

HRZZ istraživački projekt (IP-06-2016): Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa (epiSem)

ISPITANICI

U istraživanje je u periodu od 2018. do 2021. godine, uključeno 29 ispitanika koji su zbog sumnje na tumor testisa (TT) bili podvrgnuti orhidektomiji u Klinikama za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice, a kojima je nakon histopatološke analize bio utvrđen SE testisa. Također, u istraživanje su uključena i 24 zdrava dobrovoljca koji su regrutirani iz opće zdrave populacije, većinom studentske.

Svim pacijentima je prije orhidektomije uzet komplet uzoraka krvi i ejakulata koji su označeni kao predoperativni uzorci krvi i ejakulata. Ključni kriterij bila je sumnja na TT prema kliničkom protokolu za procjenu bolesnika na potencijalne TT koji uključuje nalaz čvrste opipljive mase unutar skrotuma, nalaz ultrazvuka o intratestikularnoj masi s ili bez povišenih serumskih biljega (AFP, HCG, LDH). Isključni kriterij je bila svaka histopatološka dijagnoza koja nije uključivala čistu formu SE testisa. Pacijentima sa SE testisa prije uzimanja bilo kakve terapije, uzeti su postoperativni uzorci krvi i ejakulata, osam dana do tri mjeseca nakon operacije prilikom kontrolnog pregleda u Klinici za urologiju KBC-a Zagreb i KBC-a Sestre milosrdnice.

Za potrebe istraživanja, 24 zdravih dobrovoljaca sudjelovalo je u okviru kontrolne skupine za analizu metilacije cfDNA i analizu varijacije broja kopija gena. Svi su uzorci upareni, odnosno uzeti su uzorci krvi i uzorci ejakulata istog dobrovoljca.

Kako bi se osiguralo da u svakoj skupini bude najmanje 24 uzorka usprkos očekivanom ispadanju iz studije, u istraživanje je uključeno 29 pacijenata. Ukupno je prikupljeno 96 bioloških uzoraka. Od toga 48 predoperativne i postoperativne krvi 29 pacijenata, 48 predoperativnog i postoperativnog ejakulata 24 pacijenata. Ukupno je u istraživanju prikupljeno 20 kompletiranih uzoraka krvi i 24 kompletirana uzorka ejakulata (kompletirani uzorak predstavlja biološke uzorke pacijenta od kojeg su sustavno prikupljeni i predoperativni i postoperativni uzorci određenog tekućeg tkiva). Od navedenih prikupljenih kompletiranih uzoraka, 16 ih je upareno (upareni uzorak predstavlja biološke uzorke istog pacijenta od kojeg su sustavno prikupljeni i predoperativni i postoperativni uzorci i krvi i ejakulata).

Analiza metilacije DNA provedena je na uzorcima tkiva, krvi i ejakulata dok je analiza varijacije broja kopija gena provedena na uzorcima tkiva i ejakulata.

METODE

Imunohistokemijsko bojenje i morfometrijska analiza

Ekspresija na razini proteina gena od interesa istražena je metodom imunohistokemije nakon koje je uslijedila morfometrijska analiza koja je provedena od strane patologa.

Predmetna stakla s parafinskim rezovima SE i okolnim tkivom (OT), debljine 3 µm inkubirana su u termostatu na 55 °C, 60 minuta. Uslijedila je deparafinizacija u padajućem nizu etanola. Otvaranje antigena (engl. antigen retrieval) postignuto je 30-minutnom inkubacijom na 99 °C u Tris-EDTA puferu (pH 9) ili u citratnom puferu (pH 6). Nakon inkubacije uslijedilo je hlađenje u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi te ispiranje u Tris puferiranoj fiziološkoj otopini (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) u trajanju od 5 minuta. Stakla su izvađena iz pufera. Na stakla je prvo nanesen 5 % goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se spriječilo

nespecifično vezanje protutijela. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi, BSA je uklonjen i nanoseno je primarno protutijelo (Tablica 1) koje je razrijeđeno u otopini TBS-a (0.1 % Tween 20, 1 % BSA). Stakla s nanesenim primarnim protutijelom stavljena su na +4 °C preko noći. Sljedeći dan, uzorci su isprani u TBS-u (5x po 5 minuta na miješalici). Nakon toga, na rezove je nanosena vodena otopina s 3 % H₂O₂ te su rezovi ostavljeni u mraku na 20 minuta na sobnoj temperaturi radi inaktivacije endogenih peroksidaza. Zatim su stakla 3 puta ispirana u TBS-u nakon čega je na njih nanosena otopina sekundarnog protutijela (Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) i TBS-a u omjeru 1:1. Stakla su bila inkubirana sa sekundarnim protutijelom 60 minuta na 37 °C, nakon čega je opet uslijedilo ispranje u TBS-u, 3 puta po 5 minuta. Na stakla je nanosena 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB, Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent Technologies, Njemačka) u trajanju od 6 minuta, radi vizualizacije reakcije antigen-protutijelo. Suvišak DAB-a uklonjen je 5-minutnim ispiranjem destiliranom vodom. Sa svrhom dobivanja kontrastnog bojanja, stakla su obojana hemalaunom (BioGnost, Hrvatska) u trajanju od 10 sekundi pa isprana destiliranom vodom i vodom iz slavine pod mlazom u trajanju od 8 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je uslijedilo završno ispiranje u destiliranoj vodi od 5 minuta, nakon čega je slijedilo dehidriranje u rastućem nizu alkohola. Naposljetku, tkiva su zaštićena smolom (BioMount DPX Low, BioGnost, Hrvatska) i pokrovnim staklom. Prilikom svake serije imunohistokemijskog bojenja korištene su odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Morfološka analiza imunohistokemijskih preparata provedena je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa marke Olympus, model Bx51 spojenog s digitalnom kamerom, od strane dva iskusna, nezavisna patologa. Citoplazmatsko, smeđe obojenje smatralo se pozitivnom reakcijom. Reakcija je analizirana pod vidnim povećanjem mikroskopa x400. Postotak imunoreaktivnih stanica određen je: 0 (nema signala), 1 (1-10 % pozitivnih stanica), 2 (>10-25 % pozitivnih stanica), 3 (>25-50 % pozitivnih stanica), 4 (>50-75 % pozitivnih) i 5 (> 75 % pozitivnih stanica). Intenzitet reakcije je opisan kao 0 (nema reakcije), 1 (blaga reakcija), 2 (umjerena reakcija) ili 3 (snažna reakcija). Ekspresija RASSF1A na razini proteina izražena je semikvantitativno kao imunoreaktivni indeks (engl. immunoreactivity score, IRS) koji je jednak umnošku vrijednosti imunoreaktivnih stanica i intenziteta reakcije, čime je dobivena skala od 0 do 15.

