperimentalnim skupinama u usporedbi s kontrolom. Mjerenje razina ekspresije matičnih gena ukazuje na jaču inhibicijsku sposobnost esiNanog u usporedbi s esiOct3/4. Inhibicija ekspresije matičnih gena čini se stabilnom budući da su mjerenja ekspresije provedena sedmog dana razvoja odnosno šest dana po završetku rasta zametka u esiRNA obogaćenom mediju. Ekspresija gena *Trrap* u svim je esiRNA eksperimentalnim skupinama usporediva s razinama ekspresije u kontrolnoj skupini tumora (Slika 82.).



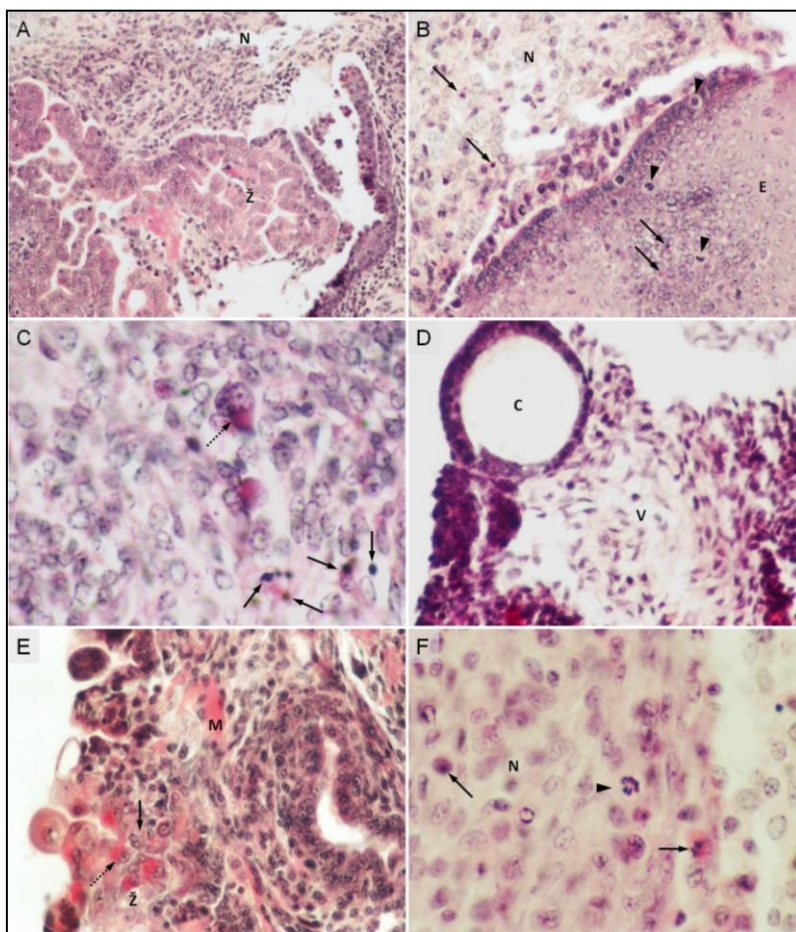
Slika 82. Ekspresije gena *Nanog*, *Oct3/4* i *Trrap* na razini mRNA u eksperimentalnom teratomu *in vitro*.

4.14. Diferencijacija u eksperimentalnom teratomu *in vitro*

Pregledom histoloških preparata obojanih HE na svjetlosnom mikroskopu, utvrđena je prisutnost derivata svih triju zametnih listića na različitom stupnju diferencijacije te pojedine organotipične strukture. Među prepoznatim tkivima prevladavalo je neuralno tkivo, žljezdani epitel, epitel probavne cijevi, epidermis, glatko mišićje, miotube i poprečno prugasta muskulatura i hrskavica (Slika 83. i 84.). Nije utvrđena razlika u tipu tkiva niti stupnju diferencijacije među eksperimentalnim teratomima raslima u različitim esiRNA obogaćenim medijima ili kontrolama.



Slika 83. Eksperimentalni teratom miša kultiviran u esiGFP obogaćenom mediju (HE). A: neuralno tkivo (N), epidermis (E), cilindrični epitel (C), žljezdani epitel (Ž) i vezivno tkivo (V) (x40). B: neuralno tkivo s vidljivim mitozama (vrh strelice) i apoptozama (strelica) (x200). C: organizacija tkiva koja histološki odgovara fundusu želuca, glavne stanice (strelica), obložne stanice (iscrtkana strelica), mitozu (vrh strelice) (x200). D: mitoze u epidermisu (vrh strelice) (x400). E: organizacija tkiva koja histološki odgovara probavnoj cijevi, obložne stanice fundusa želuca (strelica), cilindrični epitel (vrh strelice), rahlo vezivno tkivo lamine proprie (V) i nakupina glatkih mišićnih stanica (G) (x100). F: vegetativni živčani ganglij (VG) (x400).



Slika 84. Eksperimentalni teratom miša kultiviran u esiTrrap, esiOct3/4 i esiNanog obogaćenim medijima (HE). A: esiTrrap, neuralno tkivo (N), žljezdani epitel (Ž), (x100). B: esiTrrap, neuralno tkivo (N), epidermis (E), mitoze (vrh strelice) i apoptoze (strelica) (x200). C: esiTrrap, živčana stanica vegetativnog tipa (iscrtkana strelica), apoptoze (strelica) (x400). D: esiOct3/4, cista (C) i vezivno tkivo (V) (x200). E: esiNanog, organizacija tkiva koja histološki odgovara fundusu želuca, glavne stanice (strelica), obložne stanice (iscrtkana strelica), miotuba (M) (x200). F: esiNanog, neuralno tkivo (N) s mitozama (vrh strelice) i apoptozama (strelica) (x400).

5. RASPRAVA

5.1. Eksperimentalni teratokarcinom u miša

Identifikacija EC stanica u eksperimentalnom tumoru miša dobivenog ektopičnom transplantacijom zametka definira eksperimentalni teratokarcinom miša te ga razlikuje od eksperimentalnog teratoma. Do danas se identifikacija EC stanica u eksperimentalnom tumoru miša temeljila na analizi tumorskog tkiva klasičnim histološkim analizama na temelju kriterija i nomenklatura koje su postavili Stevens i Pierce 1975. godine (1). Prema navedenoj metodi, Solter, Škreb i Damjanov su u svojim radovima s mišjim sojem C3H, među eksperimentalnim tumorima miša dobivenih ektopičnom transplantacijom zametka, 50% tumora prepoznali kao benigne teratome, dočim su tek u preostalim dobivenim tumorima pronašli EC stanice te klasificirali tumore kao teratokarcinome (1-3). Jedno od ponuđenih objašnjenja predlaže da razvoj benigne odnosno maligne forme tumora ovisi o samim embrionalnim matičnim stanicama koje u ektopičnim uvjetima mogu zadržati pluripotentnost ili krenuti putem diferencijacije (4). Predlaže se i mogućnost da ektopično transplantirane matične stanice zametka bivaju aktivno uništene u razvijajućem tumoru pri čemu opstaje samo diferencirana komponenta (5). Iz navedenog proizlazi da teratom nastaje nestankom tumorskih matičnih EC stanica. Ipak, prema suvremenim spoznajama o biologiji tumora, navedena pretpostavka čini se malo vjerojatnom budući da pretpostavlja da u nekom trenutku tumorigeneze, spontano ili ne, maligni karcinom prolazi kroz konverziju u benigni tumor. Međutim, pojedini autori koji su koristili morfološku metodu identifikacije EC stanica također su objavili slične teratom/teratokarcinom udjele (6, 7). Ipak, objavljene su rijetke studije koje upozoravaju na nisku osjetljivost morfološke metode identifikacije teratokarcinoma s obzirom na izrazitu heterogenost tumora, izrazito male udjele analiziranog tkiva i subjektivnosti metode (6-8). Iles je naveo sumnju u 40% eksperimentalnih tumora u kojih nije pronašao EC stanice, budući da, kako je sam naveo, izostanak specifičnih stanica u analiziranom dijelu tkiva zasigurno ne znači da se dotične stanice ne nalaze u ostalim nepregledanim dijelovima tumora klasificiranim kao teratomi. Naime, iako je objavio visok postotak prepoznatih teratokarcinoma, Iles je identifikaciju EC stanica odnosno klasifikaciju teratokarcinoma temeljio na pregledu samo jednog na, ponekad čak, 100 histoloških rezova tumora, što čini 1% ukupne mase izrazito heterogenog tumora (6). Na nisku osjetljivost histološke metode identifikacije teratokarcinoma upozoravao je i Mintz (7). Stoga, mišljenja smo da je morfološka metoda određivanja teratokarcinoma klasičnim histološkim metodama u duhu vremena i u skladu s tehnologijom dostupnom u vrijeme postavljanja animalnog modela eksperimentalnog teratokarcinoma miša. Za potrebe ovog istraživanja odlučili smo eksperimentalni tumor miša dobiven ektopičnom transplantacijom zametka testirati na prisustvo EC stanica suvremenim molekularnim tehnologijama u duhu današnjeg vremena i u skladu s najnovijim spoznajama biologije pluripotentnih matičnih stanica.

Imunohistokemijske metode detekcije specifičnih proteina u tumorskom tkivu pokazale su se od iznimne vrijednosti u identifikaciji te klasifikaciji tumora, ali i istraživanjima razvojnih procesa u biologiji raznih tumora (9). Primjer upotrebe ove molekularne metode, kako u znanosti tako i u medicinskoj praksi, je detekcija specifičnih proteina u istraživanjima kancerogeneze tumora dojke kao i onih koji diferenciraju karcinom dojke od karcinoma ostalih sijela te identifikacija prediktivnih faktora za uspješno liječenje i potencijalnih prognostičkih faktora (10). Imunohistokemijski biljeg, proteinski produkt, koji opisuje obje komponente teratokarcinoma je AFP. Naime, Yuasa i suradnici dokazali su da je AFP izrazito pozitivan u diferenciranom teratomu i nediferenciranom embrionalnom karcinomu te da je biljeg koji navedene forme tumora zametnih stanica diferencira od seminoma, druge česte forme tumora zametnih stanica. Naime, seminom pokazuje potpunu odsutnost AFP⁺ stanica (11). Iako su istraživači određivali ekspresiju AFP u čistim formama testikularnih tumora, za pretpostaviti je da miješana forma, teratokarcinom, objedinjuje specifičnosti oba tumora, teratoma i embrionalnog karcinoma. Sukladno navedenom, očekivan izrazito pozitivan imunohistokemijski signal na AFP pronađen je u eksperimentalnom tumoru miša. Hahnel i Eddy pokazali su da se EMA-1⁺ stanice nalaze u obje komponente teratokarcinoma. EMA-1 antigen ekspimiran je na membranama mišjih stanica embrionalnog karcinoma i pojedinim tipovima diferenciranih stanica sastavnica teratomske komponente (12). Ipak, EMA-1 bojanje nije specifično za teratokarcinom budući da je ekspresija EMA-1 pronađena u mnogim normalnim tkivima (13) pa i tumorima (14). Za razliku od AFP i EMA-1 biljega, SSEA-3 ekspimiran je na membranama stanica zametka miša koji se brazda i gubi se već u stadiju blastociste (15). Kako je poznato, u miša je antigen SSEA-3 izrazito ekspimiran na stanicama tkiva bubrega, nije ekspimiran na membranama EC stanica i iznimno rijetko može se pronaći kao otočić pozitivnog signala u diferenciranim derivatima teratokarcinoma (15-17). Navedeni obrazac ekspresije u potpunosti se podudara s ekspresijom biljega SSEA-3 u eksperimentalnom tumoru miša dobivenom tijekom ovog istraživanja; izrazito pozitivno tkivo bubrega, pojedinačni rijetki otočići SSEA-3 pozitivnih stanica u prevladavajuće negativnom diferenciranom tkivu te potpuna odsutnost imunohistokemijskog signala u nediferenciranoj komponenti. Ipak, intenzivna ekspresija AFP i EMA-1 te odsutnost SSEA-3, iako opisuje teratokarcinom, ne pridonosi značajno identifikaciji eksperimentalnog tumora kao teratokarcinoma budući da AFP, EMA-1 i SSEA-3 ne razlikuju teratom od embrionalnog karcinoma. Budući da se teratomska komponenta može neosporno dokazati i prepoznavanjem diferenciranih derivata svih triju zametnih listića na standardnom HE pripremljenom preparatu, ključno je imunohistokemijski dokazati ekspresiju biljega koji razlikuju teratom i embrionalni karcinom, odnosno potvrđuju postojanje EC stanica u eksperimentalnom tumoru miša.

Temeljna značajka koja EC stanice razlikuje od ostalih stanica teratokarcinoma, neovisno o stupnju diferenciranosti, njihova je iznimna sličnost s embrionalnim matičnim stanicama, odnosno njihova pluripotentnost i matičnost. Proteinski biljeg i pripadajući gen, koji se pokazao iznimno vrijedan u razumijevanju biologije pluripotentnosti i matičnosti te biologije tumora zametnih stanica svakako je OCT3/4 (18-20). Nichols i suradnici pokazali su da je ekspresija gena *Oct3/4* esencijalni element identiteta

populacije pluripotentnih embrionalnih matičnih stanica u sisavaca (21). Iako *Oct3/4*-deficijentni zameci uspijevaju dostići stadij blastociste, embrioblast gubi svojstvo pluripotentnosti. Gubitak ekspresije gena *Oct3/4* u embrionalnim matičnim stanicama usmjerava pluripotentne stanice zametka ka diferencijaciji (22). Gen *Oct3/4* intenzivno je eksprimiran i u stanicama epiblasta, a njegova se ekspresija gubi kako se pluripotentne stanice epiblasta diferenciraju. Naposljetku, OCT3/4 ostaje prisutan isključivo u zametnim stanicama koje se smatraju prekursorima spontanijih tumora zametnih stanica među koje spada i teratokarcinom (23). U skladu s tim je stabilna ekspresija gena *OCT3/4* u nediferenciranim tipovima tumora zametnih stanica. OCT3/4 se i u kliničkoj praksi pokazao korisnim biljekom u dijagnosticiranju navedenih tumora (18-20). Ako se, pak, pad ekspresije gena *Oct3/4* u zametku održi, gubi se potencijal za razvoj samih zametnih stanica (24). Sukladno Rosnerovu opažanju, Waldrip i suradnici dokazali su da preuranjeni gubitak proteina OCT3/4 u *Smad2*-deficijentnim zamecima inducira prijevremeni gubitak matičnosti i pluripotentnosti epiblasta te naglu diferencijaciju epiblasta u diferencirane derivate zametnih listića (25). U našem istraživanju upravo je zametni štit, koji procesom gastrulacije nastaje iz epiblasta, transplantirani element iz kojeg se razvija eksperimentalni tumor. Za pretpostaviti je da, sukladno dosadašnjim istraživanjima, opstojnost ekspresije gena *Oct3/4* uvjetuje opstojnost pluripotentnih EC stanica odnosno maligne komponente eksperimentalnog teratokarcinoma. Iz svega navedenog, smatramo da je detekcija proteina OCT3/4 metoda izbora za razlikovanje OCT3/4 negativnih stanica diferencirane teratomske komponente i OCT3/4 pozitivnih EC stanica embrionalnog karcinoma. Identifikacija OCT3/4 pozitivnih pluripotentnih matičnih stanica neosporno klasificira tumor teratokarcinomom. Imunohistokemijska analiza naših uzoraka eksperimentalnog tumora miša pokazala je postojanje OCT3/4⁺ stanica. Očekivano, OCT3/4⁺ stanice detektirane su u nediferenciranom tkivu tumora. Pritom difuzna lokalizacija signala u nediferenciranom tkivu nije bila jedini iznenađujući nalaz. Naime, OCT3/4⁺ stanice identificirane su i u diferenciranoj komponenti tumora. Pronađene su u vezivu između mišićnih stanica, u vezivu između različitog dobro diferenciranog epitela, u vezivu čahure i vezivu neposredno ispod čahure bubrega koja obavlja tumor. Ovakva rasprostranjenost upozorava na izrazitu infiltrativnost OCT3/4⁺ stanica u ostatak tumora odnosno diferenciranu komponentu. Ostaje nerazjašnjeno jesu li OCT3/4⁺ stanice ishodište okolnog diferenciranog tkiva ili je njihova rasprostranjenost posljedica migracije kroz tumorsko tkivo. Navedeno dodatno naglašava mogućnost previda EC stanica klasičnom histološkom metodom identifikacije teratokarcinoma budući da se obično govori o „gnijezdima“ EC stanica. U skladu s dobivenim imunohistokemijskim nalazom, a u namjeri da izbjegnemo potrebu za velikim brojem serijskih rezova i bojanja, imunohistokemijsku detekciju OCT3/4 zamijenili smo Western blot metodom koju smo dopunili analizom ekspresije gena *Oct3/4* na razini mRNA q-PCR-om. Western blot i q-PCR izrazito su osjetljive molekularne metode detekcije te omogućuju otkrivanje specifičnog proteina odnosno mRNA u malom analitičkom uzorku iz većeg i, zbog protokola obrade, homogenog uzorka tumora. Time se, zbog izrazite heterogenosti tumora, smanjuje opasnost od uzorkovanja dijela tumora bez matičnih stanica te povećava osjetljivost detekcije ekspresije gena *Oct3/4* odnosno

