

Uloga epigenetike u razvoju bolesti na primjeru karcinoma

Stanec, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:180600>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Valerija Stanec

**Uloga epigenetike u razvoju bolesti na
primjeru karcinoma**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Valerija Stanec

**The role of epigenetics in disease
development with a focus on cancer**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom Prof. dr. sc. Mirjane Pavlica.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Uloga epigenetike u razvoju bolesti na primjeru karcinoma

Valerija Stanec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Epigenetika je znanost koja proučava nasljedne promjene u funkciji gena uzrokovane promjenom ekspresije i nastale pod utjecajem epigenetskih mehanizama. Epigenetski mehanizmi uključuju metilaciju DNA (hipometilacija, hipermetilacija), histonske modifikacije (acetilacija, metilacija) i nekodirajuće RNA te su reverzibilni. Aberantna regulacija tih mehanizama može uzrokovati pojavu karcinoma, bolesti kod koje dolazi do nekontrolirane proliferacije stanica. Karcinom se razvija posljedično nakupljanju brojnih epigenetskih i genskih promjena. Zahvaljujući reverzibilnosti epigenetskih modifikacija razvijaju se nove vrste lijekova koje bi se koristile uz već dostupne oblike terapija čime se cilja na poboljšanje ishoda liječenja. Kao detaljniji primjer opsega epigenetskih modifikacija koje se mogu javiti prilikom nastanka specifičnog tipa karcinoma opisan je karcinom dojke.

Ključne riječi: karcinom, metilacija DNA, modifikacije histona, nekodirajuće RNA
(19 stranica, 3 slike, 1 tablica, 18 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The role of epigenetics in disease development with a focus on cancer

Valerija Stanec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epigenetics is a branch of science focused on studying heritable alterations in genes caused by changes of expression and driven by epigenetic mechanisms. Epigenetic mechanisms include DNA methylation (hypomethylation, hypermethylation), histone modifications (acetylation, methylation) and non-coding RNAs all of which are reversible modifications. Aberrant regulation of these mechanisms can cause cancer occurrence. Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation and caused by an accumulation of epigenetic and genetic faults. New kinds of potential therapies revolving around the reversal of epigenetic modifications are investigated and are hoped to be used alongside existing therapies to better treatment outcome. For a more detailed look into the extent to which epigenetic modifications occur in a cancer, an example is given describing the breast cancer.

Keywords: cancer, DNA methylation, histone modification, non-coding RNA
(19 pages, 3 figures, 1 table, 18 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 2. Epigenetski mehanizmi | 2 |
| 2.1. Metilacija DNA | 2 |
| 2.1.1. Hipometilacija DNA | 4 |
| 2.1.2. Hipermetilacija DNA | 4 |
| 2.2. Modifikacije histona | 5 |
| 2.2.1. Acetilacija histona | 5 |
| 2.2.2. Fosforilacija histona | 6 |
| 2.2.3. Metilacija histona | 6 |
| 2.2. Nekodirajuće RNA | 7 |
| 3. Epigenetski mehanizmi u karcinogenezi | 9 |
| 3.1. Mikrokoliš tumora | 12 |
| 3.2. Epigenetska terapija karcinoma | 13 |
| 3.3. Karcinom dojke | 13 |
| 4. Zaključak | 16 |
| 5. Literatura | 17 |
| 6. Životopis | 19 |

1. Uvod

Epigenetika je znanost koja se bavi proučavanjem promjena u funkciji gena koje su nasljedne, a nisu posljedica promjena DNA-sekvence već promjena ekspresije gena ovisne o stanju kromatina i interakciji s proteinskim kompleksima (Bennett i Licht 2018). Genom svakog organizma je podložan mnogim promjenama i modifikacijama tokom života koje rezultiraju različitim epigenetskim stanjima. Skup epigenetskih modifikacija neke stanice u određenom trenutku naziva se epigenomom (Klug i sur. 2019).

Ako u stanicama dođe do promjena u genima koji reguliraju epigenetske procese javljaju se promjene oblika kromatina, metilacije DNA ili modifikacija histona. Takvi događaji često pogoduju razvoju raznih vrsta karcinoma u ljudi (Bennett i Licht 2018). Proučavanja metilacije DNA i ekspresije gena su prva ukazala na povezanost epigenetike i razvoja karcinoma (Dawson i Kouzarides 2012). Karcinom je bolest koja se razvija kao posljedica akumulacije epigenetskih i genetskih promjena (Virani i sur. 2012). Karakterizirana je poremećajima u ekspresiji i aberantnim funkcijama gena, promjenama u putevima vezanim uz rast i diferencijaciju matičnih stanica (Jones i Baylin 2007) te izmijenjenoj regulaciji staničnog ciklusa (Sher i sur. 2022). Stanice karcinoma mogu proliferirati i metastazirati odnosno nekontrolirano se dijeliti te se s vremenom proširiti u druge dijelove tijela i stvarati sekundarne tumore. Svojim rastom stvaraju tumore koji mogu biti benigni i maligni. Razlika koja dijeli maligne od benignih tumora je mogućnost metastaziranja zbog čega je takve tumore često teže liječiti (Klug i sur. 2019).

Ovaj završni rad je osvrt na glavne mehanizme uključene u regulaciju epigenoma te opisuje primjere slučajeva u kojima promjene epigenetskih mehanizama vode karcinogenezi.