Tablica 1. Uvjeti za imunohistokemiju. Prikaz antitijela korištenih za otkrivanje relevantnih proteina gena od interesa, njihovi kataloški brojevi, proizvođači, korišteno razrjeđivanje, HIER protokol, informacije o sekundarnim antitijelima, lokalizacija reakcije i informacije o pozitivnim i negativnim kontrolama.

Antibody	cat number	Manufacturer	dilution	HIER	Secondary	Reaction localization	Positive control	Negative control
Anti-RASSF1A	HPA040735	Atlas Antibodies	1:225	pH9 Tris-EDTA	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	cytoplasmic	colon	/
Anti-Nanog	AMAb91393	Atlas Antibodies	1:500	pH6 citrate buffer	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	nuclear	seminoma	colon
Anti-KITLG	HPA070395	Atlas Antibodies	1:500	pH9 Tris-EDTA	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	cytoplasmic	prostate cancer	colon
Anti-PRSS21	HPA008477	Atlas Antibodies	1:150	pH6 citrate buffer	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	cytoplasmic	testis	pancreas
Anti-MAGEC2	HPA062230	Atlas Antibodies	1:500	pH6 citrate buffer	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	nuclear	testis	liver
Anti-SOX17	ab224637	Abcam	1:1000	pH9 Tris-EDTA	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	nuclear	seminoma	liver
Anti-Anti-OCT4	ab109183	Abcam	1:750	pH6 citrate buffer	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	nuclear	seminoma	/
Anti-CD117	A4502	Dako	1:100	En Vision Flex-Target retrieval solution, high Ph	REAL EnVision Detection System, HRP/DAB, Rabbit/Mouse	membraneous	seminoma	spleen

Izolacija DNA

DNA je izolirana iz tkiva seminoma (gDNA) koje je skupljeno tijekom orhidektomije i iz tekućih biopsija, krvi i ejakulata (cfDNA) prije i poslije operacije.

Iz tkiva seminoma priređeni su rezovi tkiva i 5 rezova debljine 10 μm iz kojih je izolirana gDNA. Nakon deparafinizacije rezova, uslijedila je homogenizacija i digestija tkiva. Zatim, isoljavanjem proteina dobio se supernatant u kojem se nalazila gDNA. Dodavanjem izopropanola dolazi do precipitacije DNA. Nastali talog DNA ispiri se etanolom nakon čega slijedi dekantiranje, isparavanje ostataka etanola i u konačnici otapanje DNA taloga u autoklaviranoj vodi.

Iz krvne i sjemene plazme dobivene dvostrukim centrifugiranjem izolirana je cfDNA uz pomoć NucleoSnap cfDNA kit (Macherey-Nagel, Njemačka) i QIAvac 24 Plus vakuum stanice (Qiagen, Njemačka). Početni volumen krvne plazme bio je 6 mL, a sjemene plazme između 0,5 mL i 3 mL, prosjek je bio 1,5 mL.

DNA iz referentne stanične linije seminoma TCam-2 dobivena je od prof. dr. sc. LH Looijenge.

Pirosekvenciranje

Analiza metilacije DNA gena od interesa napravljena je metodom pirosekvenciranja. Nakon izolacije gDNA i cfDNA napravljena je bisulfitna konverzija. Naime, kako bi pirosekvenciranjem bila analizirana samo metilirana mjesta, nemetilirani citozini morali su se metodom bisulfitne konverzije pretvoriti u uracile. Ta konverzija napravljena je komercijalnim kitom EpiTect[®] Bisulfite Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Za umnažanje željenih fragmenata gena od interesa koristila se PCR (eng. *polymerase chain reaction*) metoda. Početnice za umnažanje željenih fragmenata ili su dizajnirane u PyroMark Software ili su uzete iz literature. Sekvence korištenih početnica kao i uvjeti nalaze se u tablici 2.

Za pirosekvenciranje PCR produkta bisulfitno konvertirane DNA, koristio se pirosekvencer Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Njemačka) i kemikalije PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Njemačka).

U računalnom programu PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen, Njemačka) napravljeni su eseji za pirosekvenciranje gena od interesa čime je utvrđen redosljed dodavanja nukleotida u reakcijsku smjesu s obzirom na sekvencu koja se analizira. Nakon završetka pirosekvenciranja, dobiveni su pirogrami koji grafički prikazuju metilaciju DNA gena od interesa svih analiziranih CpG -ova u svakom pojedinačnom uzorku. Za svaki analizirani CpG dobiven je postotak metilacije. Sama kvaliteta rezultata procijenjena je na temelju kontrole bisulfitne konverzije, negativnih kontrola i amplitude dobivenih pikova.

