

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

LEA LANGER, ANITA STOJANOVIĆ I NIKOLINA ŠPOLJARIĆ

**REGULACIJA TRANSKRIPCIJE GENA *MGAT3* U MALIGNIM
TUMORIMA PORIJEKLA EPITELNIH STANICA**

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Korać i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013. / 2014.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Patobiologija karcinoma	2
1.1.1. Definicija karcinoma	2
1.1.2. Tipovi karcinoma	2
1.1.2.1. Karcinom vrata maternice.....	2
1.1.2.2. Karcinom debelog crijeva.....	5
1.1.2.2.1. Molekularne promjene kod primarnog karcinoma debelog crijeva.....	5
1.1.2.2.2. Molekularne promjene kod metastatskog karcinoma debelog crijeva.....	10
1.2. <i>MGAT3</i>	13
2. HIPOTEZA I OPĆI CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	14
2.1. Hipoteza	15
2.2. Opći ciljevi istraživanja.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Materijali	17
3.1.1. Stanične linije karcinoma	17
3.1.2. Inhibitor DNA-metiltransferaze I.....	18
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprema stanica za tretman i tretman inhibitorom.....	18
3.2.2. Fiksacija stanica na lamelama i imunofluorescencijsko bojenje	20
3.2.3. Izolacija DNA, bisulfitna konverzija, pirosekvenciranje	22
3.2.3.1. Izolacija DNA.....	22
3.2.3.2. Bisulfitna konverzija.....	22
3.2.3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	22
3.2.3.4. Pirosekvenciranje.....	23
3.2.4. Izolacija RNA, reverzna transkripcija, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	26
3.2.4.1. Izolacija RNA.....	26
3.2.4.2. Reverzna transkripcija.....	26
3.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	27

3.2.4.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR).....	28
3.2.5. Ukocentriranje proteina za detekciju šećernih skupina	28
3.2.6. Kariotipizacija.....	29
3.2.7. Statistička obrada podataka	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Morfologija stanica nakon tretmana	31
4.2. Provjera uspješnosti tretmana imunofluorescencijskim bojenjem i određivanjem stupnja metilacije sekvence LINE1	32
4.2.1. Imunofluorescencijsko bojenje	32
4.2.2. Metilacijski status sekvence LINE-1	36
4.3. Stupanj metilacije promotora gena <i>MGAT3</i>	39
4.4. Ekspresija gena <i>MGAT3</i>	41
4.4. Analiza glikanskih skupina na izlučenim proteinima istraživanih stanica.....	44
4.5. Kariotipizacija	47
5. RASPRAVA	48
6. ZAKLJUČCI.....	53
7. ZAHVALA.....	55
8. LITERATURA.....	56
9. SAŽETAK.....	61
10. SUMMARY	62

1. UVOD

1.1. Patobiologija karcinoma

1.1.1. Definicija karcinoma

Karcinomi su maligne neoplazme porijekla epitelnih stanica koje čine 80 do 90 posto svih tumora (Weinberg, 2007.).

1.1.2. Tipovi karcinoma

Dvije najčešće podskupine karcinoma prema histologiji tumora su: adenokarcinomi i karcinomi skvamoznih stanica. Adenokarcinomi nastaju u organima ili žlijezdama, dok karcinomi skvamoznih stanica nastaju u skvamoznom epitelu (Weinberg, 2007.).

Prema primarnom mjestu nastanka, postoji šest najčešćih vrsta karcinoma. Karcinom vrata maternice i karcinom maternice, karcinom pluća, karcinom debelog crijeva i rektuma, karcinom prostate, karcinom dojke i karcinom kože (Weinberg, 2007.).

1.1.2.1. Karcinom vrata maternice

Prema ukupnom broju dijagnoza u jednoj godini, karcinom vrata maternice predstavlja drugi najčešći tip karcinoma u žena u svijetu. Iako je smrtnost od ovog tipa karcinoma u opadanju, on i dalje predstavlja problem u zemljama u razvoju, pa je tako u Africi, Aziji i Južnoj Americi najčešći oblik karcinoma u žena (Grubišić i sur., 2009.).

Karcinom vrata maternice ima sporu progresiju, što znači da se bolest može otkriti i liječiti u ranim fazama (Grubišić i sur., 2009.).

Niz epidemioloških i eksperimentalnih studija pokazale su kako je primarni uzrok nastanka i razvoja karcinoma vrata maternice humani papiloma virus (HPV, od engl. *Human papillomavirus*). Istraživanje njegove uloge u patogenezi karcinoma vrata maternice

predstavlja glavno područje istraživanja vezano za ovaj tip karcinoma u molekularnoj biologiji (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

Identificirano je preko 200 vrsta HPV-a koje se klasificiraju u 16 grupa. Genitalni HPV je klasificiran prema potencijalu induciranja malignih transformacija stanica u tipove visokog rizika (HR, od engl. *High Risk*; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, i 82), tipove vjerojatno visokog rizika (pHR, od engl. *probable High Risk*; 25, 53 i 66) i tipove niskog rizika (LR, od engl. *Low Risk*; 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108). Među visokorizičnim tipovima, HPV16 i HPV18 su najuže povezani s razvojem karcinoma vrata maternice (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

HPV tipovi visokog rizika imaju sposobnost transformacije stanica u maligni fenotip, no ipak samo manjina lezija vrata maternice zaražena s HR-HPV-om transformira u karcinom vrata maternice (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

Genom HPV-a je zatvorena, kružna, dvolančana molekula DNA, veličine 7800 do 7900 parova baza. Virusni se genom dijeli u tri regije: regija L (L od engl. *late*) kodira za strukturne proteine (proteine kapside); regija E (E, od engl. *early*) kodira za proteine odgovorne za umnožavanje virusa i transformaciju stanica domaćina stanice (imaju onkogeni učinak); regija R (R, od engl. *regulatory*) kodira za regulacijske proteine koji upravljaju procesima umnožavanja virusa (Presečki i sur., 2002.).

HPV ima u regiji L dva otvorena okvira čitanja: L1 i L2 (ORF, od engl. *open reading frame*). Regija L1 kodira za veliki kapsidni protein. ORF L2 kodira za mali kapsidni protein koji se razlikuje među genotipovima HPV-a. Regija E sadržava najmanje 6 različitih ORF-ova: E1, E2, E4, E5, E6 i E7 (Presečki i sur., 2002.).

Regije E1 i E2 kodiraju proteine odgovorne za izvankromosomsku replikaciju DNA i završetak životnog ciklusa virusa. Gubitak ekspresije virusnog proteina E2 je značajka HPV-a poveznog s karcinomom vrata maternice. Protein E4 se eksprimira u kasnijim fazama infekcije i nije poznato ima li svojstvo transformacije, no smatra se da ima važnu ulogu u sazrijevanju i replikaciji virusa. Regija E5 u otvorenom okviru čitanja je često deletirana u stanicama karcinoma vrata maternice, što upućuje na to da nije esencijalna u održavanju maligne transformacije stanice domaćina (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

E6 i E7 su najvažniji onkogeni proteini u karcinomu vrata maternice. Protein E6 pokazuje slabi onkogeni potencijal, stoga mu je potrebna suradnja s proteinom E7 za puni

transformirajući kapacitet. Ključna uloga E6 je inhibicija tumor supresorskog proteina p53. Povećanje razine p53 ima ključnu ulogu u indukciji gena što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa dopuštajući popravak oštećene DNA ili aktivaciju apoptotskih putova. Tako stanice ekspresiranjem proteina E6 održavaju niske razine funkcionalnog p53, narušavaju odgovor na oštećenje DNA i omogućavaju nakupljanje genomskih mutacija (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

Vežanje onkoproteina E7 na protein RB omogućuje komplementarnu funkciju. Vežanje oslobađa transkripcijski faktor E2F koji aktivira ekspresiju gena uključenih u sintezu DNA u stanici. Ako E6 inhibira p53, stanica preživljava u S fazi s oštećenom DNA i kroz E7 put može replicirati DNA HPV-a.

Onkogeni svojstva E6 i E7 i njihov utjecaj na p53 i pRB omogućili su osnovne temelje za daljnje istraživanje uloge HPV-a kod karcinoma vrata maternice povezanog s HPV-om (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

DNA HPV-a je obično izvankromosomska ili episomalna u benignim prekursorskim lezijama karcinoma vrata maternice. Tumorska tkiva mogu u isto vrijeme sadržavati i episomalnu i integriranu DNA HPV-a. Kod najčešćih visokorizičnih infekcija, integracija se češće pojavljuje kod HPV 18 nego kod HPV 16 infekcije. Tijekom ugradnje DNA HPV-a, virusni genom se obično lomi u E1/E2 regiji. Lom vodi do gubitka E1 i E2 regije. Gubitak E2 regije rezultira nekontroliranom i povećanom ekspresijom onkogenih proteina E6 i E7. Sama ugradnja HPV-a u DNA domaćina ima i ulogu u progresiji iz niskog u visoki stupanj neoplazme vrata maternice (Dueñas-Gonzalez i sur., 2005.).

Do danas nije u potpunosti razjašnjeno kojim je sve mehanizmima regulirana ekspresija gena HPV-a u inficiranoj stanici i koliko je u ovim mehanizmima značajna metilacija DNA.

Usprkos velikom broju istraživanja vezanih uz karcinom vrata maternice, malo se zna o regulaciji gena uključenih u sintezu glikanskih skupina na proteinima koje stanice luče i potencijalnoj povezanosti tih proteina s virusnom infekcijom. Tako je značaj glikanskih skupina izlučenih proteina za samu progresiju bolesti još uvijek neistraženo područje.

1.1.2.2. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva je glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u svijetu. S adjuvantnom kemoterapijom i kirurškim uklanjanjem, stopa preživljenja pacijenata s karcinomom debelog crijeva koji je metastazirao iznosi 69.2%, dok je stopa preživljenja pacijenata s lokaliziranim karcinomom debelog crijeva čak 90.1% (Wang i sur., 2014).

Histološki identični karcinomi debelog crijeva mogu imati različitu prognozu i/ili odgovor na terapiju što je posljedica heterogenosti ovog tipa tumora (Deschoolmeester i sur., 2010.). Razumijevanje molekularne osnove malignih promjena omogućava razvoj preciznijih terapija, a može dati i uvid u razlike vezane za individualnu podložnost pojedinaca, razvoj, progresiju, potencijal metastaziranja te odgovor na antitumorsko liječenje u određenoj populaciji bolesnika (Markowitz i Bertagnolli, 2009.).

Maligni tumori kao što su karcinomi nastanu zbog različitih molekularnih promjena u više putova, a klonalnom selekcijom dolazi do zadržavanja onih promjena koje su najpogodnije za proliferaciju stanica (Fearon i sur., 1990.). Molekularne promjene kod primarnog karcinoma debelog crijeva uključuju genomsku nestabilnost, genomske modifikacije i epigenetičke promjene, dok molekularne promjene kod karcinoma debelog crijeva koji ima potencijal metastaziranja uključuju i promjene u signalnim putevima faktora rasta i epitelno mezenhimsku tranziciju (Slika 1.) (Markowitz i Bertagnolli, 2009.).

1.1.2.2.1. Molekularne promjene kod primarnog karcinoma debelog crijeva

a) Genomska nestabilnost

Prvi predloženi model tumorigeneze karcinoma debelog crijeva uključivao je put u četiri koraka: inaktivaciju proteina APC koja uzrokuje razvoj adenoma; mutaciju KRAS koja uzrokuje rast adenoma; aberaciju kromosoma 18 koja omogućuje progresiju adenoma i inaktivaciju proteina p53 koja uzrokuje konačnu transformaciju u karcinom (Fearon i sur., 1990.). Danas se zna da se taj put javlja se u svega 60% slučajeva karcinoma debelog crijeva. Javlja se hipoteza koja kaže da stanice kontinuirano stvaraju nove genetske promjene koje im omogućuju prednost rasta i selekciju klonalnom ekspanzijom, za razliku od starije hipoteze

koja kaže da samo genomska nestabilnost uzrokuje različite mutacije u karcinomu debelog crijeva (Boland i sur., 2010.).

Patogeneza je, ukupno, posljedica neravnoteže između nastanka mutacija i mehanizama kontrole staničnog ciklusa. Kada kontrolne točke staničnog ciklusa više ne mogu kontrolirati stopu mutacija dolazi do genomske nestabilnosti. Toj neravnoteži pridonose tri različita puta: kromosomska nestabilnost, mikrosatelitna nestabilnost i CpG metilacijski fenotip (Ogino i sur., 2010.).

Kromosomska nestabilnost je najčešći tip genomske nestabilnosti, javlja se u 50-85% karcinoma debelog crijeva. Za nju je karakteristična varijabilnost kariotipa zbog gubitka ili pojave dodatnih dijelova kromosoma (Pino i Chung, 2010.). Kod kromosomske nestabilnosti dolazi do promjene u broju i strukturi kromosoma što može uzrokovati aneuploidiju, transformaciju i gubitak heterozigotnosti (Sengupta i sur., 2008.). U kromosomski nestabilnim neoplazmama čest je gubitak kraka kromosoma 18 - pojavljuje se u 70% primarnih karcinoma debelog crijeva (Pino i Chung., 2010.).

Mikrosatelitna nestabilnost detektirana je u 15% karcinoma debelog crijeva. Do nje dolazi kada se promijeni duljina mikrosatelita pa oni postanu neuobičajeno dugački ili kratki zbog gubitka ili nakupljanja dodatnih kopija ponavljajućih sekvenci (Geiersbach i Samowitz, 2011.). Mehanizam kojim dolazi do produženja ili skraćanja mikrosatelita je inaktivacija gena uključenih u popravak pogrešno sparenih baza DNA (Worthley i Leget, 2010.).

CpG metilacijski fenotip je najnovije definiran put genomske nestabilnosti. CpG otoci su regije bogate CpG (citozin-fosfat-guanin) dinukleotidima na kojima dolazi do metilacije DNA (Fearon, 2011.). Ova epigenetička modifikacija ključan je događaj u regulaciji ekspresije gena, povezana je s karcinogenezom te je čak i češća od genetskih promjena (Deschoolmeester i sur., 2010.).

Promjena metilacije u CpG otocima koji se nalaze unutar promotora mnogih gena događa se u svim zahvaćenim tkivima tijekom karcinogeneze (Kim i sur., 2009.). Ona dovodi do transkripcijskog utišavanja gena uključenih u supresiju tumora, kontrolu staničnog ciklusa, popravak DNA i apoptozu (Kim i Deng, 2007.). Hipermetilacija CpG otoka unutar promotora onemogućuje transkripciju gena jer transkripcijski faktori zbog kompaktne strukture kromatina ne mogu doći do promotora. Tako hipermetilacija dovodi do pojačane inaktivacije gena karakteristične za CpG metilacijski fenotip karcinoma (Deschoolmeester i sur., 2010.).

CpG metilacijski fenotip prisutan je u 35-40% karcinoma debelog crijeva (Goel i sur., 2007.). Pretpostavlja se da je metilacija DNA promijenjena u mukoznoj membrani debelog crijeva, predispozirajući tako tkivo za daljnje displastične promjene. Smatra se da je aberantna metilacija drugi najčešći uzrok karcinoma debelog crijeva (Worthley i Leggett, 2010.).

b) Genomske modifikacije

Inaktivacijske mutacije tumor supresorskih gena

Tumor supresorski geni kodiraju proteine uključene u regulaciju rasta, proliferacije i staničnog ciklusa, stoga se njihovom inaktivacijom pospješuje rast tumora (Markowitz i Bertagnolli, 2009.).

