

Epigenetske odrednice karcinoma

Udženija, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:090829>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Ana Udženija
0058220544

EPIGENSKE ODREDNICE KARCINOMA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biologija
Mentor: prof. dr. sc. Lidija Šver

Zagreb, 2023. godina

„ Sve bi da, da si tu, barem jedan tren da vičnost bude ...”

Ovaj rad posvećujem mojem anđelu i zvijezdi u mračnoj noći, mom djedu Stipi. Hvala na neizmjerljivoj ljubavi koja mi grije srce još i danas, i djetinjstvu iz bajke. Nadam se da me vidiš i da si ponosan.

Zahvaljujem Bogu na svim talentima i blagoslovima koje mi je dao tijekom studiranja. Zahvaljujem mojoj majki, koja mi je sve ovo omogućila, i najbitnije od svega, koja me naučila da sve u životu radim iz ljubavi i zbog ljubavi. Hvala joj što me odgojila da budem osoba kakva sam danas, i što je uvijek bila moja mirna luka u nemirnom moru. Zahvaljujem i Ninu, koji je prošao sa mnom svaki korak studiranja, koji mi je bio oslonac, prijatelj i kolega, i koji mi je pomogao da se dignem svaki put kad sam pala. Veliko hvala i mojoj mentorici, prof.dr.sc. Lidija Šver na svojoj pruženoj pomoći.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Epigenetske odrednice karcinoma

Ana Udženija, 0058220544

Sažetak:

Epigenetika je grana biologije koja proučava nasljedne promjene u ekspresiji gena bez promjena na DNA sekvenci. Epigenetske promjene ključne su za normalni razvoj i zdravlje, koje održavaju pomoću metilacije DNA, modifikacije histona i djelovanjem nekodirajućih RNA molekula. Epigenetski poremećaji imaju veliki utjecaj na razvoj karcinoma jer osiguravaju progresiju karcinoma utišavanjem ekspresije tumor-supresorskih gena i gena za popravak DNA te aktiviranjem ekspresije onkogenih gena. Epigenetski mehanizmi djeluju istovremeno, u kombinaciji jedni s drugima te u kombinaciji s genskim promjenama. Za razliku od genskih promjena, epigenetske promjene pružaju velik potencijal za razvijanje terapija, s obzirom na to da su reverzibilne.

Ključne riječi: epigenetika, karcinom, DNA metilacija, histonske modifikacije, nekodirajuće RNA

Rad sadrži: 26 stranica, 5 slika, 2 tablice, 33 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentorica: prof. dr. sc. Lidija Šver

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Epigenetic determinants of carcinoma

Ana Udženija, 0058220544

Abstract: Epigenetics is a branch of biology that studies heritable changes in gene expression made without changes in DNA sequence. Such changes are seen in e.g. normal development and health, which are maintained through DNA methylation, histone modifications, and the action of non-coding RNA molecules. Epigenetic disruptions have a significant impact on the carcinoma development, driving carcinoma progression by silencing the expression of tumor suppressor and DNA repair genes, while activating the expression of oncogenes. Epigenetic mechanisms act simultaneously, in combination with each other, and in conjunction with genetic alterations. Epigenetic alterations hold significant potential for therapeutic development because, unlike genetic alterations, they are reversible.

Keywords: epigenetic, cancer, DNA methylation, histone modification, non-coding RNA

Thesis contains: 26 pages, 5 figures, 2 tables, 34 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. Lidija Šver, PhD

Thesis defended: September 8, 2023

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. EPIGENETIKA	2
2.1.1. METILACIJA DNA	3
2.1.2. MODIFIKACIJE HISTONA	4
2.1.3. DJELOVANJE NEKODIRAJUĆIH RNA MOLEKULA	5
2.1.4. BOLESTI VEZANE UZ EPIGENSKE PROMJENE	6
2.2. KARCINOM.....	7
2.2.1. GENOM I EPIGENOM KARCINOMA	8
2.2.2. ULOGA METILACIJE DNA U KARCINOGENEZI	10
2.2.3. ULOGA HISTONSKIH MODIFIKACIJA U KARCINOGENEZI	14
2.2.4. ULOGA NEKODIRAJUĆIH RNA MOLEKULA U KARCINOGENEZI	17
2.2.5. TERAPIJA USMJERENA NA EPIGENETIKU	19
3.ZAKLJUČCI.....	23
4.POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