Tablica 2. Prikaz korištenih početnica za PCR i pirosekvenciranje, njihovih sekvenci i uvjeta.

Gene	Primer	Sequence	bp	temp source	cycle nb.
<i>KIT</i>	F	AAGGATTTATTATGAGATTGTGGGTAA	164	55°C	45
	R	BIOT- CCCCAATAATAATTTCTCTACCTCTATA			
	SEQ	GGTATTTTTTGGGTAGTG			
<i>KITLG</i>	F	ATGTTTTAGAAGTTTGGTAGATTAGG	182	55°C	45
	R	BIOT- AAATACCAAATAAACCCCAAC			
	SEQ	AGTTTGGTAGATTAGGTTAA			
<i>MAGEC2</i>	F	TAGTAGGGAGTGGTTTGGTGTA	193	56°C	45
	R	BIOT- CCCCAAATATACAATTTTCTAACTCC			
	SEQ	GTGGTTTGGTGTAGT			
<i>PRSS21</i>	F	GTAGATAAGAAAGGGATTGTG	128	55°C	45
	R	BIOT- CCCAAAACTATTTAAACCTCTCAT			
	SEQ	GGATTGTGGGGTTTA			
<i>SOX17</i>	F	BIOT- GGGGGTAGGTGTAGTTTTG	164	55°C	45
	R	AAACCTTTTCTACACAAATATAAC			
	SEQ	TTTCTACACAAATATAACCAATAA			
<i>POU5F1</i>	F	TGGTATTGTGTTTTAGGGGTTA	113	56°C	45
	R	BIOT- AACAACTAACCATTATACTTATAACT			
	SEQ	TAGTTTTTTAAATTTATTGAATG			
<i>NANOG</i>	F	TATTGGGATTATAGGGGTGGGTTA	143	56°C	45
	R	BIOT-CCCAACAACAAATACTTCTAAATTCAC			
	SEQ	ATAGGGGTGGGTTAT			
<i>RASSF1A</i>	F	AGTTTGGATTTTGGGGGAGG	136	65°C	45
	R	BIOT-CAACTCAATAAACTCAAACCTCCCC			
	SEQ	GGGTTAGTTTTGTGGTTT			

Određivanje varijacije kopija gena (CNV)

Varijacije kopije gena (CNV) analizirane su na gDNA iz tumorskog tkiva, na cfDNA iz ejakulata pacijenata i zdravih dobrovoljaca te na DNA iz referente stanične linije seminoma. Za analizu CNV-a korišten je digital droplet PCR (ddPCR) na Bio-Rad QX200TM Droplet Digital PCR sustav koji omogućava visoko preciznu, apsolutnu kvantifikaciju niskog broja kopija gena; predstavljajući bolju platformu za analizu broja kopija od Q-PCR-a. Primeri za ciljane gene bili su komercijalni ili dizajnirani (Tablica 3). Kao referentni gen korišten je *AP3B1*. Primeri za ciljane sekvence obilježeni su fluorescentnom bojom reporter FAM, a referentni primeri s HEX. Ukratko, glavna mješavina za ddPCR uključivala je ddPCR Supermix ili EvaGreen Supermix (Bio-Rad), restrikcijske enzime (Bio-Rad), primere za ciljane sekvence, referentne primere, H₂O bez RNaze i uzorak DNA. Dvadeset (20) μ L svake ddPCR mješavine i sedamdeset (70) μ L ulja za generiranje kapljica Droplet Generation Oil for Probes ili ddPCR Droplet

Generation Oil for EvaGreen (Bio-Rad) ubačeno je u DG8 Gasket za jednokratnu upotrebu (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). DG8 Gasket je postavljen unutar QX200 generatora kapljica (Bio-Rad). U generatoru kapljica QX200 svaki uzorak podijeljen je na 20 000 kapljica veličine nanolitara, a ciljne sekvence su nasumično raspoređene u kapljice. Nakon stvaranja kapljica, kapljice su pažljivo prebačene na ddPCR ploču (BioRad), toplinski zapečaćene u PX1 PCR Plate Sealer-u (Bio-Rad) s aluminijskom folijom koja se može probiti (Bio-Rad). PCR amplifikacija je izvedena na CFX96 Deep Well PCR thermal cycler (BioRad). U svaki PCR uključena je negativna kontrola. Nakon PCR reakcije ploča je prenesena i očitana pomoću QX200 čitača (Bio-Rad). Prag za ciljne gene i *AP3B1* primijenjen je na temelju negativne kontrole. Vrijednosti broja kopija za ciljne gene naknadno su dobivene iz omjera koncentracije ciljne molekule i višestruke koncentracije molekule *AP3B1* prema broju kopija *AP3B1* u genomu.

Tablica 3. Prikaz korištenih početnica za određivanje CNV-a pomoću ddPCR-a.

gene	primer	Sequence of the in-house assay	temp.	nm. of cycles
<i>KITLG</i>	F	5'- GCGGGACTTGGGTCTCATTT- 3'	57.5	40
	R	5'- TCTGGAGCCATGCAAATGGT- 3'		
gene	Commercial assay ID		temp.	nm. of cycles
<i>RASSF1A</i>	dHsaCNS143255910		57.5	40
<i>NANOG</i>	dHsaCNS193219338		57.5	40
<i>MAGEC2</i>	dHsaCNS241647353		57.5	40