Inaktivacijske mutacije tumor supresorskih gena uključuju deleciju, promjenu slijeda nukleotida, promjenu metilacije promotora ili mutaciju jednog alela i gubitak drugog alela (Markowitz i Bertagnolli, 2009.). Ključni tumor supresorski geni u patogenezi karcinoma debelog crijeva su *APC*, *TP53* i *TGF- β* .

Gen *APC* kodira za protein APC koji ima ulogu u regulaciji diferencijacije, adheziji, polarnosti, migraciji, apoptozi i segregaciji kromosoma. Mutacije gena *APC* detektirane su kod 30-70% sporadičnih adenokarcinoma (Pino i Chung, 2010.).

Gen *TP53* kodira za tumor supresorski protein p53 koji ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Ukoliko je potreban popravak DNA on zaustavlja stanice u G1/S i G2/M fazi staničnog ciklusa tj. potiče apoptozu ukoliko se oštećenje DNA ne može popraviti (Fearon i sur., 1990.).

Protein TGF- β je transformirajući faktor rasta. Mutacije koje inaktiviraju gen *TGF- β* uzrokuju transformaciju adenoma u invazivni karcinom debelog crijeva (Markowitz i Bertagnolli, 2009.).

Aktivacija onkogenih putova

Onkogeni kodiraju faktore rasta, receptore faktora rasta, signalne molekule, regulatore staničnog ciklusa i ostale faktore uključene u staničnu proliferaciju i preživljenje. Kada su onkogeni mutirani ili dođe do njihove amplifikacije posljedica je prekomjerna ekspresija proteinskog produkta, promjene u funkciji proteina ili nastanak novih proteinskih interakcija koje mogu dovesti i do epigenetičkih modifikacija (Lièvre i sur., 2010.).

Onkogeni uključeni u razvoju karcinoma debelog crijeva su *RAS*, *KRAS* i *PI3K*. Protein *RAS* uključen je u signalni put *RAS-RAF-MAPK* koji ima ulogu u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i preživljenju. *KRAS* je član *Ras* obitelji proteina i uključen je u isti signalni put (Lièvre i sur., 2010.). Mutacije gena *KRAS* detektirane su u 40% kolorektalnih adenokarcinoma (Fearon i sur.,1990.). Gen *PI3K* kodira za fosfatidilinozitol 3-kinazu uključenu u *PI3K-Akt* signalni put. Mutacija gena *PI3K* zabilježena je u trećini slučajeva karcinoma debelog crijeva (Lièvre i sur., 2010.).

c) MikroRNA

MikroRNA su kratke RNA duljine 8-25 nukleotida s regulatornom ulogom u razvoju, staničnoj diferencijaciji, proliferaciji i apoptozi. Vežu se za mRNA tumor supresorskih gena ili onkogeni i tako kontroliraju njihovu translaciju. Vjeruje se da su pogreške u regulaciji posredovanoj putem miRNA dio puta nastanka karcinoma debelog crijeva (Slaby i sur., 2009.).

d) Epigenetičke promjene

Epigenetičke promjene utječu na regulaciju ekspresije gena bez mijenjanja sekvence DNA. Takve promjene detektirane su u 40% slučajeva karcinoma debelog crijeva. Epigenetičke promjene su uglavnom promjene u modifikacijama histona i metilaciji DNA (Ashktorab i sur., 2010.).

Histonske modifikacije

Histoni su proteini koji pakiraju DNA stanice u nukleosome i imaju ulogu u regulaciji gena. Kovalentne modifikacije histona uključuju acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinilaciju i one uzrokuju prijelaz heterokromatina u eukromatin i obratno. Takve modifikacije su reverzibilne i najčešće se događaju na N- i C- terminalnim regijama. Kod karcinoma debelog crijeva može doći do deacetilacije ili metilacije lizina 9 na histonu H3. Ako dođe do acetilacije, gen kod kojega se taj histon nalazi se eksprimira, a ako dođe do metilacije isti gen se transkripcijski utiša (Wong i sur., 2007.).

Metilacija DNA

Kod karcinoma je prisutna globalna hipometilacija DNA ali i specifična hipermetilacija nekih gena (Pogribni i Beland., 2009.). Globalna hipometilacija je povezana s nestabilnošću genoma, a hipermetilacija s utišavanjem specifičnih gena. Hipometilacijom su uglavnom zahvaćeni nekodirajući dijelovi DNA tj. introni tih regija između gena, ponajviše ponavljajuće regije i transpozoni (Herrera i sur., 2008.). Veći dio genoma čovjeka čine nekodirajući sljedovi DNA, a više od 50% čine ponavljajući sljedovi DNA, uključujući i transpozone i ponavljanja jednostavnih sljedova (Lander i sur., 2001.). Ponavljanja jednostavnih sljedova su u zdravim stanicama visokometilirana. Njihova biološka funkcija se temelji na strukturnoj organizaciji kromatina koja je neophodna za pravilno odvijanje staničnog ciklusa, sparivanje i razdvajanje kromosoma tijekom diobe. Dokazano je da hipometilacija satelitnih regija utječe na stvaranje kromosomskih aberacija u tumorskim stanicama (Costa i sur., 2006.).

Transpozoni su pokretni genetički elementi koji se premještaju unutar genoma putem DNA ili RNA intermedijara čime omogućavaju horizontalni prijenos genetičke informacije. Nalaze se na svim kromosomima i to većinom u eukromatinskim područjima. Znatno manje su prisutni u heterokromatinskim regijama u kojima se nalazi satelitna DNA. Takva raspodjela objašnjava se njihovom potencijalnom ulogom u pravilnom odvijanju staničnog ciklusa. Danas znamo da više od 40% genoma čovjeka čine retrotranspozoni koji se premještaju reverznom transkripcijom RNA intermedijara (Lander i sur., 2001.).

Retrotranspozoni se dijele na elemente s dugim terminalnim ponavljanjima (LTR, od engl. *Long terminal repeats*), kratke raspršene elemente (SINE, od engl. *Short interspersed nuclear elements*) i duge raspršene elemente (LINE, od engl. *Long Interspersed Elements*). Najbrojnija porodica LINE elemenata, LINE-1, čini 17% do 25% ljudskog genoma (Lander i sur., 2001.).

Kodirajuća sekvenca LINE kod ljudi počinje s netranslatirajućom regijom (UTR, od engl. *Untranslated region*) koja uključuje promotor RNA polimeraze II, dva nepreklapajuća otvorena okvira čitanja, te završava s još jednim UTR-om. 5' kraj sadrži promotorsku sekvenca, dok 3' UTR sadrži poli-A rep i poliadenilacijski signal. S obzirom da se segment LINE pomiče mehanizmom kopiranja i ugradnje samoga sebe on povećava genom (Deininger i Batzer, 2002.). Njegova je ekspresija kao i kod ostalih pokretnih genetičkih elemenata regulirana epigenetičkim mehanizmima. Uglavnom se radi o metilaciji njihove sekvence

DNA pa su hipermetilirani i utišani osim za vrijeme globalne demetilacije tijekom embrionalnog razvoja (Morgan i sur., 2005.).

Hipometilacija elemenata LINE-1 u tumorskim stanicama povećava vjerojatnost lomova molekule DNA, čime se povećava genomska nestabilnost, reaktiviraju se retrotranspozoni i aktiviraju onkogeni kao npr. S100A4, koji je uključen i u proces metastaziranja karcinoma debelog crijeva (Kim i Deng, 2007.).

1.1.2.2.2. Molekularne promjene kod metastatskog karcinoma debelog crijeva

Završni stadiji progresije karcinoma debelog crijeva uključuju odvajanje od primarnog tumora, invaziju okolnog tkiva, migraciju, ulazak u krv ili limfu i razvoj sekundarnog tumora. Svaki korak u procesu metastaziranja uključuje specifične, dodatne, genetičke i epigenetičke promjene. Da bi došlo do metastaziranja pretpostavlja se da su nužni faktori rasta E2, EGF, VEGF i molekule uključene u epitelno-mezenhimsku tranziciju (Huang i Du, 2008.).

Kao što je ranije navedeno, dodatne promjene koje omogućavaju završne stadije progresije su najčešće promjene u signalnim putevima faktora rasta i promjene epitelno mezenhimske tranzicije (Markowitz i Bertagnolli, 2009.).

a) Putovi faktora rasta uključeni u razvoj metastatskog karcinoma debelog crijeva

Prostaglandin luče fibroblasti u stromi i epitelnim stanicama. On predstavlja signal koji se prenosi interakcijom s endoprostanooidnim receptorima. Aktivacija tih receptora potiče aktivaciju kaskade koja aktivira EGFR i P13K/Akt signalne putove, što rezultira premještanjem β -katenina u jezgru (Early i sur., 2008.). Aberantna signalizacija ima važnu ulogu u razvoju adenoma, zbog poremećene regulacije proliferacije, preživljenja, migracije i invazije (Pino i Chung, 2010.).

Epidermalni faktor rasta (EGF) veže se na specifični receptor (EGFR) čime se aktiviraju RAS-RAF-MAPK i PI3K signalne kaskade. Pogrešna aktivacija puta može biti posljedica mutacije receptora, konstitutivne aktivacije regulatora signalnog puta RAS, RAF i P13K, kao i poremećene metilacije promotora gena koji kodiraju te proteine. Ovaj signalni put aktivira transkripcijske faktore uključene u proliferaciju, angiogenezu i preživljenje

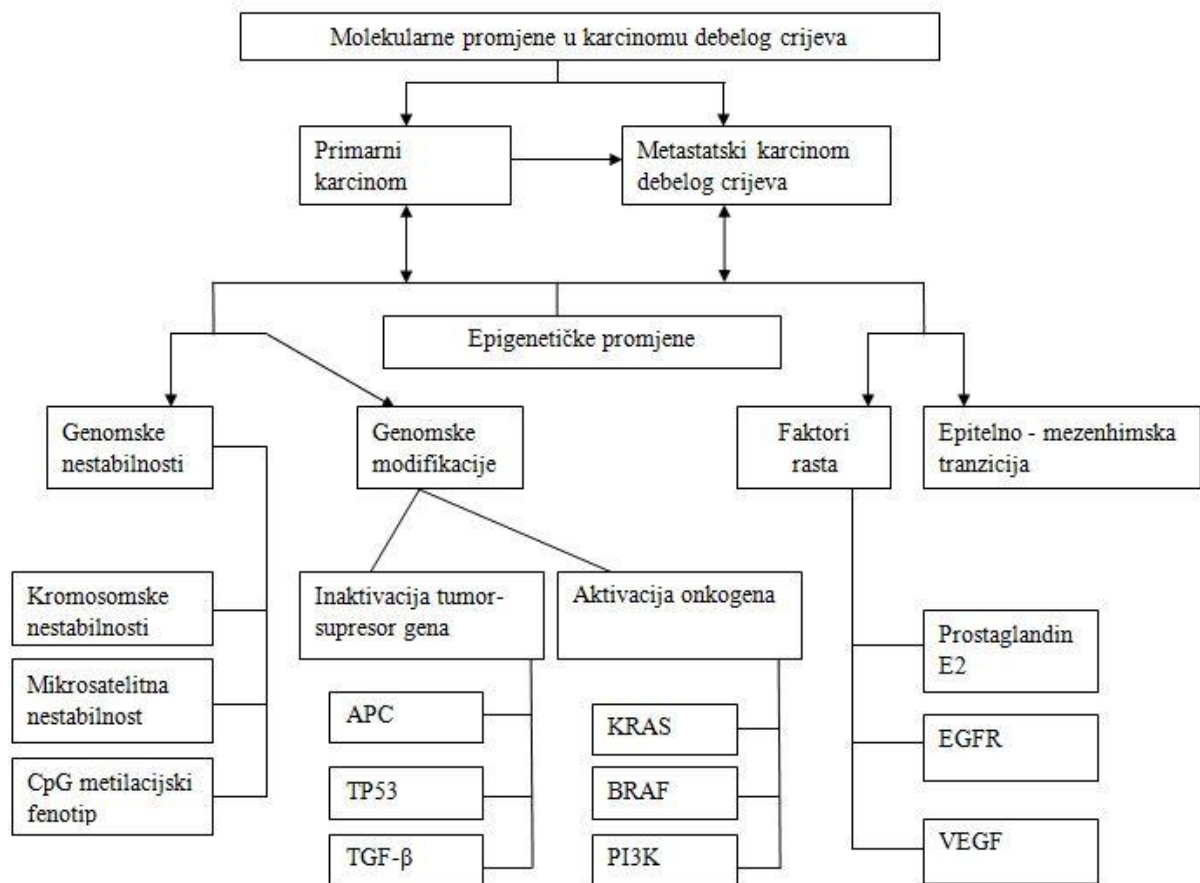
stanice (Barton i sur., 2010.). Do prekomjerne ekspresije EGFR dolazi u 65-70% karcinoma debelog crijeva koji imaju potencijal metastaziranja (Deschoolmeester i sur., 2010.).

Da bi došlo do metastaziranja potrebno je stvaranje novih krvnih žila koje tumoru omogućuju vezanje na krvožilni sustav domaćina i tako kretanje organizmom. U uvjetima hipoksije, u karcinomu debelog crijeva dolazi do pojačane sinteze angiogenih faktora, kao npr. vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) koji potiče rast endotelnih stanica, migraciju, diferencijaciju i vaskularnu permeabilnost (Krijger i sur., 2011.).

b) Promjene epitelno mezenhimske tranzicije u razvoju metastatskog karcinoma debelog crijeva

Epitelno mezenhimska tranzicija je mehanizam koji omogućuje stanicama karcinoma invaziju i metastaziranje. Pri tome dolazi do fenotipske promjene epitelnih stanica u dediferencirane mezenhimske stanice koje imaju smanjenu ekspresiju E- kadherina, proteina ključnog u stvaranju međustaničnih veza. Također dolazi do gubitka adhezije stanica za bazalnu membranu i pojačane mobilnosti stanica. Rezultat tih promjena je sposobnost stanica karcinoma da se šire lokalno, ulaze u krvotok i limfni sustav te metastaziraju (Kevans i sur., 2011.).

Karcinom debelog crijeva, kao jedan od najčešćih karcinoma u svijetu, predmet je velikih istraživačkih studija koje se najviše bave signalnim putovima i regulacijom ekspresije specifičnih proteina koji u njima sudjeluju. Još uvijek neistraženo područje predstavlja regulacija transkripcije gena uključenih u sintezu glikoproteina koje tumorske stanice izlučuju i kojima komuniciraju s okolnim tkivom.



Slika 1. Shematski prikaz molekularnih promjena u karcinomu debelog crijeva (prema Kanthan i sur., 2012.).

1.2. *MGAT3*

Gen *MGAT3* nalazi se na 22. kromosomu. Može dati informaciju za 3 transkripta: *MGAT3-001* duljine 5062 parova baza, *MGAT3-002* duljine 569 parova baza i *MGAT3-003* duljine 552 parova baza (<http://www.ensembl.org/>). Ovaj je gen nađen kod miševa, ljudi i štakora. Ima visoku razinu ekspresije u tkivu mozga i bubrega sisavaca (Priatel i sur., 1997.). Uključen je u regulaciju biosinteze i biološku funkciju oligosaharida. Produkt gena *MGAT3* je N-acetilglukozamin transferaza III (GnT-III) koja katalizira adiciju N-acetilglukozamina u beta 1-4 lancu na beta vezanu manozu trimanozilne jezgre N-vezanih šećernih lanaca. Jedan je od najvažnijih enzima uključenih u regulaciju biosinteze glikoproteinskih oligosaharida. Pripada obitelji glikoziltransferaza 17 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGAT3>). Prekomjerna ekspresija ove transferaze štiti stanice od apoptoze inducirane vodikovim peroksidom. (Shibukawa i sur., 2002).