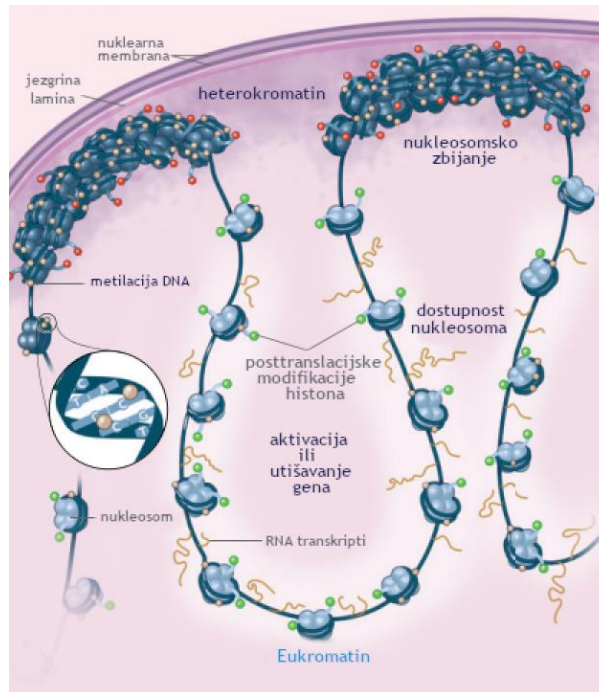
Pojam epigenetika podrazumijeva proučavanje nasljednih promjena u ekspresiji gena koje nisu praćene promjenama u DNA sekvenci (Jones i Baylin, 2007). Tijekom ranog razvoja, cijeli genom se preoblikuje epigenetskim modifikacijama poput metilacije DNA, modifikacije histona te djelovanjem nekodirajućih RNA molekula koje mijenjaju strukturu kromatina i pristupačnost DNA. Epigenetsko preoblikovanje nužno je za normalan razvoj, kao i održavanje specifičnih epigenetskih oznaka tijekom dijeljenja stanice (Costa i sur., 2023). Epigenetski mehanizmi omogućuju da tijelo ima različite stanice s različitim funkcijama, a samim tim i tkiva i organe, koji naposljetku tvore cjelokupni organizam, tako što istu DNA modificiraju na više različitih načina. Bolje rečeno, epigenetski mehanizmi će omogućiti da određeni gen bude eksprimiran u stanici kojoj je potreban tako što će promovirati nastajanje eukromatina, dok će isti taj gen u drugoj stanici, kojoj nije potreban, biti utišan tako što će epigenetske modifikacije promovirati nastajanje heterokromatina. Na taj način dobivaju se visoko diferencirane stanice, iz jedne DNA molekule. Mnoge ljudske bolesti, uključujući različite vrste raka, uzrokovane su epigenetskim promjenama (Samanta i sur., 2017). Ovaj rad će se osvrnuti na osnovne epigenetske mehanizme – metilaciju DNA, histonske modifikacije i utjecaj nekodirajućih RNA molekula, te će pružiti uvid u način na koji promjene ovih mehanizama utječu na razvoj raka, ali i uvid u razvoj terapija kojima je cilj suzbiti epigenetske promjene koje uzrokuju karcinogenezu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. EPIGENETIKA

Waddington (1942.) je opisao epigenetiku kao "granu biologije koja proučava uzročne interakcije između gena i njihovih proizvoda, koje dovode do stvaranja fenotipa". Danas se epigenetika definira kao istraživanje nasljednih i stabilnih promjena u izražavanju gena koje se događaju putem promjena na kromosomu, bez promjena na DNA sekvenci (Berger i sur., 2009). Epigenom se sastoji od informacija sadržanih unutar jezgre stanice koje se nasljeđuju tijekom diobe stanica, a koje kontroliraju razvoj, diferencijaciju tkiva i reaktivnost stanica. Epigenetske informacije su pod kontrolom genomskih sekvenci, izloženosti okolišu i stohastičnosti, odnosno slučajnih faktora. Kao takva, epigenetika se nalazi na središnjem mjestu između genoma, razvoja i izloženosti okolišu (Feinberg, 2018).