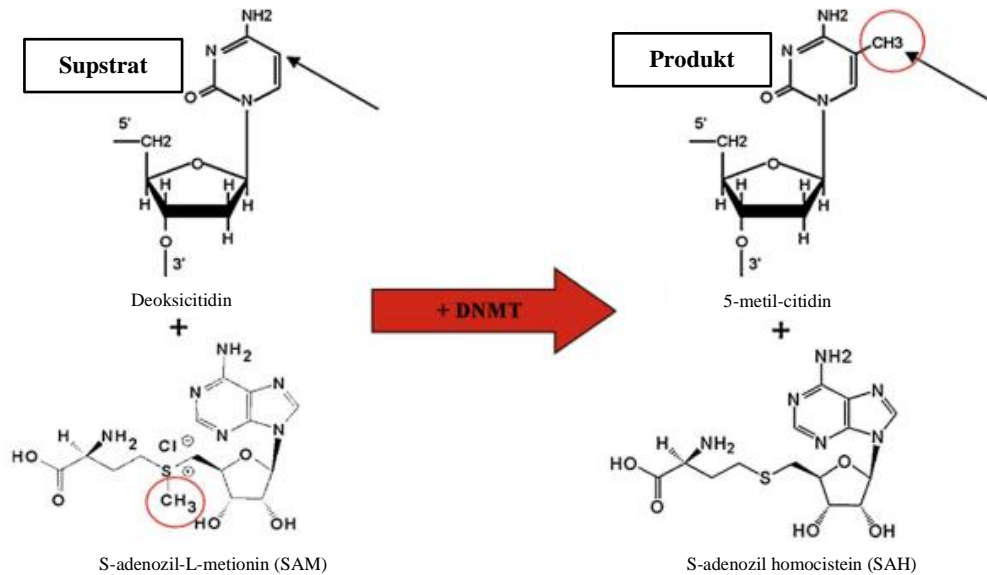
2. Epigenetski mehanizmi

Epigenom svake stanice je specifičan i podložan raznim promjenama tijekom životnog ciklusa te stanice. Tri glavne skupine promjena kojima podliježe epigenom stanice su: nekodirajuće molekule RNA koje služe regulaciji ekspresije pojedinih gena, metilacija DNA i modifikacije histona kojima se mijenja struktura kromatina (Klug i sur. 2019). Epigenetske mehanizme provode proteini nazvani čitači, pisaci i brisači. Čitači prepoznaju neku epigenetsku oznaku, pisaci kataliziraju dodatak neke oznake na histon ili DNA, a suprotno njima brisači uklanjaju takve oznake. Ovi procesi su stoga reverzibilni (Bennett i Licht 2018).

2.1. Metilacija DNA

Metilacija gena eukariotskih stanica se javlja kao česti mehanizam regulacije ekspresije (aktivacije/inaktivacije) gena. Prisutna je tijekom procesa inaktivacije kromosoma X, za vrijeme embrionalnog razvoja te prilikom utišavanja ekspresije gena kao i njihove pravovremene aktivacije u različitim stadijima razvoja (Fardi i sur. 2018). U stanicama sisavaca do metilacije dolazi za vrijeme diferencijacije stanica te nakon replikacije DNA. Ovisno o uvjetima u kojima se stanice nalaze, dolazi do promjena u metilomu, setovima nukleotida DNA metiliranih u određenom vremenskom periodu. Svako tkivo i stanica imaju vlastiti metilom (Klug i sur. 2019).

Dodatkom metilne skupine na peti ugljikov atom citozina nastaje 5-metilcitozin (5mC) (Slika 1). S obzirom na položaj 5mC, unutar velikog utora dvolančane uzvojnice DNA, dolazi do otežanog vezanja transkripcijskih faktora što posljedično sprječava ekspresiju gena. Ekspresija je također spriječena posebnim metiliranim DNA-vezujućim proteinima (Virani i sur. 2012). Takvi proteini sudjeluju u modifikacijama histona i doprinose promjeni konfiguracije kromatina kojom se suprimira ekspresija gena. Metilaciju kataliziraju enzimi DNA-metiltransferaze (DNMT) (Lu i sur. 2020).



Slika 1. Metilacija citozina (preuzeto i prilagođeno iz Jovanovic i sur. 2010).

Do metilacije DNA dolazi na citozinu koji prethodi gvaninu (CpG). CpG dinukleotidi su većinom asocirani u strukture nazvane CpG-otocima koji su smješteni unutar promotora gena, u blizini mjesta na kojem počinje transkripcija. CpG-otoci izvan opisane regije i dinukleotidi koji se nalaze u pojačivačima (engl. *enhancers*) gena ili unutar gena također mogu biti metilirani i utjecati na ekspresiju (Bennett i Licht 2018). CpG-otoci većinom nisu metilirani u velikoj mjeri uz neke iznimke: utišani geni ženskog X-kromosom te utišani autosomni geni čiji su CpG-otoci u potpunosti metilirani (Verma i Srivastava 2002).

Suprotno metilaciji javlja se demetilacija tj. micanje metilne skupine sa citozina. Demetilacija, pasivna ili aktivna, zajedno s metilacijom sudjeluje u regulaciji ekspresije gena. Pasivna demetilacija je izostanak metilacije tijekom replikacije DNA. Suprotno tome, aktivnu demetilaciju karakterizira neovisnost o replikaciji i uklanjanje metilne skupine s već metiliranog citozina. Demetilacija nije nužno prisutna samo kod određenih lokusa već se može događati bilo gdje unutar genoma (Klug i sur. 2019). Geni prethodno utišani metiltransferazama mogu se ponovno aktivirati demetilacijom. Reakciju kataliziraju TET metil-citozin-dioksigenaze (engl. *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) (Lu i sur. 2020).

Poremećaji opisanog procesa povezani su s razvojem raznih bolesti (mišićna distrofija, kongenitalne abnormalnosti, lupus te karcinomi) (Fardi i sur. 2018).

2.1.1. Hipometilacija DNA

Hipometilacija (Slika 2) utječe na smanjenje metilacije zajedno s demetilacijom. Odvija se na ponavljajućim DNA-sekvencama (CpG-otoci). Ovakav nedostatak metilacije može pogodovati preraspodjeli kromosoma i mitotskoj rekombinaciji kojom dolazi do translokacija i delecija. Dodatni poremećaji u genomu mogu biti izazvani translokacijama i transkripcijama transpozona nastalih reaktivacijom, odnosno hipometilacijom, intragenomske endoparazitske DNA malignih stanica. Hipometilacija također remeti normalno utiskivanje gena (engl. *imprinting*) koje može pratiti i pojava bolesti (Esteller 2008). Utiskivanje gena je regulacija do koje dolazi za vrijeme gametogeneze i predstavlja metilaciju specifičnih alela male skupine gena kojom se osigurava normalan razvoj organizma. Ovisno o ekspriiranom alelu, utisnuti geni se dijele na majčinske i očinske. Gubitak utiskivanja je česta pojava u ljudskim tumorima (Jelinic i Shaw 2007).