2. HIPOTEZA I OPĆI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Obzirom da je produkt gena *MGAT3* značajan za procese N-glikozilacije, njegova aberantna ekspresija jedan je od ključnih pokretača tumorigeneze karcinomskih stanica.

2.2. Opći ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je istražiti regulaciju ekspresije gena *MGAT3* u karcinomskim stanicama i analizirati posljedice koje poremećaji njegove regulacije mogu imati na genotip i fenotip tumorskih stanica.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Inhibirati DNA metiltransferazu I u staničnim linijama karcinoma
2. Odrediti promjenu stupnja metilacije sekvence LINE-1 nakon tretmana inhibitorom
3. Odrediti promjenu stupnja metilacije promotora gena *MGAT3* nakon tretmana inhibitorom
4. Analizirati promjenu razine ekspresije gena *MGAT3* nakon tretmana inhibitorom
5. Odrediti promjene količine specifičnih glikanskih skupina na proteinima koje izlučuju stanice karcinoma nakon tretmana inhibitorom
6. Analizirati promjene kariotipa nakon tretmana staničnih linija inhibitorom

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Stanične linije karcinoma

U ovom radu korištene su stanične linije: HeLa, Caco-2 i COLO 205. Sve tri stanične linije predstavljaju tumorske stanice karcinoma.

Stanična linija HeLa najstarija je i najkorištenija stanična linija u biomedicinskim istraživanjima. Imortalna stanična linija dobivena je iz stanica karcinoma vrata maternice žene u dobi od 31 godine. HeLa stanice jako brzo proliferiraju, čak i u usporedbi s drugim tumorskim stanicama. Imaju aktivnu telomerazu tijekom stanične diobe koja sprječava skraćivanje telomera. Korištene su u istraživanjima procesa rasta, diferencijacije i smrti stanica, a služile su i kao početna točka razvoja modernih vakcina poput cjepiva za polio, temelj za razumijevanje virusnih infekcija i drugih infektivnih agensa te model za razvijanje novih medicinskih tehnika kao što je *in vitro* oplodnja (Hudson, 2013).

Stanična linija Caco-2 izolirana je iz primarnog tumora debelog crijeva muškarca u dobi od 72 godine. To su heterogene epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma. Ova stanična linija eksprimira termostabilan enterotoksin i epidermalni faktor rasta (Nollevaux i sur., 2006.).

Stanična linija COLO 205 izolirana je iz stanica adenokarcinoma debelog crijeva koje su metastazirale u ascites kod muškarca u dobi od 70 godina. U trenutku izolacije, COLO 205 stanice bile su kubične morfologije. Povećanjem broja pasaža COLO 205 stanica, osim kubičnih stanica koje su rasle u jednom sloju, pojavljuju se i okrugle stanice koje rastu u nakupinama u suspenziji (Semple i sur., 1978.).

3.1.2. Inhibitor DNA-metiltransferaze I

Inhibitor DNA-metiltransferaze I korišten u ovom istraživanju je 5-aza-2'-deoksicitidin. 5-aza-2'-deoksicitidin je analog deoksicitidina koji se ugrađuje u DNA i stvara ireverzibilne kovalentne veze s DNA-metiltransferazom na mjestima metilacije citozina. To dovodi do usporavanja sinteze DNA i moguće degradacije DNA-metiltransferaze. U odsutnosti DNA-metiltransferaze dolazi do hipometilacije promotora i reaktivacije ekspresije gena (Foulks i sur., 2012.).

5-aza-2'-deoksicitidin ima potencijalno dvostruki učinak na tretirane stanice. Pri visokim dozama, tretirane stanice odlaze u apoptozu zbog vezanja inhibitora na DNA i zaustavljene sinteze DNA. Pri niskim dozama, stanice preživljavaju, ali mijenja se ekspresija gena u korist pojačane diferencijacije, smanjenje proliferacije i/ili povišene apoptoze (Foulks i sur., 2012.).

5-aza-2'-deoksicitidin konvertira se nakon ulaska u stanicu u aktivni trifosfat 5-aza-dCTP koji se ugradi u DNA. Prisutnost dušika na 5' mjestu 5-aza-dCTP-a dovodi do nastanka ireverzibilnog kovalentnog kompleksa s DNA-metiltransferazom i posljedično do njene degradacije.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema stanica za tretman i tretman inhibitorom

Stanične linije korištene za ovo istraživanje uzeli smo iz banke stanica i odmrznuli prema sljedećem protokolu:

- otopili smo smrznutu kriotubicu sa stanicama na ledu (stanice ne smiju početi metabolizirati medij s DMSO)
- kada je otopina bila blizu potpunog odmrzavanja, prebacili smo je u Falcon tubicu od 15 mL ohlađenu na ledu

- nakon potpunog otapanja, dodali smo 10 mL DMEM-a (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) komplementiranog s 2mM glutaminom i antibioticima penicilinom i streptomycinom i 10%-tnim serumom iz fetusa goveda (FBS, od engl. *fetal bovine serum*), ohlađenog na ledu, kap po kap
- stanice smo centrifugirali na 300 g 5min na 4°C
- supernatant smo izbacili i stanice resuspendirali u 10 mL DMEM-a + 10% FBS.a (zagrijanog na sobnu temperaturu)
- stanice smo prebacili u veliki flask (750mL, T-175) te dodali još 20 mL DMEM-a + 10% FBS-a
- stanice smo uzgajali na 37°C, 5% CO₂

Sve tri stanične linije karcinoma uzgajane su u 3 biološke grupe: kontrola, tretman inhibitorom koncentracije 1 µM i tretman inhibitorom koncentracije 2,5 µM. Svaka biološka grupa sadržavala je 3 biološke replike.

Nakon određivanja konfluentnosti uzgojenih stanica, u pripremljene petrijeve zdjelice promjera 10 cm i T-boce (750 mL) nasadili smo 750 000 stanica, a u petrijeve zdjelice promjera 6 cm nasadili smo 300 000 stanica.

Stanice smo tretirali inhibitorom u dvije različite koncentracije, 1 µM i 2.5 µM, u mediju sa serumom (DMEM + 10% FBS). 24h nakon prvog tretmana, medij sa serumom promijenili smo u medij bez seruma (DMEM) s inhibitorom koncentracija 1 µM i 2.5 µM. Nakon sveukupno 36 h tretmana za stanice COLO 205 i HeLa, prekinuli smo tretman i sakupili stanice te ih pripremili za izolaciju DNA, RNA, proteina i izradu kariotipa. Tretman stanica Caco-2 prekinut je nakon 48 h.

Razlika u trajanju tretmana ovisila je o vremenu umnažanja pojedine vrste stanica. HeLa i COLO 205 umnažaju se svakih 24h, a Caco-2 svakih 32h. Tretman je trajao 1,5 puta vremena potrebnog da bi se istraživane stanice umnožile, budući da je riječ o asinkronim kulturama.

3.2.2. Fiksacija stanica na lamelama i imunofluorescencijsko bojenje

Stanice smo fiksirali na lamelama kako bismo ih pripravili za imunofluorescencijsko bojenje. Imunofluorescencijskim bojenjem određivali smo količinu 5-metilcitozina u stanicama HeLa, Caco-2 i COLO 205. Sve smo radili prema ovdje navedenom protokolu:

Fiksacija:

- prebaciti lamele iz petrijevih zdjelica u bazenčice na pločici s 0,4 mL 1X PBS-a i isprati ih dva puta
- inkubirati stanice u 400 μ L 3%-tnog paraformaldehida 5 minuta, na sobnoj temperaturi
- isprati lamele u PBS-u
- inkubirati lamele u ledeno hladnom metanolu 5 minuta
- isprati lamele 3 puta po 1 minutu u PBS-u
- lamele ostaviti u PBS-u na 4°C (ili odmah krenuti na permeabilizaciju stanica)

Permeabilizacija:

- isprati lamele u PBS-u
- inkubirati lamele u 0,5%-tnom Triton X-100 u PBS-u 5 minuta, na sobnoj temperaturi (Triton X-100 radi rupe u membrani kako bi antitijelo ušlo u stanicu)
- isprati lamele tri puta po 5 minuta u PBS-u

Denaturacija:

- inkubirati lamele u 4 N HCL-u 10 minuta, na sobnoj temperaturi
- isprati lamele 5 puta po 1 minutu u PBS-u

Blokiranje:

- inkubirati lamele u 4%-tnom BSA otopljenom u PBST-u (PBS + 0,5% Triton X-100) 30 minuta, na sobnoj temperaturi
- isprati lamele 2 puta po 5 minuta u PBS-u

Vežanje primarnog antitijela:

- na predmetna stakalca nakapati po 28 μ L razrijeđenog (1/200) primarnog antitijela (Ab10805; Abcam, USA) specifičnog za 5-metilcitudin i u njih uroniti lamele tako da su stanice u otopini antitijela, obrnuto od onoga kako stoje u bazenčićima
- prije uranjanja lamele prisloniti uz papir da se ocijedi ostatak PBS-a
- inkubirati lamele u vlažnoj komori 1 h na 37°C
- u bazenčiće staviti 0,4 mL PBS-a i uroniti lamele tako da su stanice prema gore, te isprati 5 puta po 3 minute

Vežanje sekundarnog antitijela:

- na predmetna stakalca nakapati po 28 μ L razrijeđenog (1/100) sekundarnog antitijela obilježenog fluorokromom (Ab6785; Abcam, USA) koje se veže za primarno antitijelo i u njih uroniti lamele tako da su stanice u otopini antitijela, ponovno obrnuto od onoga kako stoje u bazenčićima
- inkubirati lamele 45 minuta na 37°C u mraku
- u bazenčiće staviti 0,4 mL PBS-a i uroniti lamele, isprati 5 puta po 3 minute (raditi u mraku)

Uklapanje (u mraku):

- uklopiti uzorke u 10 μ L medija za uklapanje koji sadržava DAPI (Vectashield)
- nakon toga, uzorci su spremni za interpretaciju pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX51 s filterom za FITC) i obradu dobivenih slika imunofluorescencijskog bojenja u programu ImageJ

3.2.3. Izolacija DNA, bisulfitna konverzija, pirosekvenciranje

3.2.3.1. Izolacija DNA

Nakon zaustavljanja tretmana stanice se odvajaju od podloge tripsinom, tripsin se inaktivira dodavanjem medija sa serumom (DMEM + 10% FBS) i stanice se tada sakupe u Falcon epruvete. Izolaciju DNA smo dalje radili po protokolu za izolaciju DNA iz stanica komercijalnog kita *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany).

3.2.3.2. Bisulfitna konverzija

S 500 ng izolirane DNA započeli smo tretman bisulfitne konverzije, koja se temelji na kemijskoj reakciji u kojoj se koristi natrijev bisulfit koji selektivno deaminira citozin u uracil, a metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. Bisulfitnu konverziju radili smo pomoću komercijalno dostupnog kita *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, California).

3.2.3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Nakon kemijske obrade, napravili smo PCR amplifikaciju specifičnih fragmenata konvertirane DNA (LINE1, *MGAT3*) pomoću seta kemikalija i priloženom protokolu proizvođača PyroMark PCR Kit-a (QIAGEN). Početnice dizajnirane za reakcije umnožavanja specifičnih fragmenata navedene su u Tablici 1. Umnožene fragmente provjerili smo gel-elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu koji smo inkubirali u otopini etidijeva bromida da bismo mogli vizualizirati umnožene fragmente.

3.2.3.4. Pirosekvenciranje

Razlike u količini metiliranog i nemetiliranog citozina u fragmentima DNA detektiraju se pirosekvenciranjem, koje smo radili pomoću seta kemikalija *PyroMarkTMQ24* (QIAGEN, Uppsala, Švedska), prema sljedećem protokolu:

- uključiti grijaču ploču na 80°C i uređaj PyroMark Q24 i na nju postaviti držač pločice za pirosekvenciranje
- na bazenčiće radne stanice postaviti plastične kadice i napuniti ih odgovarajućim otopinama
- alikvotirati potreban volumen dH₂O, 70%-tnog etanola, pufera za denaturaciju, pufera za ispiranje, pufera za vezanje i pufera za prijanjanje
- provjeriti imamo li sve potrebne otopine i opremu: pločica za pirosekvenciranje, 24-well PCR pločica (PyroMarkTM Q24 Plate) ili strip tubice, kuglice sefaroze obložene streptavidinom (High Performance, 34 μM, GE Healthcare), početnice za sekvenciranje, 70%-tni etanol, pufer za vezanje, 1x pufer za denaturaciju, 1x pufer za ispiranje, mili-Q H₂O, pufer za prijanjanje, PyroMarkTM Q24 Gold Reagents (enzim, supstrat dNTP), folija za pločicu ili strip kapice
- otopiti enzim i supstrat u 620 μL mili-Q H₂O
- isprati nastavke uranjanjem u bazenčić sa 70 mL mili-Q H₂O
- isključiti vakuumsku sklopku i postaviti „Iggy“ u P poziciju
- ponovo napuniti bazenčić sa 70 mL vode visoke čistoće
- promućkati bočicu s kuglicama sefaroze dok otopina na postane homogena
- pripremiti 40 μL smjese kuglica sefaroze i pufera za vezanje po uzorku
- raspodijeliti smjesu kuglica sefaroze, pufera za vezanje i vode u jažice pločice
- dodati određeni volumen PCR produkta
- poklopiti PCR pločicu folijom za pločicu i postaviti je na stalak za tresilicu
- protresati PCR pločicu konstantno na tresilici, 14000 rpm, 5-10 minuta

- pripremiti smjesu početnica i pufera za prijanjanje u tubici od 2 mL
- raspodijeliti pripremljenu smjesu početnica i pufera za prijanjanje po 40 μ L u jažice pločice za pirosekvenciranje
- odmah nakon imobilizacije postaviti PCR pločicu na radnu poziciju
- pažljivo spustiti nastavke na PCR pločicu kako bi se zahvatile kuglice s imobiliziranim kalupom
- držati nastavke filtra u pločici 15 sekundi
- provjeriti je li sva tekućina povučena iz pločice i da su se sve kuglice zarobile na nastavcima „Iggy-a”
- premjestiti „Iggy“ u bazenčić sa 70%-tnim etanolom i protresati 5 sekundi
- premjestiti „Iggy“ u bazenčić sa puferom za denaturaciju i protresati 5 sekundi
- premjestiti „Iggy“ u bazenčić s puferom za ispiranje i protresati 10 sekundi
- postaviti „Iggy“ u okomit položaj na 5 sekundi kako bi iscijedili tekućinu s nastavaka
- postaviti „Iggy“ iznad pločice s početnicama, ali ga ne uroniti
- zavrnuti vakuumsku sklopku dok „Iggy“ nije uronjen ni u jedan bazenčić
- uroniti nastavke „Iggy“-a u jažice pločice s početnicama na dvije do tri minute i otpustiti kuglice u pločicu s razrijeđenim početnicama za sekvenciranje (nježno protresati „Iggy“)
- provjeriti nalaze li se kuglice u pločici s početnicama, odnosno jesu li zaostale u pločici s uzorcima
- premjestiti „Iggy“ u bazenčić s vodom visoke čistoće i protresati 10 sekundi
- premjestiti „Iggy“ u drugi bazenčić s vodom i uključiti vakuum, isprati sa 70 mL vode
- postaviti „Iggy“ u okomit položaj na 5 sekundi kako bi se iscijedila suvišna tekućina
- zavrnuti sklopku vakuuma na „Iggy“ -u i postaviti ga u P položaj
- inkubirati pločicu sa uzorcima i početnicama na 80°C tijekom 2 minute na termobloku

- izvaditi pločicu iz držača i ohladiti uzorke na sobnu temperaturu tijekom minimalno 5 minuta
- nadopuniti potrebne volumene reagensa- dodati novo punjenje supstrata i enzima (na +4°C) i 610 µL vode (-20°C); supstrat se dodaje na kraju jer je fotoosjetljiv i čuva se u mraku
- postaviti nosač u pirosekvencer
- stavljanje (ohlađene) pločice s uzorcima u instrument
- ubacivanje USB-a sa specifičnim programom u PyroMark Q24 instrument i pokretanje postupka
- nakon završetka postupka, prije pločice vadi se nosač sa otopinama
- isprati bazenčiće vodom visoke čistoće

Početnice dizajnirane za reakcije pirosekvenciranja navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Početnice dizajnirane za reakcije umnožavanja specifičnih fragmenata i pirosekvenciranja DNA.