REZULTATI

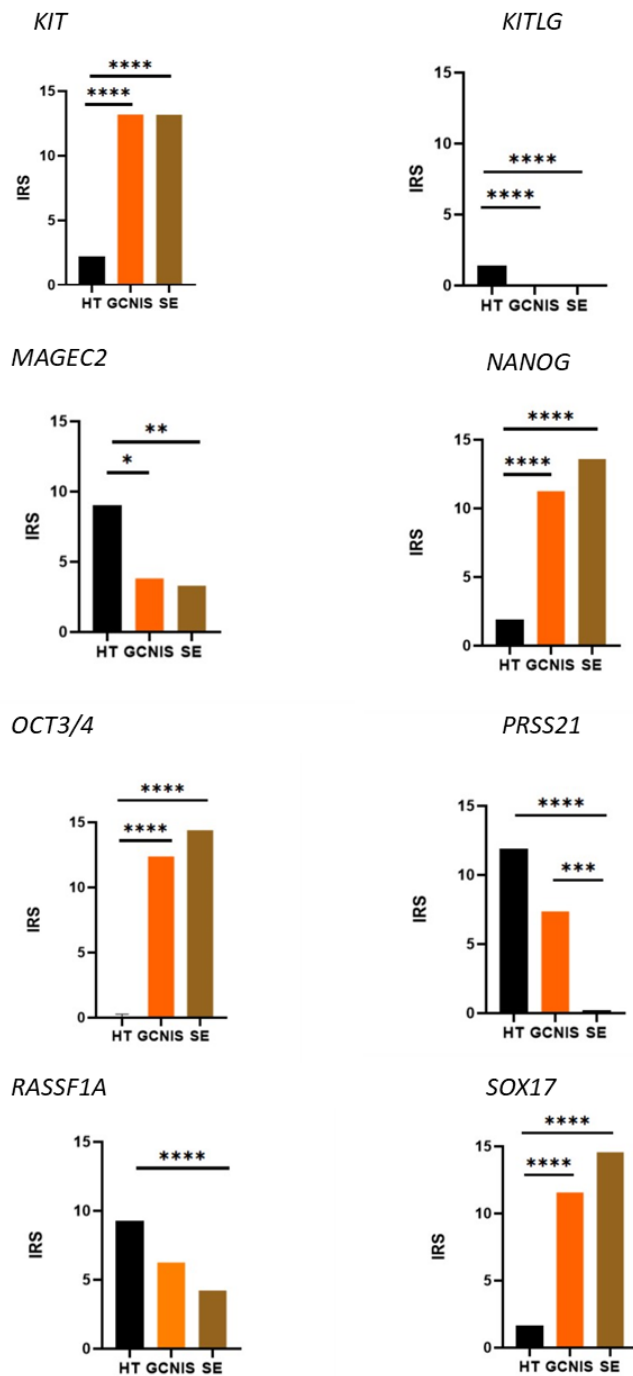
Analiza ekspresije na proteinskoj razini gena od interesa

Uzlazni trend proteinske ekspresije od HT, GCNIS pa do SE primijećen je za gene *KIT*, *NANOG*, *OCT3/4* i *SOX17*. Za ostale gene od interesa *KITLG*, *MAGEC2*, *PRSS21* i *RASSF1A* proteinska ekspresija je od HT prema SE je imala silazni trend.

Statistička analiza proteinske ekspresije u HT i GCNIS-u gena od interesa otkrila je statistički značajno povišenu proteinsku ekspresiju u GCNIS-u s obzirom na HT za gene *KIT*, *NANOG*, *OCT3/4* i *SOX17*. Proteinska ekspresija *MAGEC2*, *PRSS21* i *RASSF1A* bila je statistički značajno niža u GCNIS-u nego u HT. U slučaju *KITLG*, proteinska ekspresija nije detektirana ni u GCNIS- u ni u SE

Statistička analiza proteinske ekspresije u HT i SE otkrila je statistički značajno povišenu ekspresiju u SE u odnosu HT za gene *KIT*, *NANOG*, *OCT3/4* i *SOX17*, dok je ekspresija *MAGEC2*, *PRSS21* i *RASSF1A* bila statistički značajno niža u SE nego u HT.

Statistički značajna razlika u ekspresiji na proteinskoj razini između SE i GCNIS-a detektirana je samo jedan gen od interesa, *PRSS21*, čija ekspresija na proteinskoj razini nije detektirana u SE.