identifikacije EC stanica. I uistinu, svi nasumično odabrani uzorci svih kontrolnih 5azaC-om netretiranih skupina, izuzev jednog uzorka, neovisno o masi ili histološkoj slici pokazali su pozitivnu ekspresiju gena *Oct3/4*. Navedeni uzorak, opisan je kao OCT3/4- na Western blot analizi. Budući da je proteinski homogenat za analizu dobiven iz otprilike 200 μ m serijskih rezova tumorskog tkiva, pretpostavljamo da je negativan nalaz posljedica heterogenosti tumora te da rezovi nisu zahvatili dovoljnu količinu EC stanica. Ukupno je analizirano oko 50% svih tumora dobivenih ektopičnom transplantacijom mišjeg zametka i gotovo 100% analiziranih eksperimentalnih tumora pokazuje ekspresiju gena jezgre matičnosti *Oct3/4*. Navedeno ukazuje na to da je frakcija EC stanica prisutna u svim analiziranim tumorima. Kako bi potvrdili ovaj nalaz, analizirali smo ekspresiju još jednog ključnog gena jezgre matičnosti, gena *Nanog*. Postoje indicije da transkripcijski faktor *Nanog* i *Oct3/4* zajedno određuju i održavaju identitet matičnosti i pluripotentnosti embrionalnih matičnih stanica (26). Supresija diferencijacije pod djelovanjem NANOG-a podržava transkripciju gena *Oct3/4* čiji protein u kompleksu sa SOX2 proteinom ponovno regulira ekspresiju gena *Nanog*. Navedena interna regulacija navedenih gena koji čine jezgru matičnosti stanica održava se dok se stanica ne opredijeli za diferencijaciju (27). Chambers je opisao NANOG kao ključni regulator pluripotentnosti embrioblasta i epiblasta (27). *Nanog*-deficijentni miševi ne razvijaju se dalje od stadija blastociste budući da im u potpunosti nedostaje formirani epiblast (28). NANOG održava matične stanice epiblasta iz kojeg se transplantacijom na ektopično mjesto razvija eksperimentalni tumor miša. Stoga ne čudi da je visoka ekspresija gena *Nanog* otkrivena u EC stanicama, ali i u zametnim stanicama iz kojih se embrionalni karcinom razvija spontano (27, 29). Čini se da je gubitak ekspresije gena *Nanog* i time gubitak pluripotentnosti i matičnosti preduvjet za pokretanje diferencijacijskih procesa u EC stanicama (30). U ovoj studiji dobiven pozitivan nalaz ekspresije gena *Nanog* u svim analiziranim uzorcima tumora ukazuje na postojanje frakcije pluripotentnih matičnih stanica odnosno EC stanica te potvrđuje rezultat analize ekspresije gena *Oct3/4*.

Iz navedenog možemo zaključiti da upotreba suvremenih molekularnih metoda identifikacije EC stanica ukazuje da se transplantacijom zametka miša u fazi gastrulacije pod čahuru bubrega singenične životinje razvija isključivo „maligni teratom“, teratom s malignim EC stanicama embrionalnog karcinoma odnosno eksperimentalni teratokarcinom miša. Budući da mišji teratokarcinom po mnogočemu odgovara humanom teratokarcinomu (31), eksperimentalni teratokarcinom miša predstavlja idealni animalni model za istraživanje tumorigeneze i biologije tumora zametnih stanica u ljudi.

5.2. Utjecaj spola na razvoj teratokarcinoma

Tijekom gotovo pedeset godina od postavljanja animalnog modela eksperimentalnog teratokarcinoma u miša mnogi su se znanstvenici bavili problematikom omjera razvoja teratoma i teratokarcinoma. Pritom se često zanemarivao postotak uspješnosti razvoja teratokarcinoma odnosno transformacije zametnoga štita u eksperimentalni tumor. Bilo je uobičajeno publicirati samo broj razvijenih tumora te se stoga iz većine tih studija ne može iščitati postotak neuspjelog razvoja teratokarcinoma (1, 5, 8, 32). Iz takvih publikacija bi se moglo zaključiti da se svi ektopično transplantirani zameci razvijaju u eksperimentalni tumor. Samo u rijetkim publikacijama navode se jasni podaci koji ukazuju na nisku uspješnost razvoja teratokarcinoma iz zametka miša. Bauer je pronašao tek 32 „teratoidna tumora“ od 115 transplantiranih zametaka, što čini manje od 30% (33). Illes je opisao razvoj jednog „teratoma“ na tri transplantirana zametka (6). U ovoj studiji uspješnost razvoja teratokarcinoma iz transplantiranog zametka također je niska, prosječno 41%, a varira od 36% do 50% po pojedinim kontrolnim skupinama. Iako 5azaC-om tretirane skupine smatramo eksperimentalnim, s potencijalnim učinkom 5azaC-a na selekciju zametaka koji razvijaju teratokarcinom, valja napomenuti da je uspješnost razvoja teratokarcinoma i u toj skupini oko 50% transplantiranih zametaka. Postoci uspješnosti u nezavisnim studijama veoma su slični pa je malo vjerojatno da su uzrokovani greškom operatera prilikom izolacije i transplantacije zametaka. Vjerojatnije je da transformaciju zametka u teratokarcinom uvjetuju karakteristike odrasle jedinke primatelja zametka ili svojstva samoga zametka. Autori ranijih radova bili su usredotočeni na istraživanja osobina primatelja, prvenstveno s ciljem razrješenja opisane problematike omjera teratom/teratokarcinom (1, 5, 34). Iako su uvelike doprinijeli razumijevanju biologije teratokarcinoma, navedeni radovi nisu uspjeli identificirati faktore primatelja koji bi nedvosmisleno utjecali na transformaciju zametka u teratokarcinom. Mogući je razlog upravo zanemarivanje neuspjelih transplantacija. Karakteristike 7,5 dana starog zametka miša koje bi uvjetovale razvoj teratokarcinoma ostale su pak slabo istražene. Vjerojatno zato što se radi o eksperimentalnom animalnom modelu koji koristi „inbred“ životinje u kojem zameci međusobno, kao i zameci i odrasle jedinke, predstavljaju genetički gotovo identične organizme. Upravo ta genetička istovjetnost ukazuje na jednu temeljnu genetičku razliku i mogući faktor koji uvjetuje potencijal zametka za razvoj teratokarcinoma, a to je spol. Naša studija istražila je upravo utjecaj spola zametka na vlastiti tumorigeni potencijal. Naime, sve stanice eksperimentalnog teratokarcinoma, neovisno o stupnju diferencijacije odnosno pluripotentnosti, stanice su kćeri matičnih ektopično transplantiranih stanica zametka. Određivanjem spola razvijenog eksperimentalnog teratokarcinoma mogli smo odrediti spol izvorišnog zametka te odrediti utjecaj spola na tumorigeni potencijal zametka. Kako je prikazano u rezultatima, u 100% analiziranih uzoraka teratokarcinoma pronađena je sekvenca gena *Sry*. Navedeno ukazuje na to da su svi analizirani tumori muškog spola. Budući da je otprilike polovica transplantiranih zametaka trebala biti kariotipa XX, možemo zaključiti da ženski zameci ne mogu potaknuti razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma miša u odrasle jedinke muškog spola. Jedno je moguće objašnjenje da isključivo XY genotipovi imaju tumorigeni potencijal dok je drugo pokrenuta imunološka reakcija

primatelja (u ovoj studiji isključivo muškog spola) na zametak različitog (ženskog) spola. Ukoliko bi glavni diskriminacijski faktor razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma bila eventualna imunološka reakcija i odbacivanje zametka suprotnog spola, slični bi postoci uspješnosti transformacije zametaka u teratokarcinom trebali biti zabilježeni u primatelja XY i XX genotipa. I uistinu, Solter, Dominis i Damjanov su u jednom istraživanju naveli 105 eksperimentalnih tumora u primatelja muškog i 107 eksperimentalnih tumora u primatelja ženskog spola (1). Između ostalog, navedeno istraživanje dokazuje da su odrasle jedinke ženskog spola također permisivne za razvoj teratokarcinoma. Nažalost, autori ne navode postotak uspješnosti transplantacije (koji bi trebao biti oko 50%) i ne analiziraju spol dobivenih teratokarcinoma koji bi sukladno imunološkoj hipotezi trebali biti ženskog spola. S obzirom na velik i gotovo identičan broj dobivenih eksperimentalnih tumora te zanemarivanje postotka uspješnosti razvitka teratokarcinoma nakon transplantacije zametka, autori možda prerano zaključuju da spol primatelja, osnovni parametar hipoteze imunološkog odbacivanja, ne utječe na tumorigenost zametka. Iznimno jak protuargument toj hipotezi nešto su kasnije na temelju svojih i tuđih radova dali isti autori pronasavši supresiju rasta tumora u imunodeficientnih životinja (5). Ipak, ostaje neodgovoreno pitanje imaju li zamci genotipa XX ikakav tumorigeni potencijal u istospolnih odraslih životinja ili je sposobnost razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša ekskluzivno svojstvo zametaka XY genotipa u odraslih jedinki miša C3H neovisno o spolu primatelja. Rješavanje ovog pitanja smatramo iznimno važnim za biologiju teratokarcinoma i tumora zametnih stanica uopće. Naime, ukoliko se pokaže da se u odraslih ženki razvija teratokarcinom XX genotipa, gotovo je nemoguće zamisliti da imunološki sustav nema ulogu u selekciji zametaka ženskog spola. Dočim, dokaz da se i u primatelja ženskog spola razvijaju isključivo zamci XY genotipa vodio bi ka zaključku da isključivo XY genotip ima tumorigeni potencijal razvoja teratokarcinoma. U tom slučaju, za pretpostaviti je da genetički materijal Y kromosoma ima ulogu, premda još nerazjašnjen, u razvoju teratokarcinoma odnosno biologiji pluripotentnih matičnih stanica embrionalnog karcinoma. U prilog tome govori niz radova koji opisuju utjecaj genetičkog materijala Y kromosoma na biologiju somatskih matičnih stanica. Deasy i suradnici transplantacijom mišićnih matičnih stanica u tkivo distrofičnih miševa pokazali su da upravo spol matičnih stanica određuje njihovu sposobnost regeneracije tkiva u primatelja te da Y kromosom smanjuje matični potencijal. Važno je napomenuti da je spol primatelja somatskih matičnih stanica pokazao slab ili nikakav utjecaj na regenerativnu sposobnost matičnih stanica (35). Utjecaj spola matičnih stanica opisan je i na sposobnost hondrogene diferencijacije te regeneracije zglobne hrskavice (36). Istraživanja koja postavljaju hipotezu ključne uloge Y kromosoma u patogenezi tumora zametnih stanica novijeg su datuma. Tako je primjerice Anderson 2009. godine objavio zanimljivo istraživanje u kojem miš eksperimentalno izmijenjenog kariotipa u XX-mužjak, dakle miš kojemu nedostaju svi proteini kodirani genima lociranim na Y kromosomu, nisu razvijali tumore zametnih stanica (37). U mužjaka eksperimentalno induciranog XX *Dnd1^{Ter/Ter}* kariotipa koji posjeduju autosomalnu kopiju *Sry*, *Sry^{MYC}* pronađeni su izolirani otoci tumora zametnih stanica (38). Potonje istraživanje, u skladu s našim rezultatima određivanja spola

teratokarcinoma, pokazuje da gen *Sry*, pored determinacije muškoga spola, ima bitnu ulogu i u razvoju tumora zametnih stanica. Važno je naglasiti da, pored bioloških eksperimenata na animalnim modelima, istraživanja patogeneze tumora zametnih stanica u ljudi također idu u prilog hipotezi Y-kromosoma kao ključnog faktora tumorigeneze. Naime, nedavno je delecija na Yq11 veličine 1,6 Mb unutar AZFc regije povezana s povećanim rizikom razvoja tumora zametnih stanica u muškaraca (39, 40). Navedena *gr/gr* delecija povećava rizik razvoja tumora zametnih stanica za 1,5 puta u muškaraca bez obiteljske anamneze tumora zametnih stanica te 2,3 puta u muškaraca s pozitivnom obiteljskom anamnezom. U nezahvaćenoj populaciji *gr/gr* delecija je pronađena u tek 1% muškaraca (39). Također, mutacije AZFc regije na Y kromosomu prepoznate su kao faktor sterilnosti (41) koji je dobro opisan rizični faktor za razvoj upravo tumora zametnih stanica (42, 43). Dakle, pored istraživanja direktne povezanosti s patogenezaom tumora zametnih stanica postoje i posredni dokazi povezanosti genetičkog materijala Y kromosoma s tumorigenezom tumora zametnih stanica. Ipak, do danas nije opisan stanični mehanizam tumorigeneze nijednog opisanog incidenta na genetičkom materijalu Y kromosoma koji bi nedvosmisleno povezao Y kromosom s tumorigenezom zametnih stanica.

Pored naših rezultata i suglasnih novijih istraživanja ostalih autora koji upućuju na važnost genetičkog materijala na Y kromosomu u procesu tumorigeneze zametnih stanica, stariji pomalo zaboravljeni radovi suprotstavljaju se hipotezi Y kromosoma kao sudionika u patogenezi teratokarcinoma pa tako i tumora zametnih stanica. Illes i Evans, primjerice, u opisu kariotipa eksperimentalnih teratokarcinoma miša su naveli isključivo XX ili XO kariotip (8). Kariotip XO objašnjava se navodnom sklonošću stanica teratokarcinoma na gubitak upravo Y kromosoma (44). Pojedini su autori odbacili navedene i slične studije budući da su se temeljile na metodama kariotipizacije iz davnih 60-tih i 70-tih godina prošlog stoljeća. Ironično, najteži „udarac“ hipotezi Y kromosoma kao sudionika u patogenezi teratokarcinoma objavljen je i prije postavljanja same hipoteze. Naime, jednako davne 1980. godine McBurney i suradnici uspjeli su transplantacijom ženskog zametka heterozigota za X-vezani gen *Pgk* u odraslog primatelja XY kariotipa inducirati razvoj XX teratokarcinoma. Analizom Fosfoglicerat kinaze pratili su XX-EC stanice te nesporno dokazali aktivnost oba X kromosoma u EC stanicama tumora (32, 45). Nevezano za biologiju tumora zametnih stanica, istraživanja na P10 staničnoj liniji izoliranoj iz McBurneyevog *Pgk* heterozigotnog teratokarcinoma miša omogućila su neka iznimna otkrića u razvojnoj biologiji i dovela do ključnih spoznaja o procesima inaktivacije X kromosoma te odnosa inaktivacije X kromosoma i staničnih diferencijacijskih procesa.

Iz svega navedenog možemo zaključiti da uloga Y kromosoma u razvoju teratokarcinoma i ostalih tumora zametnih stanica izaziva podosta kontroverze. Ostaje nam iščekivati buduća istraživanja koja će pomiriti dosadašnje spoznaje te odrediti ima li ulogu, i koju, genetički materijal spolnih kromosoma u tumorigenezi zametnih stanica.