2.1.2. Hipermetilacija DNA

Pojačana ekspresija DNMT-a uzrokuje hipermetilaciju DNA. DNMT su donori metilne skupine citozinu pri čemu sudjeluje njih tri: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Uloga DNMT1 je usklađivanje uzorka metilacije novonastalih lanaca DNA nakon semikonzervativne replikacije sa roditeljskim lancem te oblikovanje heterokromatina i utišavanje gena vezanjem histonske deacetilaze. Uspostavljanje uzorka metilacije tijekom razvoja stanica germinacijske linije te za vrijeme embriogeneze omogućuju DNMT3a i DNMT3b. Pojačana ekspresija navedenih enzima često se javlja prilikom razvoja tumora gdje njihovim međudjelovanjem dolazi do *de novo* metilacija unutar tumorskih stanica. Onkogeni transkripcijski faktori stvaraju komplekse s DNMT1 i DNMT3b te tako induciraju *de novo* metilaciju CpG-otoka u promotorima gena (Virani i sur. 2012). Hipermetilacija CpG-otoka unutar promotora jedna je od pojava vezanih uz nastanak karcinoma. Takva promjena može utjecati na gene bitne za životni ciklus stanice, apoptozu, međustanične interakcije, metabolizam karcinogena, angiogenezu i popravke DNA (Esteller 2008). Utišavanjem ekspresije tumor-supresorskih gena preko hipermetilacije CpG-otoka omogućen je razvitak tumora. Akumulacijama grešaka ili utišavanjem nizvodnih elemenata u slučaju hipermetilacije transkripcijskih faktora i gena za popravak DNA također može doći do tumorigeneze (Virani i sur. 2012).

2.2. Modifikacije histona

Histoni su vrlo bazični proteini uz pomoć kojih se pakira DNA u kromatin (Fardi i sur. 2018). Promjene u konfiguraciji kromatina i modifikacije histona ključni su događaji koji kontroliraju transkripciju DNA omogućavajući ili sprječavajući pristup specifičnim proteinima. DNA se u stanicama organizira omatanjem oko oktamerne histonske jezgare pri čemu nastaju nukleosomi, daljnjom kondenzacijom i namatanjem stvara se kromatin te kromosomi. Tako oformljena struktura ne dopušta početak transkripcije (Klug i sur. 2019). Postoje dvije vrste kromatina, heterokromatin i eukromatin. Eukromatin čini slabije kondenzirani kromatin u kojem su prisutni aktivni geni, a heterokromatin je jače kondenzirani oblik te većinom sadrži inaktivne gene (Bennett i Licht 2018).

Histonske oktamerne jezgre sastoje se od četiri histona: H2A, H2B, H3 i H4. Jedna jezgra sadrži tetramer od po dva histona H2A i H2B te dva dimera H3 i H4 (Lu i sur. 2020). Svaki histon ima rep, sačinjen od aminokiselina, koji se nalazi izvan strukture nukleosoma na N-terminalnom kraju (Klug i sur. 2019). Histonski rep i globularni C-terminalni kraj su mjesta odvijanja posttranslacijskih modifikacija. Te modifikacije na specifičnim aminokiselinama uključuju acetilaciju, metilaciju, citrulinaciju, ADP ribozilaciju, biotilaciju i SUMOilaciju. Najproučavanije modifikacije su acetilacija i metilacija lizina na histonima H3 i H4 (Lu i sur. 2020).

Mnogi procesi unutar jezgre (organizacija kromosoma, DNA-replikacija i popravak, transkripcija gena) su pod utjecajem acetilacija i metilacija histona (Estler 2008).

2.2.1. Acetilacija histona

Regulacija histona acetilacijom je pod utjecajem histonskih acetiltransferaza (HAT) te histonskih deacetilaza (HDAC). HAT-enzimi vežu acetilnu skupinu na lizin i time neutraliziraju njegov pozitivan naboj. Promjenom naboja slabi veza DNA i histona te na tom mjestu dolazi do razmatanja DNA. Suprotno djelovanju HAT-ova, HDAC enzimi uklanjaju acetilnu skupinu vezanu na lizin što doprinosi stabilnosti kromatinske strukture (Slika 2) (Fardi i sur. 2018). Deacetilacija je povezana sa supresijom, a acetilacija sa aktivacijom gena. Acetiltransferaze se dijele na tip A i tip B. B-HAT acetiliraju tek translirane H3 i H4 histone koji se ne nalaze unutar strukture nukleosoma. Unutar jezgre se nalaze A-HAT koje acetiliraju jezgrine proteine i histone unutar kromatina te su dodatno podijeljene u skupine: koaktivatori

steroidnih receptora, transkripcijski koaktivatori, Gcn5, p300/CBP i MYST. Deacetilaze se dijele u skupine I, II, III i IV (Bennett i Licht 2018).

Kada dođe do poremećaja aktivnosti acetiltransferaza i deacetilaza javlja se abnormalan fenotip kromatina. Tako promijenjeni kromatin pogoduje pojavi pogrešnih obrazaca supresije i aktivacije gena koje mogu uzrokovati nastanak karcinoma (Virani i sur. 2012).

2.2.2. Fosforilacija histona

Fosforilacija je modifikacija koja se odvija djelovanjem kinaza i fosfataza koje dodaju fosfatnu skupinu ili ju uklanjaju s treonina, serina i tirozina na histonskim repovima. Dodatkom fosfatne skupine raste negativni naboj histona. Nastali naboj utječe na strukturu kromatina. Malo se zna o točnoj ulozi ove modifikacije (Fardi i sur. 2018).