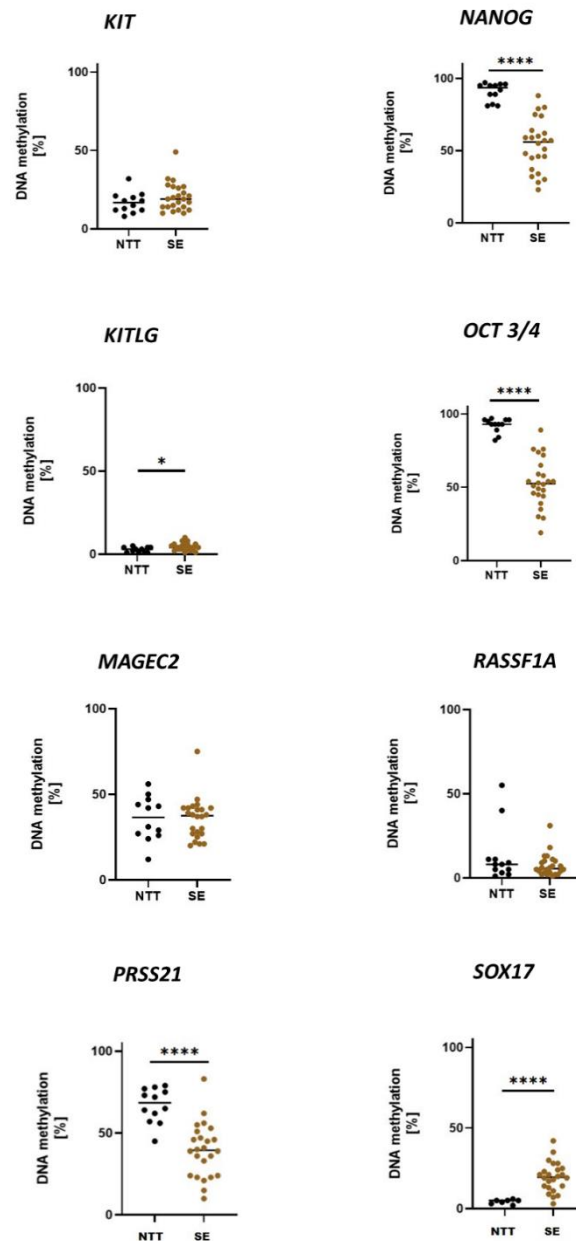


Slika 1. Grafički prikaz rezultata proteinske ekspresije gena od interesa u sjemenim kanalićima s očuvanom spermatogenezom (HT), premalignoj leziji (GCNIS) i tkivu seminoma (SE). Analiza ekspresije proteina gena od interesa između HT, GCNIS i SE određena je semi-kvantitativnom IHC morfometrijom, korištenjem IRS. Statistički značajne razlike između ove tri komponente prikazane su s p-vrijednosti; $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,0002$ *** i $p < 0,0001$ ****. Diferencijalna ekspresija gena pronađena je u većini gena od interesa.

Analiza metilacije DNA gena od interesa

- **Metilacija gDNA iz tkiva**

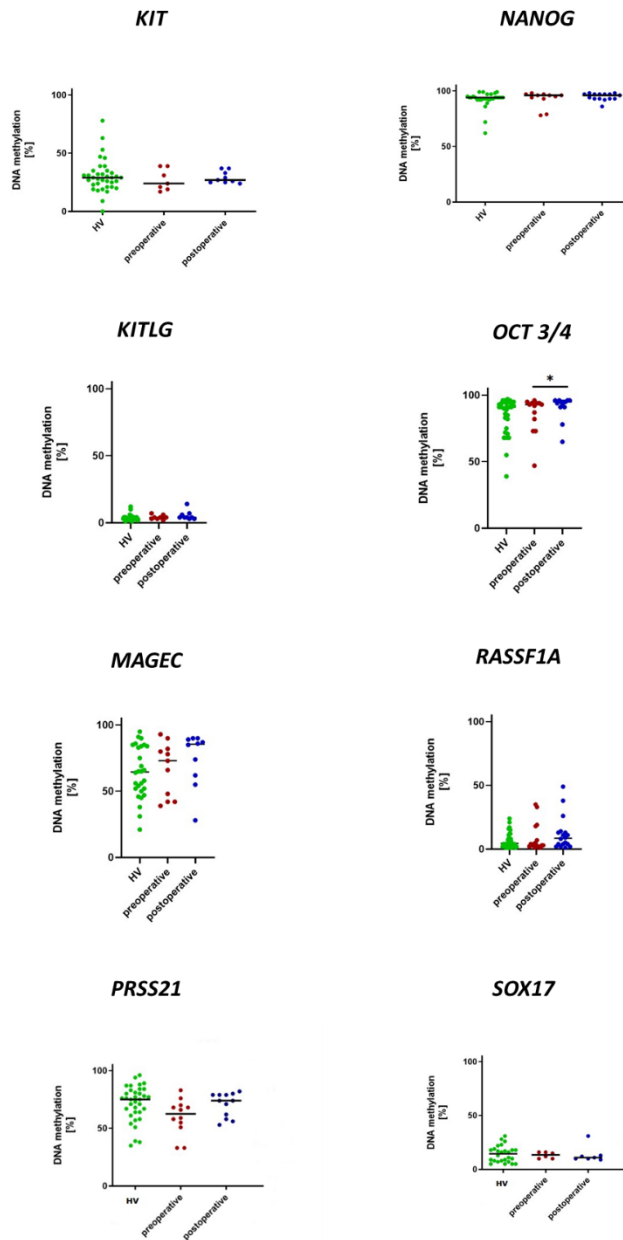
Analizom metilacije gDNA u netumorskom tkivu i tkivu seminoma detektirana je statistički značajna hipometiliranost gena *NANOG*, *OCT3/4* i *PRSS21* u uzorcima tkiva seminoma naspram netumorskog tkiva. Statistički značajna hipermetiliranost u tkivu seminoma detektirana je za gene *SOX17* i *KITLG* (Slika 2).



Slika 4. Metilacija DNA u netumorskom tkivu (NTT) i tkivu seminoma (SE). Statistički značajne razlike između skupina označene su kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. SE-seminom, STPS- sjemenski tubuli sa očuvanom spermatogenezom.