5.3. Rast teratokarcinoma

Tijekom osmotjednog razvoja eksperimentalni teratokarcinom miša ne pokazuje linearan rast mase tumora (vidi poglavlje 4.3.). Premda je takav rast teratokarcinoma opisan i u ranijim studijama (3), u ovom smo istraživanju otkrili da teratokarcinom pokazuje dva perioda rasta. Prvi je zabilježen u ranoj fazi razvoja tumora između drugog i četvrtog tjedna, dok je drugi period intenzivnog rasta teratokarcinom pokazao između šestog i osmog tjedna razvoja. Usprkos prvom periodu rasta, analiza mase tumora ukazuje na dug period razvoja teratokarcinoma (prvih šest tjedana) tijekom kojeg se ostvaruje blagi rast. Navedeno je u skladu s rezultatom kvantifikacije proteina PCNA koji pokazuje drastičan pad koncentracije odmah po transplantaciji zametka. Zaustavljanje ekspresije gena *Pcna* i drastično smanjenje proliferacijskog potencijala preklapa se s razdobljem mirovanja tumora i prvim periodom rasta. Po završetku tog perioda opaža se skok razine proteina PCNA, iako blag u usporedbi s visoko proliferativnim tkivom zametka, koji se preklapa s „eksplozivnim“ rastom teratokarcinoma i naglim povećanjem mase. Budući da u literaturi nije pronađena studija koja analizira rast eksperimentalnog teratokarcinoma C3H soja miša po etapama razvoja, naši rezultati predstavljaju prvi opis navedenog fenomena u eksperimentalnom modelu teratokarcinoma. Opisani fenomen rasta eksperimentalnog teratokarcinoma miša možemo usporediti s rastom tumora zametnih stanica čovjeka među koje spada i humani teratokarcinom. Naime, za humane tumore zametnih stanica smatra se da nastaju još *in utero* u obliku *carcinoma in situ* testisa (46). Nakon indukcije karcinoma u fetalnom razdoblju, slijedi višegodišnji period neprimjetnog rasta ili mirovanja tumora. Nakon najčešće 15-35 godina relativnog mirovanja, iz danas još nepoznatih razloga, tumori zametnih stanica započinju eksplozivni rast te postaju klinički manifestni (47-49). Nakon pokretanja intenzivnog rasta tumora, rast tumorske mase je drastičan i rapidan. Dakle, eksperimentalni teratokarcinom miša i tumor zametnih stanica ljudi dijele slično obilježje rasta iako na različitoj vremenskoj ljestvici. Inicijacija tumora nakon koje slijedi dugogodišnji period mirovanja tumora zametnih stanica te eksplozivni rast u određenom trenutku razvoja tumora, posljednjih se deset godina pokušava objasniti procesom epigenetičkog reprogramiranja, prvo zametnih, a kasnije tumorskih matičnih stanica (48, 50). Ta se hipoteza epigenetičkog reprogramiranja tijekom razvoja humanih tumora zametnih stanica u mnogočemu slaže s našim rezultatima dobivenima analizom epigenetičke platforme razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša.

5.4. Epigenetička platforma razvoja teratokarcinoma

Analizom metilacijskog statusa u ovom radu dokazali smo izrazitu hipometilaciju promotorske regije gena *Nanog* u tkivu zametka što je suglasno rezultatima dobivenim na mišjim embrionalnim stanicama (51). Gen *Nanog* ostaje hipometiliran u eksperimentalnom teratokarcinomu miša tijekom cijelog razvoja tumora s tek blagim porastom metilacijske aktivnosti prema kraju promatranog razvoja, no bez ikakve statistički značajne promjene (vidi poglavlje 4.6.3.). Sukladno zadržanoj razini hipometilacije DNA zadržana je i ekspresija gena *Nanog* na razini mRNA. Dakle, tijekom cijelog perioda razvoja teratokarcinom pokazuje jednaku ekspresiju gena *Nanog* kao i zametak s tek blagim padom prema kraju promatranog razvoja.

S druge strane, testikularno tkivo miša pokazuje hipermetilaciju promotorske regije gena *Nanog* s tek malim udjelom stanica bez metilacijske inhibicije ekspresije gena. Mala populacija NANOG pozitivnih stanica pronađena je i u neonatalnom testisu čovjeka i odgovara gonocitama (52). Frakcija testikularnih stanica miša koje nemaju metiliran gen *Nanog* gotovo je jednaka frakciji u jetrenom tkivu (Slika 4.19.). I dalje sukladno našim rezultatima, dokazana je hipermetilacija promotora gena *Nanog* u diferenciranom testikularnom tkivu miša (51). Također je dokazana odsutnost ekspresije u diferenciranom odrasлом testisu čovjeka (52) što odgovara nalazu hipermetilacije od oko 80% (53). Identičan postotak hipermetilacije pokazuje i testikularno tkivo miša u našem istraživanju.

Suglasno našim rezultatima analize metilacijskog statusa promotorske regije gena *Nanog* na tumorskom tkivu, Santagata je dokazao visoku razinu njegove ekspresije u pojedinim tipovima humanih tumora zametnih stanica, posebice embrionalnom karcinomu (29). Skotheim i suradnici tehnologijom mikropostroja analizirali su različite histološke tipove tumora zametnih stanica i došli su do jednakog zaključka da je razina ekspresije gena *NANOG* u humanom karcinomu *in situ*, embrionalnom karcinomu, pa čak i seminomu značajno povišena u usporedbi s diferenciranim testisom (54). Nettersheim je dokazao da humani embrionalni karcinom pokazuje drastičnu hipometilaciju, dočim humani teratom hipermetilaciju u usporedbi s miješanom formom tumora. Stupanj metilacije u miješanom tumoru zametnih stanica (bez seminoma) čovjeka od 45% (53) gotovo je identičan našim rezultatima u teratokarcinomu miša na kraju promatranog razdoblja razvoja. Nettersheim je na temelju navedenih rezultata zaključio da se epigenetička represija gena *NANOG* odvija s ciljem kontrole pluripotentnosti i potencijalne opasnosti od razvoja tumora zametnih stanica (53). Važnost održane razine metilacije DNA i ekspresije gena *Nanog* za razvoj tumora zametnih stanica naglašava i naš eksperiment u kojem nakon *in vitro* kultivacije zametka miša dobivamo eksperimentalni tumor. Inhibicijom ekspresije gena *Nanog* putem RNA interferencije došlo je do smanjenja rasta eksperimentalnog tumora *in vitro*. Slične rezultate objavio je i Han koji inhibicijom ekspresije gena *NANOG* putem RNA interferencije smanjuje proliferaciju te potiče G0/G1 arest staničnog ciklusa stanica karcinoma dojke (55).

Genetička istraživanja također podupiru važnost gena *NANOG* u razvoju tumora zametnih stanica. Poznato je da se gen *NANOG* nalazi na kromosomu 12. čovjeka, a upravo je u oko 80% humanih tumora

zametnih stanica pronađen izokromosom 12p (56). U ostalih je pronađena amplifikacija dijelova 12p regija (57-59). Korkola je u tumorima zametnih stanica čovjeka dokazao prekomjernu ekspresiju klastera gena na potencijalno amplificiranom fragmentu 12p13.31 u čijem se okviru nalazi i gen *NANOG* (59). Ipak, kromosomske aberacije nisu pronađene u ranom stadiju *carcinoma in situ* (60). Iz navedenih i sličnih genetičkih studija, Diez-Torez je zaključio da regija 12p sadrži gene bitne za progresiju tumora zametnih stanica i tranziciju u fazu eksplozivnog rasta odnosno invazivni tumor (61). Naši rezultati suprotstavljaju se Diez-Torezovom zaključku. Usporedbom mase tumora i hipometilacije gena *Nanog* pronašli smo negativnu korelaciju isključivo u periodu mirovanja rasta tumora, dočim se navedena korelacija u periodu eksplozivnog rasta potpuno izgubila. Naš zaključak podupire istraživanje ranog humanog karcinoma *in situ* u kojem još nisu zabilježene kromosomske aberacije niti intenzivan rast, a postoji visoka razina gena *NANOG* (62).

Iz navedenog i u skladu s ostalim epigenetičkim studijama, smatramo da je prekomjerna ekspresija gena *Nanog* uzrokovana poremećenom metilacijom DNA bitna za samu inicijaciju tumora. Kromosomske aberacije karakteristične za kasnije agresivnije stadije tumora mogle bi biti direktna posljedica širenja ili nakupljanja epimutacija prilikom dugotrajnog razvoja tumora (63-65). U tom bi slučaju progresija epimutacije koja je započela na lokusu oko gena *NANOG in utero* potaknula destabilizaciju šireg fragmenta kromatina. Nestabilnost bi dalje rezultirala kromosomskim aberacijama specifičnima za kasnije stadije tumora zametnih stanica. Naši rezultati, uz potporu dosadašnjih spoznaja, promiču predlaganje drugačijeg modela inicijacije tumora zametnih stanica. Tkivo zametka, kao i spolne prastanice, pokazuju fiziološku hipometilaciju i visoku ekspresiju gena *NANOG*. Razvojem testisa dolazi do hipermetilacije i pada ekspresije gena *NANOG*. Patološki zadržana hipometilacija promotora i posljedični izostanak inhibicije ekspresije gena matičnosti *NANOG* (u stanica stabilnog kromatina bez kromosomskih aberacija) rezultira gubitkom kontrole nad pluripotentnošću i matičnošću. Stanice sa zadržanom hipometilacijom gena *NANOG* bile bi podloga za daljnji razvoj tumora zametnih stanica pa tako i teratokarcinoma. Ostatak testikularnog tkiva, koji nije zahvaćen opisanom epimutacijom, prolazi kroz fazu aktivne metilacije gena *NANOG* tijekom koje se uspostavlja njegova hipermetilacija karakteristična za odraslo diferencirano testikularno tkivo.

Zaključno, pretpostavljamo da incident koji u miša (ektopična transplantacija) odnosno čovjeka (još uvijek nepoznato) uvjetuje zaustavljanje metilacijskog reprograma tj. zadržavanje hipometilacije gena *NANOG* na razini one u zametka inicira razvoj tumora zametnih stanica.

Iako izlazi iz okvira ove studije, navodimo jedan zanimljiv skup objavljenih nalaza koji upućuju na potencijalnog induktora epimutacije gena *NANOG*, dakle inicijacije *carcinoma in situ*, čime bi započeo razvoj tumora zametnih stanica *in utero*. Naime, gen *NANOG* eksprimiran je u humanim spolnim prastanicama, a inhibicija se njegove ekspresije događa tijekom druge polovice trudnoće pa sve do četvrtog postnatalnog mjeseca (66). Gubitak ekspresije dovodi se u vezu s posljednjim stupnjem diferencijacije gonocita u infantilne spermatogonije (66, 67). U istom periodu zabilježen je izrazit porast koncentracije

testosterona u fetusa i neonatusa muškog spola, fenomen poznat pod nazivom „mali pubertet“ (68). Kako smo već naveli, *carcinoma in situ* tumora zametnih stanica također se vjerojatno razvija u tom periodu na temelju poremećaja metilacije DNA i izostanka posljedične inhibicije ekspresije gena *NANOG*. Iako je navedeno samo pretpostavka, ukazuje na mogućnost da hormonalni poremećaj testosterona tijekom trudnoće izaziva epimutaciju gena *NANOG*.

Kako smo već naglasili, u periodu svog intenzivnog rasta teratokarcinom miša ne pokazuje korelacijski odnos metilacije promotora gena *Nanog* i rasta tumora. Dakle, iako je patološki održana hipometilacija promotorske regije gena *Nanog* inicijacijska platforma za razvoj teratokarcinoma odnosno tumora zametnih stanica, čini se da nije ključna za poticanje i ostvarivanje tumorskog rasta. Je li moguće da ulogu propagacije tumorskog rasta ostvaruje neki drugi gen koji također ima ulogu u pluripotentnosti i matičnosti te u biologiji tumora zametnih stanica (18-20)? Na ovu su mogućnost ukazali Niwa i Chambers koji su pretpostavili da je za ostvarivanje matičnosti uvjetovane genom *Nanog* potrebna ekspresija gena *Oct3/4* kao egzekutora matičnog potencijala (27, 69).

Uistinu, naši su rezultati pokazali izrazitu hipometilaciju promotorske regije te visoke vrijednosti ekspresije gena *Oct3/4* u tkivu zametka. Navedeno se slaže s već spomenutom Rosnerovom studijom koja je navela visoku ekspresiju gena *Oct3/4* u stanicama epiblasta odnosno zametka koji započinje gastrulaciju (23). Ekspresija gena *OCT3/4* pronađena je i u embrionalnim matičnim stanicama te spolnim prastanicama miša (70) i čovjeka (71), ishodišnim stanicama tumora zametnih stanica. Suglasno našim imunohistokemijskim rezultatima, ekspresija gena *OCT3/4* pronađena je u EC stanicama odnosno čistoj formi embrionalnog karcinoma (18, 72), dočim je, specifično za diferencirana tkiva, izostala u čistom teratomu čovjeka (73). U skladu s istraživanjima ekspresije mRNA, De Jong je otkrio hipometilaciju promotorske regije gena *OCT3/4* u čistoj formi embrionalnog karcinoma i hipermetilaciju u čistoj formi razvijenog teratoma čovjeka (73). Temeljeno na svojim rezultatima te sukladno objavljenim istraživanjima o tumorigenezi tumora zametnih stanica, De Jong je zaključio kako „izostanak mutacija odnosno aberantnog obrasca metilacije DNA gena *OCT3/4* te pozitivna ekspresija u malignih dvojnika primordijalnih zametnih stanica i zametnih matičnih stanica koje normalno ekspimiraju gen, odnosno CIS/seminomima i EC stanicama ... upućuje na zaključak da *OCT3/4* nije vodeći onkogeni faktor u patogenezi tumora zametnih stanica ljudi“ (73). Iako su naši rezultati usporedivi s rezultatima De Jonga, interpretacija naših rezultata i njihovo postavljanje u kontekst onih istih studija na kojima je De Jong temeljio svoju konstataciju, dovela nas je do drugačijeg zaključka o ulozi gena *Oct3/4* i reprograma metilacije DNA na njegovu promotoru u patogenezi teratokarcinoma odnosno tumora zametnih stanica.

Naime, današnji pristup problematici razvoja tumora zametnih stanica uglavnom se temelji prvenstveno na istraživanjima staničnih linija (46, 53, 70) i analizama humanog tumorskog materijala „uhvaćenog“ u određenom trenutku razvoja (18-20, 53, 62, 72, 73). Stoga smatramo da je današnje razumijevanje tumorigeneze tumora zametnih stanica, kako čovjeka tako i miša, tek projekcija fragmentalnih spoznaja o određenom trenutku tumorigeneze. Mišljenja smo da za bolje razumijevanje

nedostaje nedvosmisleno eksperimentalno dokazan slijed događaja i međuodnosa staničnih procesa tijekom čitavog perioda razvoja tumora. Ova studija otkriva upravo taj slijed na koji je i sam De Jong upozorio da nedostaje. Podsjećamo da smo tijekom promatranog razvoja teratokarcinoma otkrili drastičan epigenetički reprogram promotora gena *Oct3/4* (vidi poglavlje 4.6.1.) s postignutim maksimumom metilacije DNA u šestom tjednu razvoja kada se formira plato bez daljnje promjene metilacijskog statusa. Razina hipermetilacije DNA u periodu platoa usporediva je s vrijednostima metilacije gena *Oct3/4* u jetri koju je Hattori opisao kao izrazito hipermetilirano tkivo (74). Sukladno pronađenom hipermetilacijskom reprogramu, u tkivu zametka izmjerili smo najvišu razinu ekspresije gena *Oct3/4* koja kontinuirano pada tijekom razvoja teratokarcinoma. Dakle, zametak miša svojom hipometilacijom i visokom ekspresijom gena *Oct3/4* podsjeća na humani karcinom zametnih stanica *in situ* (18, 62, 75). Važnost hipometilacije i održane ekspresije gena *Oct3/4* za početni razvoj teratokarcinoma ukazuje i naš eksperiment s RNAi u kojem se rast zametka miša kultiviranog u esiOct3/4 mediju *in vitro* drastično smanjuje. Nakon transplantacije slijedi metilacijski reprogram promotorske regije gena *Oct3/4* s povećanjem udjela stanica inhibirane ekspresije dok teratokarcinom miša pokazuje mirovanje odnosno izostanak rasta. Podsjećamo da u tom ranom periodu razvoja gen *Nanog* ne pokazuje promjene ni metilacije DNA niti ekspresije. Dakle, događa se relativni porast stabilne ekspresije gena *Nanog* naspram padajućoj ekspresiji gena *Oct3/4* što je primijećeno i u istraživanju tumora zametnih stanica u ljudi. Almstrup je testirao hipotezu prema kojoj progresija karcinoma zametnih stanica *in situ* čovjeka uključuje upravo promjenu odnosa ekspresija *NANOG:OCT3/4*. Objavio je relativni porast ekspresije gena *NANOG* prema ekspresiji gena *OCT3/4* uspoređujući *carcinoma in situ* s klinički manifestnim embrionalnim karcinomom. Zaključio je da se pomak omjera u korist gena *NANOG* vjerojatno temelji na dodatnom povećanju njegove ekspresije pretpostavljajući stabilnu ekspresiju gena *OCT3/4* tijekom progresije tumora (62). Naši rezultati potpuno su suglasni s tim da progresijom tumora dolazi do pomaka omjera ekspresije *Nanog:Oct3/4* u korist gena *Nanog*, ali iz upravo suprotnog razloga tj. hipermetilacije promotorske regije i posljedičnog smanjenja ekspresije gena *Oct3/4*, a stabilnost ekspresije i metilacije gena *Nanog*.