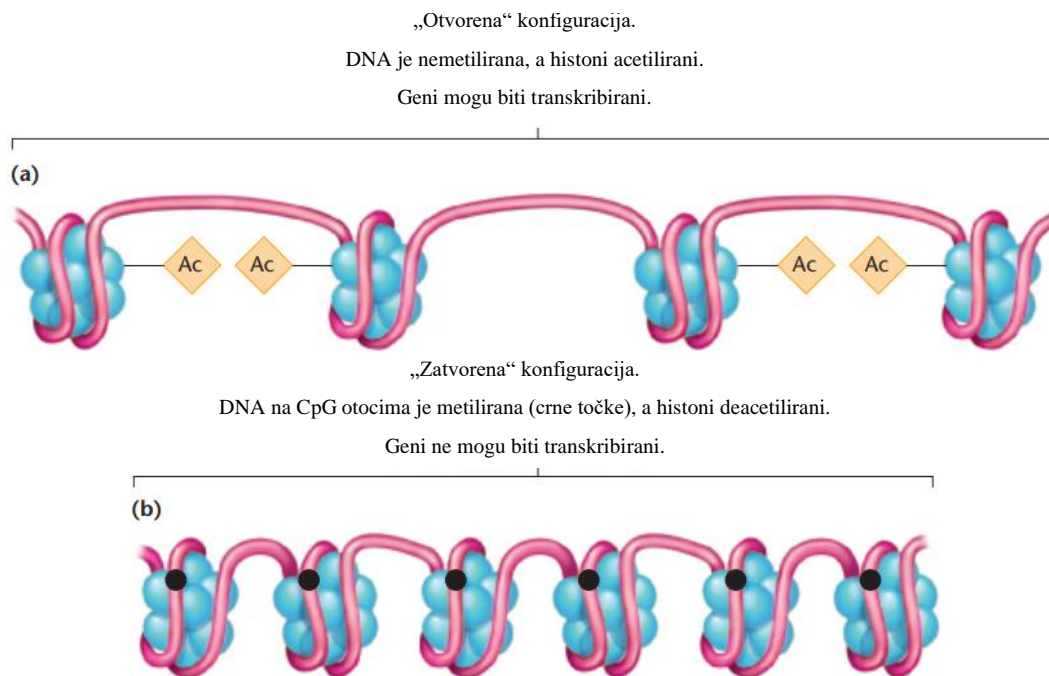
2.2.3. Metilacija histona

Metilacija histona H3 i H4 događa se na lizinskim (K) i argininskim (L) ostacima dodatkom metilne skupine pomoću prolin-arginin-metil-transferaza (PRMT) i lizin-metil-transferaza (KMT). Na lizin mogu biti vezane do tri metilne skupine dok na arginin najviše dvije. Suprotno fosforilaciji i acetilaciji, metilacija ne uzrokuje promjenu naboja histona već dolazi do promjene afiniteta za transkripcijske faktore. Posljedica metilacije ovisi o aminokiselinskom ostatku na kojem se odvija te može aktivirati transkripciju gena ili ju inhibirati (Slika 2). Primjerice, metilacijom lizina na histonu H3 odnosno metilacijom H3K9, H3K27 i H4K20 transkripcija se inhibira, a metilacijom H3K4, H3K36 i H3K79 transkripcija se aktivira. Razlike u broju provedenih metilacija također uvjetuju različite aktivnosti transkripcije, tako pri trostrukoj metilaciji H3K9 transkripcija nije moguća dok pri jednostrukoj je (Fardi i sur. 2018). Još jedan primjer je metilacija H3K4. Na mjestima početka transkripcije koja su aktivna ili pauzirana, H3K4 sadrži trostruko metiliran lizin (H3K4me3), a unutar aktivnih pojačivača gena se nalazi jednostruko metiliran lizin (H3K4me1) (Bennett i Licht 2018).

Metiltransferaza lizina bitna u održavanju matičnih stanica te diferencijaciji je EZH2. EZH2 katalizira trostruku metilaciju H3K27 kojom nastaje H3K27me3. H3K27me3 je prisutan prilikom utišavanja gena vezanih uz diferencijaciju matičnih stanica i razvoj stanica općenito. U zdravim stanicama metilacija je kontrolirana preko EZH2 u međudjelovanju s DNA-

metiltransferazama dok u stanicama karcinoma H3K27me3 inhibira ekspresiju pojedinih gena bez obzira na stanje metilacije njihovih promotora. U mnogim karcinomima se javlja pojačana ekspresija EZH2 (Virani i sur. 2012). Takva aktivnost uzrokuje utišavanje tumor-supresorskih gena (Fardi i sur. 2018).

Transkripcijska aktivnost nastala metilacijom može se inaktivirati histonskim demetilazama (Lu i sur. 2020).



Slika 2. Utjecaj metilacije i acetilacije histona na strukturu kromatina (preuzeto i prilagođeno iz Klug i sur. 2019).

2.3. Nekodirajuće RNA

Nekodirajuće RNA ili ncRNA (engl. *noncoding RNA*) su sekvence RNA dobivene transkripcijom DNA koje se ne prevode u proteine već imaju bitne uloge u epigenetskim regulacijskim putevima, metilaciji DNA, utišavanju gena, formaciji heterokromatina i histonskim modifikacijama (Klug i sur. 2019). Te se regulatorne sekvence dijele prema broju nukleotida na duge (više od 200 nukleotida) i kratke (manje od 200 nukleotida) te čine više od 70 % ljudskog genoma (Lu i sur. 2020).

Duge nekodirajuće RNA (lncRNA, engl. *long noncoding RNA*) strukturno slične molekuli mRNA uz izostanak otvorenog okvira čitanja (ne dolazi do translacije mRNA u

polipeptid). Ovisno o susjednom genu postoje antisens, dvosmjerni (bidirekcionalni), intergenski i intronski lncRNA lokusi. Nekoliko je mehanizama koji objašnjavaju ponašanje lncRNA unutar genoma. Vežanje lncRNA na transkripcijski faktor sprječava interakciju tog faktora i njegovog ciljanog gena. lncRNA mogu stvarati i RNA-proteinske komplekse vežanjem više proteina. Enzimski kompleksi koji sudjeluju u utišavanju gena promjenom strukture kromatina također mogu biti pod utjecajem lncRNA koja tada te komplekse vodi do ciljanih alela. Mijenjaju ekspresiju gena tako što upravljaju izmjenama u kromatinskoj strukturi putem interakcija sa specifičnim enzimima. Aktivne su prilikom regulacije ekspresije gena tijekom transkripcije ali i posttranskripcijski.

