

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Mislav Acman, Vedran Vuković

**Razvoj testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i
EZH2 i njihova primjena u istraživanju podtipova difuznog
B-velikostaničnoga limfoma**

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Korać i Paule Dobrinić, mag. biol. mol. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Difuzni B-velikostanični limfom	1
1.2. Replikacija u tumorskim stanicama	4
1.3. Geni <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i>	10
1.4. Kontrola genske ekspresije na razini metilacije DNA	12
2. Hipoteza i ciljevi istraživanja	15
3. Materijal i metode	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Razvijanje testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i>	17
3.2.1.1. Odabir početnica	17
3.2.1.2. Bisulfitna konverzija i umnažanje specifičnih fragmenata konvertirane DNA	21
3.2.1.3. Optimizacija uvjeta lančane reakcije polimerazom	22
3.2.1.4. Optimizacija reakcija pirosekvenciranja	22
3.2.2. Izolacija i provjera kvalitete DNA iz uzoraka tkiva zahvaćenog DLBCL-om	23
3.2.3. Bisulfitna konverzija, lančana reakcija polimerazom i pirosekvenciranje regulatornih regija gena <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i> u uzorcima DLBCL-a	24

3.2.4. Statistička obrada podataka	24
4. Rezultati	25
4.1. Odabir početnica	25
4.2. Optimizacija testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i>	29
4.3. Izolacija i provjera kvalitete DNA iz uzorka DLBCL-a	32
4.4. Bisulfitna konverzija i lančana reakcija polimerazom za odabrane fragmenete gena <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i>	33
4.5. Stupanj metilacije regulatornih regija gena <i>GMNN</i> i <i>EZH2</i> u DLBCL-u .	34
4.6. Statistička obrada podataka	39
5. Rasprava	40
6. Zaključci	45
7. Prilog	46
8. Zahvale	48
9. Literatura	49
10. Sažetak	54
11. Summary	55
12. Životopisi	56

1. Uvod

1.1. Difuzni B-velikostanični limfom

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, od eng. *diffuse large B-cell lymphoma*) javlja se u oko 37% slučajeva ne-Hodginskog limfoma i predstavlja najčešći limfom zapadnoga svijeta. U najvećem broju javlja se između šezdesete i sedamdesete godine života, ali se različiti tipovi mogu javiti i kod djece ili adolescenata. Karakteriziraju ga velike B limfoidne stanice s jezgrom dva puta većom od jezgre zdravih B-limfocita, često većom i od jezgre makrofaga te promjene strukture perifernog limfnog tkiva koje nastaju uslijed proliferacije tumorskih stanica. (1)

DLBCL pripada grupi neoplazmi zrelih B-stanica. Većina DLBCL-a pripada podskupini koja se ne može detaljnije odrediti (DLBCL NOS, od eng. DLBCL *not otherwise specified*) jer nemaju karakteristične markere pomoću kojih bi ih bilo moguće svrstati u neku od dobro definiranih skupina. Ostali slučajevi DLBCL-a, koji čine značajno manje podskupine, razvrstani su prema morfologiji, imunofenotipu, molekularnim biljezima, ekspresiji karakterističnih gena, drugim bolestima s kojima su povezani i sl. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od eng. *World Health Organization*) razlikujemo velik broj skupina DLBCL-a. (1)

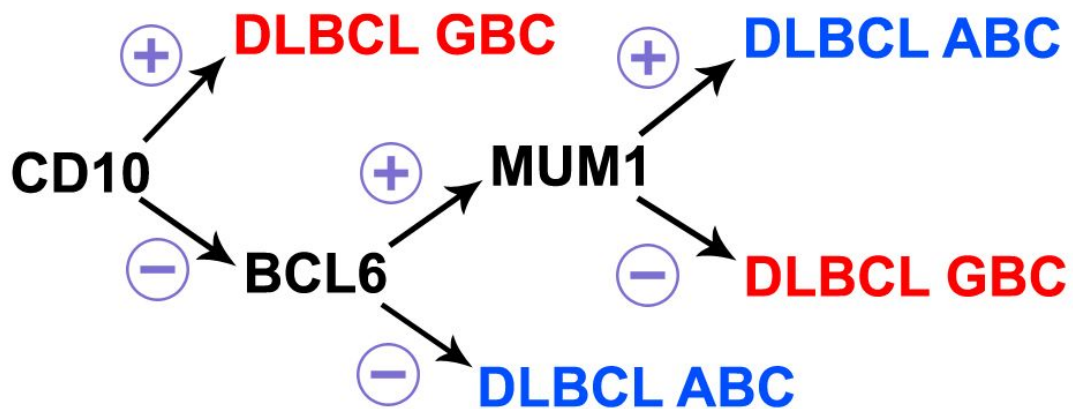
Iako je uzrok nastanka DLBCL-a još uvijek nepoznat, mogu se razlikovati slučajevi koji nastaju *de novo* (primarni) i slučajevi koji nastaju transformacijom ili

progresijom manje agresivnih limfoma i bolesti (sekundarni). Češći su slučajevi primarne pojave DLBCL-a, dok su sekundarni oblici primijećeni u rijetkim slučajevima kod bolesti kao što su: kronična limfocitna leukemija, limfoplazmocioidni limfom, folikularni limfom, limfom marginalne zone itd. (2)

Pacijenti koji boluju od DLBCL-a imaju visoko varijabilnu sliku tumorskoga tkiva što se tiče morfoloških pokazatelja, ali i veliku varijabilnost kod reakcija na razne metode liječenja, prvenstveno kemoterapiju. Kod DLBCL NOS-a, postoje tri morfološki različita morfološka podtipa: centroblastična, imunoblastična i anaplastična varijanta. (1) Primijećena su preklapanja osnovnih morfoloških inačica, ali i pojave drugih rijetkih morfoloških varijanti. (3) Budući da je morfološka podjela unutar DLBCL NOS-a nedovoljno precizna da bi se na temelju nje predvidio tijek bolesti ili odabrala najbolja terapija, rađena su mnoga istraživanja na različitim razinama biopatologije ove bolesti kojima se nastoji napraviti adekvatnija podjela. Najjasniju podjelu dala su istraživanja u kojima je analiziran ekspresijski profil gena. Tako je utvrđeno da DLBCL NOS može biti razdijeljen prema vrsti stanica različitih diferencijacijskih stadija B-limfocita. (3) Pacijenti su grupirani na one kod kojih je bolest nastala iz B-stanica germinativnog centra limfnih čvorova – tumorske stanice tada nose biljege koji odgovaraju progenitorskim centroblastima germinativnog centra, pa se taj podtip naziva DLBCL stanica germinativnog centra (GCB, od eng. *germinal-center B-cell-like*). Kod druge skupine pacijenata tumorske stanice nastale su iz aktiviranih B-stanica pa se takav podtip naziva DLBCL aktiviranih stanica (ABC, od eng. *activated B-cell-like*). Stanice podtipa ABC nastaju iz B-stanica koje su u procesu

diferencijacije u plazma stanice i ne pokazuju sličnost u ekspresiji gena sa stanicama podtipa GCB. Pacijenti koje je moguće stratificirati u ova dva podtipa pokazuju značajnu razliku u preživljenju i progresiji bolesti. (4)

Budući da je analiza ekspresijskog profila tumorskog tkiva složena i skupa metoda, ova se podjela DLBCL-a pokušala omogućiti drugim metodama kako bi je bilo moguće primijeniti u svakom hematopatološkom laboratoriju. Tako su razvijeni imunohistokemijski algoritmi koji na temelju prisutnosti tri ili više antigena na tumorskim stanicama mogu posredno odrediti podtip DLBCL-a prema tipu stanice iz koje je tumor nastao. (5, 6) Najpoznatiji algoritam napravili su Hans i suradnici (2004.). Algoritam obuhvaća antigene CD10, BCL6 i MUM1 te s oko 80% sigurnosti može utvrditi podtip DLBCL NOS-a. (slika 1.) Iako je kasnije razvijena metoda koja koristi imunohistokemijsko bojenje antigena GCET1, CD10, BCL6, MUM1 i FOXP1 i s 93% sigurnosti određuje podtip DLBCL NOS-a, nemogućnosti razvoja komercijalnih antitijela koja bi specifično i precizno detektirala sve navedene biljege dovodi do toga da se još uvijek koristi inicijalni algoritam prema Hans i sur. (5, 6)



Slika 1. Shematski prikaz algoritma kojeg su razvili Hans i suradnici (5).

Iako navedene studije omogućavaju bolje razumijevanje patobiologije DLBCL-a, potrebno je detektirati ključne korake u razvoju ove bolesti kako bi se stvorila osnova za razvoj ciljanih terapija.

Jedan od važnijih koraka u razvoju svih, a pogotovo malignih tumora, predstavljaju promjene u replikacijskom aparatu i ostalim procesima koji omogućavaju tumorskoj stanici da nakuplja pogreške te tako stvara mogućnosti za brže napredovanje i širenje bolesti.

1.2. Replikacija u tumorskim stanicama

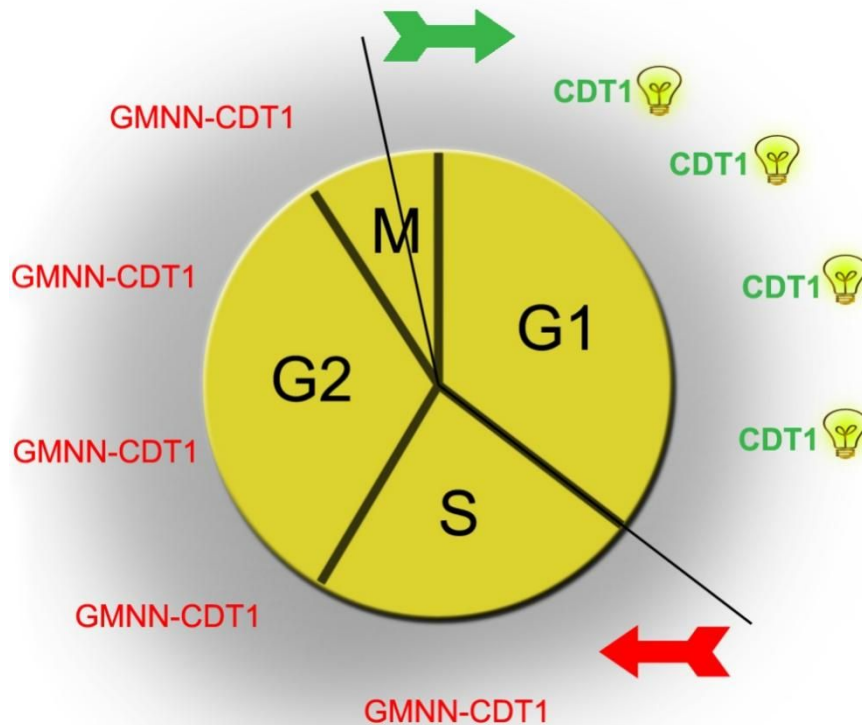
Stanični ciklus eukariotske stanice sastoji se od četiri faze: G1 (G1, od eng. *gap 1*) S (S, od eng. *synthesis*), G2 (G2, od eng. *gap 2*) i M (M, od eng. *mitosis*).

Faza G1 služi kao priprema za replikaciju DNA koja se odvija u fazi S. Tijekom faze G2 stanica sintetizira proteine koji su joj potrebni za diobu i umnožava stanične komponente koje će biti potrebne objema stanicama kćeri. Napredak staničnog ciklusa neposredno reguliraju efektorski proteini: kinaze, fosfataze i proteaze.