Očekivano, testikularno tkivo pokazuje viši stupanj metilacije DNA promotorske regije gena *Oct3/4* naspram tkivu zametka, ali ipak drastično niže vrijednosti metilacije u usporedbi s tkivom razvijenog teratokarcinoma. Dakle, u usporedbi s testisom, teratokarcinom započinje razvoj s hipometilacijom i visokom ekspresijom gena *Oct3/4* da bi tijekom razvoja postigao hipermetilacijski plato gotovo istovjetan diferenciranom tkivu jetre s frakcijom demet-*Oct3/4* stanica manjom od 20% (vidi Sliku 4.15.).

Naš nalaz reprograma metilacije promotora gena *Oct3/4* upućuje na mogućnost da je ekspresija gena *Oct3/4* uključena i u progresiju eksperimentalnog teratokarcinoma miša odnosno tumora zametnih stanica. Kontinuirani porast metilacije DNA na promotoru gena *Oct3/4* podudara se s periodom mirovanja teratokarcinoma. Već u četvrtom tjednu razvoja tumora razina metilacije DNA gena *Oct3/4* pokazuje negativan korelacijski odnos s masom tumora. U tom se periodu u tumoru odvija diferencijacija.

Povezanost promjene ekspresije gena *Oct3/4* i diferencijacijskih procesa nije nepoznata. Primjerice, Niwa je, na modelu teratokarcinoma dobivenog injekcijom staničnih linija, eksperimentalnom inhibicijom ekspresije gena *Oct3/4* pokazao da udio nediferenciranih stanica u tumoru ovisi o razini ekspresije gena *Oct3/4* i da je određena razina ekspresije temelj održavanja maligne komponente u teratokarcinomu (69). Niwa i Chambers također su utvrdili da je za održavanje matičnosti uz ekspresiju gena *Nanog* potrebna i ekspresija gena *Oct3/4* (27, 69). Ipak, valja naglasiti da je prema literaturi diferencijacija temeljena na padu ekspresije gena *Oct3/4* usmjerena prvenstveno u trofoblast (76). Ipak, navedeno se odnosi se na OCT3/4 ovisnu diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica i njihovih staničnih linija (69). Naši rezultati pokazuju da se u eksperimentalnom teratokarcinomu miša dobivenom iz zametnog štita paralelno s inhibicijom ekspresije gena *Oct3/4* odvija diferencijacija upravo u derivate svih triju zametnih listića. Valja imati na umu da diferencirana tkiva u teratomskoj komponenti teratokarcinoma također pokazuju proliferacijsku aktivnost i doprinose nakupljanju tumorske mase. Nadalje, poznato je da je promjena ekspresije gena *Oct3/4* povezana i s apoptotičkom aktivnosti. Kehler je dokazao da kondicionalnom delecijom gena *Oct3/4* u spolnim prasticama, koje se smatraju po mnogočemu istovjetnima EC stanicama teratokarcinoma, stanice ulaze u apoptozu (77). U ovoj je studiji također dokazana apoptoza u nediferenciranoj komponenti teratokarcinoma te se ne može odbaciti mogućnost da hipermetilacijski reprogram gena *Oct3/4* održava rast tumora pod kontrolom gurajući OCT3/4 negativne stanice u apoptozu. Naši rezultati koji navode na zaključak da je hipermetilacija promotora te posljedična inhibicija ekspresije gena *Oct3/4* osnovni proces kojim se sprječava progresija teratokarcinoma pronalaze potporu u Gidekelovu istraživanju. Naime, još prije gotovo deset godina, Gidekel je dokazao da u eksperimentalnim teratokarcinomima nastalima injekcijom stanica ZHBTc4 stanične linije s disfunkcionalna oba *Oct3/4* alela i integriranim dox-negativno-reguliranim *Oct3/4* transgenom, dox-inducirana ablacija *Oct3/4* ekspresije, nakon perioda razvoja tumora, rezultira djelomičnom ili potpunom regresijom teratokarcinoma sa smanjenjem ili odsutnošću malignih OCT3/4 pozitivnih stanica, prevladavajućom diferenciranom komponentom i fibrozom (75).

Iz navedenih studija i naših rezultata može se zaključiti da je kontinuiranim hipermetilacijskim reprogramom promotora gena *Oct3/4* jednako tako kontinuirano inhibiran razvoj punog malignog potencijala tumora te suprimiran drastičan rast teratokarcinoma. Nadalje, naši rezultati pokazuju da se u određenom trenutku razvoja teratokarcinoma formira hipermetilacijski plato te ne postoji daljnja hipermetilacija promotora gena *Oct3/4* odnosno smanjenje frakcije malignih matičnih stanica koje ekspresiraju gen matičnosti *Oct3/4* pored gena *Nanog*. Upravo taj trenutak odgovara ponovnom porastu ekspresije proliferacijskog gena *Pcna* i eksplozivnom rastu mase tumora. Masa tumora u periodu eksplozivnog rasta statistički značajno korelira upravo s udjelom demetiliranih *Oct3/4* stanica odnosno frakcijom matičnih EC stanica koje ekspresiraju gen matičnosti *Oct3/4*.

Sukladno iznesenom, dopunjujemo gore predloženi model razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša odnosno tumora zametnih stanica zaključkom da tijekom razvoja tumora na platformi stabilne

ekspresije i hipometilacije promotora gena *Nanog*, potencijalne tumorske stanice aktivno hipermetiliraju promotor gena *Oct3/4* odnosno inhibiraju njegovu ekspresiju čime dokidaju svoju pluripotentnost i matičnost te pokreću vlastitu diferencijaciju ili apoptozu. Navedeni kompenzacijski hipermetilacijski reprogram na promotoru gena *Oct3/4*, čini se, drži rast tumora pod nadzorom te smanjuje udio nediferencirane maligne komponente u tumoru. Dostizanjem maksimuma mogućnosti kompenzacijskog hipermetilacijskog reprograma gena *Oct3/4* gubi se kontrola nad rastom tumora te tumor ostvaruje svoj eksplozivni rast u korelaciji s udjelom OCT3/4 pozitivnih matičnih stanica.

Ostaje nejasno koji mehanizam pokreće i provodi selektivnu hipermetilaciju gena matičnosti *Oct3/4* tijekom tumorigeneze teratokarcinoma, ali znamo da je u embrionalnom karcinomu mašinerija *de novo* metilacije DNA izrazito aktivna. To je u skladu s nalazima ekspresija *DNMT3A* i *DNMT3B* (54). Moguće je objašnjenje povezano s činjenicom da embrionalne stanice provode fiziološku *de novo* hipermetilaciju promotorske regije gena *Oct3/4* upravo u periodu ranog embrionalnog razvoja odnosno visoke ekspresije gena *Oct3/4*. Također, kako je opisano u uvodu, poznato je da OCT3/4 regulira svoju ekspresiju vezivanjem za vlastiti promotor. Je li stoga moguće da sama ekspresija gena *Oct3/4* pokreće *de novo* hipermetilaciju vlastitog promotora i u tumorima zametnih stanica? Ta bi negativna povratna sprega spriječila produljenu matičnost stanica i usporila, ako ne i zaustavila, daljnji razvoj tumora.

Pored gena *NANOG* i *OCT3/4*, matičnost stanica, posebice embrionalnih, uvjetovana je i ekspresijom gena *SOX2*. Upravo međudodnos ova tri gena čini takozvanu jezgru matičnosti, platformu za organizaciju matičnog fenotipa stanica. Stoga ih, kako smo već naveli u uvodu, nazivamo genima matičnosti (78). Iako je Santagata 2007. godine dokazao diferencijalnu ekspresiju gena *SOX2* u embrionalnom karcinomu i teratomu odnosno teratokarcinomu čovjeka te izostanak ekspresije u seminomu i ostalim oblicima tumora zametnih stanica (29), gen *SOX2* za sada ostaje na marginama interesa u istraživanjima tumora zametnih stanica. Budući da je specifičan za obje komponente teratokarcinoma, u ovom istraživanju nismo istraživali njegovu ekspresiju. Što se metilacije tiče, naša istraživanja pokazala su iznimno niske vrijednosti metilacije njegove promotorske regije osobito u usporedbi s genom *Nanog* i *Oct3/4* i to od transplantiranog zametnog štita pa tijekom cijelog razvoja teratokarcinoma. Zanimljivo, metilacijske promjene gena *Sox2* tijekom razvoja teratokarcinoma pokazala su veliku sličnost s metilacijskim reprogramom gena *Oct3/4* iako na znatno nižim razinama metilacije. Hipometilacija gena *Sox2* u skladu je s visokom ekspresijom u epiblastu miša te se smatra nužnom u održavanju matičnog potencijala epiblasta (79).

U populaciji spolnih prastanica i gonocita ekspresija gena *SOX2* potpuno je inhibirana (80) te gen nije eksprimiran tijekom razvoja zametnih stanica (81). Međutim, Sonne je dokazao ponovnu uspostavu ekspresije gena *SOX2* u *carcinoma in situ* tumora zametnih stanica. Blaga ekspresija u *carcinoma in situ* progredira do intenzivne u razvijenom embrionalnom karcinomu (81). Naši rezultati izrazite hipometilacije gena *Sox2* tijekom čitavog razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma podupiru Sonneova nalaze ponovne ekspresije gena *SOX2* već u najranijem stupnju kancerogeneze tumora testisa kao i jaku ekspresiju tijekom

čitavog razvoja. Iako ekspresija gena *SOX2* nesporno pridonosi matičnom fenotipu stanica teratokarcinoma pa tako i tumora zametnih stanica, njegova uloga u razvoju još uvijek nije jasna. Rana pojava njegove ekspresije te poticanje matičnog fenotipa stanica upućuje na ulogu u inicijacijskim procesima. Kontinuirani porast ekspresije tijekom tumorigeneze ukazuje pak na ulogu u progresiji tumora. Iako naši rezultati ukazuju da ne postoji korelacija hipometilacije gena *Sox2* i tumorskog rasta, opisano je da gen *SOX2* uistinu potiče progresiju i invazivnost nekih karcinoma (82, 83). Slične nalaze Alonso je opisao u istraživanjima malignog glioma gdje je dokazao patološku hipometilaciju i porast ekspresije gena *SOX2* u usporedbi sa zdravim odnosno ishodišnim tkivom. Sukladno rezultatima zaključio je da je epimutacija gena *SOX2* osnovni tumorigeni incident koji uzrokuje razvoj malignog glioma (84). Uistinu, eksperimentalnom inhibicijom gena *SOX2* u matičnim stanicama mozga došlo je do gubitka matičnog fenotipa. Ipak, ektopična ekspresija gena *SOX2* u staničnim linijama glioma, bez istovremene ekspresije ostalih gena matičnosti, nije održala matični fenotip stanica. S druge strane, ektopična je ekspresija gena *SOX2* bila dovoljna za indukciju invazije i migracije stanica glioma (84). Ističemo upravo Alonsovo istraživanje budući da iz njega proizlaze zaključci koji se mogu primijeniti i na tumorigenezu teratokarcinoma. Naime, možemo pretpostaviti da je patološka hipometilacija promotorske regije gena *Sox2* te posljedična ekspresija bitna za održavanje matičnog fenotipa teratokarcinoma miša kao i humanih tumora zametnih stanica. Ovoj hipotezi suprotstavljaju se barem dva protuargumenta na koje možemo odgovoriti samo pretpostavkama. U teratokarcinomu ekspresija gena *SOX2* pronađena je i u diferenciranim stanicama koje nemaju ni približno fenotip matičnih stanica (81). Moguće se objašnjenje krije u činjenici da je veći dio diferenciranih stanica zapravo „potomstvo“ matičnih EC stanica koje su dokinule matični fenotip i krenule putem diferencijacije. Postoji mogućnost da se navedena diferencijacija ostvarila i bez hipermetilacijske inhibicije gena *SOX2* budući da je u tim stanicama dokazan inaktiviran gen matičnosti *OCT3/4* bez kojeg *SOX2* ne može održati matični fenotip. Drugi je protuargument da seminom karakteristično pokazuje potpunu odsutnost ekspresije gena *SOX2* iako je nesporno građen od stanica s malignim matičnim fenotipom (29). Potencijalno objašnjenje pronalazimo u Masuiovom istraživanju koje je dokazalo da se matični fenotip embrionalnih stanica može održati i u *Sox2*^{-/-} stanica pojačanom ekspresijom gena *Oct3/4* (85). Autor je kontroverzni nalaz objasnio činjenicom da ostali proteini iz *SOX* obitelji poput *SOX4*, *SOX 11* i *SOX15* mogu nadomjestiti funkciju *SOX2* ukoliko je zadovoljen preduvjet matičnosti odnosno ekspresija gena *Oct3/4*. Visoka ekspresija gena *Oct3/4* svakako je prisutna u seminomu te je moguće da je sposobna održati matičnost stanica seminoma bez specifične ekspresije gena *SOX2*.

Kako bi se razjasnila uloga gena *SOX2* u inicijaciji i progresiji odnosno razvoju tumora zametnih stanica testisa, svakako su potrebna daljnja istraživanja.

Marginaliziran poput gena *SOX2*, gen *SCGB3A1* također je dokazano podložan epimutacijama u tumorima zametnih stanica čovjeka (86). Rezultati naših istraživanja pokazali su intermedijarni stupanj metilacije promotora regije gena *Scgb3a1* u tkivu zametka te zadržavanje jednakog stupnja metilacije s

blagim oscilacijama tijekom razvoja teratokarcinoma. Uz navedeno, teratokarcinom pokazuje statistički značajno viši stupanj metilacije promotora gena *Scgb3a1* tijekom čitavog razvoja u usporedbi s tkivom testisa. Promjene metilacije promotorske regije gena *SCGB3A1* u tumorima zametnih stanica čovjeka dokazao je Lind. U svom istraživanju naveo je kako zdravo tkivo testisa pokazuje potpunu demetilaciju kao i *carcinoma in situ* i seminom. Embrionalni karcinom pokazuje hipometilaciju dočim teratom hipermetilaciju promotora. Također je naveo da je razina ekspresije gena potpuno komplementarna promijenjenoj razini metilacije DNA (86). Navedeno istraživanje donijelo je i jedno iznimno i jedinstveno otkriće o genu *SCGB3A1*. Naime, Lind je zapravo dokazao da diferencirana tkiva najzrelijeg oblika tumora zametnih stanica bez komponente malignih matičnih stanica imaju iznimno nisku razinu ekspresije gena *SCGB3A1*, dok maligne forme (embrionalni karcinom, a posebice seminom) koje su građene isključivo od stanica matičnog fenotipa sličnima matičnim stanicama zametka odnosno spolnim prastanicama, pokazuju najvišu ekspresiju gena *SCGB3A1* i to gotovo identičnu kao i potpuno zdravo tkivo testisa. Ovaj nalaz možda ne bi bio toliko zanimljiv da ne proturječi gotovo svim studijama koje istražuju gen *SCGB3A1* i njegove promjene u karcinogenezi mnogih tumora čovjeka. Gen *SCGB3A1* prvi je put povezan s karcinogenezom 2001. godine, kada je Krop dokazao različitu ekspresiju u malignom tumoru i zdravom tkivu dojke i nazvao ga „visok u normalnom“ (engl. *high in normal*, HIN-1) budući da je njegova ekspresija bila drastično smanjena u većini tumora dojke (87). U slijedećih deset godina uslijedilo je niz istraživanja koja su potvrđivala Kropovo otkriće visoke ekspresije i hipometilacije gena *SCGB3A1* u zdravom okolnom tkivu odnosno drastične inhibicije ekspresije i hipermetilacije u tumorskom tkivu čovjeka (88-92). Budući da se u mnogim studijama predlaže da ga se proglasi genom supresorom tumora (93, 94), Lind je zaključio da je *SCGB3A1* zasigurno meta patološke hipermetilacije u tumorima zametnih stanica. Naše istraživanje razvoja teratokarcinoma miša može se samo djelomično složiti s Lindovim zaključkom. Naime gen *Scgb3a1* uistinu pokazuje značajnu hipermetilaciju u usporedbi s tkivom testisa što pokazuju i Lindovi rezultati. Međutim, nije otkriven nikakav bitan korelacijski odnos metilacijskog statusa i rasta teratokarcinoma koji bi potvrdio ikakvu ulogu gena *Scgb3a1* u tumorigenezi teratokarcinoma. Sukladno Lindovim rezultatima očekivali bi promjene razine metilacije na račun formiranja teratomske komponente i u našem istraživanju. Međutim, tijekom razvoja teratokarcinoma, od zametka do potpuno razvijenog tumora, nismo otkrili nikakve značajne promjene metilacijskog statusa promotora gena *Scgb3a1*. Iz navedenog zaključujemo da tijekom razvoja teratokarcinoma, pa tako i tumora zametnih stanica, može doći do hipermetilacije promotorske regije gena *SCGB3A1*, ali navedena epimutacija nema, čini se, nikakav utjecaj na maligni potencijal i progresiju tumora. Sukladno navedenom smatramo mogućim da je epimutacija gena *SCGB3A1* kolateralna posljedica epigenetskog reprograma tijekom tumorigeneze osobito ranog razvoja tumora zametnih stanica kada, kako je Lind dokazao, metilacijski status uistinu diferencira različite tipove tumora. Napominjemo dalje da je, iako je moguće da spada u gene supresore tumora, gen *SCGB3A1* dokazani imunomodulator povezan s upalama, infekcijama, oksidacijskim stresom i cijeljenjem (94, 95). Budući da ne postoji dokaz koji bi njegovu ekspresiju povezao s diferencijacijskim procesom bilo

kojeg tumora (94), zapravo i nije toliko kontradiktorna njegova ekspresija u diferenciranom teratomu. Teratokarcinom je jedinstveni tumor odrasle jedinke koji progresijom pokazuje veći stupanj diferencijacije od ishodišnog tkiva. Lindovo istraživanje metilacije gena *SCGB3A1* možemo gledati i kao potvrdu hipoteze po kojoj je teratom najudaljenija točka tumorigeneze tumora zametnih stanica testisa.