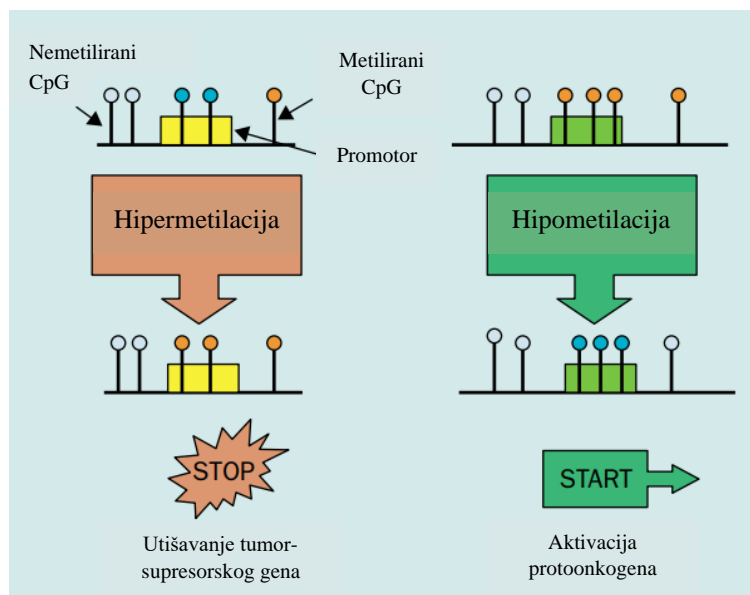
Kratke nekodirajuće RNA (sncRNA, engl. *small noncoding RNA*) se dodatno dijele na siRNA (engl. *small interfering RNA*), piRNA (engl. *piwi-interacting RNA*) i miRNA (engl. *microRNA*). piRNA djeluje u stanicama germinacijske linije utišavajući gene stvaranjem RNA-proteinskih kompleksa, a siRNA i miRNA također djeluju kao represori gena. Nastaju procesiranjem iz prekursora duljine 70 do 100 nukleotida u sekvencu od 20 do 25 ribonukleotida (Klug i sur. 2019).

Dobro opisana vrsta nekodirajućih RNA su miRNA koje pripadaju skupini sncRNA. Sekvenca koju nose je vrlo konzervirana i duljine oko 20 nukleotida. Mnogo ljudskih gena koji kodiraju proteine su pod njihovom regulacijom. Vežanjem na 3'-kraj ciljane mRNA sprječavaju translaciju i nastanak proteina te ovisno o ciljanom genu mogu imati ulogu tumor-supresora ili onko-miRNA (Lu i sur. 2020). Općenito je ekspresija miRNA izrazito bitna prilikom diferencijacije, proliferacije i apoptoze te je strogo regulirana. Kod zdravih i tumorskih tkiva otkrivene su razlike u ekspresiji miRNA (Esteller 2008).

Jedna od vrsta onkogene miRNA je miR-101. Smanjena ekspresija miR-101 je primijećena u nekoliko karcinoma kao uzrok pojačane ekspresije EZH2. Posljedično tome, ekspresija EZH2 doprinosi metilacijama unutar tumor-supresorskih gena (primjerice metilacija H3K27me3) što povećava šansu pojave karcinoma. Pri povećanoj ekspresiji miR-101 dolazi do suprotnog efekta, odnosno zaustavljanja rasta stanica karcinoma. Molekule miRNA mogu se koristiti kao biomarkeri u dijagnosticanju karcinoma, zatim pri utvrđivanju šansi preživljavanja pacijenta te za uvid u način na koji će karcinom utjecati na organizam i ponašati se tijekom liječenja (Fardi i sur. 2018).

3. Epigenetski mehanizmi u karcinogenezi

Karcinomi nastaju kao posljedica promjena u regulaciji gena uzrokovanoj epigenetskim mehanizmima. Tumori mogu biti opisani kao plastični i heterogeni. Njihov razvitak se objašnjava preko dva modela. Prvi model se odnosi na matične stanice karcinoma i smatra ih se izvorom onkogenih promjena, a drugi tzv. klonalni model se svodi na progresivno stjecanje onkogenih promjena kod stanica koje nisu matične stanice karcinoma (Lu i sur. 2020). Prema klonalnom modelu, sve stanice karcinoma nastale su iz jedne zajedničke stanice u kojoj se javio određen broj mutacija koje pogoduju razvoju karcinoma. Usprkos tome, sve stanice unutar nekog tumora nisu genetički jednake već dolazi do pojave subpopulacija stanica koje sadrže varijacije u mutacijama. Model matičnih stanica karcinoma predlaže da postoje stanice unutar tumora koje ne proliferiraju i one koje proliferiraju. Tumorske stanice koje proliferiraju nazivamo matičnim stanicama karcinoma (Klug i sur. 2019). Definiraju se kao skupina stanica unutar tumora koje imaju sposobnost diferencijacije, samoobnove te uzrokuju nastanak tumora (Yu i sur. 2012). Sudionici u početku nastanka karcinoma su supresije tumor-supresorskih gena i aktivacije onkogenata (Tablica 1), procesi koji se javljaju uslijed epigenetskih promjena u stanicama povezanih s metilacijom (Slika 3). Najčešće se javlja hipermetilacija CpG- otkoja u promotorima tumor-supresorskih gena iako uz to može biti prisutna i hipermetilacija nekih drugih gena ključnih za životni ciklus. Neki od primjera su tumor-supresorski geni CDKN2 i PTEN koji su hipermetilirani kod melanoma, gen SIX3 kod glioblastoma te gen RASSF10 čija hipermetilacija izaziva karcinom bubrega. Kod karcinoma prostate hipermetilacija se javlja na više mjesta. Hipermetiliran je promotor gena GSTP1 koji kodira za glutation S-transferazu pi kao i gena TIMPS, DAPK te CDKN2A koji kontroliraju apoptozu, stanični ciklus i metastaziranje stanica (Lu i sur. 2020). Moguće je odrediti stupnjeve metastaze te vrstu i podvrstu tumora ovisno o načinu metilacije CpG-otoka (Klug i sur. 2019).



Slika 3. Utjecaj metilacije na aktivnost gena kod karcinoma (preuzeto i prilagođeno iz Verma i Srivastava 2002).

Kod mnogih karcinoma nađene su i aberantne miRNA. Onko-miRNA utišavanju tumor-supresorske gene i često su pojačano eksprimirane, dok tumor-supresorske miRNA inhibiraju ekspresiju onkogeno. Postoje i miRNA koje obavljaju obje uloge, neke čak tijekom razvoja istog karcinoma. Takve su primjerice miR-181 čija je neujednačena ekspresija u tumorima dovela do pretpostavke da obavljaju funkciju tumor-supresorskih miRNA i onko-miRNA. Geni za članove skupine miR-181 se nalaze na različitim dijelovima kromosoma te podliježu različitim epigenetskim modifikacijama zbog čega se pretpostavlja da epigenetske modifikacije mogu općenito modificirati biogenezu miRNA (Lu i sur. 2020). Skupina miR-181 sadrži četiri člana: miR-181a, miR-181b, miR-181c i miR-181d. miR-181a-1 i miR-181b-1 nalaze se na kromosomu 1, miR-181a-2 i miR-181b-2 na kromosomu 9 te miR-181c i miR-181d na kromosomu 19 (Pop-Bica i sur. 2018). Poremećena regulacija modifikacije N6-metiladenozina (m6A) u procesiranju mRNA i primarnog transkripta miRNA (pri-miRNA) je često prisutna u karcinomima. Pisači METT3 i METT14, koji omogućuju translaciju određenih mRNA preko modifikacija m6A, su kod nekih tipova karcinoma nađeni u povećanim količinama. Do ukidanja funkcije miRNA može doći kad se na njih vežu lncRNA ili circRNA (engl. *circular RNA*).