Replikacija DNA započinje na mjestima DNA koja nazivamo ishodišta replikacije. Prije samog početka replikacije na ishodišta se vežu proteini ORC (ORC, od eng. *origin recognition complex*), CDC6 (CDC6, od eng. *cell division cycle 6*), CDT1 (CDT1, od eng. *cdc10-dependent transcript 1*) i MCM2-7 (MCM2-7, od eng. *mini-chromosome maintenance complex 2-7*). Ti proteini zajedno čine prereplikacijski kompleks (pre-RC, od eng. *prereplication complex*). ORC, CDC6 i CDT1 čine sustav za vezanje MCM2-7 na DNA. MCM2-7 je helikaza koja u kasnijoj fazi replikacije odmata molekulu DNA kako bi je polimeraza mogla prepisivati u novu, identičnu kopiju. Molekule MCM2-7 vežu se na DNA tijekom kasne M i G1 faze ciklusa, te tako označavaju ishodište replikacije, kako bi se na to mjesto mogla vezati konačna replikacijska mašinerija i tako osiguravaju replikaciju svih dijelova DNA samo jedanput tijekom jednog staničnog ciklusa. Taj događaj nazivamo licenciranje jer on predstavlja signal kojim stanica dobiva informaciju da upravo to mjesto DNA smije replicirati. Vezanjem MCM2-7 proteini ORC, CDC6 i CDT1 otpuštaju se s ishodišta pa taj fragment DNA više nije moguće replicirati sve do iduće S faze.

Helikazna aktivnost MCM2-7 kompleksa ostaje inaktivna sve do S faze staničnog ciklusa kada kinaze ovisne o ciklinima i drugi signalni proteini dopuste

odmatanje DNA, vezanje replikacijske mašinerije, a time i replikaciju DNA. (7, 11). Geminin (GMNN) je jedan od proteina zaslužan za regulaciju staničnog ciklusa. Djeluje kao inhibitor CDT1 i time sprečava stvaranje replikacijskog kompleksa u pogrešnom koraku staničnog ciklusa. (slika 2.)



Slika 2. Inhibicija CDT1 gemininom u S, G2 i M fazi staničnog ciklusa. Razgrađivanje geminina u kasnoj M fazi i G1 fazi rezultira slobodnim CDT1, koji je ključan za ovlašćivanje ishodišta replikacije.

Aktivaciju helikaze koordiniraju ciklin E/A-Cdk2 i Dbf4-ovisne kinaze. Aktiviranoj helikazi pridružuje se replikacijska mašinerija, te replikacija DNA može

započeti. Nastali kompleks nazivamo replisom. Osim helikaznog kompleksa MCM2-7, ključne komponente eukariotskog replisoma uključuju, kompleks primaze (polimeraza α), protein RPA (RPA, od eng. replication protein A), protein RFC (RFC, od eng. replication factor C), PCNA (PCNA, od eng. proliferating cell nuclear antigen) i odgovarajuće DNA polimeraze. U tablici 1 navedene su glavne eukariotske DNA polimeraze i njihova uloga u stanici.

Tablica 1. Glavne eukariotske DNA polimeraze i njihova uloga u stanici.

DNA polimeraza	Uloga
α	Sinteza početnica
β	Popravak DNA
γ	Replikacija mitohondrijske DNA
δ	Sinteza tromog lanca
ϵ	Sinteza vodećeg lanca

Replikacija se istovremeno događa na oba lanca dvolančane DNA.

Jednolančane segmente koji nastaju tijekom replikacije DNA štiti RPA od djelovanja endonukleaza, a zahvaljujući interakcijama s MCM2-7 i RPA, DNA polimeraza α dolazi na kalup i sintetizira kratke RNA početnice (8 – 12 nukleotida), koje onda produži u DNA od 30-ak baza. RFC prepoznaje strukturu RNA početnica-kalup DNA, veže se i koristeći energiju dobivenu hidrolizom ATP-a postavlja PCNA oko DNA, u isto vrijeme uklanjajući DNA polimerazu α . PCNA

formira prsten kojim pričvršćuje DNA polimerazu ϵ (na vodeći lanac), tj. DNA polimerazu δ (na tromi lanac), a služi i kao platforma za različite proteine potrebne tijekom elongacije.

Elongacija se odvija na oba lanca istovremeno. Na vodećem lancu nastaje nova molekula kontinuiranim procesom dodavanja odgovarajućih nukleotida, dok na tromom lancu nastaju Okazakijevi fragmenti koje na kraju poveže DNA ligaza. Oba lanca čitaju se u smjeru 3'-5' tj. i vodeći lanac i Okazakijevi fragmenti nastaju u 5'-3' smjeru.

Terminacija replikacije uglavnom se odvija bez posebnih elemenata. Na određenim dijelovima sekvence mogu postojati tzv. replikacijske barijere, koje usporavaju replikacijske vilice i čine mjesto terminacije. MCM2-7 se uklanja s DNA i ne veže se do iduće mitoze tj. do idućeg ciklusa kada se opet prepoznaje licencirano mjesto kojim se označava dio koji je potrebno replicirati.

Kada je DNA replicirana, nužno je i ispravno kopiranje epigenetičke informacije u što su uključeni brojni enzimi poput CAF1 (CAF1, od eng. *chromatin assembly factor 1*), DNMT1 (DNMT1, od eng. *DNA methyltransferase I*), HDAC (HDAC, od eng. *histone deacetylase*), HAT (HAT, od eng. *histone acetyltransferase*; kao npr. protein P300), itd. Neki od tih proteina povezani su s replisomom preko PCNA.

Jedna od razlika između tumorskih i zdravih stanica je nedostatak kontrole staničnog ciklusa, pa tumorske stanice pokazuju povećanu stopu diobe, tj. proliferaciju. Proliferacija je uzrokovana gubitkom funkcije ili utišavanjem gena koji

reguliraju stanični ciklus. Ti geni najčešće kodiraju transkripcijske faktore ili proteine čija je zadaća remodeliranje kromatina, aktivacija ili inhibicija raznih kompleksa koji sudjeluju u replikaciji i mitozu. Svi navedeni procesi moraju biti precizno vremenski i prostorno usklađeni kako bi replikacija bila koordinirana i uspješna. U slučaju bilo koje nepopravljene pogreške koja dovodi do nemogućnosti kontrole staničnog ciklusa, stanica može umrijeti programiranom staničnom smrću ili postati tumorska. (7, 8)

Promjene u replikacijskom aparatu zamijećene su kod kolorektalnog i hepatocelularnog karcinoma. U tumorskim stanicama nađeno je oko 30% više kopija gena *GMNN* i *CDK13* (*CDK13*, od eng. cyclin-dependent kinase 13). Dokazano je da je povećan broj kopija tih gena u korelaciji s njihovom onkogenom aktivnosti. (9) Kod kolorektalnog karcinoma utvrđeno je i da je hipermetilacija tumorskih stanica povezana s povećanom ekspresijom enzima DNMT1 koji u normalnim stanicama održava integritet epigenetičke informacije tako što metilira hemimetilirana područja replicirane DNA. (10) U velikom broju drugih tipova karcinoma (malignim cervikalnim, kolorektalnim, laringealnim, vulvalnim i drugim tumorima) dokazana je poremećena regulacija ekspresije proteina MCM, što je djelomično posljedica i pogreške u ravnoteži *GMNN* i *CDT1*. Prekomjerna ekspresija *MCM2*, *MCM4*, *MCM5* i *MCM6* detektirana je kao biljeg karcinoma s klinički agresivnim fenotipom. (11)

Osim gena koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i replikaciji, primijećeni su i poremećaji u genima koji sudjeluju u ispravnoj uspostavi kromatina nakon replikacije. Primjer za to je *EZH2* (*EZH2*, od eng. *enhancer of zeste homolog 2*)

protein koji u sklopu represivnog polikomb kompleksa sudjeluje u metilaciji histona. Mutacije u genu *EZH2* česte su u ranim fazama razvoja folikularnog limfoma. (12)

1.3. Geni *GMNN* i *EZH2*

Gen *GMNN* (geminin) se nalazi na pozitivnom lancu 6. kromosoma, na poziciji 24 774 931-24 786 099. Poznato je 7 izrezujućih varijanti (transkripata), te 71 ortolog. Kodirajuća regija duga je 8 553 nukleotida i sadrži 6 egzona. Protein *GMNN* je homotetramer, a može se naći i u jezgri i u citoplazmi.

Kada ishodište replikacije postaje licencirano CDT1 posreduje vezanju helikaze MCM2-7 na pre-RC, čime započinje replikacija DNA. *GMNN* regulira stanični ciklus tako što inhibira CDT1. Kada je CDT1 vezan na *GMNN*, blokiran je, ali i stabiliziran (nema degradacije). *GMNN* se nakuplja u S, G2 i M fazi i tako sprečava licenciranje, a time i replikaciju u pogrešnom koraku staničnog ciklusa. U kasnoj M i G1 fazi dolazi do razgrađivanja *GMNN*-a pa je CDT1 onda slobodan čime je i vezanje MCM2-7 na ishodište replikacije moguće. (slika 2.) (7)

Prekomjerna ekspresija geminina povezana je s različitim malignim tumorima kod čovjeka: karcinomom dojke, debelog crijeva, rektuma i dr. (13) Kod DLBCL-a GCB podtipa kineskih pacijenata uočena je pojačana proliferacija stanica koje učestalije ekspimiraju geminin, Ki-67 i ciklin D3. (14)

Gen *EZH2* se nalazi na 7. kromosomu između 148 807 383.-eg i 148 884 321.-og nukleotida negativnog lanca. Poznato je 10 različitih transkripata,

83 ortologa i 7 paraloga. Kodirajuća regija duga je 39 653 parova baza i sadrži 19 egzona. Regulatorna regija gena sadrži CpG otok dug 1566 nukleotida i sadrži 22,6% CpG mjesta koja mogu biti metilirana.

Gen *EZH2* kodira protein koji katalizira metilaciju lizina 27 na histonu H3 (H3K27) i tako utječe na organizaciju kromatinske strukture. *EZH2* kao i njegov homolog *EZH1* su proteinske podjedinice velikog kompleksa nazvanog represivni kompleks polikomba (*PRC2*, od eng. *polycomb repressive complex 2*) koji je zaslužan za održavanje staničnog identiteta. *PRC2* zaustavlja transkripciju različitih gena u različitim tipovima stanica. U toj regulaciji metilacija H3K27 ima barem djelomičnu ulogu, no detalji samog procesa nisu u potpunosti poznati. *EZH2* je dio polikomb grupe proteina koji se nalaze u srži *PRC2* bez kojih kompleks gubi funkciju.