- **Metilacija cfDNA iz krvi**

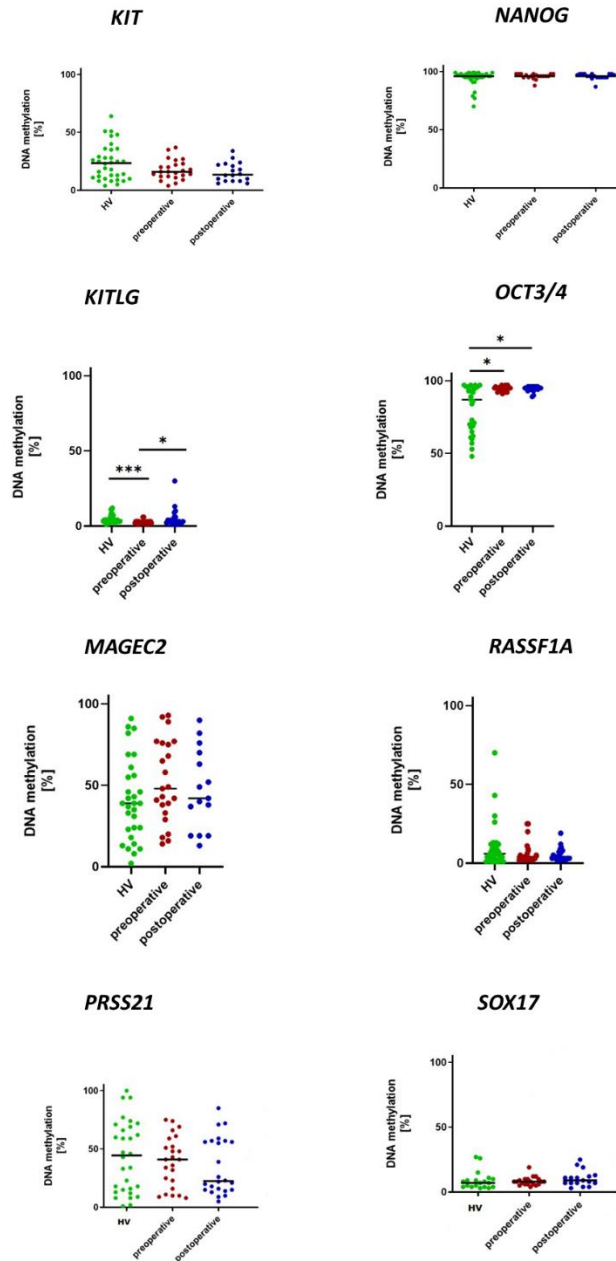
Statistički značajna razlika detektirana je samo za *OCT3/4* koji je bio hipometiliran u preoperativnim uzorcima pacijenata u odnosu na postoperativne uzorke.



Slika 5. Metilacija DNA u krvi zdravih dobrovoljaca, preoperativnim i postoperativnim uzorcima pacijenata. Statistički značajne razlike između skupina označene su kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. HV- zdravi dobrovoljci

- **Metilacija cfDNA iz ejakulata**

U uzorcima ejakulata statistički značajna razlika detektirana je za gen *KITLG* koji se statistički značajno razlikovao u uzorcima zdravih dobrovoljaca i preoperativnih uzoraka pacijenata kao i između preoperativnih i postoperativnih uzoraka pacijenata.

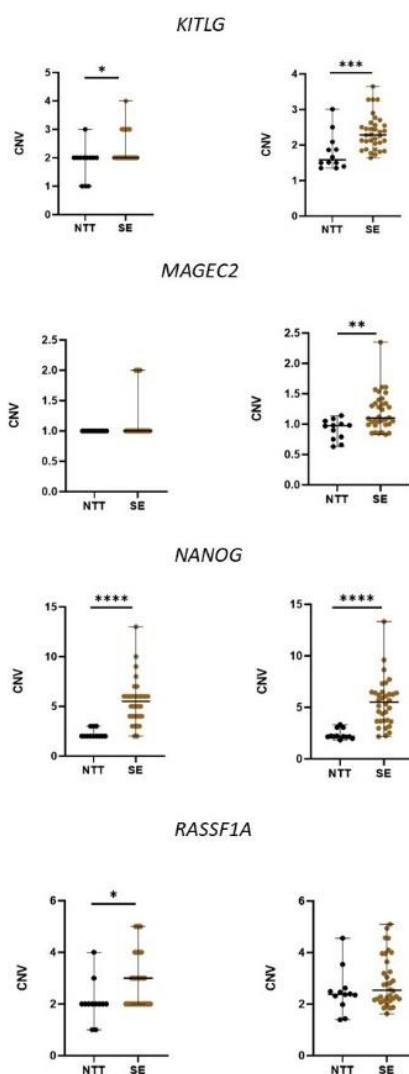


Slika 6. Metilacija DNA u ejakulatu zdravih dobrovoljaca, preoperativnim i postoperativnim uzorcima pacijenata. Statistički značajne razlike između skupina označene su kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. HV- zdravi dobrovoljci

Varijacije broja kopije gena (CNV)

Usporedba detektiranih CNV-a u netumorskom tkivu (NTT) i seminomu (SE) prikazana je na slici 5. Prikazani su sirovi podaci, kao i zaokruženi brojevi CNV-a. Razine CNV-a u odabranim genima nisu bile normalno raspoređene u ispitanika unutar iste skupine. Stoga su rezultati prikazani kvartilnim rasponom. Statistički značajna razlika u CNV između NTT i SE otkrivena je u svim analiziranim genima.

Analiza CNV-a pojedinog gena pokazala je da je statistički najznačajnija razlika između NTT i SE u CNV NANOG. U SE otkriveni CNV NANOG-a varirao je od CNV=3 (11,76%) do CNV=13 (2,93%). U većini uzoraka SE, CNV= 6 (32,35%), CNV=5 (14,71%) ili CNV=4 (14,71%). CNV =8;9;10 otkriven je u samo 2,94% SE. U slučaju KITLG, u 26,47% SE uzoraka detektiran je CNV=3, dok je u 2,94% otkriven CNV=4. Što se tiče RASSF1A, otkriven je CNV= 3 u 26,27%, CNV= 4 u 14,71%, a CNV= 5 u 11,76% SE uzoraka. Za MAGEC2, povećani CNV otkriven je u samo 17,65% SE (Slika 5).