Poremećaji u modifikacijama histona također su jedan od razloga nastanka karcinoma. Modifikacije histona povezane su s djelovanjem nekodirajućih RNA i abnormalnom

metilacijom DNA pa čak i s drugim modifikacijama histona. Primjerice, kod multiplog mijeloma pojačana metilacija H3K36me2 uzrokuje pojačanu acetilaciju H3K27ac (Lu i sur. 2020). Unutar stanica karcinoma dolazi do poremećaja ekspresije gena koji kodiraju za enzime acetilaze, metiltransferaze, deacetilaze i demetilaze. Također su prisutne promjene u regulacijama enzima čitača, pisača i brisača. Sve navedene komponente utječu na promjene strukture kromatina čineći promotore gena dostupnima transkripcijskoj mašineriji ili sprječavajući početak transkripcije. U procesu transformacije stanice u tumorsku jedan od prvih koraka je promjena u deacetilaciji histona. Mutirani DNA-vezujući proteini vode histonske deacetilazne komplekse u područje tumor-supresorskih gena, kromatin se na tim mjestima jače kondenzira što sprječava transkripciju i doprinosi razvitku maligne tumorske stanice (Klug i sur. 2019). Zabilježeno je da histonske deacetilaze (HDAC) iz skupine I (1, 2, 3, 8) i skupine II (4, 5, 6, 7, 9) sudjeluju u tumorigenezi. Enzimi tipa A-HAT su uključeni u neke mutacije i translokacije nađene u čvrstim tumorima i hematološkim zloćudnim bolestima. Kod leiomioma i leiomiosarkoma je često pojačana ekspresija Hat-1 koja je također povezana s težim preživljavanjem osoba s navedenim karcinomima. Pojačana ekspresija demetilaze LSD1 prisutna je u nekolicini karcinoma. Djeluje na način da sprječava transkripciju demetilacijom H3K4me1/2. Pojačana ekspresija enzima PRMT je također često zamijećena kod karcinoma. Enzim PRMT5 (engl. *protein arginine N-methyltransferase 5*) je primjerice pojačano eksprimiran kod karcinoma prostate, glioblastoma, limfoma i leukemije gdje aktivira onkogene transkripcijske faktore od kojih je jedan c-Myc. Kod karcinoma pluća, NSCLC (eng. *non-small-cell lung carcinoma*) dolazi do pojačane ekspresije PRMT1 i PRMT4 (Bennett i Licht 2018).

Pacijentima koji boluju od karcinoma moguće je odrediti prognozu bolesti analizom hipermetiloma DNA i tumor-supresorskih gena te čak i potencijalno predvidjeti reakciju na liječenje (Esteller 2008).

Neki od uzroka pojave epigenetskih modifikacija su analozi baza, hormoni, stres, duhanski dim, radijacija, teški metali (nikal, kadmij, arsen), reaktivne molekule kisika i mnogi drugi spojevi (Verma i Srivastava 2002). S obzirom na učestalost abnormalnosti epigenetskih promjena nađenih u tumorima pretpostavlja se da su epigenetske promjene u tumorima zastupljenije od mutacija gena (Klug i sur. 2019).

Tablica 1. Geni koji pod utjecajem epigenetskih modifikacija sudjeluju u nastanku karcinoma
(Verma i Srivastava 2002)

| Vrsta karcinoma | Geni |
|------------------------|--|
| Dojka | p16, BRCA1, GSTP1, DAPK, CDH1, TIMP-3 |
| Mozak | p16, p14ARF, MGMT, TIMP-3 |
| Mjehur | p16, DAPK, APC |
| Debelo crijevo | p16, p14ARF, MGMT, hMLH1, DAPK, TIMP-3, APC |
| Jednjak | p16, p14ARF, GSTP1, CDH1, APC |
| Glava i vrat | p16, MGMT, DAPK |
| Bubrezi | p16, p14ARF, MGMT, GSTP1, TIMP-3, APC |
| Leukemija | p15, MGMT, DAPK1, CDH1, p73 |
| Jetra | p16, GSTP1, APC |
| Limfom | p16, p15, MGMT, DAPK, p73 |
| Pluća | p16, p14ARF, MGMT, GSTP1, DAPK, FHIT, TIMP-3, RARb, RASSF1A |
| Jajnici | p16, BRCA1, DAPK |
| Gušterača | p16, MGMT, APC |
| Želudac | p16, MGMT, APC |
| Maternica | p16, p14ARF, hMLH1 |

3.1. Mikrookoliš tumora

Mikrookoliš tumora čine imunosne stanice, stromalne stanice, citokini i izvanstanični matriks. Stanice unutar takvog okoliša izlučuju izvanstanične vezikule koje sadrže mRNA, nekodirajuće RNA te fragmente DNA zadužene za međustaničnu komunikaciju tijekom nastajanja niše tumora prije početka metastaziranja. Povezane su sa metastaziranjem i tranzicijom epitelnih stanica u mezenhimske (Lu i sur. 2020). Tranzicija epitelnih u mezenhimske stanice se odnosi na promjenu fenotipa koji obuhvaća pojačanu sposobnost

proizvodnje komponenata izvanstaničnog matriksa, migracije stanica i pojačanu otpornost na apoptozu (Kalluri i Weinberg 2009). Razvoju pogodnog mikrookoliša mogu doprinijeti miRNA translocirane u stanice koje se nalaze oko stanica karcinoma prenoseći im onkogene signale.