EZH2 je eksprimiran u gotovo svim tkivima, a njegova prekomjerna ekspresija pronađena je kod karcinoma dojke, debelog crijeva, grkljana, testisa i nekih limfoma. Pretpostavlja se da je uzrok tome utišavanje regulatornih gena putem metilacije H3K27. (15)

Kod podtipa GCB DLBCL-a i folikularnog limfoma, ali ne i kod podtipa ABC DLBCL-a ili bilo koje druge podskupine DLBCL-a nađene su mutacije *EZH2*. (16) Budući da je njegova funkcija ključna za formiranje bivalentnih kromatinskih domena kod gena važnih za izlaz B-stanica iz germinativnog centra, mutirani aleli *EZH2* dovode do blokade diferencijacije B-stanica, a time i do hiperplazije germinativnog centra i ubrzane limfomageneze. (17)

1.4. Kontrola genske ekspresije na razini metilacije DNA

Metilacija DNA predstavlja jedan od epigenetičkih načina regulacije transkripcije. Sama metilacija je proces u kojem pojedini citozinski nukleotidi dobivaju metilnu skupinu. Ta metilna skupina u većini slučajeva onemogućava vezanje transkripcijskog kompleksa, pa tako dolazi do utišavanja gena. Najčešća mjesta metilacije su regulatorne regije gena, točnije područja bogata CpG dinukleotidima koja nazivamo CpG otoci. (7, 18) Smatra se da je 70 – 80% CpG mjesta unutar nekog CpG otoka metilirano kada je riječ o utišanoj ekspresiji. (19)

Način metilacije gena nasljeđuje se prilikom diobe stanica pa je on uglavnom isti za određeni tip stanica. DNA metiltransferaza I predstavlja enzim koji ima ulogu održavanja (od eng. *maintenance methyltransferase*) metilacijskog zapisa. Ona preferencijalno djeluje na CG mjesta DNA koja su sparena s metiliranim GC mjestima roditeljskog lanca. Drugi tipovi DNA metiltransferaza mogu *de novo* metilirati određenu regiju genoma i time pridonijeti različitom ekspresijskom profilu tj. diferencijaciji stanica, stvaranju tumora, utišavanju X kromosoma i sl. Još jedna od karakteristika nasljeđivanja koja uključuje metilaciju DNA je prenošenje metilacijske karakteristike regije roditeljskog genoma na potomka. Ta pojava se naziva genomski utisak. (7, 18)

Promjene metilacije DNA detektirane su kao prva epigenetička komponenta razvoja malignih tumora. U tumorima dolazi do sljedećih promjena: hipermetilacije, hipometilacije i genskog utiska. Hipermetilacija regulatornih regija (poglavito CpG otoka) javlja se kod tumor supresorskih gena koji na taj način bivaju utišani.

Posljedica je nemogućnost zaustavljanja staničnog ciklusa uslijed čega dolazi do nekontrolirane proliferacije stanica ili odlaska u apoptozu. Globalna hipometilacija prisutna je u velikom broju tumora jer je na taj način omogućeno prepisivanje velikog broja gena, a samim time i progresija bolesti. Hipometilacija na razini specifičnog gena najčešće se može detektirati kod onih gena koji potiču diobu i napredovanje staničnog ciklusa. (20)

Budući da je metilacija DNA važna za život pojedine stanice, a njena promjena može poslužiti kao biljeg nekog od staničnih procesa, danas su razvijene mnoge metode za analizu stupnja metilacije pojedinih dijelova DNA ili za analizu ukupnog metilacijskog statusa genoma. Često se koriste metode čija je osnova lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) koje koriste uzorke DNA prethodno tretirane natrijevim hidrogensulfitom. Tradicionalni naziv za ovu sol je natrijev bisulfit, zbog čega je postupak dobio ime bisulfitna konverzija. Bisulfitnom konverzijom epigenetičke karakteristike "prepišu" se u sam slijed nukleotida na način da metilirani citozini ostanu netaknuti, dok se nemetilirani citozini uz natrijev bisulfit deaminiraju u uracile. PCR-om umnoženi uzorci se nakon toga mogu analizirati direktnim sekvenciranjem, pirosekvenciranjem, metodom MS-SSCA (MS-SSCA, od eng. *methylation-sensitive single-strand conformation analysis*), analizom mekšanja DNA visoke razlučivosti (HRM, od eng. *high resolution melting analysis*) i sl. (21, 22)

Metoda koja se zbog cijene i preciznosti najčešće koristi je pirosekvenciranje. Fragment molekule DNA od interesa produljuje se postepenim dodavanjem

određene vrste deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP). Ukoliko se određeni nukleotid ugradi nastaje pirofosfatni ostatak koji je supstrat enzima apiraze. U posljedičnoj reakciji apiraze nastaje ATP koji kao kofaktor zajedno s enzimom luciferazom sudjeluje u stvaranju svjetlosnog signala. Prema intenzitetu svjetlosti pirosekvencer kvantificira broj uspješno ugrađenih nukleotida, a prema redosljedu ubacivanja pojedinih nukleotida i vrstu ugrađenog nukleotida te na taj način očitava sekvencu. (23)

2. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza ovog istraživanja je da se podtipovi difuznog B-velikostaničnoga limfoma razlikuju prema stupnju metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2*.

Opći cilj istraživanja je razviti testove za procjenu stupnja metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* i primijeniti ih za analizu podtipova DLBCL-a.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- a) razviti testove za utvrđivanje stupnja metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* metodom pirosekvenciranja,
- b) prikupiti uzorke dva podtipa DLBCL-a koje se razlikuju prema porijeklu stanice iz kojih su nastali,
- c) izolirati DNA iz svih uzoraka DLBCL-a,
- d) bisulfitnim tretmanom konvertirati DNA,
- e) razvijenim testovima odrediti stupanj metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* u svim uzorcima,
- f) usporediti stupanj metilacije regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* među podtipovima DLBCL-a.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Za optimizaciju lančane reakcije polimerazom i pirosekvenciranja tijekom razvijanja testova za analizu metilacije DNA korištena je DNA izolirana iz staničnih linija HeLa i HEK293. Dodatno je za optimizacije korištena DNA izolirana iz formalinom fiksiranog, u parafin uklopljenog (FFPE, od eng. *formalin fixed, parafin embedded*) tkiva tonzile.

Razvijeni testovi korišteni su za analizu regulatornih regija odabranih gena na uzorcima limfnih čvorova i slezene zahvaćenih difuznim B-velikostaničnim limfomom. Uzorci su podijeljeni na dvije skupine koje se razlikuju po stupnju agresivnosti bolesti: 13 uzoraka je imalo dijagnozu podtipa DLBCL GCB, a 9 DLBCL ne-GCB. Dob pacijenata bila je između 28 i 83 godine. Za izolaciju DNA korišteni su prerezi tkiva obojeni hemalaunom i eozinom.

Ovo je istraživanje dio većeg projekta odobrenog od strane etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur.

3.2. Metode

3.2.1. Razvijanje testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena

GMNN i *EZH2*

3.2.1.1. Odabir početnica

Sekvence na temelju kojih su dizajnirani testovi za analizu metilacije DNA preuzete su s mrežnih stranica pretraživača genoma UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>). Korištena je verzija sekvence ljudskog genoma (od eng. *assembly*) GRCh37/hg19 sastavljena u veljači 2009. godine jer je opširnije anotirana od verzije GRCh38/hg38 iz prosinca 2013. Preuzete su sekvence označenih CpG otoka u blizini mjesta početka transkripcije gena *GMNN* i *EZH2* te 500 nukleotida uzvodno od početka i nizvodno od njihovog kraja. CpG otoci ovdje su definirani kao dijelovi genoma s više od 50% GC sadržaja, duljine barem 200 parova baza te omjerom postojećih i očekivanih CG parova većim od 0,6. Preuzete sekvence obuhvaćaju regiju uzvodno od mjesta početka transkripcije, prvi egzon i dio prvog introna svakog od istraživanih gena.

Prilikom odabira početnica za regulatorne regije kriteriji su bili:

- početnice su duljine barem 16 nukleotida radi postizanja specifičnog umnažanja i izbjegavanja polimorfni mjesta,
- temperature mekšanja (T_m , od eng. *melting temperature*) početnica jednog

para ne smiju se razlikovati više od 2 °C,

- sekvenca početnice mora biti takva da ne dolazi do stvaranja stabilnih homodimera,
- sekvence početnica jednog para moraju biti takve da ne dolazi do stvaranja stabilnih heterodimera,
- sekvenca pojedine početnice mora biti takva da ne stvara ukosnice ili slične sekundarne strukture,
- početnice ne smiju sadržavati duge uzastopne sljedove istoga nukleotida,
- početnice ne smiju sadržavati polimorfna mjesta,
- fragment koji se umnaža mora biti relativno kratak, maksimalne duljine 120 parova baza. (24)

Ovi parametri odabranih sekvenci analizirani su pomoću programa *OligoAnalyzer* dostupnog na mrežnim stranicama tvrtke Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, SAD; <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Pomoću njega određene su optimalne početnice za umnažanje dijelova regulatorne regije gena *EZH2*.

U svrhu bržeg traženja sekvenci potencijalnih početnica napisan je računalni program u programskom jeziku Python koji unutar zadane regije sustavno traži sve potencijalne parove početnica koji zadovoljavaju navedene uvjete. Prvo za svaku poziciju u sekvenci utvrdi koliko je udaljeno najbliže CpG (ili SNP) mjesto u 3' i 5' smjeru. Lokalni maksimumi dobivenih vrijednosti nalaze se na prvoj poziciji

lijevo od CpG mjesta za smjer 5'-3' i na prvoj poziciji desno od CpG mjesta za smjer 3'-5'. Njihova vrijednost najveća je udaljenost (nu) do najbližeg CpG mjesta. Pozicija u sekvenci na kojoj se lokalni maksimumi nalaze je posljednja (3') pozicija početnice točno ispred CpG mjesta. Nazvana je pk , što je skraćeno od posljednja koordinata. Regija je dio sekvence između $pk - nu$ i pk za 5'-3' smjer, odnosno pk i $pk + nu$ za 3'-5' smjer. Program odabire sve parove regija u koje se mogu smjestiti početnice minimalne duljine, okružuju potreban broj CpG mjesta i koje nisu previše udaljene (udaljene manje od $maksimalna_duljina_fragmenta - 2 \times minimalna_duljina_početnice$). U svakom paru regija odabire sve moguće početnice koje spadaju u tu regiju i zadovoljavaju kriterije duljine početnica i fragmenta te broja uzastopnih nukleotida. Na temelju njihova slijeda i zadanih koncentracija procjenjuje temperaturu mekšanja i promjenu Gibbsove energije pri 37 °C (ΔG_{37}) za proces vezanja najduljeg potpuno komplementarnog slijeda homo- i heterodimera. Pri tom eliminira one parove koji ne odgovaraju ograničenjima ΔG_{37} i T_m . Program ispiše sve parove početnica i njihova svojstva, grupirane po regijama u kojima se nalaze. Uzima u obzir sljedeće parametre (u zagradama su prikazane vrijednosti korištene za pretraživanje regulatorne regije gena *EZH2*; za pretraživanje regulatorne regije gena *GMNN* korišteni su isti ili slični parametri određeni specifično za *GMNN*):

- najmanja i najveća duljina početnica (16 i 30),
- najveća duljina dobivenog fragmenta (120),
- minimalan broj CpG mjesta u fragmentu (5),

- minimalan prihvatljiv ΔG_{37} (-23,8488 kJ mol⁻¹),
- minimalan prihvatljiv T_m (49,0 °C),
- maksimalna razlika u T_m početnica (2,0 °C),
- maksimalan broj istih uzastopnih nukleotida (5),
- koncentracije jednovalentnih kationa, magnezija te deoksiribonukleotida (50 mM, 1,6 mM te 200 μM),
- imena ulaznih datoteka - datoteke iz koje se učitavaju sekvenca i popis SNP-ova,
- ime izlazne datoteke - datoteke u koju se zapisuju podatci o odabranim parovima početnica.