Pored gena *SCGB3A1*, tumori zametnih stanica povezuju se s promjenama metilacije DNA još jednog potencijalnog gena supresora tumora, gena *PRSS21*. Riječ je o genu za Testisin koji je specifično eksprimiran u tkivu testisa (96). Vođen nalazom ekspresije specifične za testis, Manton je istražio metilacijski status *PRSS21* u tkivu testisa i tumorima zametnih stanica (97). Naši rezultati hipometilacije promotorske regije gena *Prss21* u tkivu testisa slažu se s Mantonovim. Dapače, pokazali su da miš i čovjek imaju gotovo identičan stupanj metilacije promotora gena za Testisin tj. 19% i 20%. Manton je naveo hipermetilaciju gena za Testisin od oko 85% u analiziranim tumorima zametnih stanica čovjeka te je zaključio da je patološka hipermetilacija promotorske regije gena *PRSS21* ključna epimutacija odnosno pokretačka snaga tumorigeneze tumora zametnih stanica čovjeka. Naši su rezultati pokazali izrazitu hipermetilaciju promotorske regije gena *Prss21* u zametku te, suglasno Mantonovom nalazu, hipermetilaciju u teratokarcinomu. Međutim, hipermetilacija gena *Prss21* ne pokazuje nikakve značajne oscilacije tijekom razvoja teratokarcinoma. Razina izmjerene hipermetilacije u teratokarcinomu miša bila je na razini od oko 90%, gotovo identična hipermetilaciji u tumorima zametnih stanica čovjeka, od oko 85%. No, na temelju naših rezultata i dosadašnjih spoznaja o podrijetlu tumora zametnih stanica hipermetilaciju promotorske regije gena *Prss21* nikako ne bi okarakterizirali kao epimutaciju koja igra ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora zametnih stanica već, upravo suprotno, kao pokazatelja stabilnog metiloma bez metilacijskih reprograma u skupini gena specifičnih za testis. Naime, naglasili smo da i zametni štit pokazuje visoke vrijednosti hipermetilacije te suglasno tome smatramo da je malo vjerojatno da zametak i spolne prastanice, ukratko stanice matičnog fenotipa ispoljavaju gen specifičan za diferencirano tkivo testisa. Vjerojatnije je da je gen *PRSS21* hipermetilirao u stanicama iz kojih tumori zametnih stanica vuku podrijetlo. Navedena bi hipermetilacija, sukladno našim rezultatima, bila izrazito stabilna i u razvijenim klinički manifestnim tumorima zametnih stanica koje je Manton analizirao. Stanice koje nisu doživjele ranije opisane epimutacije koje predlažemo induciraju patogenezu tumora zametnih stanica, tijekom razvoja sukladno potrebama diferencijacije postepeno demetiliraju gen za Testisin što kulminira testis specifičnom ekspresijom u zdravom tkivu testisa. Dodatni argument predloženom zaključku je nepostojanje ikakvog korelacijskog odnosa metilacije DNA promotora gena *Prss21* i tumorskog rasta.

Tijekom ove studije istražili smo status metilacije DNA u tkivu zametka te otkrivali i pratili metilacijske reprogramme tijekom razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma miša i na promotorima gena *Rassf1a*, *Mgmt* i *Brca1*. Za navedene gene objavljena su istraživanja koja pretpostavljaju uključenost promjena metilacije njihovih promotora u razvoj tumora zametnih stanica u čovjeka (97-101). Međutim, neovisno o otkrivenom metilacijskom statusu u tkivu zametka, za ni jedan od navedenih gena nismo pronašli iole

značajne razlike u usporedbi s testikularnim tkivom. Nismo pronašli ni promjene metilacije tijekom razvoja eksperimentalnog teratokarcinoma niti korelacijske odnose razina metilacija DNA i tumorskoga rasta. Na temelju svojih rezultata zaključujemo da navedeni geni nemaju značajnu ulogu u inicijaciji ili progresiji tumora zametnih stanica. Objavljene epimutacije navedenih gena skloni smo objasniti kao nakupljene tijekom dugogodišnjeg razvoja tumora zametnih stanica. Sličan fenomen nakupljanja epimutacija tijekom razvoja već je pronađen u mnogim tumorima, primjerice kolorektalnom karcinomu (102, 103). Svoje objašnjenje temeljimo i na činjenici da su objavljeni radovi istraživali razvijene klinički manifestne tumore ili stanične linije za koje je također poznato da mogu pokazivati različite genome i epigenome u usporedbi s ranim stadijem tumora (104). Takova su istraživanja nesporno iznimno vrijedna u identifikaciji epimutacija prisutnih u tumorima zametnih stanica. Ipak, mišljenja smo da su pomalo nezahvalna za definiranje važnosti otkrivenih epimutacija u patogenezi tumora zametnih stanica s obzirom na kompleksnost njihove biologije, genezu *in utero* i dugotrajnu asimptomatsku tumorigenezu. Pored navedenih gena, istražili smo i metilacijske obrasce promotorskih regija gena *c-Myc*, *Stat3* i *Trrap*. Za njih je poznato da su uključeni u tumorigenezu mnogih tumora (105-107) iako do sada nisu povezani s tumorima zametnih stanica. Naši rezultati pokazali su da navedeni geni nisu bili podložni promjenama metilacije DNA koje se mogu povezati s inicijacijom ili progresijom teratokarcinoma odnosno tumora zametnih stanica.

Pored analiza statusa gen specifičnih metilacija promotorskih regija, proveli smo i analizu metilacije različitih repetitivnih sekvenci. Navedeno testiranje smatra se ekvivalentom analize globalne metilacije DNA i često se provodi u istraživanju neoplazija (108). Globalna hipometilacija DNA prva je epigenetička aberacija odnosno epimutacija dokazana u tumorima još 1982. godine (109). Iako je do danas globalna hipometilacija DNA pronađena u gotovo svim karcinomima, njena uloga ostaje nerazjašnjena i kontroverzna te je predmet mnogih rasprava (108). Upravo su tumori zametnih stanica često uključeni u navedene rasprave. Naime, poznato je da diferencirani oblici tumora zametnih stanica, poglavito teratom, pokazuju normalnu globalnu metilaciju poput zdravog diferenciranog tkiva dočim nediferencirane forme, posebice seminom, pokazuju izraziti stupanj globalne hipometilacije (110, 111). Našim istraživanjem obuhvatili smo tri različite repetitivne sekvence koje fiziološki pokazuju različite stupnjeve metilacije DNA, od hipermetilirane *Mml*, intermedijarne *Mmetnltr* do, možemo reći, hipometilirane *B1*. Razina metilacije *Mml* sekvence u transplantiranom zametku bila je viša nego u testikularnom tkivu te je tijekom daljnjeg razvoja teratokarcinoma pokazala izrazitu stabilnost. Razina globalne metilacije DNA na ostalim je repetitivnim sekvencama također pokazala izrazitu stabilnost tijekom razvoja teratokarcinoma. Nadalje, nisu pronađeni nikakvi korelacijski odnosi globalne metilacije DNA i tumorske mase tijekom razvoja tumora. Navedeno nam nameće zaključak da globalna metilacija DNA vjerojatno nema značajnu ulogu u patogenezi teratokarcinoma odnosno tumora zametnih stanica. U tom smislu, skloni smo se složiti s hipotezom da razina globalne metilacije DNA može odražavati specifičnost određenog tipa tumora bez značajnog ili barem poznatog utjecaja na sam razvoj tumora (108).

Temeljem naših rezultata i ostali objavljenih radova, možemo zaključiti da se eksperimentalni teratokarcinom miša razvija na platformi epigenetičkih modifikacija odnosno patološki izmijenjenog programa metilacije DNA promotorskih regija gena matičnosti *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*. Pokušali smo dalje dobivene rezultate postaviti u kontekst razvoja tumora zametnih stanica čovjeka te temeljem zaključaka predložiti epigenetički model razvoja navedenih tumora.

5.5. Učinak 5-azacitidina na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma

Kao što smo naveli u uvodu, 5azaC i njegovi analozi u kliničkoj su uporabi kao DNA demetilacijski protutumorski lijekovi koji potiču reaktivaciju patološki utišanih gena supresora tumora, indukciju ekspresije diferencijacijskih gena s posljedičnom uspostavom diferenciranih staničnih fenotipova, inhibiciju proliferacije i rasta tumora te gubitka tumorskog klonaliteta (112-114). Najveći je proboj u onkološku praksu 5azaC ostvario u liječenju akutne mijeloične leukemije (AML) i mijelodisplastičnog sindroma (MDS) (115). Istraživanja terapijskog potencijala 5azaC-a u liječenju solidnih tumora navode ohrabrujuće rezultate i najavljuju potencijalno proširenje primjene u terapiji primjerice karcinomima pluća, jajnika te tumora glave i vrata (116, 117). Naša je studija bazično istraživanje na pragu navedenog i prva koja istražuje učinke 5azaC-a na eksperimentalni teratokarcinom miša *in vivo* s ciljem otkrivanja terapijskog potencijala jednog epigenetičkog DNA demetilacijskog agensa u liječenju tumora zametnih stanica. Postavili smo eksperimentalni dizajn po kojem smo istraživali učinak 5azaC-a na najraniju fazu razvoja teratokarcinoma neposredno nakon transplantacije, bi odgovaralo najranijoj fazi razvoja tumora zametnih stanica u ljudi, zatim učinak 5azaC-a na teratokarcinom u ranoj fazi razvoja kada tek započinju diferencijacijski procesi (skupina 6tj. 5azaC tj. 5azaC primijenjen od drugog tjedna razvoja) te učinak 5azaC-a na rani razvijeni teratokarcinom (skupina 8tj. 5azaC tj. 5azaC primijenjen od četvrtog tjedna razvoja).

Budući da su stanice epiblasta po mnogočemu, osobito organizaciji metiloma, izrazito slične spolnim prasticama iz kojih podrijetlo vuku zametni epitel i tumori zametnih stanica, ali i stanicama *carcinoma in situ* zametnih stanica (vidi poglavlje 5.4.), mišljenja smo da je zametak neposredno po ektopičnoj transplantaciji prikladan eksperimentalni model za istraživanje najranijeg stupnja razvoja tumora zametnih stanica. Kako je prikazano u rezultatima, kada je tretman započet neposredno po transplantaciji, zametak je potpuno izgubio tumorigeni potencijal te se nakon četiri tjedna tretmana nije razvio niti jedan teratokarcinom. Na mjestu ektopične transplantacije zametka, odnosno transplantacijskoga reza, pažljivom smo inspekcijom uočili isključivo fibrozu bubrežne čahure. Dobiveni rezultati ukazuju da 5azaC izaziva potpunu resorpciju ektopično transplantiranog zametka odnosno prospektivnih teratokarcinomskih stanica. Ovaj nalaz smatramo iznimno vrijednim novootkrivenim učinkom 5azaC. Ipak, zbog potpune inhibicije razvoja tumora nismo bili u mogućnosti provesti predviđena testiranja na kojima bi se temeljilo objašnjenje otkrivenog protutumorskog učinka 5azaC-a. Stoga ćemo mehanizam kojim 5azaC izaziva arrest tumorigeneze i resorpciju prospektivnih teratokarcinomskih stanica pokušati razjasniti sintezom naših rezultata i dosadašnjih spoznaja.

Sličan je učinak 5azaC-a na zametak opisala Vlahović u svojim istraživanjima učinka 5azaC-a na razvoj štakora *in vivo*. Jednokratnim tretmanom gravidne ženke u periodu prije, za vrijeme i neposredno nakon gastrulacije, Vlahović je otkrila isključivo resorpciju zametaka. U ranijim i kasnijim fazama, 5azaC nije imao učinka na fenotip potomstva ili je uzrokovao pojavu malformacija (118). 5azaC-om inducirane resorpcije zametaka tretiranih oko perioda gastrulacije opisane su naknadno i u miša (119). Dakle,

neosporan je učinak 5azaC-a na zametak u fazi gastrulacije. Stoga ne iznenađuje Bulutovo otkriće da *in utero* 5azaC-om tretirani miševi *post partum* pokazuju smanjenje i dezintegraciju zametnog epitela u sjemenim kanalićima testisa s citoplazmatskim vakuolama u stanicama. Nadalje, što je tretiranje gravidne ženke bilo bliže postgastrulacijskom periodu oštećenja su testisa bila izraženija. Za naše istraživanje značajan je nalaz da su mužjaci iz skupine tretirane *in utero* najbliže moguće fazi gastrulacije pokazivali smanjenu proliferacijsku i izrazito jaku apoptotičku aktivnost u tkivu zametnog epitela testisa (119). Smanjenje proliferacijske aktivnosti inducirano tretmanom s 5azaC-om pronašli smo i mi u vidu blagog smanjenja ekspresije gena *Pcna* na razini proteina u teratokarcinomima ostalih 5azaC-om tretiranih skupina. Proapoptotički učinak 5azaC dokazano je najintenzivniji upravo u spermatogonijama (120). Da 5azaC uzrokuje teško i trajno oštećenje stanica zametnoga epitela dokazuje smanjenje fertiliteta, povećanje preimplantacijskih gubitaka zametaka i povećanje incidencije malformacija u potomaka mužjaka tretiranih s 5azaC (120, 121). Dakle, dokazano je da 5azaC potiče resorpciju zametka u stadiju gastrulacije te izrazitu apoptotičku aktivnost, inhibiciju proliferacije i oštećenja stanične strukture u stanicama zametnog epitela testisa. Na temelju navedenog čini se vjerojatnim da je resorpcija ektopično transplantiranih zametaka odnosno potpuna inhibicija razvoja teratokarcinoma posljedica 5azaC-om inducirane apoptoze i inhibicije proliferacije.

Vođeni činjenicom da, kako smo već naglasili, stanice epiblasta i spolne prastanice dijele mnoge značajke, navodimo Doerksenovo istraživanje kojim je dokazao da se učinak 5azaC-a na zametni epitel, a posebice na spermatogonije, prenosi i na potomstvo u obliku smanjenog razvojnog potencijala i mnogostrukih malformacija (120, 121). Međutim, sam Doerksen je naglasio kako nije jasno jesu li navedeni učinci 5azaC-a posljedica toksičnog djelovanja na stanični metabolizam ili induciranog patološkog reprograma metiloma spolnih stanica. Stoga je usporedio učinke demetilacijski aktivnog 5azaC-a i epigenetički inertnog 6azaC-a. Rezultati su pokazali da 6azaC koji ne interagira s epigenetičkim sustavom stanice ne pokazuje nikakve učinke na spolne stanice, reproduksijsko zdravlje ili potomstvo. Sukladno rezultatima je zaključio kako je vjerojatno da se učinak 5azaC-a temelji na indukciji metilacijskog reprograma (121). Kasnije je i dokazao da 5azaC izaziva drastičnu globalnu hipometilaciju u zametnom epitelu testisa i to očekivano najintenzivnije u spermatogonijama (120). Naši nalazi globalne hipometilacije u teratokarcinomima tretiranima nakon perioda slobodnog rasta u skladu su s metilacijskom hipotezom i opisanim DNA hipometilacijskim učinkom 5azaC-a na spermatogonije. Čini se da je teratokarcinom u svim istraživanim fazama tumorigeneze čak osjetljiviji od zametnog epitela testisa na hipometilacijski učinak 5azaC-a jer je korišten protokol tretiranja potaknuo značajnu globalnu hipometilaciju u tkivu teratokarcinoma, dok se testis kao tkivo dokazano osjetljivo na 5azaC pokazao znatno otpornijim na globalni demetilacijski učinak. O sposobnosti 5azaC-a da potakne reprogram metiloma koji rezultira inhibicijom tumorskog potencijala, ali i dugotrajnu održivost nanovo organiziranog metiloma, svjedoče i druga istraživanja. Šerman je iz gravidne ženke štakora tretirane oko perioda gastrulacije naknadno izolirala ektoplacentarni konus zametka. Ektopičnom transplantacijom ektoplacentarnog konusa analizirala je

utjecaj 5azaC-om induciranog metilacijskog reprograma na maligni potencijal matičnih stanica trofoblasta. Navedenim pokusom Šerman je otkrila da 5azaC-om tretirani zamci pokazuju drastičan pad malignog potencijala te značajno smanjenje infiltracije okolnog zdravog tkiva tjednima nakon transplantacije (122).