Proces karcinogeneze zahtjeva suprimirani imunosni okoliš. U mnogim karcinomima dolazi do epigenetske supresije kemokina koja sprječava dovođenje imunosnih stanica u mikrookoliš tumora. Djelovanje imunosnog sustava sprječava se i inhibicijom njegovih kontrolnih točaka. Kod karcinoma je indukcija proteina kontrolnih točaka pod epigenetskom kontrolom te se tim putem onesposobljava rad T-stanica. U promotorima gena za proteine nađeno je manje represivnih histonskih oznaka i metilacijskih oznaka DNA. Sadrže manje H3K9me3 i H3K27me3. Epigenetskoj regulaciji kontrolnih točaka doprinose i ncRNA (Lu i sur. 2020).

3.2. Epigenetska terapija karcinoma

Razvoj kvalitetnijeg liječenja kemoterapijom i radioterapijom nailazi na prepreke s obzirom na plastičnost i heterogenost karcinoma. Zbog takvih razlika je napredak u standardnoj terapiji za pacijente oboljele od karcinoma podosta ograničen i zahtjeva razvoj personalizirane terapije.

Epigenetske promjene su reverzibilne i podložne vanjskim faktorima što pruža mogućnost razvoja novih terapija za liječenje karcinoma. Kao potencijalni lijekovi javljaju se inhibitori enzima DNMT, HDAC, histonskih metiltransferaza i demetilaza. Lijekovi bazirani na miRNA, kao analozi miRNA i anti-miRNA, se također proučavaju kao potencijalna terapija. Korištenjem nekoliko epigenetskih lijekova ili kombinirajući ih s imunoterapijom i kemoterapijom u kliničkim istraživanjima postignut je napredak u suzbijanju tumora.

Razvoj nekih epigenetskih lijekova nailazi na probleme jer ti lijekovi ne djeluju samo na specifično ciljane mete te mogu izazvati neželjene modifikacije. Također, primijećen je razvoj rezistentnosti na neke od lijekova (Lu i sur. 2020).

3.3. Karcinom dojke

Najčešći karcinom kod žena je karcinom dojke. Razvija se pod utjecajem nekolicine epigenetskih modifikacija (Temian i sur. 2018). Povećani rizik pojave karcinoma dojke je povezan sa spolnim hormonima estrogenima. Rast tumora je također povezan s aktivnošću hormona pri čemu kod mnogih tipova tumora rast može biti stimuliran estrogenima (Jovanovic

i sur. 2010). Heterogenost karcinoma dojke je jedan od najčešćih čimbenika vezanih uz visoku smrtnost ove bolesti. Karcinom dojke je kategoriziran u pet podtipova ovisno o načinu ekspresije gena u koje se ubrajaju i proliferacijski indeks Ki-67, ekspresija epidermalnog receptora za faktor rasta HER2 te ekspresija hormonalnih receptora estrogena i progesterona (Sher i sur. 2022). Ki-67 je protein jezgre eksprimiran samo u stanicama koje proliferiraju te služi kao dobar pokazatelj stupnja proliferacije stanica karcinoma dojke (Dedić Plavetić i sur. 2015). Širenjem subpopulacije tumorskih stanica i zauzimanjem sekundarnih lokacija, metastaza i tranzicija epitelnih stanica postaju ireverzibilne (Temian i sur. 2018).

U stanicama karcinoma dojke prisutne su brojne promjene u metilaciji gena. Hipometilirani geni LDH, LIMD2, SEPTIN7 i TRIM27 povezani su s metastaziranjem, proliferacijom i širenjem bolesti (Sher i sur. 2022). Geni koji kodiraju za regulatore staničnog ciklusa CCND2 i p16^{ink4A}/CDKN2A su često metilirani (Jovanovic i sur. 2010), kao i tumor-supresorski geni SFN, APC, GSTP1, RARB i DAPK (Tang i sur. 2016). Tumor-supresorski geni BRCA1, BCL2 i RAS pri oslabljenoj aktivnosti zajedno s pojavom hipermetilacije potiču transformaciju stanica. Epigenetske modifikacije gena čiji su produkti antioksidansi, također se povezuju sa karcinomom dojke. Primjer je gen superoksid dismutaza 3 (SOD3) kojem se smanjuje aktivnost metilacijom promotora pri čemu se niža aktivnost ili njezin potpuni izostanak javlja kod agresivnijih podtipova ovog karcinoma. Hipometilacija široko rasprostranjena cijelim genomom se javlja kod karcinoma podtipa TNBC (engl. *triple-negative breast cancer*). Poremećena regulacija metilacije DNA je jedan od glavnih događaja koji vodi transformaciji mezenhimskih stanica u tumorske te je također važna za razvoj različitih obilježja matičnih stanica karcinoma. Poremećena regulacija metilacije na veznim mjestima određenih transkripcijskih faktora, kao što su SIN3A, OCT4, SOX2 i NANOG, uzrokuje nakupljanje cirkulirajućih tumorskih stanica u klastere. Takva aktivnost pogoduje napredovanju karcinoma i njegovom metastaziranju. Gen regulator u specijalizaciji stanica tijekom embrionalnog razvoja HOXC8 je također uključen u ekspresiju obilježja matičnih stanica karcinoma dojke do čega dolazi uslijed slabljenja njegove ekspresije (Sher i sur. 2022). Aberantna metilacija je često lokalizirana oko specifičnih klastera gena, unutar manjih regija genoma veličine nekoliko stotina kb te nije nasumična (Jovanovic i sur. 2010).

Metilacija DNA je zajedno s drugim mehanizmima značajno povezana s funkcijom ncRNA. Aberantna metilacija remeti regulaciju čak dvanaest ncRNA koji sudjeluju u razvoju karcinoma dojke (Sher i sur. 2022). Povećana ekspresija lncRNA HOTAIR je povezana s agresivnim rastom tumora djelujući na metilaciju histona H3K27 (Temian i sur. 2018). lncRNA

DANCR ima ulogu u tranziciji epitelnih stanica u mezenhimske te razvoju obilježja matičnih stanica u kasnijim fazama trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC) (Sher i sur. 2022). Inicijaciji metastaze potpomažu miRNA potičući tranziciju epitelnih stanica u mezenhimske (Temian i sur. 2018). Smatra se da miRNA potiču rast stanica karcinoma neovisno o prisutnosti estrogena te doprinose otpornosti na endokrinu terapiju.