Program određuje temperaturu mekšanja početnica na temelju uvjeta PCR-a (koncentracije jednovalentnih kationa, magnezija i deoksiribonukleotida) (25). Promjenu entalpije (ΔH) i entropije (ΔS) pri vezanju komplementarnih DNA lanaca procjenjuje na temelju modela termodinamike najbližeg susjeda (od eng. *nearest neighbour thermodynamics*). (26) Na temelju ΔH i ΔS određuje promjenu Gibbsove funkcije pri 37 °C (ΔG_{37}) za komplementarne sljedove DNA. Ova vrijednost uobičajeno se koristi u procjeni stabilnosti homodimera i heterodimera. Budući da program nema mogućnost procjenjivanja stabilnosti ukosnica, potrebno je provjeriti početnice koje program preporuči pomoću postojećih bioinformatičkih alata kao što je *OligoAnalyzer*. Pseudokod napisanog algoritma nalazi se u dodatnom materijalu (prilog 1.)

Opisani algoritam korišten je za određivanje početnica za analizu regulatorne regije gena *GMNN* koje su potom provjerene i standardno korištenim načinom koji je korišten u određivanju početnica i za regulatornu regiju gena *EZH2*.

Početnice za regulatornu regiju gena *EZH2* određene su i novim algoritmom.

Svi rezultati tako su provjereni na oba načina kojima se mogu odrediti optimalne početnice.

3.2.1.2. Bisulfitna konverzija i umnažanje specifičnih fragmenata konvertirane DNA

DNA stanične linije HeLa podvrgnuta je bisulfitnom tretmanu pomoću seta kemikalija *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, SAD), prema uputama proizvođača. Za lančanu reakciju polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) korišten je *PyroMark Kit* (Qiagen, Germantown, Maryland, SAD) za umnažanje dijelova konvertirane DNA prethodno određenim parovima početnica.

Reakcijska smjesa pripremljena je prema uputama proizvođača navedenog seta kemikalija, a program reakcije bio je 15 minuta 95 °C za početnu denaturaciju, 45 ciklusa od 30 sekundi pri 94 °C za denaturaciju, 30 sekundi na temperaturi prijanjanja određenoj za svaki par početnica i 30 sekundi na 72 °C za produljivanje lanca, te 10 minuta na 72 °C za konačno produljivanje.

Produkti svake reakcije PCR-a analizirani su elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu. Nakon elektroforeze, gel je obojen u otopini

etidijeva bromida i slikan na UV transiluminatoru.

3.2.1.3. Optimizacija uvjeta lančane reakcije polimerazom

Pri određivanju optimalnih uvjeta reakcije umnažanja specifičnih fragmenata prvo su isprobane temperature prijanjanja početnica (T_a , od eng. *annealing temperature*) 5 °C niže od srednje T_m para početnica zaokružene na najbliži cijeli broj. Temperature prijanjanja podizane su prema potrebi za slučajeve kad je dolazilo do nespecifičnog vezanja početnica. Isprobano je i kraće vrijeme produljenja, kako bi se preferencijalno umnažali kraći tj. specifični fragmenti DNA. Nakon što su određeni uvjeti pri kojima sve početnice specifično umnažaju fragmente očekivane duljine, provjereno je umnažaju li početnice fragmente genomske (nekonvertirane) DNA odgovarajućih dijelova genoma.

3.2.1.4. Optimizacija reakcija pirosekvenciranja

Pirosekvenciranje je metoda koja se temelji na mjerenju intenziteta svjetlosti nastale oksidacijom luciferina konjugirane sa sintezom DNA lanca pomoću pirofosfata. Budući da je za ovu metodu potrebno koristiti jednolančani produkt PCR-a koristi se metoda za odvajanje lanaca koja se temelji na reakciji biotina i streptavidina. Stoga se koriste iste početnice kao u reakciji umnažanja specifičnih fragmenata, osim što se na 5' kraj jedne od njih dodaje biotin. Prije početka postupka pirosekvenciranja potrebno je utvrditi redoslijed dodavanja nukleotida (DO, od eng. *dispensation order*). Računalni program *PyroMark Q24 Advanced*

Software generira DO na temelju originalne sekvence pojedinog fragmenta. Pojedine dodatne pozicije u DO služe kao kontrola metode ili kontrola efikasnosti bisulfitne konverzije. U odnosu na te kontrole, intenzitet dobivenih signala i prisutnost nespecifičnih signala procjenjuje se kvaliteta dobivenih rezultata.

Za uspostavu optimalnih uvjeta reakcije pirosekvenciranja za svaki par kreiranih početnica korištena je PCR-om umnožena konvertirana DNA izolirana iz staničnih linija HeLa i HEK293, uz odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole.

3.2.2. Izolacija i provjera kvalitete DNA iz uzoraka tkiva zahvaćenog DLBCL-om

Tkivni prerezi limfnih čvorova i slezene uzoraka zahvaćenih DLBCL-om obojeni hemalaunom i eozinom analizirani su pod mikroskopom kako bi se odredili dijelovi tkiva koji predstavljaju tumorske stanice. Ti su dijelovi prikupljeni s predmetnih stakalaca i inkubirani u digestijskom puferu (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, pH 8,5) uz dodatak proteinaze K (konačne koncentracije 0,77 mg/mL) na 37 °C uz protresanje od 300 rpm tijekom noći. Sljedeći dan uzorci su inkubirani 8 minuta na 95 °C kako bi se inaktivirala proteinaza K i nakon toga pohranjeni na 4 °C.

Uzorci izolirane DNA sadrže ostatke parafina i staničnih komponenti pa je određivanje koncentracije spektrofotometrom neprecizno. Umjesto toga kvaliteta dobivene DNA u većini slučajeva može se procijeniti korištenjem PCR-a s više parova početnica (od eng. *multiplex* PCR) koji daju fragmente poznate veličine. U ovom istraživanju korištene su početnice, protokol i uvjeti PCR-a preuzeti od

grupe BIOMED2. Očekivani fragmenti mogu biti veličina 100, 200, 300, 400 i 600 pb pa se prema tome određuje duljina najvećeg fragmenta u uzorku i kvaliteta izolirane DNA za nizvodne analize (27).

3.2.3. Bisulfitna konverzija, lančana reakcija polimerazom i pirosekvenciranje regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* u uzorcima DLBCL-a

Uzorci DNA iz tkiva zahvaćenog DLBCL-om podvrgnuti su bisulfitnoj konverziji te je konvertirana DNA umnožena koristeći odabrane početnice kako je ranije opisano (odlomak 3.2.1.2.).

Napravljeno je pirosekvenciranje optimiziranim protokolima na uzorcima oba podtipa DLBCL-a.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Kako bi se odredila značajnost razlike u stupnju metilacije regulatornih regija odabranih gena između podtipova DLBCL-a korišten je Mann-Whitneyev U test. Uspoređen je metilacijski status zasebnih CpG mjesta svakog fragmenta, kao i prosjek svih CpG mjesta svakog od analiziranih fragmenata. U obzir su uzeta samo ona mjesta koja su analizom pirograma zadovoljila uvjete kontrole kvalitete rezultata pirosekvenciranja. Korišten je javno dostupan program R (<http://www.r-project.org/>), a razina značajnosti bila je $p=0,05$.

4. Rezultati

4.1. Odabir početnica

Regulatorna regija gena *GMNN* analizirana je pomoću novoga programa. Algoritam je odabrao tri para početnica unutar CpG otoka. Dodatnom analizom uobičajenim načinom, koristeći javno dostupne alate, nije pronađen nijedan dodatni par početnica. (slika 3.)

Regulatorna regija gena *EZH2* analizirana je uobičajenim načinom. Tako su odabrana tri para početnica za umnažanje triju različitih fragmenata unutar CpG otoka gena *EZH2* prema pretraživaču genoma *UCSC*. Dodatnom analizom sekvence te regulatorne regije novim programom uočen je još jedan fragment koji uključuje više CpG mjesta, a nalazi se 128 nukleotida uzvodno od CpG otoka. (slika 4.)

Dvostrukom provjerom početnica za analizu regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* tako je određeno sedam fragmenata za analizu metilacije DNA. Početnice za njihovo umnažanje lančanom reakcijom polimerazom navedene su u tablici 2.

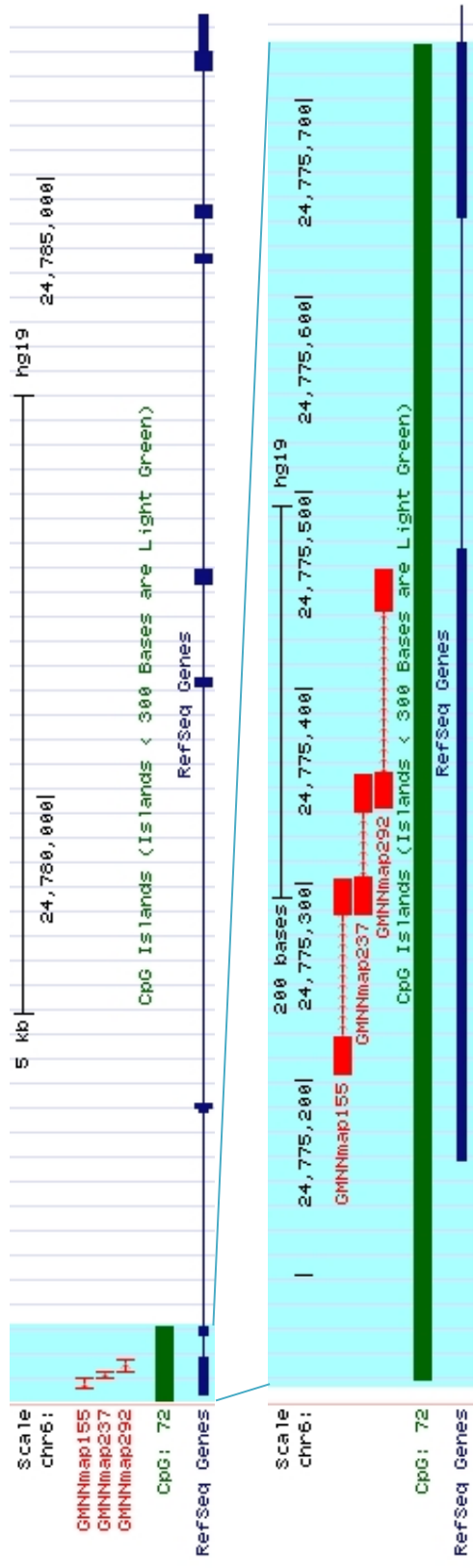
Vrijednosti svih parametara koje je novo napisani program odredio bile su slične vrijednostima dobivenim pomoću *OligoAnalyzer*-a. Odlučeno je da će se određivanje temperatura prijanjanja za PCR ipak temeljiti na vrijednostima dobivenim pomoću *OligoAnalyzer*-a zato što je dostupniji za brzu provjeru podataka.

Tablica 2. Početnice za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2*.