Resorpciju zametaka tretiranih neposredno po transplantaciji moguće bi bilo objasniti oštećenjem stanica zametka povezanog s 5azaC indukcijom oksidacijskog stresa. Nadasi je, primjerice, pokazao kako 5azaC potiče apoptozu stanica povećavajući stvaranje kisikovih radikala u stanicama proksimalnih kanalića bubrega *in vitro*. Upravo tu indukciju oksidacijskog stresa smatra ključnom u 5azaC-om induciranju nefrotoksičnosti *in vivo* (123). Citotoksičan i proapoptotički učinak 5azaC-a na stanične linije AML-e i ALL-e također se objašnjava indukcijom stvaranja kisikovih radikala posebice superoksida (124). No, iako je objavljeno podosta studija koje navode slične zaključke, naši rezultati pokazuju da 5azaC nije utjecao na koncentracije superoksida u tretiranom teratokarcinomu. Dapače, vrijednosti analiziranih biljega oksidacijskog stresa bile su slične izmjerenim vrijednostima u kontrolnim skupinama. Navodimo i da su analizirani biljezi pokazivali normalne vrijednosti tijekom cijelog razvoja teratokarcinoma (vidi poglavlje 4.11.).

Resorpcija zametaka mogla bi se objasniti i 5azaC-om induciranim staničnim oštećenjima koja bi potaknula imunološku reakciju na transplantirano tkivo te posljedičnu resorpciju. Ipak, Damjanov je dokazao da imunološki sustav nije usmjeren protiv tumora tijekom razvoja teratokarcinoma (5). Naše istraživanje potvrđuje da ni u jednom periodu razvoja tumora ne dolazi do stvaranja imunološke reakcije domaćina protiv transplantiranog zametka ili teratokarcinoma. Naime, u tkivima 5azaC-om tretiranih teratokarcinoma 6tj. K i 8tj. K skupina pronađene su jednake vrijednosti Katalaze i AOPP-a, te čak niže vrijednosti Lipidne peroksidaze u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama teratokarcinoma. Naši rezultati suglasni su s primjerice Dieselovim istraživanjem učinka 5azaC-a na ekspresiju ključnog protuupalnog gena *TLR2* u humanim endotelnim stanicama na temelju kojeg je zaključio da 5azaC ne inducira upalnu reakciju (125).

Statistički značajan učinak 5azaC na rast i razvoj teratokarcinoma uočen je u najranijoj fazi razvoja tumora kao i kada je tretiranje započeto nakon četiri tjedna slobodnog razvoja tumora. Navedeno dokazuje da 5azaC ima sposobnost inhibicije rasta i već razvijenog tumora zametnih stanica, teratokarcinoma. Kimura je također opisao 5azaC-om induciranu supresiju rasta tumora iz SKM-1 stanične linije *in vivo* (126). Sve ranije navedeno u diskusiji o vjerojatnim mehanizmima i staničnim procesima uključenima u supresiju rasta tumora, temelji se upravo na analizama oksidacijskoga stresa i biljega upale u 5azaC-om tretiranim skupinama. Stoga smatramo vjerojatnim da je 5azaC potaknuo uspostavu protuproliferacijskog i proapoptotičkog metilacijskog reprograma u stanicama razvijenog teratokarcinoma s posljedičnim gubitkom tumorigenog potencijala te inhibicijom tumorskoga rasta. Otkriveni obrasci za gen specifične metilacije DNA na promotorima analiziranih gena u tretiranih teratokarcinoma potvrđuju potencijalno protutumorsko djelovanje 5azaC-a na eksperimentalni teratokarcinom odnosno tumore zametnih stanica. Naime, iako je 5azaC DNA demetilacijski agens koji je

doveo do globalne hipometilacije, nije uzrokovao demetilacijske promjene gena matičnosti *Nanog*, *Oct3/4* i *Sox2* što bi potaknulo progresiju tumora, a ne opisanu supresiju tumorskoga rasta. Štoviše, analiza ekspresije na razini mRNA dokazala je dodatnu 5azaC-om izazvanu inhibiciju ekspresije gena *Oct3/4* i *Nanog* u tretiranih teratokarcinoma. Navedeni učinak 5azaC-a možemo objasniti činjenicom da se veliki udio 5azaC-a u stanici inkorporira upravo u molekule RNA (127). Na razini mRNA 5azaC utječe na samu sintezu i posttranskripcijsku obradu mRNA u smjeru inhibicije ekspresije pojedinog gena (128). Cifareli je pak objavio istraživanje na staničnim linijama preadipocita u kojem je 5azaC inducirao ponovnu ekspresiju gena *Oct3-4*, *Nanog* i *Sox2* (129). Gotovo identične rezultate je naveo i Tsuji-Takayama koji je 5azaC indukcijom povećao ekspresiju gena *SSEA-1*, ali ponovno i gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2* u kulturi djelomično diferenciranih matičnih embrionalnih stanica. Također je opisao 5azaC-om induciranu demetilaciju gena *H19* koji je metiliran tijekom diferencijacijskih procesa (130). Ipak moramo istaknuti da su navedena i njima slična istraživanja koristila intenzivan tretman upravo s ciljem uspostave 5azaC-om inducirano fenotipa matičnih stanica. Kao dodatan argument da 5azaC u našem istraživanju nije uopće interferirao s metilacijskim obrascima gena matičnosti tijekom razvoja teratokarcinoma je i nalaz da 5azaC nije promijenio hipermetilacijski reprogram promotora gena *Oct3/4* i *Sox2* koje na temelju ranije diskutiranih rezultata smatramo osnovnim kompenzacijskim mehanizmima kojima stanice drže matičnost i proliferaciju odnosno progresiju tumora pod nadzorom. Pored toga, u istraživanjima koja nisu zamišljena da induciraju matičnost stanica navode se rezultati suglasni našima. Primjerice, u Dongovu istraživanju analog 5azaC-a također je potaknuo ponovnu ekspresiju specifičnog gena, ali je riječ bila o pojavi mRNA gena *RIZ1* u TE-13 stanicama karcinoma jednjaka. Dakle, u navedenom slučaju 5azaC je demetilirao i reaktivirao ekspresiju gena koji upravo suprimira matičnost stanica odnosno tumorigeni potencijal istraživano karcinoma (131). Vlahović je u *in vitro* sustavu pokazala da u zametku s tumorigenim potencijalom 5azaC inducira statistički značajno intenzivniju diferencijaciju matičnih stanica zametka i to u čitavu paletu stanica i tkiva poput neuroblasta, hrskavice, eritropoetskog tkiva i miotuba (132). Slično navedenom, Qian je otkrio 5azaC-om induciranu ekspresiju gena *ERK* s posljedičnim gubitkom matičnosti i diferencijacijom mezenhimalnih matičnih stanica pupčane vrpce čovjeka u kardiomiocyte (133). Burlacu je naveo kako se iz dosad objavljenih studija može zaključiti da 5azaC *in vitro* i *in vivo* inducira diferencijaciju stanica koštane srži u stanice koje eksprimiraju gene specifične za kardiomiocyte. Čak je i predložio tretman matičnih stanica 5azaC-om neposredno pred transplantaciju u oštećen srčani mišić što bi, kako je smatrao, doprinijelo regeneracijskom potencijalu stanica (134). Kato je nadalje dokazao da 5azaC potiče diferencijaciju malignih stanica rabdomiosarkoma te ponovnu ekspresiju biljega mišićnih stanica (135) što ne čudi budući da je upravo miogeneza jedan od najdokumentiranijih diferencijacijskih učinaka 5azaC-a. Walker je dokazao da 5azaC-om inducirana miogena diferencijacija nije posljedica selekcije miogenih subpopulacija stanica koje su postojale prije početka tretmana već da 5azaC inducira miogenezu i u stanicama koje nisu usmjerene u mišićnu liniju diferencijacije (136). U našem smo istraživanju također uočili izrazitu isprepletenost nezrelih stanica i miotuba u 5azaC-om tretiranim

teratokarcinomima. Ipak, budući da se u netretiranom teratokarcinomu kao dio normalnog razvoja teratomske komponente tumora pojavljuju miotube, nismo mogli navedeni nalaz pripisati isključivo diferencijacijskom učinku 5azaC tretmana.

Iz svega navedenog, zaključujemo da je 5azaC induciranjem protuproliferacijskog i proapoptotičkog metilacijskog reprograma stanica zametka odnosno matičnih stanica teratokarcinoma bez demetilacijskog učinka na gene jezgre matičnosti i utjecaja na kompenzacijski reprogram, te poticanja staničnog oksidacijskog stresa i upalne imunološke reakcije, inducirao potpun gubitak tumorigenog potencijala u ranoj fazi razvoja tumora te supresiju rasta već razvijenog tumora. Naše je istraživanje prvo koje ukazuje na uspješno protutumorsko djelovanje demetilacijskog agensa 5azaC-a na eksperimentalni teratokarcinom u miša, te ukazuje na mogući potencijal epigenetički aktivnih tvari u terapiji tumora zametnih stanica čovjeka.

6. ZAKLJUČCI

1. Ektopičnom transplantacijom pod čahuru bubrega zametak miša soja C3H u stadiju gastrulacije razvija se isključivo u teratokarcinom.
2. Eksperimentalni teratokarcinom miša razvija se iz zametka muškog spola.
3. Eksperimentalni teratokarcinom osmotjedni razvoj započinje blagim rastom nakon kojeg slijedi mirovanje, a završava eksplozivnim rastom.
4. Teratokarcinom ima manji proliferacijski potencijal od zametka s obzirom na manju ekspresiju gena *Pcna*.
5. Period eksplozivnog rasta teratokarcinoma poklapa se s povećanjem ekspresije proliferacijskog gena *Pcna*.
6. Smanjenje ekspresije gena matičnosti pomoću esiNanog i esiOct3/4 izaziva supresiju rasta zametka *in vitro*.
7. Zadržavanje hipometilacije gena *Nanog* na razini zametka u teratokarcinomu važno je za inicijaciju tumora.
8. Tijekom razvoja teratokarcinoma aktivna hipermetilacija gena *Oct3/4* podudara se s mirovanjem rasta tumora, a dostizanjem maksimuma hipermetilacijskog reprograma gena *Oct3/4*, teratokarcinom započinje intenzivan rast koji je u korelaciji s udjelom *Oct3/4* demetiliranih stanica u tumoru.
9. Gen *Sox2*, iako s niskim stupnjem metilacije DNA, pokazuje reprogram metilacije promotora tijekom razvoja teratokarcinoma sličan promotoru gena *Oct3/4*.
10. Metilacijski obrasci i njihove promjene na promotorima gena *Scgb3a1*, *Prss21*, *Stat3*, *Brca1*, *Mgmt*, *c-Myc*, *Trrap* i *Rassf1* te obrasci globalne metilacije DNA dobiveni analizom repetitivnih sekvenci *Mml*, *Mmetnltr* i *B1* nisu uključeni u razvoj teratokarcinoma.
11. 5-azacitidin primijenjen neposredno nakon transplantacije zametka uzrokuje njegovu resorpciju tj. potpuno sprječava razvoj teratokarcinoma.
12. 5-azacitidin primijenjen na razvijeni teratokarcinom značajno smanjuje rast tumora.
13. 5-azacitidin primijenjen na razvijeni teratokarcinom ne mijenja značajno metilacijski status i metilacijske reprogramme gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2*.

14. 5-azacitidin smanjuje ekspresiju gena *Oct3/4* i *Nanog* u tretiranih razvijenih teratokarcinoma mehanizmom koji ne uključuje promjene metilacije DNA njihovih promotora.
15. 5-azacitidin primijenjen na razvijeni teratokarcinom izaziva globalnu hipometilaciju genoma.
16. 5-azacitidin primijenjen na razvijeni teratokarcinom ne izaziva promjene ni oksidacijskog stresa niti upalnih procesa.

7. SAŽETAK

Cilj disertacije bio je istražiti epigenetičku platformu i utjecaj DNA demetilacijskog agensa 5-azacitidina (5azaC) na razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma miša (TCa) dobivenog transplantacijom gastrulirajućeg zametka (E 7,5) pod čahuru bubrega odrasle životinje. Otkriveno je da se TCa razvija samo iz zametaka muškog spola. Istraživani osmotjedni razvoj TCa započeo je blagim rastom nakon kojeg je uslijedio period mirovanja. TCa je završio razvoj eksplozivnim rastom koji se dogodio istovremeno s povećanjem ekspresije proliferacijskog gena *Pcna*. Eksperiment *in vitro* ukazao je na ključnu ulogu ekspresije gena matičnosti *Oct3/4* i *Nanog* u razvoju TCa jer je inhibicijom njihove ekspresije pomoću esiRNA došlo do supresije rasta zametka. Analizom metilacije DNA otkrili smo kontinuiranu hipometilaciju gena matičnosti *Nanog* tijekom razvoja TCa u usporedbi s testisom. Gen *Oct3/4* pokazao je pak hipermetilacijski reprogram u usporedbi s zametkom koji se preklapao s periodom blagog rasta i mirovanja tumora. Postizanjem maksimuma hipermetilacije, TCa je započeo intenzivan rast u korelaciji s udjelom *Oct3/4* demetiliranih stanica. Gen *Sox2*, iako s niskim stupnjem metilacije DNA, pokazao je reprogram metilacije promotora u usporedbi s zametkom tijekom razvoja teratokarcinoma sličan promotoru gena *Oct3/4*. Analizom metilacijskih obrazaca i njihove promjene na promotorima gena *Scgb3a1*, *Prss21*, *Stat3*, *Brca1*, *Mgmt*, *c-Myc*, *Trrap* i *Rassf1* te globalne metilacije DNA temeljene na analizi repetitivnih sekvenci *Mml*, *Mmetnltr* i *B1* moglo se zaključiti da navedeni geni i sekvence nisu bili uključeni u razvoj teratokarcinoma. 5azaC primijenjen neposredno nakon transplantacije zametka potpuno je spriječio razvoj TCa, dočim primijenjen na razvijeni TCa, statistički značajno smanjuje rast tumora. Iako je 5azaC uzrokovao globalnu hipometilaciju, nije utjecao na metilacijski status i metilacijske reprogramme gena matičnosti *Oct3/4*, *Nanog* i *Sox2*. Dapače, 5azaC inhibirao je ekspresiju gena matičnosti *Oct3/4* i *Nanog* u tretiranih razvijenih TCa mehanizmom koji ne uključuje promjenu metilacije DNA. Naši rezultati pokazali su da 5azaC ne izaziva promjene biljega oksidacijskog stresa, niti onih povezanih s upalnim procesima. Dakle, čini se da 5azaC izaziva uspostavu metiloma koji vjerojatno potiče apoptozu i smanjuje proliferaciju tumorskih matičnih stanica TCa. Naše istraživanje otkriva epigenetičku platformu razvoja tumora i potencijal upotrebe 5azaC u liječenju tumora zametnih stanica testisa.

8. SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to investigate the DNA methylation pattern and influence of DNA demethylating agent 5-azacytidine (5azaC) on the development of experimental mouse teratocarcinoma (TCa) obtained by the transplantation of gastrulating mouse embryo (E 7,5) under the kidney capsule of an adult animal. It was discovered that TCa develops from male embryos only. Investigated 8- week long period of TCa development started with subtle growth followed by resting phase. TCa development ended with explosive growth paralleled with concomitant increase in expression of *Pena* gene (proliferation marker). *In vitro* experiments have pinpointed the key role of stemness genes *Oct3/4* and *Nanog* expression since their esiRNA induced inhibition caused the suppression of tumour development from the embryo. Through analysis of DNA methylation pattern we discovered continuing hypomethylation of *Nanog* gene during TCa development compared with normal testicular tissue. Contrary, compared with embryo development, *Oct3/4* gene showed hypermethylation reprogramming overlapping with the period of tumour subtle growth and resting phase period. Achieving the maximum hypermethylation phase, TCa initiated the intensive growth correlating with proportion of *Oct3/4* demethylated cells. *Sox2* gene, although with low percentage of DNA methylation, showed the promoter methylation reprogramming during TCa development similar to the one established for *Oct3/4* gene promoter. Based on the promoter DNA methylation pattern analysis of *Scgb3a1*, *Prss21*, *Stat3*, *Brca1*, *Mgmt*, *c-Myc*, *Trrap* and *Rassf1* genes and established global methylation pattern based on the analysis of *Mml*, *Mmetnltr* and *B1* repetitive DNA sequences it may be concluded that these genes and repetitive sequences are not involved in teratocarcinoma development. 5azaC applied immediately after the embryo transplantation completely inhibited teratocarcinoma development whereas applied on already developed teratocarcinoma, decreased its growth with statistical significance. Despite the fact that 5azaC causes global hypomethylation, its application did not influence the methylation status and reprogramming of stemness genes *Oct3/4*, *Nanog* and *Sox2*. Quite contrary, treatment with 5azaC inhibited the expression of *Oct3/4* and *Nanog* genes in developed teratocarcinoma by some other mechanisms that did not include DNA methylation change. Our results showed that 5azaC treatment does not cause changes of oxidative stress markers nor the markers associated with the inflammation process. According to our obtained results it seems that 5azaC influence the establishment of methyloma which encourages apoptosis and decreases proliferation of TCa stem cells. Our research reveals the epigenetic platform of TCa development and potentials of 5azaC in the treatment of testicular germ cell tumours.

9. POPIS LITERATURE

1. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942 (1977);1:18-20.
2. Barrero MJ, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. *Cell Stem Cell* 2010;7:565-70.
3. Caldjí C, Hellstrom IC, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ. Environmental regulation of the neural epigenome. *FEBS Lett* 2011;585:2049-58.
4. Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. Regenerating the epigenome. *EMBO Rep* 2011;12:208-15.
5. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009;23:781-3.
6. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-54.
7. Sincic N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 2011;23:69-76.
8. Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 2007;22:91-103.
9. Blomen VA, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:27-44.
10. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501-2.
11. Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Mol Reprod Dev* 2010;77:105-13.
12. Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 2005;280:225-36.
13. Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome* 2009;20:532-43.
14. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002;241:172-82.
15. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J, Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 2004;128:703-8.
16. Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:526-37.
17. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17:330-9.
18. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
19. Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310:45-59.
20. Hughes LA, van den Brandt PA, de Bruine AP i sur. Early life exposure to famine and colorectal cancer risk: a role for epigenetic mechanisms. *PLoS One* 2009;4:e7951.

21. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A i sur. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 2006;9:199-207.
22. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 2011;21:502-17.
23. Hernandez-Vargas H, Sincic N, Ouzounova M, Herceg Z. Epigenetic signatures in stem cells and cancer stem cells. *Epigenomics-Uk* 2009;1:261-80.
24. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A i sur. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res* 2010;20:440-6.
25. Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia* 2008;10:266-78.
26. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C i sur. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* 2008;9:359-66.
27. Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL i sur. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 2010;29:1653-62.
28. Khandige S, Shanbhogue VV, Chakrabarty S, Kapettu S. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward. *Oncol Res* 2011;19:105-10.
29. Lima SC, Hernandez-Vargas H, Herceg Z. Epigenetic signatures in cancer: Implications for the control of cancer in the clinic. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12:316-24.
30. Hawes SE, Stern JE, Feng Q i sur. DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer* 2010;69:172-9.
31. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y i sur. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:13-27.
32. Wermann H, Stoop H, Gillis AJ i sur. Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 2010;221:433-42.
33. Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F i sur. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One* 2010;5:e9749.
34. Boumber Y, Issa JP. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park)* 2011;25:220-6, 8.
35. Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:536-46.
36. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 2008;659:40-8.
37. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006;174:341-8.
38. Lister R, Ecker JR. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 2009;19:959-66.

39. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH i sur. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009;462:315-22.
40. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH i sur. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982;10:2709-21.
41. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 2009;10:805-11.
42. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B i sur. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 2009;41:178-86.
43. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
44. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* 2010;20:609-17.
45. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009;10:295-304.
46. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003;300:455.
47. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69:915-26.
48. Lei H, Oh SP, Okano M i sur. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996;122:3195-205.
49. Riggs AD, Xiong Z, Wang L, LeBon JM. Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. *Novartis Found Symp* 1998;214:214-32.
50. Schubeler D, Lorincz MC, Cimbora DM i sur. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 2000;20:9103-12.
51. Pfeifer GP, Steigerwald SD, Hansen RS, Gartler SM, Riggs AD. Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8252-6.
52. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998;19:219-20.
53. Ramsahoye BH, Binizskiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5237-42.
54. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M i sur. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:149-58.
55. Miniou P, Jeanpierre M, Blanquet V i sur. Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 1994;3:2093-102.

56. Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2536-40.
57. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
58. Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S i sur. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000;24:368-71.
59. Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, Muegge K. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 2001;15:2940-4.
60. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* 2011;286:18347-53.
61. Oswald J, Engemann S, Lane N i sur. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000;10:475-8.
62. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R47-58.
63. Ma DK, Jang MH, Guo JU i sur. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009;323:1074-7.
64. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 2007;29:288-99.
65. Kanduri C, Whitehead J, Mohammad F. The long and the short of it: RNA-directed chromatin asymmetry in mammalian X-chromosome inactivation. *FEBS Lett* 2009;583:857-64.
66. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008;9:129-40.
67. Chandler VL. Paramutation: from maize to mice. *Cell* 2007;128:641-5.
68. Zabolotneva A, Tkachev V, Filatov F, Buzdin A. How many antiviral small interfering RNAs may be encoded by the mammalian genomes? *Biol Direct* 2010;5:62.
69. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010;220:126-39.
70. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136:642-55.
71. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-9.
72. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005;19:517-29.
73. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004;431:338-42.
74. Liu J, Carmell MA, Rivas FV i sur. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437-41.
75. Fuchs U, Borkhardt A. The application of siRNA technology to cancer biology discovery. *Adv Cancer Res* 2007;96:75-102.

76. Pithova P, Piskala A, Pitha J, Sorm F. Nucleic Acid Components and Their Analogues. 58. 5-Azacytidine and Related Compounds - Study of Structure Tautomerism and Possibilities of Pairing with Purine Derivatives. *Collect Czech Chem C* 1965;30:1626-37.
77. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer* 2008;123:8-13.
78. Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist* 2005;10:176-82.
79. Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D i sur. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:6956-61.
80. Lee T, Karon M, Momparler RL. Kinetic studies on phosphorylation of 5-azacytidine with the purified uridine-cytidine kinase from calf thymus. *Cancer Res* 1974;34:2482-8.
81. Van Rompay AR, Norda A, Linden K, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol Pharmacol* 2001;59:1181-6.
82. Zadrazil S, Fucik V, Bartl P, Sormova Z, Sorm F. The structure of DNA from *Escherichia coli* cultured in the presence of 5-azacytidine. *Biochim Biophys Acta* 1965;108:701-3.
83. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980;20:85-93.
84. 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;81:6993-7.
85. Xu F, Mao C, Ding Y i sur. Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem* 2010;17:4052-71.
86. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res* 1983;84:202-11.
87. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 2008;123:8-13.
88. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8905-9.
89. 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;28:752-71.
90. Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* 2010;38:4313-24.
91. Ghoshal K, Datta J, Majumder S i sur. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 2005;25:4727-41.
92. Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res* 1970;30:2760-9.

93. Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep* 1987;71:959-64.
94. Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Fucic A, Maric S, Serman D. Changes in the placenta and in the rat embryo caused by the demethylating agent 5-azacytidine. *Int J Dev Biol* 1999;43:843-6.
95. Cummings AM. Effect of 5-azacytidine administration during very early pregnancy. *Fundam Appl Toxicol* 1994;23:429-33.
96. Sincic N, Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Serman L, Serman D. Acetylsalicylic acid protects rat embryos from teratogenic effects of 5-azacytidine. *Period Biol* 2002;104:441-4.
97. Rutledge JC. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. *Mutat Res* 1997;396:113-27.
98. Branch S, Francis BM, Brownie CF, Chernoff N. Teratogenic effects of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in the Swiss Webster mouse. *Toxicology* 1996;112:37-43.
99. Branch S, Chernoff N, Brownie C, Francis BM. 5-AZA-2'-deoxycytidine-induced dysmorphogenesis in the rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 1999;19:329-38.
100. Bulut HE, Ozdemir O, Basimoglu-Koca Y, Korkmaz M, Atalay A. Effects of a DNA demethylating agent--5-azacytidine--on testicular morphology during mouse embryo development. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1999;76:47-53.
101. Cisneros FJ, Branch S. Transplacental exposure to the DNA demethylating agent, 5-AZA-CdR, affects the sexual behavior of CD-1 male mice. *Neurotoxicology* 2004;25:411-7.
102. Kelly TL, Li E, Trasler JM. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *J Androl* 2003;24:822-30.
103. Doerksen T, Benoit G, Trasler JM. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology* 2000;141:3235-44.
104. Doerksen T, Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod* 1996;55:1155-62.
105. Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y i sur. Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:86-90.
106. Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, You S, Lee HT, Yoon HS. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation* 2006;74:149-59.
107. Walker C, Nettesheim P. In vitro transformation of primary rat tracheal epithelial cells by 5-azacytidine. *Cancer Res* 1986;46:6433-7.
108. Cifarelli RA, Conconi MT, Marmo R i sur. 5-Azacytidine Makes Human Preadipocytes Able to Differentiate into Mesoderm-Derived Cell Lineages. *Stem Cells Dev* 2011;21:76-85.
109. Qian Q, Qian H, Zhang X i sur. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev* 2012;21:67-75.

110. Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview. *Arch Physiol Biochem* 2006;112:260-4.
111. Baiocchi M, Di Rico C, Di Pietro R, Di Baldassarre A, Migliaccio AR. 5-azacytidine reactivates the erythroid differentiation potential of the myeloid-restricted murine cell line 32D Ro. *Exp Cell Res* 2003;285:258-67.
112. Kato H, Ohta S, Koshida S i sur. Expression of pericyte, mesangium and muscle markers in malignant rhabdoid tumor cell lines: differentiation-induction using 5-azacytidine. *Cancer Sci* 2003;94:1059-65.
113. Walker C, Ranney DF, Shay JW. 5-Azacytidine-induced uncoupling of differentiation and tumorigenicity in a murine cell line. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:877-85.
114. Hamm CA, Costa FF. The impact of epigenomics on future drug design and new therapies. *Drug Discov Today* 2011;16:626-35.
115. Chitambar CR, Libnoch JA, Matthaeus WG, Ash RC, Ritch PS, Anderson T. Evaluation of continuous infusion low-dose 5-azacytidine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 1991;37:100-4.
116. Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005;32:443-51.
117. Kihlslinger JE, Godley LA. The use of hypomethylating agents in the treatment of hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1676-95.
118. Kaminskas E, Farrell A, Abraham S i sur. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2005;11:3604-8.
119. Edlin R, Connock M, Tubeuf S i sur. Azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Health Technol Assess* 2010;14 Suppl 1:69-74.
120. Ozbalak M, Cetiner M, Bekoz H i sur. Azacitidine has limited activity in 'real life' patients with MDS and AML: a single centre experience. *Hematol Oncol* 2011; u postupku objave.
121. Bernstein I, Byun HM, Mohrbacher A i sur. A phase I biological study of azacitidine (Vidaza) to determine the optimal dose to inhibit DNA methylation. *Epigenetics* 2010;5:750-7.
122. Bauman J, Verschraegen C, Belinsky S i sur. A phase I study of 5-azacytidine and erlotinib in advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69:547-54.
123. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
124. Purdue MP, Devesa SS, Sigurdson AJ, McGlynn KA. International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int J Cancer* 2005;115:822-7.
125. Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Moller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int J Cancer* 2006;118:3099-111.
126. Holmes L, Jr., Escalante C, Garrison O i sur. Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? *Public Health* 2008;122:862-72.

127. McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao L, Tarone RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* 2003;97:63-70.
128. Matsuda T, Saika K. Comparison of time trends in testicular cancer incidence (1973-97) in East Asia, Europe and USA, from *Cancer Incidence in Five Continents Vols IV-VIII*. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:578-9.
129. Baade P, Carriere P, Fritschi L. Trends in testicular germ cell cancer incidence in Australia. *Cancer Causes Control* 2008;19:1043-9.
130. Huddart RA. Survival from testicular cancer in England and Wales up to 2001. *Br J Cancer* 2008;99 Suppl 1:S83-5.
131. Einhorn LH, Donohue J. Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* 1977;87:293-8.
132. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO histological classification of testis tumours. U: Kleihues P, Sobin LH, ur. *Pathology & Genetics Tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC Press; 2004, str. 250-62.
133. 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;36:11-5.
134. Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D. Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int J Cancer* 2005;116:331-9.
135. Bulic-Jakus F, Ulamec M, Vlahovic M i sur. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. *Coll Antropol* 2006;30:921-4.
136. Sokoloff MH, Joyce GF, Wise M. Testis cancer. *J Urol* 2007;177:2030-41.
137. Grabel L, Becker S, Lock L, Maye P, Zanders T. Using EC and ES cell culture to study early development: recent observations on Indian hedgehog and Bmps. *Int J Dev Biol* 1998;42:917-25.
138. Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1526-30.
139. van de Geijn GJ, Hersmus R, Looijenga LH. Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009;87:96-113.
140. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 1964;24:1544-51.
141. Diez-Torre A, Silvan U, Diaz-Nunez M, Arechaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. *Cancer Biol Ther* 2010;10:529-36.
142. Atkin NB. High chromosome numbers of seminomata and malignant teratomata of the testis: a review of data on 103 tumours. *Br J Cancer* 1973;28:275-9.
143. Korkola JE, Heck S, Olshen AB i sur. In vivo differentiation and genomic evolution in adult male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:43-55.
144. Atkin NB, Baker MC. i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* 1983;10:199-204.

145. Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B i sur. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* 2003;111:161-73.
146. Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS i sur. Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 2006;66:820-7.
147. Skotheim RI, Autio R, Lind GE i sur. Novel genomic aberrations in testicular germ cell tumors by array-CGH, and associated gene expression changes. *Cell Oncol* 2006;28:315-26.
148. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 2008;642:1-13.
149. Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. The epigenome of testicular germ cell tumors. *APMIS* 2007;115:1147-60.
150. Kempkensteffen C, Christoph F, Weikert S i sur. Epigenetic silencing of the putative tumor suppressor gene testisin in testicular germ cell tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:765-70.
151. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J Pathol* 2006;210:441-9.
152. Kawakami T, Okamoto K, Kataoka A i sur. Multipoint methylation analysis indicates a distinctive epigenetic phenotype among testicular germ cell tumors and testicular malignant lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:97-101.
153. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene* 2003;22:461-6.
154. Schulz WA, Hoffmann MJ. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics* 2007;2:37-42.
155. Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L i sur. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 2005;23:1035-43.
156. Grinnell KL, Yang B, Eckert RL, Bickenbach JR. De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *J Invest Dermatol* 2007;127:372-80.
157. De Jong J, Weeda S, Gillis AJ, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Differential methylation of the OCT3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep* 2007;18:127-32.
158. Santagata S, Ligon KL, Hornick JL. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2007;31:836-45.
159. de Jong J, Looijenga LH. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog* 2006;12:171-203.
160. Boyer LA, Lee TI, Cole MF i sur. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947-56.
161. Loh YH, Wu Q, Chew JL i sur. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006;38:431-40.

162. Sonne SB, Perrett RM, Nielsen JE i sur. Analysis of SOX2 expression in developing human testis and germ cell neoplasia. *Int J Dev Biol* 2010;54:755-60.
163. Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 1970;227:503-4.
164. Pierce GB. Neoplasms, differentiations and mutations. *Am J Pathol* 1974;77:103-18.
165. Damjanov I. From stem cells to germ cell tumors and back. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2004;88:39-44.
166. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3585-9.
167. Lambert JF, Benoit BO, Colvin GA, Carlson J, Delville Y, Quesenberry PJ. Quick sex determination of mouse fetuses. *J Neurosci Methods* 2000;95:127-32.
168. Skreb N, Crnek V. Development of embryo-derived teratomas in vitro. *Results Probl Cell Differ* 1980;11:283-9.
169. Kittler R, Surendranath V, Heninger AK i sur. Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat Methods* 2007;4:337-44.
170. Yang D, Buchholz F, Huang Z i sur. 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;99:9942-7.
171. 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;2:779-84.
172. Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D i sur. 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;69:243-52.
173. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT i sur. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
174. Frommer M, McDonald LE, Millar DS i sur. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-31.
175. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
176. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
177. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
178. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lindeman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *J Lab Clin Med* 1992;120:720-5.