POČETNICE	SEKVENCA
MGAT3_F	GTTGTTGAGATTTAG
MGAT3_R	(Btn)CTAAACTCTACCCTCC
LINE1_F	(Btn)TAGGGAGTGTTAGATAGTGG
LINE1_R	AACTCCCTAACCCCTTAC
MGAT3_PYRO1	GGTGAGTTGATTT
LINE1_PYRO1	CAAATAAAACAATACCTC

3.2.4. Izolacija RNA, reverzna transkripcija, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

3.2.4.1. Izolacija RNA

Izolaciju RNA radili smo prema protokolu za izolaciju RNA komercijalno dostupnog seta kemikalija *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN).

3.2.4.2. Reverzna transkripcija

Budući da izolirane molekule RNA ne mogu poslužiti kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom, potrebno je napraviti reverznu transkripciju izolirane RNA kako bismo dobili komplementarnu DNA (cDNA).

Ovu reakciju napravili smo pomoću enzima reverzne transkriptaze koji na temelju molekule RNA kao kalupa stvara komplementarnu jednolančanu molekulu DNA. U prvom koraku reakcije koristili smo nasumične heksamere (RH, od engl. *Random Hexamere*, Applied Biosystems), oligonukleotidne sekvence koje se sastoje od 6 baza i prijanjaju nasumično. Za svaki uzorak postavljena je reakcija dodatkom dNTP-a (TaKaRa Bio Europe/SAS) radne koncentracije 0,5 mM i 1 µg RNA. Uzorci su zatim inkubirani na 65°C u vremenu od 5 minuta kako bi se denaturirale sekundarne strukture RNA koje bi smetale u reakciji. Uzorci su ohlađeni na ledu 5 minuta kako bi se omogućilo prijanjanje početnica nasumičnih heksamera na mRNA. Zatim smo dodali i preostale sastavnice reakcije prema Tablici 2. Reverzna transkripcija odvijala se inkubiranjem uzoraka na 42°C tijekom jednog sata, a zatim se reverzna transkriptaza inaktivirala na 70°C u vremenu od 15 minuta.

Tablica 2. Sastavnice reakcije reverzne transkripcije

Sastojak	Volumen (μl)
RT pufer (5x PrimeScript Buffer, TaKaRa)	4
dH2O	4,5
Inhibitor RNaza (Recombinant RNase Inhibitor, TaKaRa)	1
Reverzna transkriptaza (PrimeScript RTase, TaKaRa)	0,5

3.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Dobivenu cDNA moguće je umnožiti u lančanoj reakciji polimerazom koja se provodi na jednak način kao i kada je kalup genomska DNA. Umnožavanjem fragmenata gena *HPRT1* dugog 108 pb utvrđuje se uspješnost reverzne transkripcije i kvaliteta izolirane RNA. Početnice za gen *HPRT1* dizajnirane za lančanu reakciju polimerazom navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Početnice za umnažanje gena *HPRT1* dizajnirane za lančanu reakciju polimerazom.

HPRT1_F	5'- GTT GTA GGA TAT GCC CTT GAC TAT-3'
HPRT1_R	5'-TGA ACT CTC ATC TTA GGC TTT GT-3'

3.2.4.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR)

Ekspresiju gena *MGAT3* određivali smo koristeći hibridizirajuću probu TaqMan® (PN 4316831, Applied Biosystems) na aparatu Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR, koristeći reakcijsku smjesu i uvjete reakcije od istog proizvođača, prema protokolu za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu, *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, California, USA). Koncentracija cDNA s kojom smo pokrenuli reakciju iznosila je 50 ng.

3.2.5. Ukoncentriravanje proteina za detekciju šećernih skupina

Nakon prekida tretmana inhibitorom prenijeli smo pipetom približno 10 mL medija u kojem se nalaze izlučeni proteini u Falcon epruvetu. Centrifugirali smo 10 minuta na 1200 g, na 4°C. Prenijeli smo supernatant u novu Falcon epruvetu i centrifugirali 10 minuta na 2400 g pri 4°C. U sljedećem koraku supernatant smo prenijeli u Amicon Ultra 10K ultrafiltration kolonu za koncentriranje proteina (Milipore) koju smo centrifugirali 30 minuta na 4000 g pri 20°C. Centrifugiranjem većina supernatanta prođe kroz kolonu, a u koloni ostane oko 150 µL koncentrata proteina. Ispirali smo oba filtera 10 puta, lagano i oprezno ispuštajući oko 100 µL koncentrata po samom filteru kolone kako bi se i zaostali proteini sakupili. Koncentrat smo prenijeli u Eppendorf epruvete od 1,5 mL i pohranili na -20°C.

Analiza glikanskih skupina napravljena je u suradničkoj ustanovi (Genos d.o.o.) tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC, od engl. Ultra performance liquid Chromatography).

Princip rada UPLC-a je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac (cijev punjenu materijalom sačinjenim od sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac. Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira (dođe do kraja stupca) naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, što poboljšava rezoluciju kromatograma. Koriste se uobičajena otapala.

3.2.6. Kariotipizacija

Sve tri stanične linije kariotipizirane su nakon završetka tretmana u Citogenetskom laboratoriju Kliničke bolnice „Sveti Duh”. Korišten je standardni protokol za prekid rasta stanica, izradu metafaznih ploča i G-pruganje.

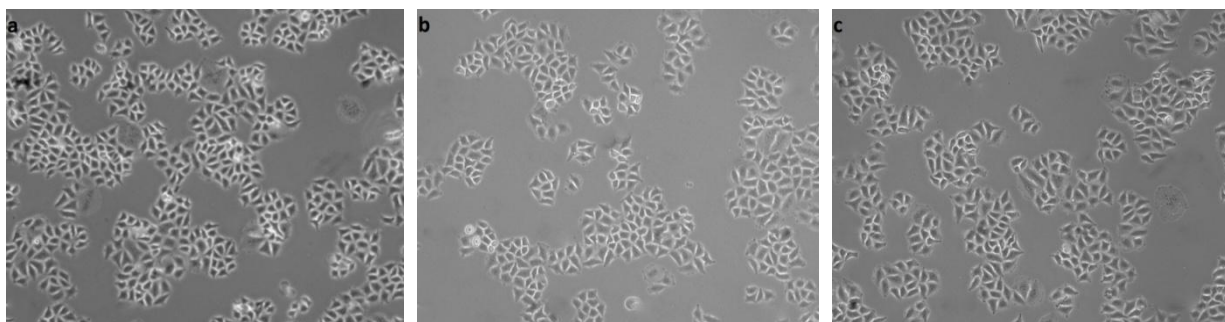
3.2.7. Statistička obrada podataka

Za usporedbe dobivenih rezultata svih mjerenja između kontrolne skupine i stanica tretiranih inhibitorom korišteni su Mann Whitney U test ili nezavisni t-test. Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj razini značajnosti. Za statističku analizu podataka korišten je informatički program STATISTICA® (verzija 8.0, *StatSoft, Inc.*, Tulsa, USA).

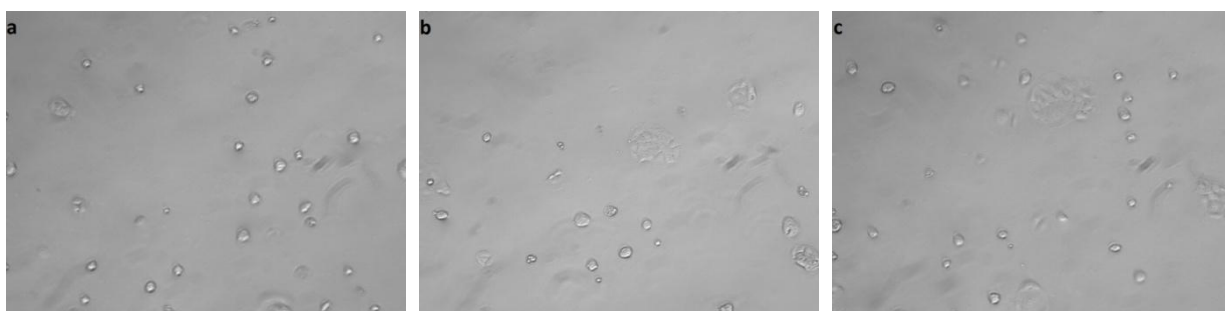
4. REZULTATI

4.1. Morfologija stanica nakon tretmana

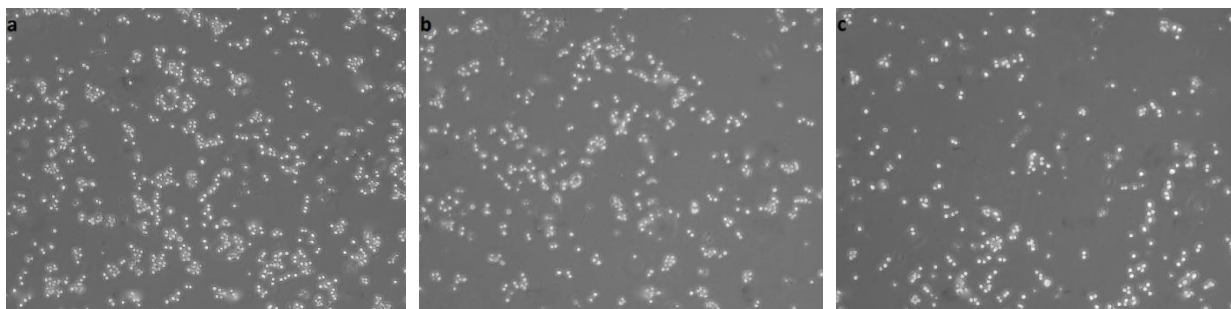
Nakon završetka tretmana sve su stanične linije prvo analizirane morfološki. Mikroskopiranjem je potvrđeno da su stanice svih staničnih linija tretirane s obje koncentracije inhibitora preživjele tretman i da među kontrolnim i testnim skupinama nema razlika u njihovoj morfologiji (Slike 2., 3. i 4.).



Slika 2. Stanice HeLa : a) kontrolna skupina, b) stanice tretirane 1 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom, c) stanice tretirane 2.5 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom.



Slika 3. Stanice Caco-2 : a) kontrolna skupina, b) stanice tretirane 1 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom, c) stanice tretirane 2.5 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom.



Slika 4. Stanice COLO 205 : a) kontrolna skupina, b) stanice tretirane 1 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom, c) stanice tretirane 2.5 μM 5-aza-2'-deoksicitidinom.

4.2. Provjera uspješnosti tretmana imunofluorescencijskim bojenjem i određivanjem stupnja metilacije sekvence LINE1

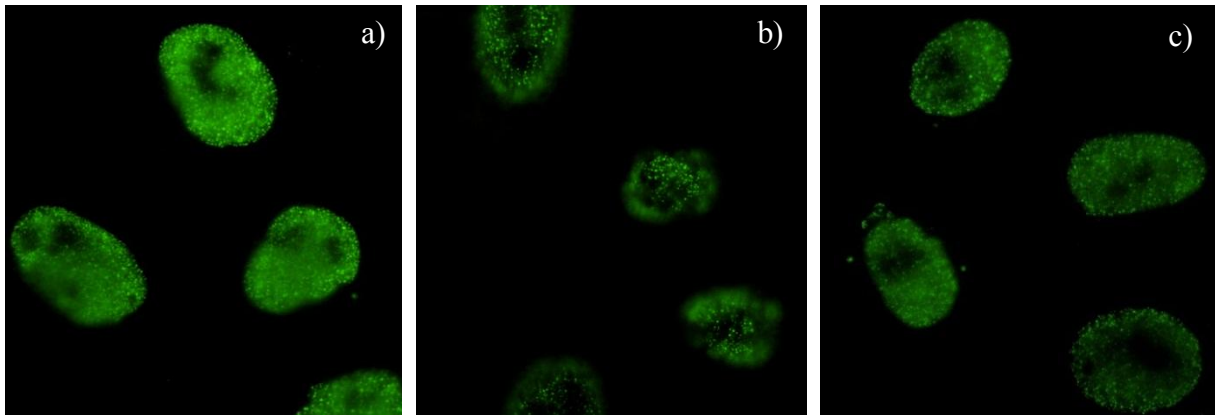
Kako bi provjerili uspješnost tretmana inhibitorom DNA metiltransferaze I, 5-aza-2'-deoksicitidinom, napravili smo imunofluorescencijsko bojenje koristeći antitijelo za 5-metilcitozin i odredili globalnu metilaciju sekvence LINE-1.

4.2.1. Imunofluorescencijsko bojenje

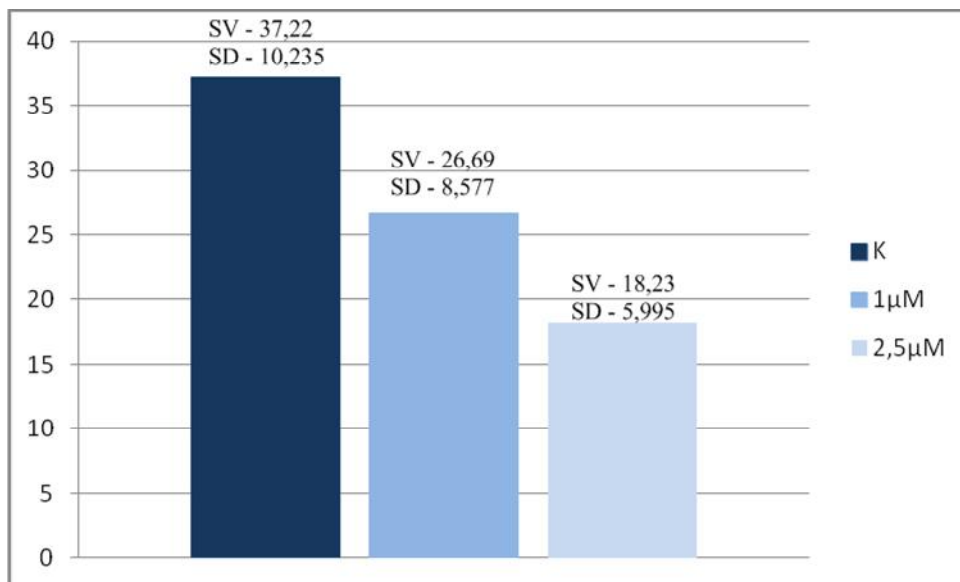
Imunofluorescencijskim bojenjem antitijelom anti-5-metilcitozin, odredili smo intenzitet fluoresciranja pojedinih jezgara u kontrolnoj skupini stanica i populacijama stanica nakon tretmana s dvije koncentracije inhibitora.

Stanična linija HeLa

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost intenziteta fluorescence, koji je proporcionalan količini 5-metilcitozina, u kontrolnim stanicama 37,22, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 26,69, a u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 18,23 (Slike 5. i 6.).



Slika 5. Imunofluorescencijsko bojenje antitijelom za 5-metilcitozin jezgara stanica HeLa: a) kontrolne skupine, b) stanica tretiranih inhibitorom koncentracije 1 μ M i c) stanica tretiranih inhibitorom koncentracije 2,5 μ M.