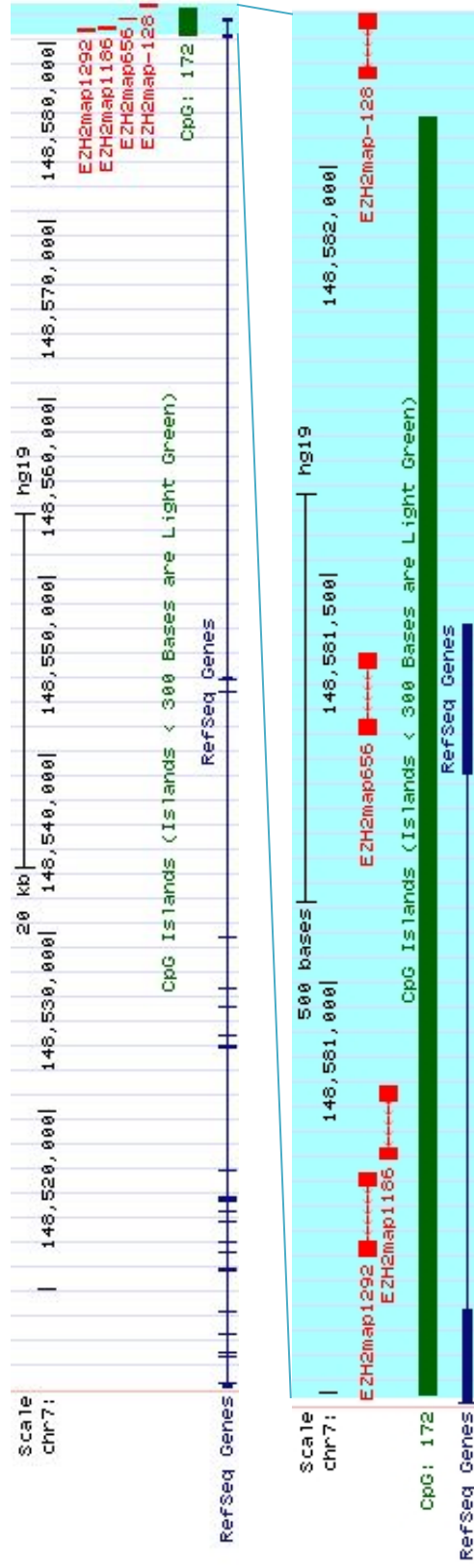
Naziv početnice	Sekvenca	L_p /nt	T_m /°C	L_a /pb	Broj CpG mjestu u amplikonu
GMNNmap155F*	GAGTTAGTAGGGTTTTATTG	20	52,9	101	7
GMNNmap155R	ACTATAACTACAACACCTC	19	53,0		
GMNNmap237F	GAGGTGTTGTAGTTATAGTT	20	54,0	72	5
GMNNmap237R	CTCTTACCCACTTACTAAAT	20	53,8		
GMNNmap292F	TAGTAAGTGGGTAAGAGG	18	53,7	122	9
GMNNmap292R	CCTACAACCTATCAAAATAAAAC	22	53,3		
EZH2map-128F	AGGTTGAGGTATGAGAA	17	53,3	83	7
EZH2map-128R	ATCCAAACTAAAATACAATAAC	22	53,0		
EZH2map656F	GGTTGGGGGGGTTAAATAA	19	58,6	101	11
EZH2map656R	ACTCCACTACCTTCTAAATCC	21	58,0		
EZH2map1186F	GGTTTAGGGTGGTAGTT	17	54,3	92	9
EZH2map1186R	ACCAACTTATATCTATCCC	19	52,2		
EZH2map1262F	GGATAGATATAAGTTGGTGG	20	53,8	103	8
EZH2map1262R	AATATCATACCCCTTCCC	18	54,3		

L_p – duljina početnice, T_m – temperatura mekšanja, L_a – duljina produkta

* broj u nazivu početnica predstavlja poziciju prvog nukleotida u odnosu na početak CpG otoka prema pretraživaču genoma *UCSC*



Slika 3. Prikaz regulatome regije gena *GMN* u pretraživaču genoma UCSC. Crveno su označeni PCR-produkti dobiveni odabranim početnicama (crveni kvadrati). Plavo je označen gen, s kvadratima u području egzona i tankom linijom u području introna. Zeleno je označeno područje CpG otoka.



Slika 4. Prikaz regulatorne regije gena *EZH2* u pretraživaču genoma UCSC. Crveno su označeni PCR-produkti dobiveni odabranim početnicama (crveni kvadrati). Plavo je označen gen, s kvadratima u području egzona i tankom linijom u području introna. Zeleno je označeno područje CpG otoka.

4.2. Optimizacija testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena

GMNN i *EZH2*

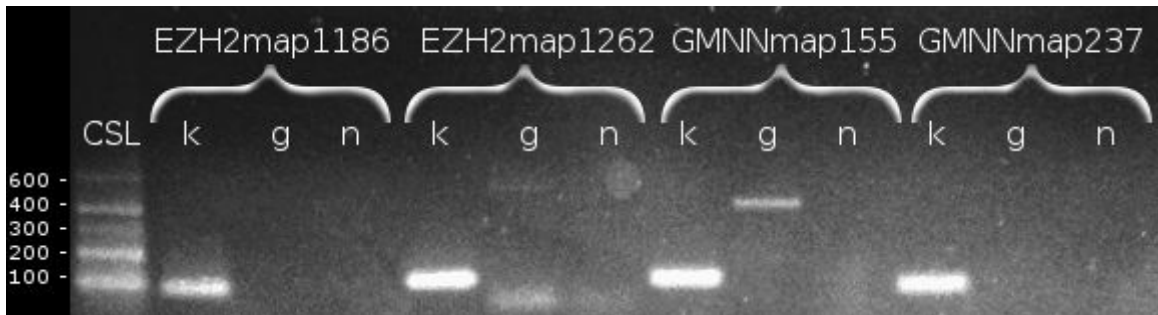
Uvjeti PCR-a za većinu fragmenata bili su uspješni kod korištenja temperature prijanjanja 5 °C niže od temperature mekšanja početnica. Kod umnažanja fragmenta *EZH2map-128* (ime fragmenta odgovara imenu početnica) umnožavali su se i nespecifični fragmenti dulji od očekivanog fragmenta. Specifičnost umnažanja povećana je povišenjem temperature prijanjanja. Određene optimalne temperature prijanjanja za umnažanje svih fragmenata navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Optimalne temperature prijanjanja za sve odabrane parove početnica regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2*.

Fragment	Temperatura prijanjanja / °C
GMNNmap155	49
GMNNmap237	49
GMNNmap292	49
EZH2map-128	55
EZH2map656	53
EZH2map1186	49
EZH2map1262	49

Uspješnost bisulfitne konverzije provjerena je korištenjem svih parova početnica u reakciji kod koje je kao kalup korištena nekonvertirana tj. genomska DNA. Neki parovi početnica umnažali su i fragmente genomske DNA. Budući da

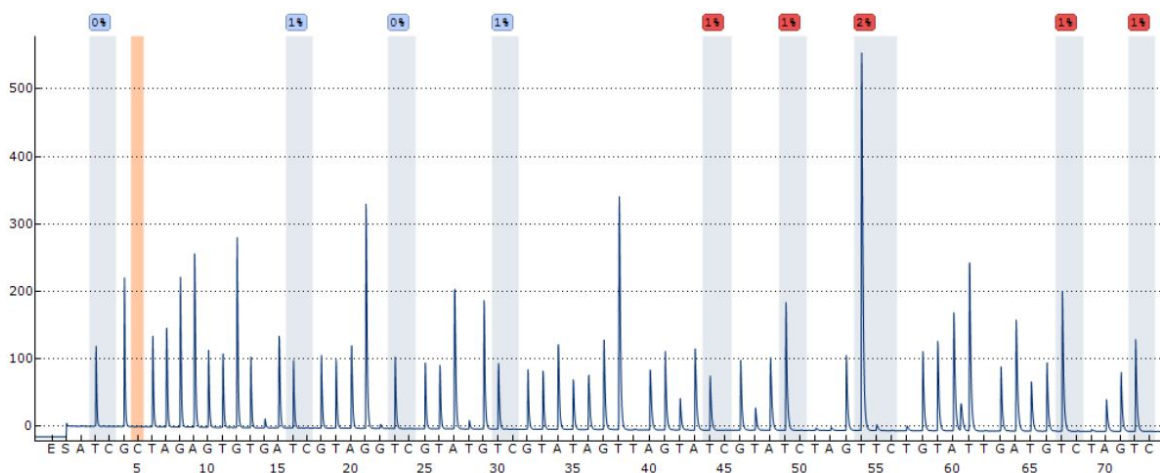
su ti fragmenti nespecifični i veći od očekivanih fragmenata dobivenih umnažanjem konvertirane DNA ovakvi su rezultati prihvaćeni kao dovoljno kvalitetni za kasniji postupak pirosekvenciranja (slika 5).



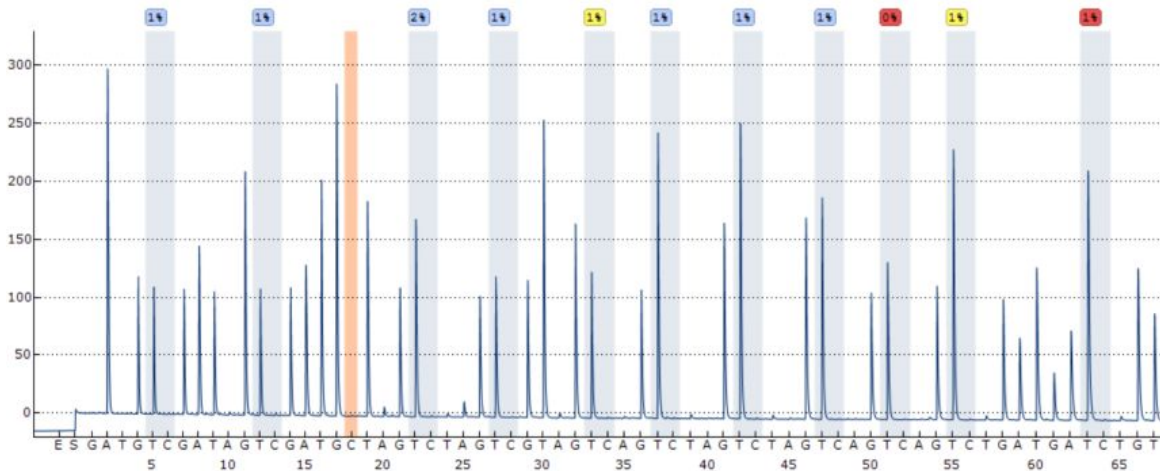
CSL – marker, k–konvertirana DNA, g - genomska DNA, n - negativna kontrola

Slika 5. Reprezentativni prikaz umnoženih odabranih fragmenata korištenjem konvertirane i genomske DNA kao kalupa.

Pirosekvenciranjem uzoraka dobivenih PCR-om koristeći konvertiranu DNA iz stanične linije HeLa nisu dobiveni rezultati koji su bi bili pouzdani prema kontroli kvalitete. Reakcije su stoga optimizirane koristeći DNA stanične linije HEK293 i stanica tkiva tonzile. Optimizirani uvjeti uključivali su: povećanje količine sefaroze obložene streptavidinom u postupku imobilizacije biotiniliranog lanca DNA s preporučenih 1 μ L na 3 μ L, povećanje broja ciklusa PCR-a s 45 na 50 i zamjenu nukleotida na kontrolnim mjestima u DO na kojima se pojavljuje neočekivani signal u pirogramu. Optimizirani pirogrami prikazani su na slici 6.