179. Ricci G, Caccuri AM, Lo Bello M, Pastore A, Piemonte F, Federici G. Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Biochem* 1994;218:463-5.
180. Inoue M, Koyama K. In vivo determination of superoxide and vitamin C radicals using cytochrome c and superoxide dismutase derivatives. *Methods Enzymol* 1994;234:338-43.
181. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T i sur. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161:2524-32.
182. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988;174:331-6.
183. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
184. Solter D, Dominis M, Damjanov I. Embryo-derived teratocarcinoma: I. The role of strain and gender in the control of teratocarcinogenesis. *Int J Cancer* 1979;24:770-2.
185. Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol* 1993;37:39-46.
186. Solter D, Damjanov I. Teratocarcinoma and the expression of oncodevelopmental genes. *Meth Cancer Res* 1979;18:277-323.
187. Damjanov I, Bagasra O, Dominis M, Solter D. Embryo-derived teratocarcinoma. IV. The role of immune factors in the regulation of teratocarcinogenesis. *Int J Cancer* 1982;30:759-62.
188. Iles SA. Mouse teratomas and embryoid bodies: their induction and differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 1977;38:63-75.
189. Mintz B, Cronmiller C, Custer RP. Somatic cell origin of teratocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2834-8.
190. Iles SA, Evans EP. Karyotype analysis of teratocarcinomas and embryoid bodies of C3H mice. *J Embryol Exp Morphol* 1977;38:77-91.
191. Handorf CR. Gene expression analysis and immunohistochemistry in evaluation of cancer of unknown primary: time for a patient-centered approach. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:1415-20.
192. Umemura S, Osamura RY. Utility of immunohistochemistry in breast cancer practice. *Breast Cancer* 2004;11:334-8.
193. Yuasa T, Yoshiki T, Ogawa O i sur. Detection of alpha-fetoprotein mRNA in seminoma. *J Androl* 1999;20:336-40.
194. Hahnel AC, Eddy EM. The distribution of two cell surface determinants of mouse embryonal carcinoma and early embryonic cells. *J Reprod Immunol* 1987;10:89-110.
195. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:339-53.
196. Leroy X, Buisine MP, Leteurtre E i sur. MUC1 (EMA): A key molecule of carcinogenesis? *Ann Pathol* 2006;26:257-66.

197. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS i sur. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329-37.
198. Damjanov I, Fox N, Knowles BB, Solter D, Lange PH, Fraley EE. Immunohistochemical localization of murine stage-specific embryonic antigens in human testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 1982;108:225-30.
199. Fox N, Shevinsky L, Knowles BB, Solter D, Dawjanov I. Distribution of murine stage-specific embryonic antigens in the kidneys of three rodent species. *Exp Cell Res* 1982;140:331-9.
200. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP i sur. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 2003;63:2244-50.
201. Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. OCT4: A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8544-7.
202. Richie JP. OCT4 staining in testicular tumors. A sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *J Urol* 2005;174:569-70.
203. Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K i sur. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95:379-91.
204. Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001;19:271-8.
205. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K i sur. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990;345:686-92.
206. Pesce M, Gross MK, Scholer HR. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 1998;20:722-32.
207. Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 1998;92:797-808.
208. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002;298:597-600.
209. Chambers I, Colby D, Robertson M i sur. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113:643-55.
210. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H i sur. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113:631-42.
211. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007;17:42-9.
212. Damjanov I, Solter D. Animal model of human disease: teratoma and teratocarcinoma. *Am J Pathol* 1976;83:241-4.
213. McBurney MW, Strutt BJ. Genetic activity of X chromosomes in pluripotent female teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Cell* 1980;21:357-64.
214. Bauer H, Kaltschmidt A, Muller M. Experimental induction of embryo-derived teratomas and teratocarcinomas in mice. *Arch Geschwulstforsch* 1989;59:333-40.

215. Solter D, Damjanov I. Teratocarcinomas rarely develop from embryos transplanted into athymic mice. *Nature* 1979;278:554-5.
216. Deasy BM, Lu A, Tebbets JC i sur. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol* 2007;177:73-86.
217. Matsumoto T, Kubo S, Meszaros LB i sur. The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* 2008;58:3809-19.
218. Anderson PD, Lam MY, Poirier C, Bishop CE, Nadeau JH. The role of the mouse y chromosome on susceptibility to testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 2009;69:3614-8.
219. Noguchi T, Noguchi M. A recessive mutation (ter) causing germ cell deficiency and a high incidence of congenital testicular teratomas in 129/Sv-ter mice. *J Natl Cancer Inst* 1985;75:385-92.
220. Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R i sur. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet* 2005;77:1034-43.
221. Linger R, Dudakia D, Huddart R i sur. A physical analysis of the Y chromosome shows no additional deletions, other than Gr/Gr, associated with testicular germ cell tumour. *Br J Cancer* 2007;96:357-61.
222. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976;34:119-24.
223. Schottenfeld D, Warshauer ME, Sherlock S, Zauber AG, Leder M, Payne R. The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1980;112:232-46.
224. Petersen PM, Skakkebaek NE, Giwercman A. Gonadal function in men with testicular cancer: biological and clinical aspects. *APMIS* 1998;106:24-36.
225. Bunker MC. Y-chromosome loss in transplanted testicular teratomas of mice. *Can J Genet Cytol* 1966;8:312-27.
226. Paterno GD, McBurney MW. X chromosome inactivation during induced differentiation of a female mouse embryonal carcinoma cell line. *J Cell Sci* 1985;75:149-63.
227. Rorth M, Rajpert-De Meyts E, Andersson L i sur. Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000;166-86.
228. Farthing CR, Ficiz G, Ng RK i sur. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet* 2008;4:e1000116.
229. Hoei-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE i sur. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology* 2005;47:48-56.
230. 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;6:114-22.
231. Skotheim RI, Lind GE, Monni O i sur. Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res* 2005;65:5588-98.

232. Han J, Zhang F, Yu M i sur. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2012;321:80-8.
233. Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF. Reviews of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenetics and genes in testicular tumors. *J Urol* 1996;155:1531-56.
234. Rodriguez S, Jafer O, Goker H i sur. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene* 2003;22:1880-91.
235. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U i sur. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 2004;64:4736-43.
236. Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem* 2010;52:145-67.
237. Jankowska AM, Szpurka H. Mutational determinants of epigenetic instability in myeloid malignancies. *Semin Oncol* 2012;39:80-96.
238. Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM i sur. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008;288:111-8.
239. Hadziselimovic F, Thommen L, Girard J, Herzog B. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol* 1986;136:274-8.
240. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37:148-51.
241. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372-6.
242. Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:463-71.
243. Pauls K, Schorle H, Jeske W i sur. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 2006;21:397-404.
244. Palumbo C, van Roozendaal K, Gillis AJ i sur. Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* 2002;196:467-77.
245. Hattori N, Nishino K, Ko YG, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 2004;279:17063-9.
246. Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361-70.
247. Harvey AJ, Armant DR, Bavister BD, Nichols SM, Brenner CA. Inner cell mass localization of NANOG precedes OCT3/4 in rhesus monkey blastocysts. *Stem Cells Dev* 2009;18:1451-8.
248. Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B i sur. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 2004;5:1078-83.

249. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-40.
250. Perrett RM, Turnpenny L, Eckert JJ i sur. The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. *Biol Reprod* 2008;78:852-8.
251. Girouard SD, Laga AC, Mihm MC i sur. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab Invest* 2012;92:362-70.
252. Wang X, Liang Y, Chen Q i sur. Prognostic significance of SOX2 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Invest* 2012;30:79-85.
253. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L i sur. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* 2011;6:e26740.
254. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y i sur. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:625-35.
255. Krop IE, Sgroi D, Porter DA i sur. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9796-801.
256. Wong TS, Kwong DL, Sham JS i sur. Promoter hypermethylation of high-in-normal 1 gene in primary nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:3042-6.
257. Shigematsu H, Suzuki M, Takahashi T i sur. Aberrant methylation of HIN-1 (high in normal-1) is a frequent event in many human malignancies. *Int J Cancer* 2005;113:600-4.
258. Gong Y, Guo MZ, Ye ZJ, Zhang XL, Zhao YL, Yang YS. Silence of HIN-1 expression through methylation of its gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011;17:526-33.
259. Kim JH, Choi YD, Lee JS i sur. Quantitative assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens. *Virchows Arch* 2010;457:35-42.
260. Guo M, Ren J, Brock MV, Herman JG, Carraway HE. Promoter methylation of HIN-1 in the progression to esophageal squamous cancer. *Epigenetics* 2008;3:336-41.
261. Mazumdar J, Hickey MM, Pant DK i sur. HIF-2alpha deletion promotes Kras-driven lung tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14182-7.
262. Jackson BC, Thompson DC, Wright MW i sur. Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily. *Hum Genomics* 2011;5:691-702.
263. Stripp BR, Reynolds SD, Plopper CG, Boe IM, Lund J. Pulmonary phenotype of CCSP/UG deficient mice: a consequence of CCSP deficiency or altered Clara cell function? *Ann N Y Acad Sci* 2000;923:202-9.
264. Hooper JD, Nicol DL, Dickinson JL i sur. Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 1999;59:3199-205.
265. Manton KJ, Douglas ML, Netzel-Arnett S i sur. Hypermethylation of the 5' CpG island of the gene encoding the serine protease Testisin promotes its loss in testicular tumorigenesis. *Br J Cancer* 2005;92:760-9.
266. Koul S, Houldsworth J, Mansukhani MM i sur. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. *Mol Cancer* 2002;1:8.

267. Koul S, McKiernan JM, Narayan G i sur. Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* 2004;3:16.
268. Smith-Sorensen B, Lind GE, Skotheim RI i sur. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene* 2002;21:8878-84.
269. Lichtenstein AV, Kisseljova NP. DNA methylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:235-55.
270. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:686-700.
271. Perez-Garcia A, Carrion-Navarro J, Bosch-Fortea M, Lazaro-Ibanez E, Prat-Acin R, Ayuso-Sacido A. Genomic instability of surgical sample and cancer-initiating cell lines from human glioblastoma. *Front Biosci* 2012;17:1469-79.
272. Loizou JI, Oser G, Shukla V i sur. Histone acetyltransferase cofactor Trapp is essential for maintaining the hematopoietic stem/progenitor cell pool. *J Immunol* 2009;183:6422-31.
273. Inghirami G, Chiarle R, Simmons WJ, Piva R, Schlessinger K, Levy DE. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005;4:1131-3.
274. Robson S, Pelengaris S, Khan M. c-Myc and downstream targets in the pathogenesis and treatment of cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1:305-26.
275. Diala ES, Hoffman RM. DNA methylation levels in normal and chemically-transformed mouse 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;104:1489-94.
276. Wild L, Flanagan JM. Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806:50-7.
277. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP i sur. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1:598-607.
278. Serman L, Serman A, Fabijanovic D. An in vivo rat model to study epigenetic control of cell invasion. *Med Hypotheses* 2011;76:407-9.
279. Nadasi E, Clark JS, Szanyi I i sur. Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells. *Anticancer Res* 2009;29:2295-9.
280. Gao S, Mobley A, Miller C, Boklan J, Chandra J. Potentiation of reactive oxygen species is a marker for synergistic cytotoxicity of MS-275 and 5-azacytidine in leukemic cells. *Leuk Res* 2008;32:771-80.
281. Diesel B, Ripoché N, Risch RT, Tierling S, Walter J, Kierner AK. Inflammation-induced up-regulation of TLR2 expression in human endothelial cells is independent of differential methylation in the TLR2 promoter CpG island. *Innate Immun* 2012;18:112-23.
282. Kimura S, Kuramoto K, Homan J i sur. Antiproliferative and antitumor effects of azacitidine against the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. *Anticancer Res* 2012;32:795-8.
283. Dong SW, Cui YT, Zhong RR i sur. Decreased expression of retinoblastoma protein-interacting zinc-finger gene 1 in human esophageal squamous cell cancer by DNA methylation. *Clin Lab* 2012;58:41-51.

284. Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Serman L, Sincic N, Katusic A. Epigenetic deregulation through DNA demethylation seems not to interfere with the differentiation of epithelia from pre-gastrulating rat embryos in vitro. *Acta Dermatovenereol Croat* 2008;16:183-9.

10. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja:

16. ožujka 1981., Pula, Hrvatska

Adresa zaposlenja:

Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavod za biologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Akademski stupanj:

2005. godine Doktor medicine

Obrazovanje:

2005.-2012. Doktorski poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
1995.-2005. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zaposlenja:

Od 2011. godine Asistent pri Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
Od 2006. godine Naslovni asistent pri Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu
Od 2006. godine Asistent pri Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Usavršavanja:

2009. godine Stereology analyzes u organizaciji Slovenian Society for Stereology and
Quantitative Image Analysis, Zagreb
2009. godine i "COST Action B24 Training School in the Experimental Design and Statistical
2008. godine Analysis of Biomedical Experiments" u organizaciji FRAME Reduction Steering
Committee and University of Manchester, Manchester
2007. godine "Introduction to Bioinformatics" u organizaciji Biološkog odsjeka Prirodoslovno
matematičkog fakulteta, Zagreb
2006. godine "Umijeće Medicinske Nastave" u organizaciji Škole narodnog zdravlja „Andrija
Štampar“, Zagreb

Značajnije stipendije:

2009. godine	Bilateralna stipendija Vlade Republike Francuske i Republike Hrvatske
2009. godine	COST Action B24 stipendija
2008. godine	FEBS's Scholarship
2008. godine	COST Action B24 stipendija

Članstvo:

HDIR, Hrvatsko društvo za istraživanje raka
HDBMB, Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju
DKGH, Društvo za kliničku genetiku Hrvatske
EACR, European Association for Cancer Research
ES, Epigenetic society
FEBS, Federation of European Society of Biochemistry and Molecular Biology
IUBMB, The International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Značajnije nagrade i priznanja:

2006. - 2010.	ARCA, Zagreb
2006. godine	Nagrada za poster, 17 th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology: award for the best poster: Šerman Lj, Sinčić N, Vlahović M, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Šerman A, Katušić A: Foetal survival determined by 5-azacytidine impact on the placenta, 2006.
2003. godine	Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu za rad „Acetilsalicilna kiselina inhibira teratogeni učinak 5-azacitidina” izrađen pod mentorstvom prof dr. sc. Maje Vlahović.

Poglavlje u knjizi:

Serman Lj, Vlahovic M, Sincic N i sur. DNA Methylation Changed by 5-Azacytidine Can Affect Normal Fetal and Placental Development. U: Pinter B, Meszaros Z, ur. Epigenetics: Mechanisms, Functions and Human Effects. New York: Nova Science Publishers Inc.; 2010, str. 253-63.

Prijevod:

Vlahović M, Sinčić N. Razvojna genetika. U: Bulić-Jakuš F, Barišić I, ur. Hrv. Izd. Emeryjeve osnove medicinske genetike. Prijevod: Turnpenny P, Ellard S, ur. Engl. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Str. 83-108.

Popis publikacija:

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;36:11-5.
2. Sincic N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 2011;23:69-76.
3. Hernandez-Vargas H, Sincic N, Ouzounova M, Herceg Z. Epigenetic signatures in stem cells and cancer stem cells. *Epigenomics-Uk* 2009;1:261-80.
4. Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Vlahovic M i sur. Development of epithelia in experimental teratomas derived from rodent embryos. *Acta Dermatovenerol Croat* 2008;16:119-22.
5. Katusic A, Juric-Lekic G, Jovanov-Milosevic N i sur. Development of the fetal neural retina in vitro and in ectopic transplants in vivo. *Coll Antropol* 2008;32:201-7.
6. Kulisic SM, Juric-Lekic G, Bulic-Jakus F i sur. Development of epithelia in the ectopic transplant of the fetal rat epiglottis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2008;16:55-9.
7. Serman L, Sijan M, Kuzmic R i sur. Changes of membrane proteins expression in rat placenta treated with 5-azacytidine. *Tieraerztl Umschau* 2008;63:391-5.
8. Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Juric-Lekic G, Serman L, Sincic N, Katusic 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;16:183-9.
9. Serman L, Vlahovic M, Sijan M i sur. The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta* 2007;28:803-11.
10. Bulic-Jakus F, Ulamec M, Vlahovic M i sur. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. *Coll Antropol* 2006;30:921-4.
11. Šerman L, Sinčić N, Vlahović M i sur. Foetal survival determined by 5-azacytidine impact on the placenta. *Acta Clin Croat* 2006;45:141-4.
12. Sincic N, Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Serman L, Serman D. Acetylsalicylic acid protects rat embryos from teratogenic effects of 5-azacytidine. *Period Biol* 2002;104:441-4.
13. Vlahovic M, Sincic N, Bulic-Jakus F, Serman L, Serman D. Acetylsalicylic acid seems to diminish teratogenic effects of 5-azacytidine. *Period Biol* 2001;103:343-6.