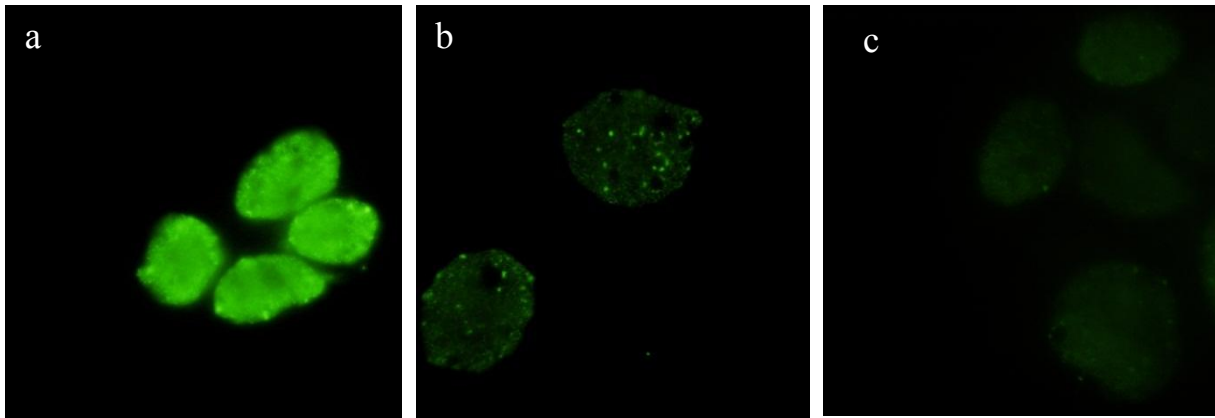


Slika 6. Usporedba intenziteta fluoresciranja 5-metilcitozina u kontrolnoj skupini i skupinama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora kod stanične linije HeLa.

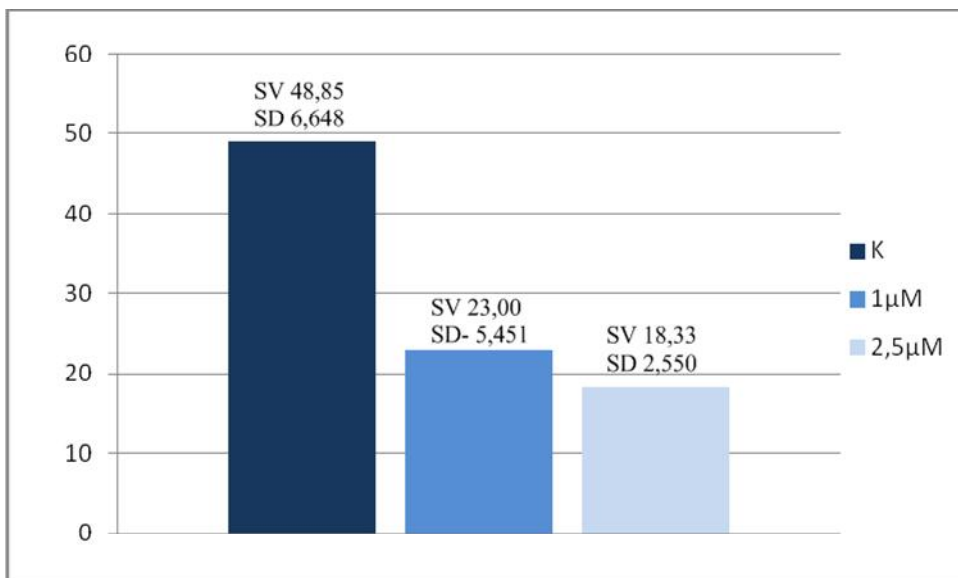
Statistička obrada podataka pokazala je značajan pad količine 5-metilcitozina kod stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,02$), kod stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,000$), kao i između dva tretmana različitim koncentracijama inhibitora ($p=0,03$).

Stanična linija Caco-2

Dobiveni rezultati pokazali su srednju vrijednost intenziteta fluorescence u kontrolnim stanicama 48,85, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 23,00, i u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 18,33 (Slike 7. i 8.).



Slika 7. Imunofluorescencijsko bojenje antitijelom za 5-metilcitozin jezgara stanica Caco-2 a) kontrolne skupine, b) tretmana inhibitorom 1 μM i c) tretmana inhibitorom koncentracije 2,5 μM.

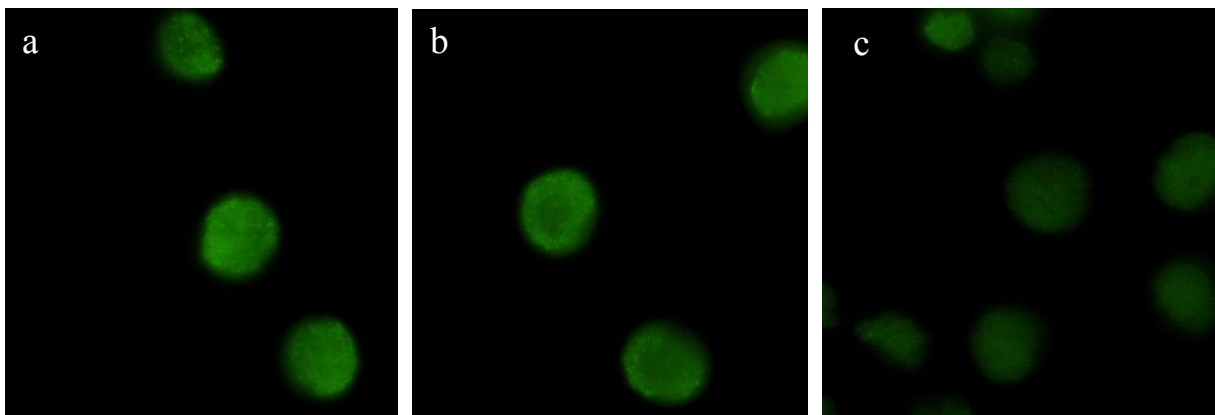


Slika 8. Usporedba intenziteta fluoresciranja 5-metilcitozina u kontrolnoj skupini i skupinama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora kod stanične linije Caco-2.

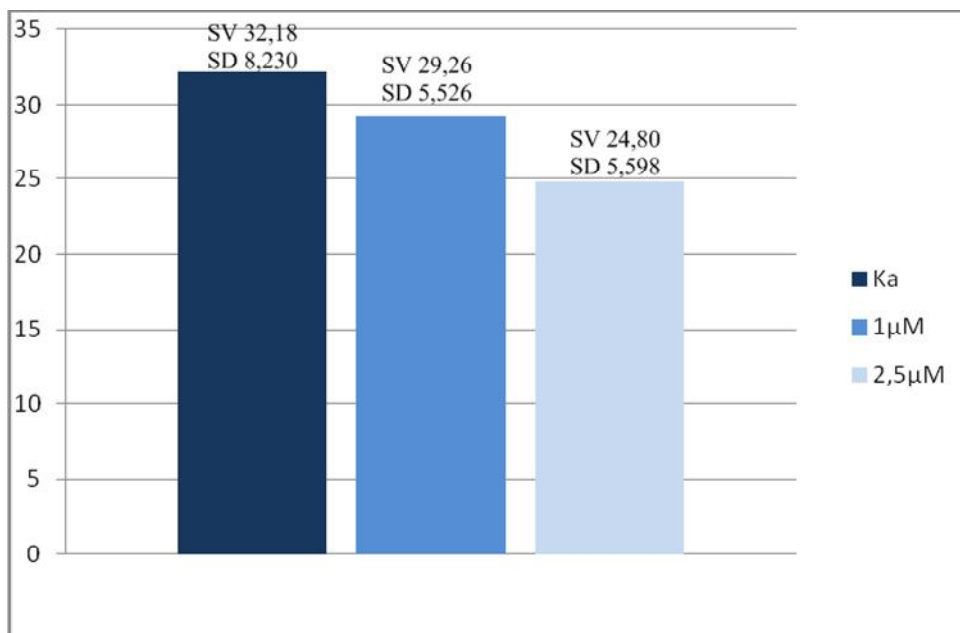
Statistički značajan pad količine 5-metilcitozina zamijećen je kod stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,000$), kao i kod stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,000$). Između tretmana s različitim koncentracijama inhibitora nema statistički značajne razlike ($p=0,082$).

Stanična linija COLO 205

Srednja vrijednost intenziteta fluorescence koji je proporcionalan količini 5-metilcitozina u kontrolnim stanicama iznosila je 32,18, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 29,26, a u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 24,80 (Slike 9. i 10.).



Slika 9. Imunofluorescencijsko bojenje antitijelom za 5-metilcitozin jezgara stanica COLO 205 a) kontrolna skupine, b) tretman inhibitorom 1 μ M i c) tretman inhibitorom 2,5 μ M.



Slika 10. Usporedba intenziteta fluoresciranja 5-metilcitozina u kontrolnoj skupini i skupinama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora kod stanične linije COLO 205.

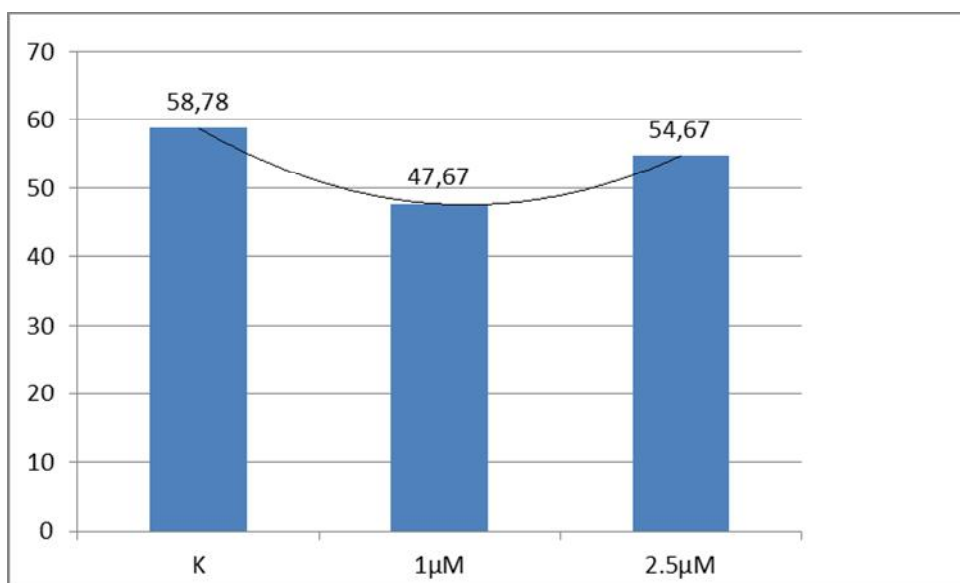
Statistička obrada podataka nije pokazala statistički značajan pad količine 5-metilcitozina kod stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,222$). Kod stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu postoji statistički značajan pad ($p=0,000$), kao i između tretmana s različitim koncentracijama inhibitora ($p=0,000$).

4.2.2. Metilacijski status sekvence LINE-1

Uspješnost tretmana inhibitorom 5-aza-2'-deoksicitidinom odredili smo i analiziranjem globalne metilacije pomoću sekvence LINE-1. Stupanj metilacije sekvence LINE-1 prikazan je kao srednja vrijednost svih šest analiziranih CpG mjesta.

Stanična linija HeLa

Metilacija sekvence LINE-1 u kontrolnim stanicama iznosila je 58,75%, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 47,67%, a u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 54,67% (Slika 11.).

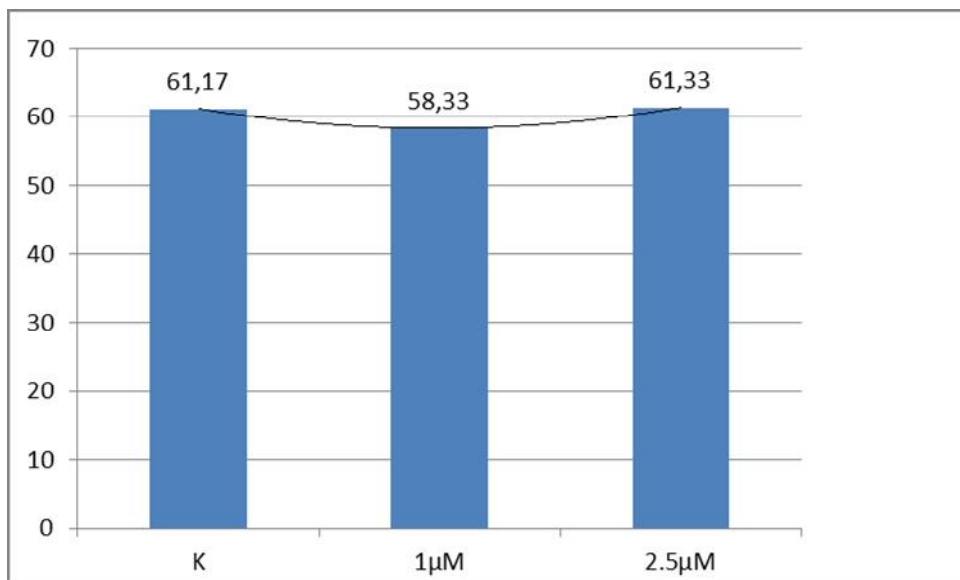


Slika 11. Stupanj metilacije sekvence LINE-1 u stanicama HeLa.

Statistička obrada podataka pokazala je da smanjenje globalne metilacije nakon tretmana s obje koncentracije inhibitora u odnosu na kontrolu nije značajno ($p > 0,05$). Razlika metilacije sekvence LINE-1 u stanicama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora statistički je bila značajna ($p = 0,046$).

Stanična linija Caco-2

Metilacija sekvence LINE-1 u kontrolnim stanicama iznosila je 61,17%, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 58,33%, a u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 61,33% (Slika 12.).

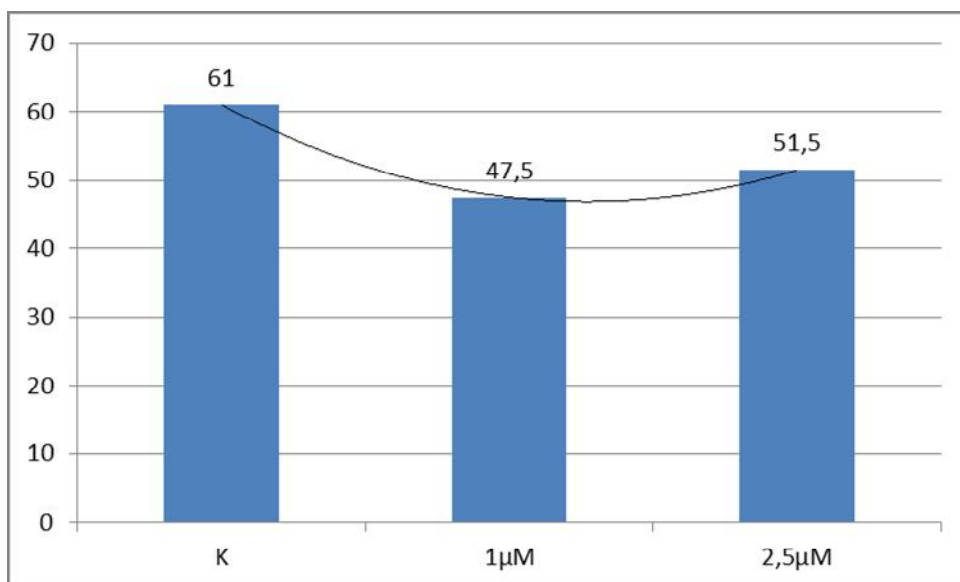


Slika 12. Stupanj metilacije sekvence LINE-1 u stanicama Caco-2.