(a)



(b)

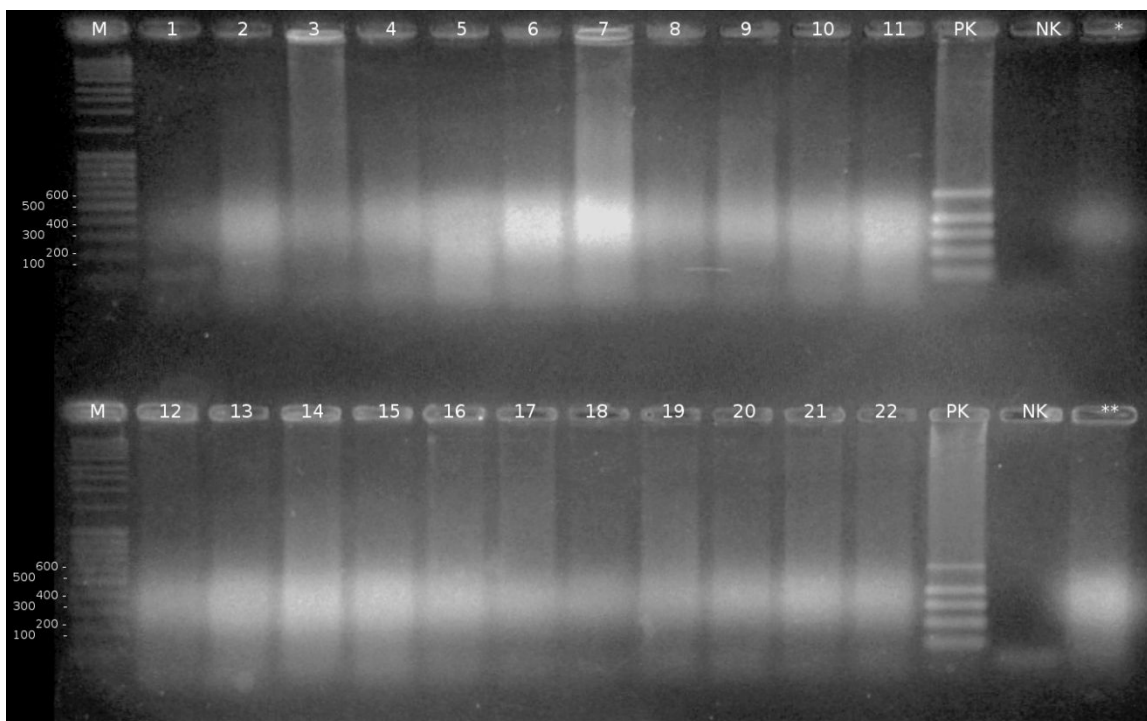
Crveno označena CpG mjesta prikazuju rezultate čija kvaliteta nije zadovoljavajuća, žuto označena mjesta rezultate koje je potrebno provjeriti dok su plavo označeni rezultati prihvaćeni u odnosu na sve razine kontrole kvalitete.

Slika 6. a) Optimizacija reakcije pirosekvenciranja za fragment GMNNmap292 na uzorcima DNA stanične linije HEK293 b) Optimizacija reakcije pirosekvenciranja za fragment EZH2map656 na uzorcima DNA stanične linije HEK293.

Ukupno su optimizacijom svih odabranih fragmenata za regulatorne regije oba gena od interesa kreirana dva testa, po jedan za svaki gen, koji daju pouzdanu procjenu metilacije DNA regulatornih regija. Optimizirani su testovi za fragmenete GMNNmap292 i EZH2map656.

4.3. Izolacija i provjera kvalitete DNA iz uzorka DLBCL-a

Nakon kontrolnog umnažanja genomske DNA iz uzorka DLBCL-a PCR-om s više parova početnica koje daju fragmente poznate veličine nisu dobiveni rezultati koji bi potvrdili njenu kvalitetu. (slika 7.)



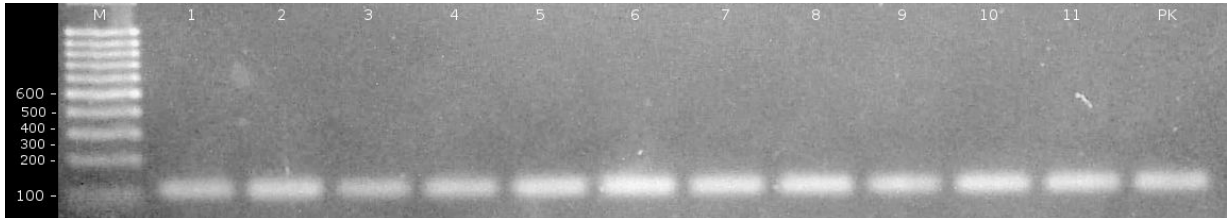
M – marker, PK – uzorak DNA izoliran iz HeLa stanica koji služi kao pozitivna kontrola, NK – negativna kontrola, 1-22 brojevi koji označavaju uzorke DLBCL-a, * i ** - uzorci genomske DNA iz dva uzorka DLBCL-a

Slika 7. Provjera kvalitete DNA izolirane iz rezova tumorskog tkiva fiksiranog formalinom, uklopljenog u parafin i obojenog hemalaunom i eozinom.

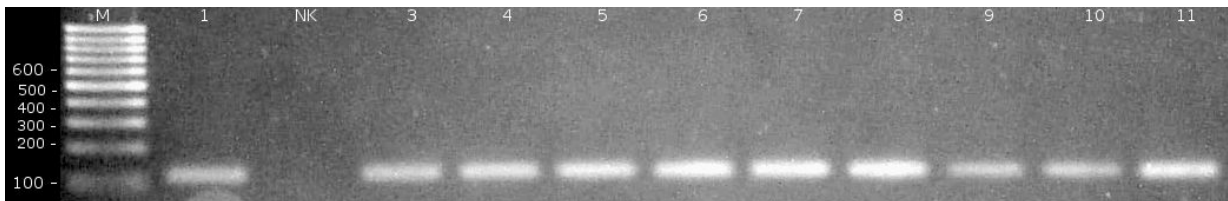
4.4. Bisulfitna konverzija i lančana reakcija polimerazom za odabrane fragmente gena *GMNN* i *EZH2* na uzorcima DNA izoliranih iz DLBCL-a

Uspješnost bisulfitne konverzije, kao i dodatna kontrola kvalitete izolirane DNA iz uzoraka DLBCL-a provjereni su elektroforezom nakon umnažanja

fragmenata *GMNN*map292 i *EZH2*map656 optimiziranim PCR-om. (slika 8.)



(a)



(b)

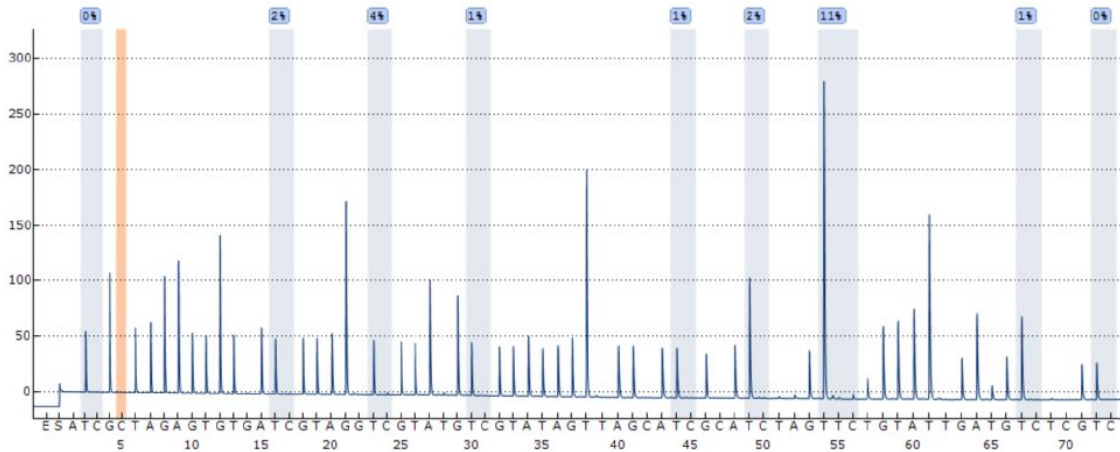
M – marker, PK – konvertirani uzorak DNA izoliran iz HeLa stanica koji služi kao pozitivna kontrola, NK – negativna kontrola, 1-11 brojevi uzoraka DLBCL-a

Slika 8. Reprezentativni prikaz a) umnoženog fragmenta *GMNN*map292 i b) *EZH2*map656, na uzorcima DLBCL-a.

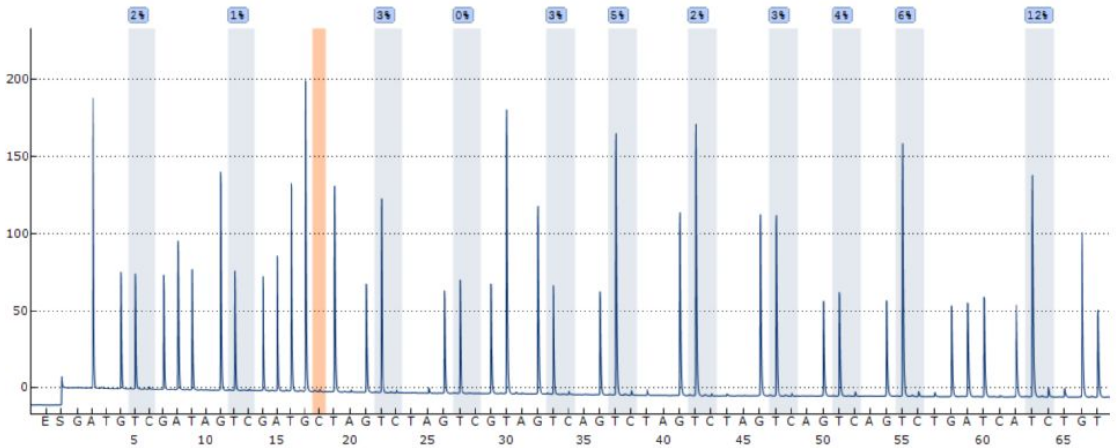
4.5. Stupanj metilacije regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* u DLBCL-u

Pirosekvenciranje fragmenata *GMNN*map292 i *EZH2*map656 na uzorcima DLBCL-a dalo je pouzdane i kvalitetne rezultate za sva CpG mjesta analiziranih

fragmenata (slika 9.).



(a)



(b)

Slika 9. Reprezentativni prikaz dobivenih pirograma na uzorcima DLBCL-a (a) fragment GMNNmap292 (b) fragment EZH2map656.

Nakon sekvenciranja, iz pirograma uzoraka u kojima je umnažan fragment GMNNmap292 uklonjen je šum koji je nastao zbog duljine ovog fragmenta. Uzrok

šuma su mali signali nastali nakon dodatka kontrolnog nukleotida te, samo u uzorku 10, nespecifičan signal nakon dodatka 8.-og nukleotida. Ti signali nisu korišteni kao referentni, što je značajno povećalo kvalitetu procjene metilacije.

Dobiveni rezultati analizirani su u odnosu na podtip DLBCL-a (tablice 4 i 5).