Aktivnost histonske metiltransferaze EZH2 je povišena pogotovo kod agresivnijih tipova. Na razvoj karcinoma dojke utječe N6-metiladenozin (m6A) djelovanjem na gene koji reguliraju apoptozu. Takav je gen BNIP3 (tumor-supresorski gen i poticatelj apoptoze) koji pokreće nastanak karcinoma pod utjecajem pojačane ekspresije FTO (m6A demetilaza). Enzimi PRMT 1, 3, 5, 7 i 8 te DNMT, HKMT i KDM2A povezani su s nižim šansama preživljavanja (Sher i sur. 2022). Kompleks SWI/SNF koji sudjeluje u modeliranju kromatina (Temian i sur. 2018) poremećeno je reguliran prilikom pojačane ekspresije PRMT4, dok PRMT7 promovira tranziciju epitelnih stanica u mezenhimske inhibicijom ekspresije E-kadherina (Bennett i Licht 2018). Za rast i održavanje matičnih stanica karcinoma važna je histonska demetilaza KDM7A. U nastanku tumora je izražena i uloga acetilacije histona. Povezana je s moduliranjem i reprogramiranjem ekspresije gena uključenih u način razvoja bolesti. Primjerice, pojačana ekspresija histonskih deacetilaza HDAC1 i HDAC6 je povezana s razvojem blažih, a HDAC2 i HDAC3 s razvojem agresivnijih podtipova karcinoma. Općenito je ekspresija histonskih acetiltransferaza povezana s lošijom prognozom bolesti. Acetilacije lizina H3K18ac, H4K12ac i H3K9ac su zamijećene kod podtipova s lošijom kliničkom prognozom dok se hipoacetilacija H4K16ac povezuje s boljom prognozom. Također, metilacije arginina H4R3me2 te lizina H4K20me3 i H3K4me2 su povezane s lošijim ishodom bolesti (Sher i sur. 2022).

Jedan od većih izazova u liječenju težih slučajeva karcinoma dojke predstavlja otpornost na lijekove. Nestabilnost genoma, obnavljajuće matične stanice karcinoma, epigenetske promjene i mutacije, citokini, heterogenost, faktori rasta te mikrookoliš tumora djeluju na signalne puteve i doprinose varijacijama u metabolizmu te utječu na uspješnost djelovanja terapije. Istraživanja liječenja karcinoma dojke korištenjem kombinacije epigenetskih modifikatora te uz dodatnu uporabu imunoterapije, kemoterapije ili endokrine terapije pokazuju obećavajuće rezultate. Epigenetska terapija karcinoma dojke je još u ranim fazama razvoja te nije u kliničkoj uporabi (Sher i sur. 2022).

4. Zaključak

Pojava karcinoma uvjetovana je međudjelovanjem brojnih reverzibilnih epigenetskih promjena koje utječu na ekspresiju različitih gena. Promjene koje nastupaju uzrokuju izmjenu oblika kromatina i modifikacije DNA. Utišavanje tumor-supresorskih gena i ekspresija protoonkogeni te oblikovanje pogodnog mikrokoliša su bitni koraci koji vode uspješnom nastanku i daljnjem napretku karcinoma.

Reverzibilnost epigenetskih modifikacija omogućila je razvoj novih vrsta terapija u liječenju karcinoma. Korištenjem inhibitora pojedinih enzima koji provode epigenetske modifikacije pokušava se vratiti prvobitan zdravi oblik stanice. Utjecaj djelotvornosti epigenetske terapije se istražuje i u kombinaciji s već postojećim terapijama. No, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdila sigurnost i djelotvornost takvih lijekova.

5. Literatura

1. Bennett, R.L. and Licht, J.D., 2018. Targeting epigenetics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 58, 187-207.
2. Dawson, M.A. and Kouzarides, T., 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27.
3. Dedić Plavetić, N., Jakić-Razumović, J., Kulić, A., Sirotković-Skerlev, M., Barić, M., & Vrbanec, D. (2015). Prognostic value of ki-67 in breast carcinoma: tissue microarray method versus whole section analysis- potentials and pitfalls. *Pathology oncology research*, 21(2), 315–324.
4. Esteller, M., 2008. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159.
5. Fardi, M., Solali, S. and Hagh, M.F., 2018. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes & Diseases*, 5(4), 304-311.
6. Jelinic, P. and Shaw, P., 2007. Loss of imprinting and cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211(3), 261-268.
7. Jones, P.A. and Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
8. Jovanovic, J., Rønneberg, J.A., Tost, J. and Kristensen, V., 2010. The epigenetics of breast cancer. *Molecular oncology*, 4(3), 242-254.
9. Kalluri, R. and Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
10. Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., Killian, D. (2019). Concepts of genetics, Global Edition. Person, str. 471-491, 617-636.
11. Lu, Y., Chan, Y.T., Tan, H.Y., Li, S., Wang, N. and Feng, Y., 2020. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular cancer*, 19(1), 1-16.
12. Pop-Bica, C., Pintea, S., Cojocneanu-Petric, R., Del Sal, G., Piazza, S., Wu, Z.H., Alencar, A.J., Lossos, I.S., Berindan-Neagoe, I. and Calin, G.A., 2018. MiR-181 family-specific behavior in different cancers: a meta-analysis view. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 17-32.
13. Sher, G., Salman, N. A., Khan, A. Q., Prabhu, K. S., Raza, A., Kulinski, M., Dermime, S., Haris, M., Junejo, K., & Uddin, S., 2022. Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Seminars in cancer biology*, 83, 152–165.

14. Tang, Q., Cheng, J., Cao, X., Surowy, H. and Burwinkel, B., 2016. Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clinical epigenetics*, 8(1), 1-18.
15. Temian, D.C., Pop, L.A., Irimie, A.I. and Berindan-Neagoe, I., 2018. The epigenetics of triple-negative and basal-like breast cancer: current knowledge. *Journal of breast cancer*, 21(3), 233-243.
16. Verma, M. and Srivastava, S., 2002. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *The lancet oncology*, 3(12), 755-763.
17. Virani, S., Colacino, J.A., Kim, J.H. and Rozek, L.S., 2012. Cancer epigenetics: a brief review. *Ilar Journal*, 53(3-4), 359-369.
18. Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P. and Pestell, R.G., 2012. Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12), 2144-2151.

6. Životopis

Rođena sam 14.8.2000. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Bogumila Tonija 2015. godine u Samoboru. Maturirala sam 2019. godine u Gimnaziji Antuna Gustava Matoša u Samoboru te iste godine upisala studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Govorim engleski i njemački jezik.