Statistička obrada podataka pokazala je da smanjenje globalne metilacije nakon tretmana s obje koncentracije inhibitora u odnosu na kontrolu nije značajno ($p > 0,05$). Razlika metilacije sekvence LINE1 u stanicama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora statistički je bila značajna ($p = 0,05$).

Stanična linija COLO 205

Metilacija sekvence LINE-1 u kontrolnim stanicama iznosila je 61%, u stanicama nakon tretmana s nižom koncentracijom inhibitora 47,5%, a u stanicama nakon tretmana s višom koncentracijom inhibitora 53% (Slika 13.).



Slika 13. Stupanj metilacije sekvence LINE-1 u stanicama COLO 205.

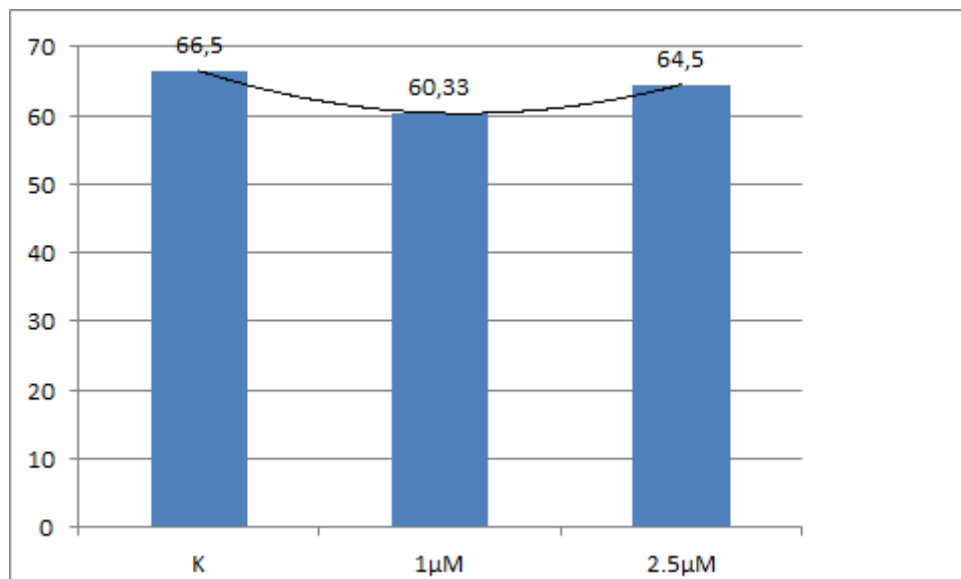
Statistička obrada podataka pokazala je značajno smanjenje globalne metilacije nakon tretmana s obje koncentracije inhibitora u odnosu na kontrolu ($p=0,037$). Razlika metilacije sekvence LINE-1 u stanicama tretiranim različitim koncentracijama inhibitora prema 5%-tnoj razini značajnosti bila je granična tj. $p=0,05$.

4.3. Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3*

Metilaciju promotora gena *MGAT3* odredili smo pirosekvenciranjem. Stupanj metilacije promotora *MGAT3* prikazan je kao srednja vrijednost svih pet analiziranih CpG mjesta.

Stanična linija Hela

Srednja vrijednost metilacije promotora gena *MGAT3* kontrolnih stanica iznosila je 66,50%, stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora 60,33%, a stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora 64,50% (Slika 14.).

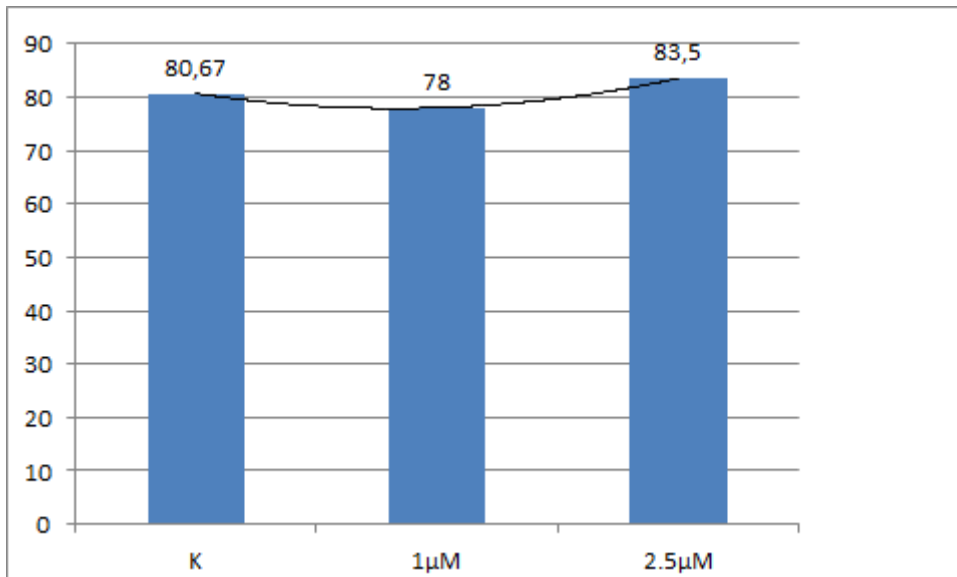


Slika 14. Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama HeLa.

Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama tretiranih s obje koncentracije inhibitora u odnosu na kontrolu i tih skupina međusobno nije pokazao statistički značajnu razliku ($p>0,05$).

Stanična linija Caco-2

Srednja vrijednost metilacije promotora gena *MGAT3* kontrolnih stanica iznosila je 80,67%, stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora 78%, a stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora 83,5% (Slika 15.).

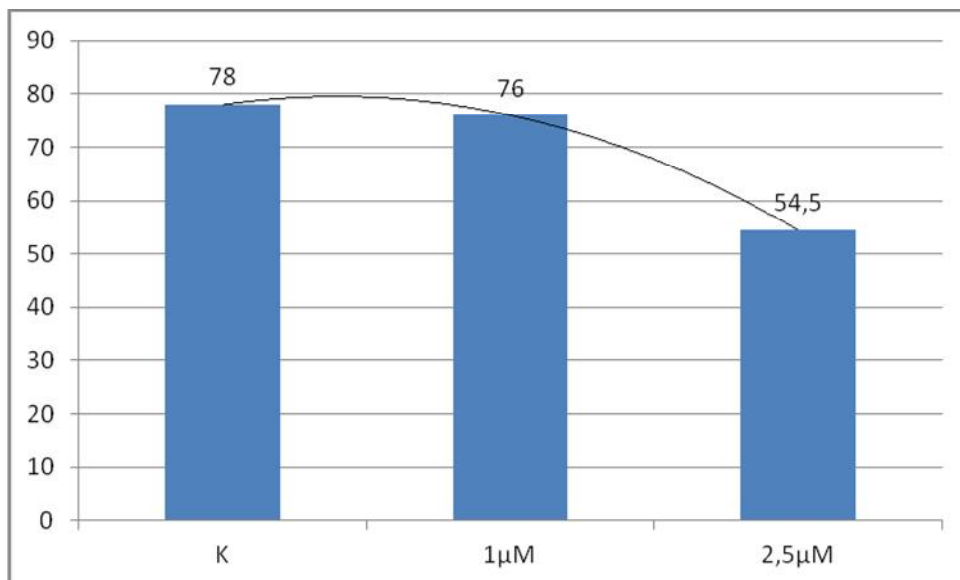


Slika 15. Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama Caco-2.

Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama tretiranih s obje koncentracije inhibitora u odnosu na kontrolu i tih skupina međusobno nije pokazao statistički značajnu razliku ($p > 0,05$).

Stanična linija COLO 205

Srednja vrijednost metilacije promotora gena *MGAT3* kontrolnih stanica iznosila je 78%, stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora 76%, a stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora 54,5% (Slika 16.).



Slika 16. Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama COLO 205.

Stupanj metilacije promotora gena *MGAT3* u stanicama tretiranih nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolu nije pokazao statistički značajnu razliku ($p > 0,05$), dok statistički značajna razlika postoji kod tretmana višom koncentracijom u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,046$). Razlika metilacije između dva tretmana bila je na granici 5%-tne značajnosti ($p = 0,05$).

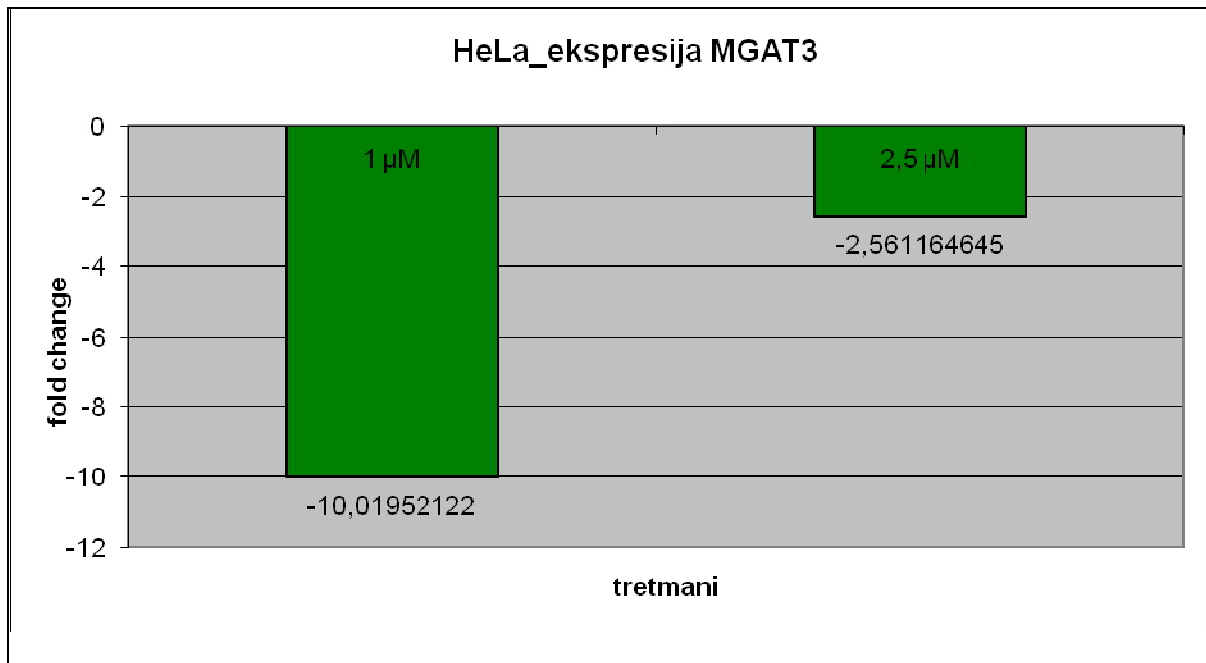
4.4. Ekspresija gena *MGAT3*

Ekspresiju gena *MGAT3* odredili smo lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu.

Stanična linija Hela

Rezultati su pokazali da tretiranjem stanica inhibitorom DNA-metiltransferaze I dolazi do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* (Slika 17.).

Ekspresija gena *MGAT3* u stanicama tretiranim nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolnu skupinu stanica smanjena je 9,16-11,69 puta ($p = 0,000$). Između stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora i kontrolne skupine stanica ekspresija gena *MGAT3* smanjena je 1,7-2,6 puta ($p = 0,044$). Između dva tretmana inhibitorom ekspresija je promijenjena 3,99-6,12 puta ($p = 0,023$).

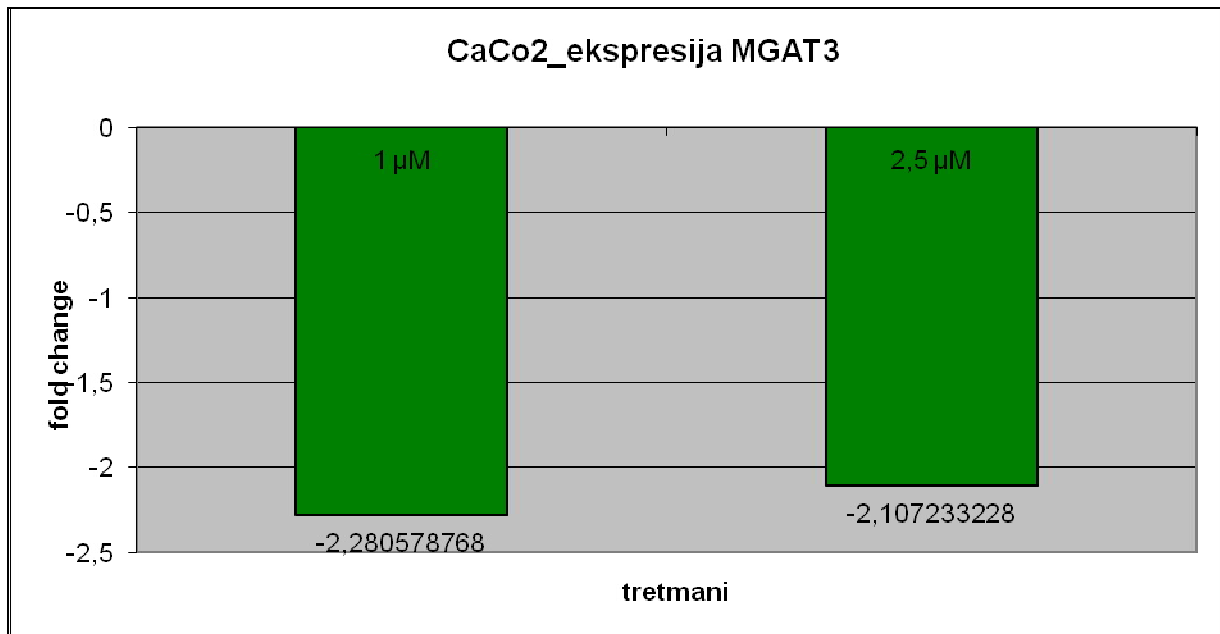


Slika 17. Ekspresija gena *MGAT3* u stanicama HeLa. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 1µM ekspresija je u prosjeku 10 puta manja u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 2,5 µM ekspresija je u prosjeku 2,56 puta manja u odnosu na kontrolu.

Stanična linija Caco-2

Rezultati su pokazali da tretiranjem stanica inhibitorom dolazi do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* (Slika 18.).

Statistički je značajno smanjenje ekspresije gena *MGAT3* 1,53-2,26 puta u stanicama tretiranih nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolu ($p=0,049$), no nema značajne razlike u ekspresiji toga gena između stanica tretiranih višom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolu ($p=0,500$) kao ni između ekspresije u obje grupe stanica tretiranih različitim koncentracijama inhibitora ($p=0,922$).