Tablica 4. Stupanj metilacije 9 CpG mjesta fragmenta GMNNmap292 u uzorcima dva podtipa DLBCL-a.

redni broj uzorka	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	P	Skupina DLBCL-a
1	2	1	0	0	1	4	8	1	1	2,00	ne-GCB
2	0	1	1	1	0	1	7	3	0	1,56	GCB
3	5	1	1	3	2	4	7	4	1	3,11	ne-GCB
4	2	2	2	3	1	1	6	1	0	2,00	GCB
5	0	5	1	3	1	1*	/	/	/	1,83	ne-GCB
6	2	2	1	1	0	3	7	2	1	2,11	ne-GCB
7	2	1	2	1	1	2	4	2	1	1,78	ne-GCB
8	1	2	1	1	0	1	9	2	2	2,11	GCB
9	1	1	2	2	0	2	4	2	0	1,56	GCB
10	5	1	3	3	0	3	4	2	0	2,33	ne-GCB
11	0	2	4	1	1	2	11	1	0	2,44	GCB
12	3	1	2	3	2	1	7	2	0	2,33	GCB
13	1	2	1	0	0	1	7	2	0	1,56	GCB
14	1	1	2	0	1	0	3	1	0	1,00	GCB
15	2	1	0	0	0	2	0	2	0	0,78	GCB
16	1	2	0	1	0	0	4	0	2	1,11	ne-GCB
17	1	2	1	1	0	0	3	2	1	1,22	GCB
18	3	2	0	1	0	0	7	1	0	1,56	ne-GCB
19	1	1	1	1	0	5	4	2	2	1,89	GCB
20	2	0	2	2	0	1	4	2	0	1,44	ne-GCB
21	1	3	0	2	1	3	4	2	0	1,78	GCB
22	2	1	1	1	0	2	5	1	0	1,44	GCB

M₁₋₉ – postotak metilacije pojedinih CpG mjesta, P - prosječna metilacija svih analiziranih CpG mjesta.

Tablica 5. Stupanj metilacije 11 CpG mjesta fragmenta EZH2map656 u uzorcima dva podtipa DLBCL-a.

redni broj uzorka	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀	M ₁₁	P	Skupina DLBCL-a
1	2	1	3	1	1	2	2	1	1	3	5	2,00	ne-GCB
2	3	2	2	2	2	2	4	1	1	3	4	2,36	GCB
3	2	3	4	1	2	2	3	2	2	3	4	2,55	ne-GCB
4	1	1	2	1	2	2	2	1	1	3	3	1,73	GCB
5	2	1	3	0	3	5	2	3	4	6	12	3,73	ne-GCB
6	1	1	3	1	1	2	1*	1	1	2	4	1,64	ne-GCB
7	1	1	3	1	2	3*	2	2	1	2	2	1,82	ne-GCB
8	2	2	3	1	1	1	2	3	2	4	6	2,45	GCB
9	1	0	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1,45	GCB
10	2	2	3	1	3	5	3	3	1	3	3	2,64	ne-GCB
11	1	2	3	1	3	2	2	3	2	4	2	2,27	GCB
12	4	1	2	2	3	4	5	1	0	1	6	2,64	GCB
13	0	1	2	1	1	3	2	1	2	2	3	1,64	GCB
14	1	1	3	2	2	3	2	3	1	2	4	2,18	GCB
15	1	2	3	1	2	2	2	2	2	2	2	1,91	GCB
16	1	1	2	1	1	2	2	1	0	1	2	1,27	ne-GCB
17	1	1	1	0	2	2	2	1	1	2	3	1,45	GCB
18	2	1	3	1	1	3	4	3	1	2	3	2,18	ne-GCB
19	1	2	3	1	2	2	3	2	1	2	3	2,00	GCB
20	1	1	0	0	1	1	2	1	2*	2	/	1,10	ne-GCB
21	1	1	4	1	1	2	2	2	1	2	6	2,09	GCB
22	1	1	2	1	2	3	3	1	1	2	4	1,91	GCB

M₁₋₁₁ – postotak metilacije pojedinih CpG mjesta, P - prosječni postotak metilacije svih analiziranih CpG mjesta.

4.6. Statistička obrada podataka

Mann-Whitneyev U test nije pokazao statistički značajnu razliku između prosjeka metilacije svih CpG mjesta fragmenta GMNNmap292 ili fragmenta EZH2map656 u podtipovima DLBCL-a. Pojedina CpG mjesta također ne pokazuju značajnu razliku među podtipovima, osim prvog CpG mjesta u fragmentu GMNNmap292 ($p=0,047$). (tablica 6.)

Tablica 6. Rezultati Mann Whitney U testa kojim su uspoređene metilacije CpG mjesta regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* dva podtipa DLBCLa.

Fragment	GMNNmap292	EZH2map656
P	0,402	0,973
M₁	0,047	0,224
M₂	0,825	0,784
M₃	0,55	0,276
M₄	0,357	0,105
M₅	0,76	0,348
M₆	0,56	0,509
M₇	0,681	0,726
M₈	0,807	0,611
M₉	0,155	0,879
M₁₀	-	0,713
M₁₁	-	0,941

M₁₋₁₁ – metilacija pojedinih CpG mjesta u analiziranom fragmentu, P - prosjek metilacije svih analiziranih CpG mjesta toga fragmenta

5. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kompleksnost izrade pouzdanih testova za određivanje metilacije DNA regulatornih regija pojedinih gena i njihovu važnost za znanstvena istraživanja.

Korištenjem dostupnih bioinformatičkih alata i novo dizajniranim programom određeno je sedam fragmenata za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2*. Vrijednosti svih parametara koje je novi program odredio slične su vrijednostima dobivenim pomoću *OligoAnalyzer*-a iako dolazi do malih odstupanja zbog upotrebe različitog modela za procjenu temperatura mekšanja i različitih eksperimentalnih parametara za izračun ΔG_{37} najbližih susjeda. Usporedbom korištenih programa pokazala se veća brzina nalaženja početnica, zadovoljavajuća pouzdanost i mogućnost detekcije dodatnih fragmenata za analizu regulatorne regije DNA korištenjem novog algoritma.

Obuhvaćanje većeg broja CpG mjesta unutar regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* pokazalo se kompleksnim. Iako je najdulji mogući fragment čiju je metilaciju moguće pouzdano odrediti pomoću pirosekvenciranja relativno kratak (do 500 pb) potrebno je voditi računa o vrsti materijala na kojem se istraživanje provodi. Formalinom fiksirana, u parafin uklopljena tkiva, koja predstavljaju većinu arhivskog materijala, imaju degradiranu DNA pa je potrebno ograničiti analize na fragmente do maksimalno 200 pb.

Nakon odabranih početnica prema kriterijima koji su u obzir uzeli vrstu

materijala koji će se koristiti u istraživanju kreirano je 7 parova početnica. PCR-om je utvrđeno da je odabrane fragmente za oba istraživana gena moguće specifično i reproducibilno umnožiti koristeći DNA iz staničnih linija HeLa, HEK298 i iz arhivskog materijala.

Daljnjom optimizacijom od sedam parova početnica za fragmente regulatorne regije dva gena pouzdanima su se pokazala samo dva. Razlog tome je osjetljivost i kompleksnost metode pirosekvenciranja. Ova metoda uvelike ovisi o: stvaranju dimera početnica, količini sefaroze u reakciji, kvaliteti DNA specifičnih vrsta uzoraka (vrsta stanične linije, način pohrane tkiva, ...) i redosljed u dodavanja deoksiribonukleotida prilikom pirosekvenciranja.

Pirosekvenciranje fragmenata umnožene konvertirane DNA iz stanične linije HeLa, uz redosljed dodavanja deoksiribonukleotida koji je računalni program *PyroMark Q24 Advanced Software* automatski odredio, pokazalo se nepouzdanim za sve fragmente. Prilikom PCR-a je vjerojatno ostala određena količina neiskorištenih biotiniliranih početnica. Početnice neiskorištene prilikom PCR-a tvorile su dimere prilikom pirosekvenciranja, a njihovo produživanje stvaralo je šum u pirogramu koji je bio dovoljno intenzivan da onemogući ispravnu procjenu stupnja metilacije. Povećanjem broja ciklusa PCR-a, čime se povećava iskorištavanje početnica i uz promjenu DO dobiveni su kvalitetniji rezultati za sve početnice.

Pirosekvenciranjem fragmenata umnožene konvertirane DNA iz stanica HEK293 i tonzile, uz malu izmjenu DO, dobiveni su kvalitetni i reproducibilni

rezultati za fragmente GMNNmap292 i EZH2map656, a i pirosekvenciranje ostalih pet fragmenata na DNA izoliranoj iz HEK293 stanica rezultiralo je kvalitetnijim pirogramima nego pirosekvenciranje s kalupom iz HeLa stanica.

Konačno, trostrukim povećanjem količine sefaroze prilikom pripreme uzoraka za pirosekvenciranje dobiveni su značajno kvalitetniji rezultati pirosekvenciranja. Razlog tome najvjerojatnije je velika brzina taloženja sefaroze, zbog čega dio uzoraka zaostane u pločici za pripremu.

Zaključno, stvaranje dimera odabranih početnica, količina sefaroze u reakciji, kvaliteta DNA specifičnih vrsta uzoraka i redoslijed dodavanja deoksiribonukleotida prilikom pirosekvenciranja su parametri koje je potrebno prilagoditi svakoj regiji svakoga istraživanoga gena i svakoj vrsti materijala koja se u istraživanju koristi.

Testovi koji su u potpunosti optimizirani primijenjeni su za analizu uzoraka dva podtipa DLBCL-a. Uzeti uzorci predstavljali su reprezentativne grupe GCB i ne-GCB tipova DLCL-a tj. skupine koje se razlikuju prema porijeklu stanica iz kojih je tumor nastao, a time i prema brzini napredovanja bolesti.

Kontrola kvalitete izolirane DNA iz formalinom fiksiranih, u parafin uklopljenih prereza tkiva obojenih hemalaunom i eozinom nije bila zadovoljavajuća korištenjem standardne metode za kontrolu kvalitete neobojenih uzoraka arhivskog tkiva. Ipak, nakon bisulfitne konverzije svi su uzorci uspješno umnoženi lančanom reakcijom polimerazom uz početnice odabrane za istraživane gene. Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu za dodatnim pročišćavanjem uzoraka

izolirane DNA iz arhivskog materijala obojenog standardnim bojenjima za morfološke analize. Pretpostavka je da osnovna bojenja sadrže tvari koje djeluju kao inhibitori DNA polimeraze pa onemogućavaju umnožavanje izolirane DNA. Postupkom bisulfitne konverzije dolazi do njihova uklanjanja iz uzoraka pročišćavanjem DNA na koloni.

Ne-GCB podtip DLBCL-a prepoznat je u prijašnjim istraživanjima kao skupina čije se stanice brže dijele pa je pretpostavka bila da će se ta skupina imati značajno drugačiju regulaciju transkripcije gena koji uvjetuju početak i tijek replikacije te posljedično uspostavljanje kromatina. (3) Suprotno očekivanom, odabrani fragmenti regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* nisu pokazali statistički značajnu razliku u metilaciji DNA navedenih podtipova. Rezultati tako sugeriraju da nema razlike u regulaciji transkripcije gena *GMNN* i *EZH2* u dva podtipa DLBCL-a na razini metilacije DNA istraženih dijelova regulatornih regija.

Budući da je analizirano samo 12% CpG mjesta u regulatornoj regiji gena *GMNN* i 6% CpG mjesta u regulatornoj regiji gena *EZH2* potrebno je razviti dodatne testove za analizu čim većeg broja CpG mjesta regulatornih regija oba gena kako bi se mogli donijeti precizni zaključci o regulaciji njihove transkripcije na razini metilacije DNA. Te je testove moguće napraviti dodatnim optimizacijama preostalih 5 fragmenata ovog istraživanja i korištenjem drugih metoda osim prirosekvenciranja. Za pouzdano određivanje razlike te bi testove bilo dobro primijeniti i na većoj skupini ispitanika.

Osim gena *GMNN* i *EZH2* postoje i drugi geni koji sudjeluju u replikaciji i

organizaciji kromatina za koje su tijekom izrade ove studije dobiveni rezultati koji pokazuju da je količina njihovih transkripata značajno različita u različitim limfomima. Regulaciju ekspresije na razini metilacije DNA bilo bi potrebno istražiti i kod tih gena kako bi se dobio jasniji uvid u razlike u mehanizmu replikacije GCB i ne-GCB podtipova DLBCL-a.