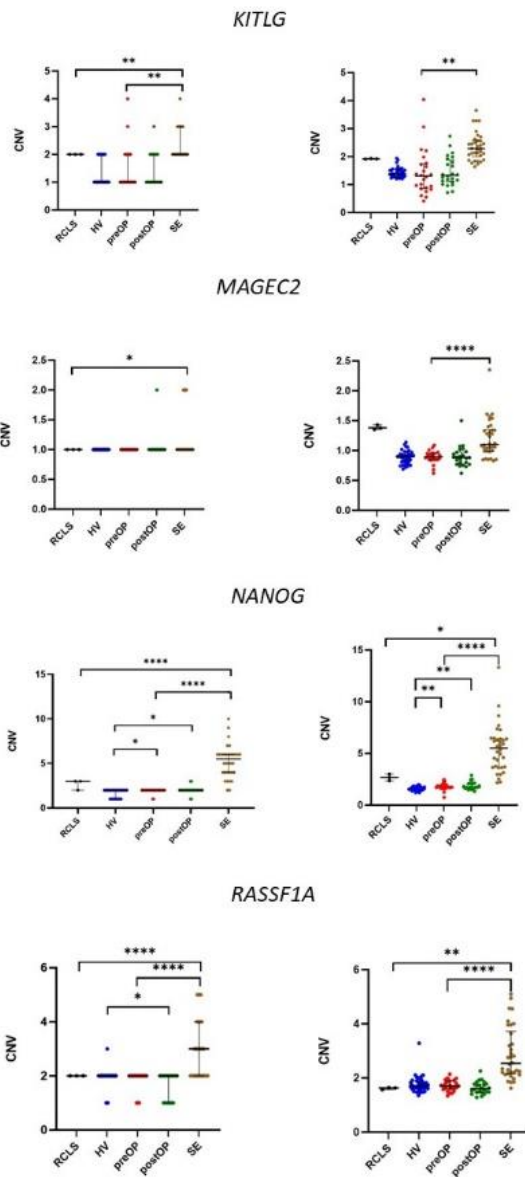
Slika 5. Varijacija broja kopija gena otkrivena u netumorskom (NTT) i seminomskom (SE) tkivu. Za svaki analizirani gen prikazan je zaokruženi broj CNV (lijevo) i sirovi podaci CNV-a (desno) otkrivenih u gDNA. Crne linije predstavljaju medijan s interkvartilnim rasponom. Statistički značajna razlika je naznačena kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$.

Uspoređujući podatke dobivene o cfDNA iz preoperativne sjemene plazme i gDNA iz SE tkiva, otkrivena je statistički značajna razlika CNV-a svih analiziranih gena, osim za *MAGEC2*. Povećanje broja kopija otkriveno je samo za *KITLG*, odnosno u 4,16% preoperativnih uzoraka CNV=3 ili CNV=4. Međutim, u slučaju *KITLG*-a otkriven je i gubitak broja kopija, odnosno u 62,5% preoperativnog uzorka CNV=1. Gubitak broja kopija također je uočen u preoperativnim uzorcima za *RASSF1A* (CNV=1 u 16,6%) i *NANOG* (CNV=1 u 8,33%), ali u manjem broju uzoraka nego za *KITLG*.

U cfDNA iz postoperativnih uzoraka sjemene plazme otkriven je aberantni CNV za sve analizirane gene, tj. *MAGEC2* (CNV=2 u 4,16%), *RASSF1A* (CNV=1 u 37,5%), *NANOG* (CNV=3 u 8,33%; CNV=1 u 8,33%), te u *KITLG* (CNV=1 u 62,5%; CNV=3 u 4,16%) u odnosu na SE gDNA.

Usporedbom CNV u cfDNA iz preoperativnih i postoperativnih uzoraka sjemene plazme dobiveni su sljedeći rezultati. CNV *NANOG*-a statistički se razlikovao između zdravih dobrovoljaca i preoperativnih uzoraka, dok za ostale gene razlike između ove dvije skupine nisu otkrivene. U usporedbi zdravih dobrovoljaca i postoperativnih uzoraka sjemene plazme, zamijećeno je značajno smanjenje CNV u postoperativnim uzorcima za *RASSF1A*, a dok je za *NANOG* otkriveno povećanje CNV-a. U usporedbi preoperativnih i postoperativnih uzoraka sjemene plazme, nije otkrivena razlika u CNV ni za jedan analizirani gen, ali je u postoperativnim uzorcima uočen trend smanjenja CNV svih odabranih gena.

U usporedbi CNV otkrivenog u referentnoj staničnoj liniji i SE tkivu, statistički značajno povećanje CNV u svim analiziranim genima otkriveno je u SE tkivu. Najveća razlika uočena je u slučaju *NANOG* i *RASSF1A* (Slika 6).



Slika 6. Varijacija broja kopija gena detektirana u gDNA iz referentne stanične linije seminoma (RCLS), cfDNA iz sjemene plazme i gDNA iz tkiva seminoma. Za svaki analizirani gen prikazan je zaokruženi broj CNV-a (lijevo) i sirovi podaci CNV-a (desno) otkrivenih u gDNA i cfDNA. Crne linije predstavljaju medijan s interkvartilnim rasponom. Statistički značajna razlika je naznačena kao *p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,0001 i ****p < 0,00001.

ZAKLJUČAK

U sklopu ovog projekta identificirani su potencijalni biomarkeri za probir i praćenje pacijenata sa seminomom testisa. Po prvi puta je ejakulat bio istražen u kontekstu izvora biomarkera. Također po prvi puta smo otkrili CNV određenih gena u tkivu seminoma i u ejakulatu.

DISEMINACIJA

Radovi (3):

1. Raos D, Krasic J, Masic S, Abramovic I, Coric M, Kruslin B, et al. In Search of TGCT Biomarkers: A Comprehensive In Silico and Histopathological Analysis. *Dis Markers*. 2020 Nov 6;2020:8841880. Available from: doi:10.1155/2020/8841880.