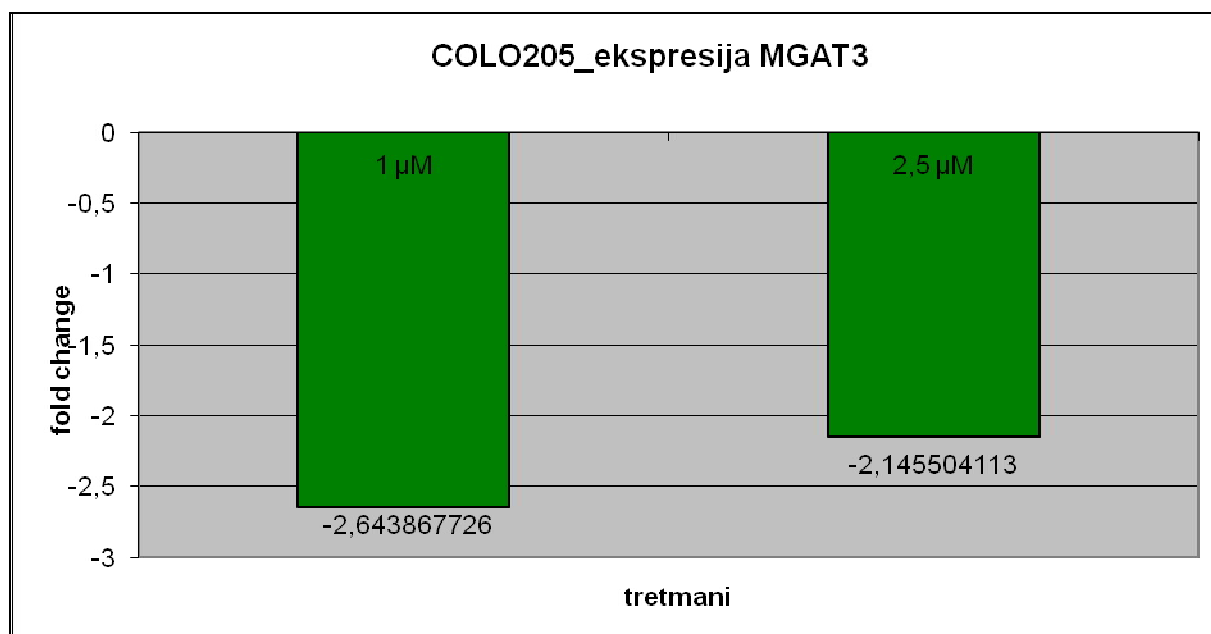


Slika 18. Ekspresija gena *MGAT3* u stanicama Caco-2. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 1µM ekspresija je u prosjeku 2,28 puta manja u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 2,5 µM ekspresija je u prosjeku 2,10 puta manja u odnosu na kontrolu.

Stanična linija COLO 205

Rezultati su pokazali da tretiranjem stanica inhibitorom dolazi do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* (Slika 19.).

Ekspresije toga gena između stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora i kontrolne skupine manja je 2,41-2,9 puta ($p=0,003$). Između skupine tretirane višom koncentracijom inhibitora i kontrolne skupine stanica, kao ni između obje skupine stanica tretiranih različitim koncentracijama inhibitora nije bilo statistički značajnog pada ekspresije gena *MGAT3* ($p=0,084$ i $p=0,331$).



Slika 19. Ekspresija gena *MGAT3* u stanicama COLO205. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 1 µM ekspresija je u prosjeku 2,64 puta manja u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana inhibitorom koncentracije 2,5 µM ekspresija je u prosjeku 2,15 puta manja u odnosu na kontrolu.

4.4. Analiza glikanskih skupina na izlučenim proteinima istraživanih stanica

Kompozicija glikoma izlučenih proteina izražena je kao postotak pojedinih glikanskih skupina koje su izlučene kao zasebni kromatografski pikovi tj. skupine specifičnog retencijskog vremena. Kod Hela stanica zabilježeno je 28 glikanskih skupina, a kod Caco-2 i COLO 205 stanica detektirano je 29 glikanskih skupina. Glikanske skupine (GP, od engl. *glycan peak*) kraćeg retencijskog vremena predstavljaju jednostavnije strukture (GP1-16). Skupine duljeg retencijskog vremena predstavljaju razgranate glikanske skupine, većinom tri- i tetra-antenare (GP17-28 kod stanične linije HeLa, GP17-29 kod staničnih linija Caco-2 i COLO 205). Srednje vrijednosti količine svih glikanskih skupina sve tri populacije stanica, sve tri stanične linije prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Srednje vrijednosti količina svih glikanskih skupina za a) staničnu liniju HeLa i b) stanične linije Caco-2 i COLO 205.

a)	HeLa				b)	Caco-2				COLO 205				
	GP*	K	1 μ M	2,5 μ M		GP	K	1 μ M	2,5 μ M	K	1 μ M	2,5 μ M		
	1	2,03	2,82	3,43		1	3,58	2,81	4,45		1	3,59	2,22	1,84
	2	0,6	1,17	2,4		2	0,65	0,48	0,74		2	1,15	0,47	0,33
	3	1,31	1,68	1,8		3	7,11	5,77	9,55		3	8,97	5,76	5,88
	4	5,13	6,93	7,69		4	2,89	2,16	4,18		4	3,62	2,01	1,97
	5	1,34	1,97	2,26		5	3,59	3,49	4,46		5	4,56	3,21	4,21
	6	5,75	6,16	6,14		6	0,16	0,13	0,46		6	0,41	0,26	0,24
	7	0,65	0,89	1,62		7	3,57	2,97	5,34		7	4,81	2,8	2,93
	8	8,28	9,67	10,42		8	1,18	1,1	1,98		8	1,69	1,07	1,32
	9	0,2	0,26	0,04		9	1,78	1,45	2,86		9	3,81	2,21	2,43
	10	4,59	4,45	4,25		10	4,64	5,51	5,78		10	5,37	5,19	6,85
	11	5,35	477	4,13		11	1,5	1,08	2,33		11	2,04	1,35	1,43
	12	122	1,26	1,25		12	4,07	4,24	5,23		12	4,69	4,36	5,17
	13	7,57	8349	9,25		13	1,95	1,7	2,18		13	1,87	1,61	1,6
	14	3,55	3,08	2,5		14	1,19	0,9	1,62		14	1,35	1,05	0,84
	15	4,52	455	4,43		15	0,47	0,37	0,48		15	0,38	0,29	0,27
	16	4,46	3,89	2,58		16	4,42	4,73	4,2		16	3,76	4,36	4,55
	17	3,88	3,6	2,96		17	5,4	5,38	4,66		17	5,19	5,28	4,9
	18	1,17	1,28	1,2		18	0,95	0,8	0,9		18	0,86	0,81	0,6
	19	12,75	10,81	8,27		19	18,2	21,81	14,63		19	16,24	20,88	22,02
	20	1,84	2,07	2,49		20	0,91	0,76	0,64		20	0,63	0,81	0,53
	21	9,57	8,19	6,73		21	11,53	14,12	9,12		21	9,39	13,72	13,82
	22	3,72	3,23	3,27		22	2,48	1,92	1,77		22	2,13	2,04	1,92
	23	2,78	2,3	2,34		23	5,4	5,31	4,12		23	4,04	5,98	4,82
	24	2,19	1,83	1,69		24	3,56	3,47	2,44		24	2,67	3,69	3,08
	25	0,99	0,9	1,14		25	3,87	3,79	2,79		25	2,83	4,21	3,25
	26	2,48	1,93	2,52		26	1,39	0,92	0,66		26	1,16	1,19	0,82
	27	0,39	0,32	0,33		27	1,38	1,05	0,82		27	0,93	1,23	0,92
	28	1,56	1,38	2,41		28	1,17	0,94	0,82		28	1,01	1,11	0,81
						29	0,9	0,71	0,66		29	0,73	0,71	0,56

*Glikanske skupine označene istim brojem kod stanične linije HeLa i staničnih linija Caco-2 i COLO205 ne predstavljaju iste strukture.

Stanična linija HeLa

Od 28 (GP1-GP28) skupina glikana koje su detektirane na izlučenim proteinima HeLa stanica statistički značajnu promjenu nakon tretmana pokazalo je više skupina. Nakon

tretmana nižom koncentracijom inhibitora zamijećen je porast u količini skupine GP2 u odnosu na količinu te skupine u kontrolnoj populaciji stanica. Nakon tretmana višom koncentracijom inhibitora došlo je do porasta količine skupina GP1, GP2, GP5, GP7, te do smanjenja količine glikanskih skupina GP9 i GP16, GP19. Statistički značajne razlike između tretmana dviju količina inhibitora pokazale su porast skupina GP2 i GP7 te pad količine skupine GP16 pri tretmanu višom koncentracijom.

Stanična linija Caco-2

Od 29 (GP1-GP29) skupina glikana koje su detektirane na izlučenim proteinima Caco-2 stanica statistički značajnu promjenu nakon tretmana pokazalo je više skupina. Nakon tretmana nižom koncentracijom inhibitora zamijećen je porast količine skupina GP10, GP19 i GP21 te pad količine skupine GP11, u odnosu na količinu tih skupina u kontrolnoj populaciji stanica. Nakon tretmana višom koncentracijom inhibitora došlo je do porasta količine skupina GP6-10 i pada količine skupina GP22, GP24, GP26-28. Statistički značajne razlike između tretmana dviju količina inhibitora pokazale su porast skupina GP1, GP3, GP4, GP6-GP9, GP11 te pad količine skupina GP19, GP21 i GP24 pri tretmanu višom koncentracijom.

Stanična linija COLO 205

Od 29 (GP1-GP29) skupina glikana koje su detektirane na izlučenim proteinima COLO 205 stanica statistički značajnu promjenu nakon tretmana pokazalo je više skupina. Nakon tretmana nižom koncentracijom inhibitora zamijećen je pad količine skupina GP1, GP3-5, GP7, GP8, GP11 te porast količina skupina GP19, GP21, GP23-GP25 u odnosu na količinu te skupine u kontrolnoj populaciji stanica. Nakon tretmana višom koncentracijom inhibitora došlo je do pada količine skupina GP1-4, GP7, i porasta količine skupina GP10, GP16 GP19 i GP21 u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. Statistički značajne razlike između tretmana dviju količina inhibitora pokazala je porast skupine GP10 i pad količine skupine GP26 pri tretmanu višom koncentracijom.

4.5. Kariotipizacija

Kariotipizacijom je pokazano da obje koncentracije inhibitora u svim istraživanim staničnim linijama uzrokuju pojavu novih strukturalnih i numeričkih promjena. Promjene nisu konzistentne unutar jedne stanične linije i/ili nakon tretmana jednom od korištenih koncentracija inhibitora.

Jedina uočena pravilnost bio je smanjen broj metafaznih ploča dobivenih u uzorcima tretiranim inhibitorom u odnosu na broj metafaznih ploča dobivenih u kontrolnoj skupini. Tretman s obje koncentracije inhibitora smanjuje količinu metafaznih ploča po uzorku 4-5 puta.

5. RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj metilacije DNA na ekspresiju gena *MGAT3* u stanicama karcinoma i utvrditi razlikuje li se regulacija transkripcije toga gena u tumorima porijekla iste vrste stanica.

Rezultati imunofluorescencijskog bojenja pokazali su da je tretmanom inhibitorom 5-aza-2'-deoksicitidinom staničnih linija koje smo istraživali došlo do smanjenja metilacije DNA tj. da je nakon tretmana u stanicama prisutna niža količina 5-metilcitozina. Prema očekivanju, tretman višom koncentracijom inhibitora rezultirao je većim smanjenjem količine 5-metilcitozina u stanicama u odnosu na tretman nižom koncentracijom inhibitora i kontrolnu skupinu (Foulks i sur., 2012.).

Dodatno smo provjerili stupanj globalne metilacije DNA koristeći ponavljajuću sekvencu LINE-1. Rezultati su u sve tri stanične linije pokazali iste promjene, no one su ukazivale na drugačije posljedice od rezultata dobivenih imunofluorescencijskim bojenjem. Kod tretmana s većom koncentracijom inhibitora, pirosekvenciranjem šest CpG mjesta sekvence LINE-1, dobiven je veći postotak metilacije u odnosu na tretman s nižom koncentracijom inhibitora, dok je u odnosu na kontrolnu skupinu postotak metilacije tretmana s većom koncentracijom bio manji.

S obzirom na dva načina provjere rezultata tretmana koji su pokazali različite ishode, obje smo metode ponovili i rezultati su bili jednaki onima nakon prvog testiranja. Budući da je imunofluorescencijsko bojenje subjektivnija metoda koja se, između ostaloga, temelji na odabiru jezgara čije se imunofluorescencijsko bojenje mjeri, a i samo fluoresciranje ovisi o vremenu korištenja preparata tijekom mikroskopiranja, odabiru filtera i jačini UV svjetla, tu metodu smatramo manje preciznom (Waters, 2009.).

Rezultati smanjenja metilacije nakon tretmana dobivenih dvama različitim koncentracijama inhibitora dobiveni pirosekvenciranjem sekvence LINE-1 ne pokazuju ujednačeno statistički značajno smanjenje u svim staničnim linijama, no zamjetan je istovjetan trend u promjeni razine metilacije. Korištenjem manje količine inhibitora u svim staničnim linijama dolazi do smanjenja metilacije u odnosu na kontrolnu skupinu. Korištenjem veće koncentracije inhibitora dolazi do smanjenja metilacije u odnosu na kontrolnu skupinu, no suprotno očekivanom, to je smanjenje manje nego kod smanjenja izazvanog manjom koncentracijom inhibitora. Ovakvi rezultati upućuju na potrebu za pažljivim i preciznim

određivanjem doze inhibitora, pogotvo inhibitora ove vrste koji se pod nazivom decitabin koristi u terapijske svrhe (Issa i sur., 2004.).

Jedno je od objašnjenja navedene pojave je i sam način djelovanja odabranog inhibitora. Kako je prije pokazano u istraživanjima na staničnim linijama akutne mijeloidne leukemije, hipometilacija DNA primijećena je tretiranjem s nižim koncentracijama dok pri tretmanu višim koncentracijama 5-aza-2-deoksicitidina ona nije opažena (Foulks i sur., 2012.). Slični rezultati dobiveni i u ovom istraživanju upućuju na to da odabrani inhibitor pri nižim koncentracijama dovodi do smanjenje aktivnosti DNA-metiltransferaze I dok je moguće da pri višim koncentracijama inhibitora stanice zastaju u staničnom ciklusu pa zbog nemogućnosti popravaka metilacijskog mehanizma opstaju samo one koje se adaptiraju, npr. one u kojima DNA metiltransferaze 3a i b preuzmu ulogu DNA metiltransferaze I (Christman, 2002.), (Xu i sur., 2010.).

S obzirom na razliku u značajnosti promjene metilacije sekvence LINE-1, može se zaključiti i da je koncentracija inhibitora DNA metiltransferaze I kojom se postiže specifičan učinak ovisna o vrsti stanica koje se tretira, a ne samo vremenu koje je pojedinim stanicama potrebno za udvostručavanje.

Kod staničnih linija HeLa i Caco-2, rezultati određivanja metilacije promotora gena *MGAT3* pirosekvenciranjem uglavnom ne pokazuju značajnu razliku između tretmana višom i nižom koncentracijom inhibitora, kao niti razliku u metilaciji nakon tretmana u odnosu na kontrolu. S obzirom na mogućnost pogreške metode pirosekvenciranja koja se procjenjuje na 5% i rezultate čije je odstupanje blizu pogreške same metode ne možemo sa sigurnošću odrediti da li je stupanj metilacije ostao nepromijenjen ili se radi o promjenama koje nije moguće utvrditi ovom metodom (Mikeska i sur., 2011.).

U sve tri stanične linije zabilježen je statistički značajan pad ekspresije gena *MGAT3*, kod stanica tretiranih nižom koncentracijom inhibitora. Statistički značajan pad ekspresije toga gena u stanicama tretiranih višom koncentracijom inhibitora, zamijećen je samo kod stanične linije HeLa. Ovakvi rezultati ukazuju da je ekspresija gena *MGAT3* značajnija za patogenezu karcinoma vrata maternice, nego za patogenezu karcinoma debelog crijeva.

Kod analize promjene ekspresije *MGAT3* vidljiv je sličan trend u sve tri stanične linije kao i kod analize promjene metilacije sekvence LINE-1. Razlike u mjerenjima u stanicama tretiranim nižom koncentracijom inhibitora u odnosu na kontrolu značajnije su i više

odstupaju od kontrolne skupine. Rezultati dobiveni mjerenjem u populacijama svih staničnih linija nakon tretmana višom koncentracijom u odnosu na kontrolnu skupinu pokazuju manju razliku nego onih dobivenih nakon tretmana nižom koncentracijom inhibitora. Ovakav trend potvrđuje efekt doze i ukazuje na mogućnost da većom koncentracijom inhibitora stanice brže prolaze stanje odluke tijekom zastoja u staničnom ciklusu, lakše dolazi do apoptoze većine stanica i opstanka onih koje se prilagođavaju tj. sličnije su kontrolnoj skupini.