Epigenetske promjene utječu na izražavanje gena na različite načine. Vrste epigenetskih promjena na koje će se ovaj rad fokusirati su metilacija DNA (metilacija i hidroksimetilacija citozina), modifikacija histona (acetilacija lizina, metilacija lizina i arginina, fosforilacija serina i treonina, ubikvitinacija lizina,) te djelovanje nefunkcionalnih RNA molekula, koje uzrokuju modifikacije kromatina mijenjajući njegovu gustoću, strukturu (pozicioniranje nukleosoma, kromosomske petlje..) i funkciju. Primjeri tako ostvarenih funkcijskih promjena su paramutacije (paramutageni alel uzrokuje promjenu ekspresije homolognog paramutabilnog alela), bookmarking (zadržavanje transkripcijskih faktora specifičnih za slijed na lokusima ciljnih gena), imprinting (gašenje alela metilacijom), inaktivacija X kromosoma, učinak položaja, transvekcija (regulatorni elementi na jednom lokusu kontroliraju lokus na homolognom kromosomu uz nemjotičko sparivanje), maternalne i paternalne učinke – epigenetske promjene nastale djelovanjem okoliša na majčinski, odnosno očinski organizam (Loscalzo i Handy, 2014).



Slika 1. Oblik epigenetske informacije u normalnim stanicama (prema Feinberg, 2018)

2.1.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA je kovalentna modifikacija, često zvana „oznakom“ (engl. *tag*) nukleobaze citozina na 5' poziciji, koja je povezana s utišavanjem, ali i aktivacijom gena, što je ovisno o lokusu i staničnom kontekstu. Ova epigenetska modifikacija se smatra najjasnijim primjerom epigenetskih informacija (Feinberg, 2018). Često se odvija na repetitivnim sljedovima, pojačivačima, promoterima; najčešće u regijama koje sadrže CpG dinukleotide, no može se javiti i u dijelovima koji nisu dio CpG sekvenci. Ne-CpG metilacija na CpA, CpT i CpC često je specifična za tip stanica (npr. neuroni i glija). Važna je za regulaciju izražavanja gena u embrijskim stanicama. Epigenetske promjene temeljene na metilaciji citozina provode se putem više obitelji proteina koji su po svojim funkcijama nazvani pisačima, čitačima i brisačima, pri čemu su pisači enzimi koji stvaraju metilacijske oznake. U sisavaca to su enzimi DNA metiltransferaze (DNMT, engl. *DNA methyltransferase*), koje uključuju *de novo* metiltransferaze DNMT3a i DNMT3b te DNMT1 (Loscalzo i Handy, 2014).

DNMT1 preferencijalno metilira hemimetiliranu DNA *in vitro* i lokaliziran je na replikacijskim fokusima. Odgovoran je za održavanje metilacijskih obrazaca DNA kopiranjem metilacije na novonastali lanac tijekom replikacije DNA. Za razliku od DNMT1, DNMT3a i DNMT3b imaju sklonost prema nemetiliranim CpG dinukleotidima te provode *de novo* metilaciju tijekom embrijskog razvoja (Jin i sur., 2011).

Pravila sparivanja baza omogućuju održavanje recipročne metilacije tijekom kasnijih ciklusa

replikacije DNA, što pruža mehanizam za prenošenje negenskog svojstva iz stanice u stanicu. Na taj način, metilacija DNA se smatra dugoročnim, stabilnim epigenetskim svojstvom. Prisutnost metiliranog citozina može inhibirati transkripciju putem inhibicije vezanja transkripcijskih faktora ili može potaknuti vezanje drugih transkripcijskih represora, uključujući proteine koji modificiraju histone, poput histonskih deacetilaza (HDAC) (Loscalzo i Handy, 2014).

Dok su enzimi DNMT odgovorni za metilaciju, TET (engl. *Ten Eleven Translocation*) skupina enzima odgovorna je za demetilaciju. Ovi enzimi su dioksidaze te djeluju na način da oksidiraju 5-metilcitozin (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC). Oksidacija 5-metilcitozina doprinosi pasivnom gubitku DNA metilacije tijekom replikacije. Ova skupina enzima zajedno sa skupinom DNMT osigurava model dinamične regulacije DNA metilacije (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Demetilaciju još provode AID/APOBEC obitelj enzima (putem deaminacije 5mC ili 5hmC) i obitelj BER glikozilaza (izrezivanjem modificirane baze te posljedičnim popravkom) (Cacabelos i sur., 2019).