Financijer: HRZZ, epiSem

2. Raos D., Ulamec M., Katusic Bojanac A., Bulic-Jakus F., Jezek D. and Sincic N. (2020) "Epigenetically inactivated RASSF1A as a tumor biomarker", *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. doi: 10.17305/bjbms.2020.5219.

Financijer: CERRM i HRZZ, epiSem

3. Raos, D.; Abramović, I.; Tomić, M.; Vrtarić, A.; Kuliš, T.; Ćorić, M.; Ulamec, M.; Katušić Bojanac, A.; Ježek, D.; Sinčić, N. CNV Hotspots in Testicular Seminoma Tissue and Seminal Plasma. *Cancers* 2022, 14, 189. <https://doi.org/10.3390/cancers14010189>

Sažeci (12):

1. Mašić S, Raos D, Tomić M, Sinčić N, Ulamec M, Krušlin B. cfDNA methylation of NANOG as a potential screening biomarker in patients with testicular seminoma, 33rd European Congress of Pathology, Pathology: Compass for optimal patient therapy, Virtual, 2021
2. Raos D, Krasic J, Silvija Masic S, Coric M, Kruslin B, Katusic Bojanac A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Ulamec M, Sincic N, RASSF1A and PRSS21 as Future Diagnostic Biomarkers for Testicular Germ Cell Tumors, The 45th FEBS Congress, Ljubljana, 2021
3. Raos D, Krasic J, Silvija Masic, Katušić Bojanac A, Bulić-Jakuš F, Ježek D, Ulamec M, Sinčić N. Tumor suppressor genes RASSF1A and PRSS21 as Future Biomarkers for Testicular Germ Cell Tumors, EACR 2021 Virtual Congress - Innovative Cancer Science: Better Outcomes Through Research, 2021.
4. Raos D, Krasic J; Silvija M; Cori M; Kruslin B; Katusic Bojanac A; Bulic-Jakus F; Jezek D; Ulamec M; Sincic N, RASSF1A, MGMT, and PRSS21 as Future Diagnostic Tool for Testicular Germ Cell Tumors, ETW 2021 Workshop - Virtual Edition, 2021
5. D. Raos, J. Krasic, S. Masic, M. Coric, B. Kruslin, A. Katušić Bojanac, F. Bulić Jakuš, D. Ježek, M. Ulamec, N. Sinčić. MAGEC2 as a biomarker for testicular germ cell tumors. *International Congress of Andrology, Münster, 5-9 December, 2020; J Reproduktionsmed Endokrinol* 2020; 17 (Supplementum 1), p. 56

6. Raos D, Krasic J, Masic S, Coric M, Kruslin B, Katusic Bojanac A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Ulamec M, Sincic N. Analysis of protein expression – possible panel for TGCT diagnostics. Book of Abstracts Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology „Crossroads at Life Sciences“, p.111, 2019 Sep 25-28; Lovran, Croatia, <http://www.hdbmb2019.imi.hr/>
7. Raos D, Masic S, Katusic Bojanac A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Ulamec M, Sincic N. Expression of Sox17 and OCT 3/4 in testicular seminoma. Book of Abstracts of 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, p. 345, 2019 Jun 16-20; Split, Croatia, <https://isabs.hr/>
8. Raos D, Masic S, Katusic Bojanac A, Tomic M, Bulic-Jakus F, Jezek D, Tomaskovic I, Ulamec M, Sincic N. Comparison of the expression of c-KIT and OCT 3/4 in the testicular seminoma. Final program and Book of Abstracts of 27th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, p. 44, 2019 May-Jun 31-1; Zagreb, Croatia,
9. Raos D, Masic S, Katusic Bojanac A, Tomic M, Bulic-Jakus F, Jezek D, Tomaskovic I, Sincic N, Ulamec M. Immunohistochemical study: could SOX17 gene be new biomarker for testicular seminoma? Abstract Book of Centre of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine (CERRM) of 3rd Andrology Symposium, p. 57, 2019 Jun 6th; Zagreb, Croatia, <https://mef.unizg.hr/simpozij-3rd-andrology-symposium>
10. Raos D, Masic S, Katusic Bojanac A, Tomic M, Bulic-Jakus F, Jezek D, Tomaskovic I, Sincic N, Ulamec M. Comparative analysis of OCT 3/4 and c-KIT in the testicular seminoma. Abstract Book of Centre of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine (CERRM) of 3rd Andrology Symposium, p. 59, 2019 Jun 6th; Zagreb, Croatia, <https://mef.unizg.hr/simpozij-3rd-andrology-symposium>
11. Raos D, Masic S, Katusic Bojanac A, Bulic-Jakus F, Jezek D, Ulamec M, Sincic N. Expression of KIT gene in testicular seminoma. Abstract Book of Centre of Excellence for Reproductive and Regenerative Medicine (CERRM) of Nikola Škreb Symposium: “New platforms in developmental biology – towards the clinical application“ Book of Abstracts, p.32, 2018 Nov 29-30; Zagreb, Croatia, <https://hrcak.srce.hr/226223>
12. Raos D, Milošević M, Krasić J, Tomić M, Kuliš T, Katušić Bojanac, Tomašković I, Bulić-Jakuš F, Ježek D^{3,6}, Ulamec M^{3,4,7}, Sinčić N^{1,3} Comparison of epidemiological data in a patient with testicular tumors and healthy volunteers, HDIR-5, Zagreb, 2018.

Stipendije (2)

1. HDBMB Bursary za The 45th FEBS Congress, Ljubljana, 2021
2. Grants of the DGA (“Deutsche Gesellschaft für Andrologie”) and ISA society (“International Society for Andrology”) za International Congress of Andrology, Münster, 5-9 December, Munster