6. Zaključci

- Novi algoritam za automatski odabir parova početnica u CpG otoku je učinkovit i visoko protočan, ali nedovoljno selektivan.
- Ključni parametri koji omogućuju reproducibilne rezultate pirosekvenciranja su: broj ciklusa PCR-a, kvaliteta DNA (vrsta materijala na kojem se vrši istraživanje), DO, i količina sefaroze.
- DNA izolirana iz formalinom fiksiranih, u parafin uklopljenih prereza tkiva obojenih hemalaunom i eozinom potencijalno sadrži inhibitore DNA polimeraze koji se pročišćavaju tijekom postupka bisulfitne konverzije.
- GCB i ne-GCB podtipovi DLBCL-a ne razlikuju se prema metilaciji fragmenata regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* za koje su u ovom istraživanju razvijeni eseji.

7. Prilog

Prilog 1. Pseudokod algoritma napisanog kako bi se ubrzao i automatizirao postupak odabira početnica:

početno_vrijeme = trenutno vrijeme

upiši parametre, npr. *minimalna_duljina_početnice* := 16 itd.

iz datoteka učitaj sekvencu gena i poziciju SNP-ova

odredi konvertiranu sekvencu gena

odredi poziciju svih CpH (CpA, CpC i CpT) mjesta

za svako mjesto u konvertiranoj sekvenci gena:

odredi udaljenost do najbližeg CpG mjesta uzvodno i nizvodno

za svako CpG mjesto u konvertiranoj sekvenci gena:

ako ispred/iza tog mjesta može stati početnica minimalne duljine koja ne bi sadržavala druga polimorfna mjesta:

zapamti regiju ispred/iza tog mjesta

za sve odabrane regije:

napravi parove regija takve da odgovaraju kriterijima

za sve odabrane parove regija:

$f = "$

sve dok f ne odgovara kriterijima za početnicu:

odaberi početnicu f iz uzvodne regije

$r = "$

sve dok r ne odgovara kriterijima za početnicu:

odaberi početnicu r iz nizvodneregije

ako početnice f i r odgovaraju kriterijima za par početnica:

zapamti par početnica f i r i njihova svojstva

za sve odabrane parove regija:

zapiši u datoteku početnu i završnu poziciju i broj CpG mjesta

za sve odabrane parove početnica:

zapiši u datoteku slijed i svojstva početnica

ispiši *konvertirani_gen*

ispiši trenutno vrijeme - *početno_vrijeme*

8. Zahvale

Najljepša hvala našoj mentorici, doc. dr. sc. Petri Korać koja nas je uvela u ovaj rad. Hvala joj na ukazanom povjerenju, utrošenom vremenu, stručnim savjetima, strpljenju, motiviranju i velikom trudu prilikom izrade rada.

Zahvaljujemo i voditeljici našeg rada, Pauli Dobrinić, mag. biol. mol., na strpljivim uputama i savjetima kojima nas je vodila i poticala na donošenje ispravnih zaključaka, te naučila kako kvalitetno i efikasno raditi u laboratoriju.

Zahvalu upućujemo Mariji Klasić, mag. biol. mol. koja nam je pomogla u pirosekvenciranju ustupivši nam pozitivne kontrole.

Zahvaljujemo izv. prof. dr. sc. Slavku Gašparovu na pomoći kod prikupljanja uzoraka.

Hvala doc. dr. sc. Mili Šikiću koji je pregledao i dao savjete za oblikovanje pseudokoda.

Zahvaljujemo i Vlatanu Vukoviću koji je provjerio da su svi rezultati ispravno prepisani.

9. Literatura

1. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Vardiman J. W. (Eds.). 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon Monographs, IARC Library 146.
2. Martelli M., Ferreri J. M., Agostinelli C., Di Rocco A., Pfreundschuh M., Pileri S. A. 2013. Diffuse large B-cell lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 87, 146-71.
3. Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., et al. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma indentified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-11.
4. Frick M., Dörken B., Lenz G. 2011. The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma. *Therapeutic Advances in Hematology* 2(6), 369-79
5. Hans C. P., Weisenburger D. D., Greiner T. C., Gascoyne R. D., Delabie J., et al. 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103, 275-82.
6. Choi W. W. L., Weisenburger D. D., Greiner T. C., Piris M. A., Banham A. H., et al. 2009. A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-Cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy. *Clinical Cancer Research* 15, 5494-502.

7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, Taylor & Francis Group: New York NY.
8. Cox L. S. (Eds.) 2009. Molecular Themes in DNA Replication. Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.
9. Kim H. E., Kim D. G., Lee K. J., Son J. G., Song M. Y., et al. 2012. Frequent Amplification of CENPF, GMNN and CDK13 Genes in Hepatocellular Carcinomas. *Public Library of Science one* 7(8), e43223.
10. Samaei N. M., Yazdani Y., Alizadeh-Navaei R., Azadeh H., Farazmandfar T. 2014. Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin pathway regulators and its association with expression of DNMT1 enzyme in colorectal cancer. *Journal of Biomedical Science* 21, 73.
11. Tachibana K. K., Gonzalez M. A., Coleman N. 2005. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *Journal of Pathology* 205, 123-9.
12. Bödör C., Grossmann V., Popov N., Okosun J., O'Riain C., et al. 2013. *EZH2* mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 122(18), 3165-8.
13. Montanari M., Boninsegna A., Faraglia B., Coco C., Giordano A., et al. 2005. Increased Expression of Geminin Stimulates the Growth of Mammary Epithelial Cells and Is a Frequent Event in Human Tumors. *Journal of Cellular Physiology* 202, 215-22.

14. Liu Y. H., Xu F. P., Zhuang H. G., Lai K. C. C., Xie D., et al. 2008. Clinicopathologic significance of immunophenotypic profiles related to germinal center and activation B-cell differentiation in diffuse large B-cell lymphoma from Chinese patients. *Human Pathology* 39, 875-84.
15. Garapaty-Rao S., Nasveschuk C., Gagnon A., Chan. E. Y., Sandy P., et al. 2013. Identification of EZH2 and EZH1 Small Molecule Inhibitors with Selective Impact on Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Growth. *Chemistry & Biology* 20, 1329-39.
16. Morin R. D., Johnson N. A., Severson T. M., Mungall A. J., An J., et al. 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics* 42(2), 181-5.
17. Béguelin W., Popovic R., Trater M., Jiang Y., Bunting K. L., et al. 2013. EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell* 23, 677-92.
18. Phillips, T. 2008. The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1), 116.
19. Ziller M. J., Gu H., Müller F., Donaghey J., Tsai L. T., et al. 2013. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500(7463), 477-81.
20. Sandoval J., Esteller M., 2012. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development* 22, 50-5.

21. Kristensen L. S., Hansen L. L. 2009. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry* 55(8), 1471-83.
22. Fraga M. F., Esteller M. 2002. DNA methylation: a profile of methods and applications. *BioTechniques* 33(3), 632-49.
23. Tost J., Gut I. G. 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols* 9(2), 2265-75.
24. Mikeska T., Felsberg J., Hewitt C. A., Dobrovic A. 2011. Analysing DNA Methylation Using Bisulphite Pyrosequencing. In *Methods in Molecular Biology* 791, 33-53. Humana Press, Clifton, New Jersey, NJ.
25. Von Ahsen N., Wittwer C. T., Schütz E. 2001. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: Nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clinical Chemistry* 47, 1956-61.
26. SantaLucia J. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2), 1460-5.
27. van Dongen J. J. M., Langerak A. W., Brüggemann M., Evans P. A. S., Hummel M., et al. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene

recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2
Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17(12), 2257-317.

10. Sažetak

Razvoj testova za analizu metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* i njihova primjena u istraživanju podtipova difuznog B-velikostaničnoga limfoma

Mislav Acman i Vedran Vuković

Istraživanja malignih tumora ukazala su na važnost gena uključenih u replikaciju i ponovnu uspostavu kromatina u onkogenezi. Njihova poremećena funkcija može biti povezana s epigenetičkim promjenama. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati stupanj metilacije DNA regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* kod podtipova difuznog B-velikostaničnog limfoma. U tu su svrhu razvijeni testovi za procjenu stupnja metilacije pojedinih CpG mjesta unutar regulatornih regija tih gena. Odabrani su parovi početnica koji lančanom reakcijom polimerazom umnažaju fragmente bisulfitno konvertirane DNA unutar regulatornih regija gena od interesa. Razvijena su tri testa za regulatorne regije gena *GMNN* i četiri testa za regulatorne regije gena *EZH2*. Nakon toga određeni su optimalni uvjeti reakcija pirosekvenciranja. Završno je razvijen po jedan test za svaki gen. Ti su testovi primijenjeni u analizi podtipova difuznog B-velikostaničnog limfoma. Analizirani dijelovi regulatornih regija gena *GMNN* i *EZH2* nisu pokazali značajne razlike između podtipova. Budući da su ovim istraživanjem obuhvaćeni relativno mali dijelovi regulatornih regija oba gena, analizu bi trebalo proširiti na dodatna CpG mjesta te uključiti veći broj uzoraka.

Ključne riječi: *GMNN*; *EZH2*; DLBCL; pirosekvenciranje; metilacija DNA.

11. Summary

Assay development for DNA methylation analysis of regulatory regions of genes *GMNN* and *EZH2* and their application in evaluation of diffuse large B-cell lymphoma subtypes

Mislav Acman and Vedran Vuković

Cancer research pointed to the importance of genes involved in replication and reestablishment of chromatin in oncogenesis. Gene dysfunction in tumours is often associated with epigenetic changes. The aim of this study was to analyse DNA methylation of regulatory regions of genes *GMNN* and *EZH2* in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Methylation assays were developed for the analysis of those regions at single CpG site resolution. Primers for PCR-amplification of bisulfite treated DNA fragments were designed. PCR conditions were optimized for the amplification of three and four fragments of regulatory region of *GMNN* and *EZH2*, respectively. Subsequently, optimal conditions for pyrosequencing were determined. Finally, one assay per gene was created. Newly developed assays were used in the analysis of diffuse large B-cell lymphoma subtypes. The results showed no statistically significant difference between the subtypes. Since the analysis covered only a small part of the regulatory regions of *GMNN* and *EZH2*, the study should be expanded to additional CpG sites and repeated on a larger group of patients.

Key words: *GMNN*; *EZH2*; DLBCL; pyrosequencing; DNA methylation.

12. Životopisi

Mislav Acman

Rođen sam 29. rujna 1993. u Zagrebu. Završio sam OŠ grofa Janka Draškovića nakon koje sam upisao V. gimnaziju. 2012. godine maturirao sam s odličnim uspjehom, što mi je omogućilo upis studija molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na kojem trenutno završavam preddiplomski studij.

Vedran Vuković

Rođen sam 1994. godine u Splitu. U Sinju sam završio osnovnu školu i gimnaziju. Tijekom školovanja pokazao sam interes prema prirodoslovnim predmetima i programiranju. 2012. godine upisao sam preddiplomski studij molekularne biologije na PMF-u u Zagrebu. Od prve godine upisujem dodatne kolegija sa studija kemije. U slobodno vrijeme bavim se, osim programiranja, popularizacijom znanosti kroz članke i predavanja za srednjoškolce te proučavanjem povijesti znanosti.