Usporedbom rezultata promjene metilacije promotora i promjene ekspresije gena *MGAT3* vidimo da regulacija transkripcije nije direktno određena metilacijom samog promotora, no globalno gledano smanjenje ukupne metilacije dovodi do smanjenja ekspresije toga enzima. Iz toga možemo zaključiti da je ekspresija gena *MGAT3* posredno regulirana metilacijom tj. da je ekspresija proteina koji određuju količinu njegove ekspresije (npr. transkripcijskih faktora koji reguliraju njegovu ekspresiju) vjerojatno regulirana metilacijom njihovih promotora.

Promjene u količini skupina glikana na izlučenim proteinima svih istraživanih stanica nakon oba tretmana ukazuju na to da je barem dio enzima odgovornih za njihovu produkciju transkripcijski reguliran metilacijom – smanjenjem metilacije dolazi do značajnog porasta i/ili pada količine pojedinih glikanskih skupina kako je i prije opisano (Horvat i sur., 2013.). Zanimljivo je da smanjenjem metilacije kod karcinoma vrata maternice i primarnog karcinoma debelog crijeva dolazi do porasta jednostavnijih glikanskih skupina i pada količine razgranatih glikanskih skupina, dok kod metastatskih stanica karcinoma debelog crijeva smanjenje metilacije ima suprotan učinak: pad količine jednostavnijih struktura i porast količine razgranatih glikanskih skupina. Iz toga je vidljivo da su za razvoj primarnih tumora i njihovu potencijalnu progresiju potrebni potpuno različiti mehanizmi kojima tumorske stanice komuniciraju sa stanicama svoga mikrookoliša.

Način reakcije stanice na inhibitor metilacije kojim je tretirana najbolje je vidljiv iz rezultata kariotipizacije. Dolazi do zamjetnog smanjenja u broju metafaza koje se mogu formirati, a kariotipovi tretiranih stanica pokazuju dodatne aberacije. Ovakvi rezultati sugeriraju i potvrđuju efekt opažen ostalim mjerenjima: citotoksično djelovanje inhibitora i preživljenje samo onih stanica koje uspiju opstati tj. onih koje nose potencijalne promjene koje im to omogućuju.

Ukupno gledano, rezultati pokazuju da, iako su istog staničnog porijekla, različiti tipovi karcinoma imaju različito regulirane iste gene. Sve karcinomske stanice slično reagiraju

na inhibiciju DNA metiltransferaze I –zaustavljaju se u nekoj fazi staničnog ciklusa, a preživljavaju i dijele se samo one koje razviju neke dodatne prednosti što je moguće vidjeti u promjenama njihovih kariotipova, kao i profilu glikana na izlučenim proteinima. Kod svih istraživanih karcinoma određen broj gena potreban za prilagodbu i opstanak, a koji su uključeni u produkciju glikanskih skupina, reguliran je metilacijom. Metilacija samog *MGAT3* u svim staničnim linijama ovog istraživanja nije direktan regulator njegove ekspresije. Pretpostavljamo da je gen *MGAT3* posredno reguliran mehanizmom metilacije, a njegova je ekspresija važna za opstanak stanica kod kojih dolazi do inhibicije DNA metiltransferaze I.

Ukupno, rezultati pokazuju da tumorske stanice istog porijekla ne koriste iste mehanizme za razvoj i širenje već da su mehanizmi određeni i lokalizacijom samog tumora i stupnjem njegove progresije. Dodatno, ovo istraživanje ukazuje na potrebu detaljnih analiza inhibitora metilacije DNA koji se koriste u terapijske svrhe budući da stanice koje ipak prežive tretman nose dodatne promjene koje im omogućavaju daljnju progresiju.

6. ZAKLJUČCI

1. Inhibitor 5-aza-2'deoksicitidin inhibira DNA metiltransferazu I u staničnim linijama karcinoma.
2. Metilacija sekvence LINE1 određena pirosekvenciranjem pouzdaniji je pokazatelj globalne metilacije od procjene količine 5-metilcitozina imunofluorescencijskim bojenjem.
3. Promjena stupnja metilacije gena *MGAT3* nakon tretmana inhibitorom DNA metiltransferazom I nije značajna.
4. Inhibiranjem DNA metiltransferaze I dolazi do pada ekspresije gena *MGAT3* u svim istraživanim staničnim linijama karcinoma.
5. Smanjenje globalne metilacije dovodi do promjene količina pojedinih glikanskih skupina na proteinima koje luče stanicama karcinoma.
6. Poticanjem hipometilacije staničnih linija karcinoma dolazi do citotoksičnosti i nastanka dodatnih kromosomskih aberacija.

7. ZAHVALA

Najiskrenije zahvaljujemo doc. dr. sc. Petri Korać i Mariji Klasić, mag. biol. mol. na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i pruženom znanju, te na susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom izrade ovoga rada.

Zahvaljujemo i za podršku i stečeno iskustvo koje ćemo ponijeti u daljnji rad.

Posebno hvala na strpljenju, brizi i prijateljskom pristupu te na svim lijepim trenucima.

Hvala suradničkim ustanovama, Genosu d.o.o. i Citogenetskom laboratoriju Kliničke bolnice „Sveti Duh” na susretljivosti i pomoći oko provedbe specifičnih dijelova istraživanja.

8.LITERATURA

Ashktorab H, Schäffer AA, Daremipouran M *et al.*, (2010). Distinct genetic alterations in colorectal cancer, PLoS ONE, vol.5, (1)

Barton S, Starling N, Swanton C, (2010). Predictive molecular markers of response to epidermal growth factor receptor (EGFR) family-targeted therapies. *Current Cancer Drug Targets*.10(8),799-812

Boland C, Goel A, (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* , 138 (6),2073-e3.

Christman JK, (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'deoxyctidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 21 (35): 5483-5495

Costa FF, Paixao VA, Cavalher FP *et al.* SATR-1 (2006). Hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*.165,135-43.

Deininger PL, Batzer MA (2002). Mammalian retroelements. *Genome Res*. 12,1455–65.

Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, *et al.* (2010). A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* ,15 (7), 699-731.

Dueñas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, *et al.* (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*, 4, 38

Early DS, Fontana L, Davidson NO, (2008). Translational approaches to addressing complex genetic pathways in colorectal cancer. *Translational Research*, 151 (1), 10-16

Fearon E, (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology*. 6, 479-507.

Fearon E, Vogelstein B, (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis.*Cell*.61 (5),756-767.

Foulks JM, Parnell KM, Nix RN, *et al.* (2012). Epigenetic Drug Discovery: Targeting DNA Methyltransferases. *Journal of Biomolecular Screening*,17 (1), 2-17

Geiersbach K, Samowitz W, (2011). Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125, 1269-1277.

- Goel A, Nagasaka T, i Arnold C, (2007). The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* ,132 (1), 127-138.
- Grady W, Carethers J, (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* ,135 (4), 1079-1099.
- Grubišić G, Klarić P. Jokanović LJ, *et al.* (2009). Diagnostic approach for precancerous and early invasive cancerous lesions of the uterine cervix. *Collegium antropologicum*, 33, 1431-1436
- Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, *et al.* (2008). The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics*, 9, 43-50.
- Horvat T, Deželjin M., Redžic I, *et al.* (2013). Reversibility of Membrane *N*-Glycome of HeLa Cells upon Treatment with Epigenetic Inhibitors. *PLoS ONE*, 8
- Huang D, Du X, (2008). Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World Journal od Gastroenterology*, 14 (12), 1823-1827
- Hudson KL, Collins FS, (2013) Family Matters. *Nature*. 500, 141-142
- Issa JPJ, Garcia-Manero G, Giles FJ, *et al.* (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2 deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies 103: 1635-1640
- Kanthan R., Senger J, Chandra Kanthan S, (2012). Molecular Evants in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International*
- Kevans D, Wang LM, Sheahan K, *et al.* (2011). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *International Journal of Surgical Pathology*, 20 (10), 1-10
- Kim J, Shin S, Kwon H, *et al.* (2009). Prognostic implications of CpG island hypermethylator phenotype in colorectal cancers. *Virchows Archiv* 455, 485-494.

- Kim Y, Deng G, (2007). Epigenetic changes (aberrant DNA methylation) in colorectal neoplasia. *Gut and Liver* ,1 (1), 1-11.
- Krijger I, Mekenkamp LJM, Punt CJA, *et al.* (2011). MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. *Journal of Pathology*. 224 (4), 438-447
- Lander ES, Linton LM., Birren B *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409, 860-921
- Lièvre A, Blons H., Laurent-Puig P, (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*, 29, (21), 3033-3043
- Markowitz S, Bertagnolli M, (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journals of Medicine* ,361 (25), 2404-2460.
- Mikeska T, Felsberg J, Hewitt C, *et al.* (2011). Analysing DNA Methylation Using Bisulphite Pyrosequencing Methods in *Molecular Biology* , 791, 33-53
- Morgan HD, Santos F, Green K. *et al.* (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*.14, 47 - 58
- Nollevaux G, Deville C, El Moualij B, *et al.* (2006). Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21), *BMC, Cell Biol.*, 2, 7-20.
- Ogino S, Chan A, Fuchs C, *et al.* (2010). Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* ,60 (3), 397-411.
- Pino M, Chung D, (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* ,138 (6), 2059-2072.
- Pogribny IP, Beland FA, (2009). DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci* ,66, 2249–61.
- Priatel JJ, Sarkar M., Schahter, *et al.* (1997). Isolation, characterization and inactivation of the mouse *Mgat3* gene: the bisecting N-acetylglucosamine in asparagine-linked oligosaccharides appears dispensable for viability and reproduction. *Glycobiology*, 7; 45 - 56
- Presečki, *et al.* (2002). *Virologija, Medicinska naklada*

Semple TU, Quinn LA, Woods LK, *et al.* (1978). Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.*, 38 (5), 1345-1355

Sengupta N, Gill K, MacFie T, (2008). Management of colorectal cancer: a role for genetics in prevention and treatment? *Pathology Research and Practice* ,204 (7), 469-477.

Shibukawa Y, Takahashi M, Laffont I, *et al.* (2003). Down regulation of Hydrogen Peroxide - PKCd activation in N-acetylglucosaminyltransferase III- transfected HeLaS Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 3197-3203.

Slaby O, Svoboda M, Michalek J, *et al.* (2009). MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8, 102

Waters JC, (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*,185, 1135 - 1148.

Weinberg RA (2007). *The Biology Of Cancer*, Garland Science, Taylor Francis Group, LLC

Wong JJJ, Hawkins NJ, Ward RL, (2007). Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*,56 (1), 140-148

Worthley D, Leggett B, (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews* ,31 (2), 31-39.

Wang Y, Yadong L, Ye X, *et al.* (2014). Prognostic and Predictive Value of CpG Island Methylator Phenotype in Patients with Locally Advanced Nonmetastatic Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*.

Xu F, Mao C, Ding Y, *et al.* (2010). Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem.*, 17 (33): 4052-4071

www.ensembl.org

www.genecards.org

9. SAŽETAK

Lea Langer, Anita Stojanović i Nikolina Špoljarić

REGULACIJA TRANSKRIPCIJE GENA *MGAT3* U MALIGNIM TUMORIMA PORIJEKLA EPITELNIH STANICA

Karcinomi su maligne neoplazme porijekla epitelnih stanica koje čine 80 do 90 posto svih tumora. Prema ukupnom broju dijagnoza u jednoj godini, karcinom vrata maternice predstavlja drugi najčešći tip karcinoma u žena u svijetu dok je karcinom debelog crijeva glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u svijetu. U ovom radu istraživana je regulacija gena *MGAT3* u tri vrste karcinomskih stanica: staničnim linijama karcinoma vrata maternice (HeLa), primarnog karcinoma debelog crijeva (Caco-2) i metastatskog karcinoma debelog crijeva (COLO 205). Korišten je inhibitor DNA-metiltransferaze I, 5-aza-2'-deoksicitidin u dvije različite koncentracije. Analizirane su posljedice smanjenja metilacije DNA na genotip i fenotip tumorskih stanica. Nakon tretmana inhibitorom dobiven je veći stupanj metilacije sekvence LINE1 kod tretmana s većom koncentracijom inhibitora u odnosu na tretman s nižom koncentracijom inhibitora. Promjena stupnja metilacije gena *MGAT3* nakon tretmana inhibitorom istraživanih stanica nije bila značajna. Zabilježen je pad ekspresije gena *MGAT3* u sve tri stanične linije, kao i promjena količine pojedinih glikanskih skupina proteina koje izlučuju stanice karcinoma nakon tretmana s inhibitorom. Metilacija promotora gena *MGAT3* u istraživanim vrstama karcinoma nije presudna za njegovu ekspresiju. Dodatno, nakon tretmana staničnih linija inhibitorom pokazano je zamjetno smanjenje broja stanica kao i nastanak dodatnih aberacija njihovih kariotipova.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da maligni tumori porijekla iste vrste stanica reguliraju ekspresiju istih gena na drugačiji način i da su im za opstanak i progresiju potrebne drugačije glikanske strukture na izlučenim proteinima. Osim toga, ovo istraživanje pokazuje potrebu detaljnih analiza inhibitora metilacije DNA koji se koriste u terapijske svrhe budući da stanice koje prežive nose dodatne promjene koje im omogućavaju opstanak i daljnju progresiju.

Ključne riječi: gen *MGAT3*, maligni tumori, inhibitor DNA metiltransferaze I

10.SUMMARY

Lea Langer, Anita Stojanović i Nikolina Špoljarić

REGULATION OF *MGAT3* GENE EXPRESSION IN MALIGNANT TUMORS DERIVED FROM EPITHELIAL CELLS

Carcinoma refers to a malignant neoplasm derived from epithelial cells. They account for 80 to 90 percent of all cancers. According to the total number of diagnoses per year, cervical cancer is the second most common type of cancer in women worldwide while colorectal cancer is the main cause of mortality and morbidity in the world. In this study, we investigated the regulation of *MGAT3* gene in three types of carcinoma cell lines: cervical cancer cell line (HeLa), primary colorectal carcinoma cell line (Caco-2) and metastatic colorectal carcinoma cell line (COLO205). We used DNA methyltransferase I inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine, in two different concentrations. We have analyzed effects of decreased DNA methylation on the genotype and phenotype of carcinoma cells. After the treatment with inhibitor, we saw a higher degree of LINE1 sequence methylation in the cells treated with higher concentration of inhibitor compared to the cells treated with the lower concentration of inhibitor. Changes in levels of *MGAT3* gene promoter methylation after treatment with the inhibitor were not significant. Decreased *MGAT3* gene expression in all analyzed cell lines was observed, as well as changes in the amount of specific glycan groups on proteins that carcinoma cells secrete following treatment with the inhibitor. Methylation of *MGAT3* gene in all cell lines of this study was not essential for its expression. Additionally, after the treatment with the inhibitor, a significant decrease in cell number was shown and additional karyotype aberrations were detected.

Results of this study showed that malignant tumors with the same cell type origin regulate the expression of the same genes differently, and that those tumors require different glycan structures on secreted proteins for survival and progression. Moreover, this study shows the importance of understanding precise mechanisms of DNA methylation inhibitors that are used for therapeutic protocols since the cells that survive carry additional changes that enable their further progression.

Keywords: *MGAT3* gene, malignant tumors, inhibitor DNA methyltransferase I