Metilacija DNA obično se uklanja tijekom formiranja zigote, a zatim se ponovno uspostavlja u embriju otprilike u vrijeme implantacije. Ova vrsta modifikacije neophodna je za normalan razvoj i osim inhibicije transkripcije, igra važnu ulogu i u inhibiciji transpozicije ponavljajućih elemenata te inaktivaciji X-kromosoma. Još važnije, metilirana DNA sudjeluje u formiranju kromatina putem interakcija s različitim drugim epigenetskim modifikacijama poput histonskog koda, polikompleksa, pozicioniranja nukleosoma, nekodirajućih RNA i ATP-ovisnih proteinskih kompleksa za preuređivanje kromatina. Kada je poremećena, doprinosi bolestima poput razvojnih poremećaja i karcinoma (Jin i sur., 2011).

2.1.2. Modifikacije histona

Slično metilaciji DNA, posttranslacijske modifikacije histona ne utječu na nukleotidni slijed DNA, već mogu modificirati dostupnost DNA transkripcijskim mehanizmima. Poznato je više vrsta histonskih modifikacija, među kojima su acetilacija, metilacija, fosforilacija i ubikvitinacija najbolje proučavane te najpoznatije u regulaciji strukture kromatina i transkripcijske aktivnosti. Histonske modifikacije kataliziraju specifični enzimi koji djeluju uglavnom, ali ne isključivo, na N-terminalne repove histona uključujući aminokiseline poput lizina ili arginina, kao i serina, treonina, tirozina itd. (Alaskhar Alhamwe i sur., 2018).

Acetilacija histona mijenja strukturu kromatina i regulira izražavanje gena otvaranjem ili zatvaranjem strukture kromatina. Ova vrsta modifikacija podrazumijeva dodavanje acetilne

skupine bočnim lancima lizina u izbočenim repovima histona. Obično je povezana s aktivacijom transkripcije i reguliraju je dvije suprotstavljene skupine enzima: histon acetiltransferaze (HAT) koje dodaju acetilne skupine i histon deacetilaze (HDAC) koje ih uklanjaju. Ima važnu ulogu u napredovanju staničnog ciklusa i diferencijaciji (Gujral i sur., 2020).

Poremećaji metilacije histona imaju uzročnu ulogu u tumorigenezi. Metilacija histona je blisko povezana s regulacijom transkripcije jer utječe na strukturu kromatina, privlačenje i aktiviranje transkripcijskih faktora, interakciju s faktorima inicijacije i elongacije te na obradu RNA. Metilacija histona odvija se na dušikovim atomima bočnih lanaca lizina i arginina, najviše na histonu H3, a zatim na H4 (Zhao i Shilatifard, 2019).

Fosforilacija histona može se dogoditi na aminokiselinama serinu, treoninu i tirozinu. Sve četiri histonske repne regije sadrže mjesta koja mogu biti fosforilirana od strane brojnih proteinskih kinaza i defosforilirana od strane fosfataza. Ova vrsta modifikacije značajno je uključena u različite esencijalne stanične procese povezane s remodeliranjem kromatina i izražavanjem gena. Najpoznatija funkcija fosforilacije histona događa se tijekom staničnog odgovora na oštećenje DNA, kada fosforilirani histon H2A(X) označava velike domene kromatina oko mjesta oštećenja DNA (Rossetto i sur., 2012).

Ubikvitinacija histona ključan je dio aktivnih i represivnih transkripcijskih stanja te leži u središtu signalizacije popravka oštećene DNA. Histonski ostaci koji su ciljani za ubikvitinaciju često su visoko konzervirani tijekom evolucije, a obuhvatna istraživanja enzima koji kataliziraju ubikvitinaciju i deubikvitinaciju histona otkrila su ključne uloge povezane s rastom i diobom stanica, razvojem i bolestima u modelnim sustavima koji obuhvaćaju kvasac i ljudske stanice (Chen i sur., 2022).

2.1.3. Djelovanje nekodirajućih RNA molekula

Nekodirajuće RNA molekule su skupina RNA molekula koje ne kodiraju funkcionalne proteine i prvobitno su smatrane regulatorima ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini. Međutim, široki spektar nedavnih istraživanja sugerira da su mikro RNA (miRNA), piwi-interaktivne RNA (piRNA), endogene kratke interferirajuće RNA (siRNA) i druge nekodirajuće RNA najčešći regulatori RNA molekula te postoje sve veći dokazi da regulacijske nekodirajuće RNA igraju važnu ulogu u epigenetskoj kontroli (Wei i sur., 2017).

U ovu skupinu molekula ubrajaju se: miRNA, duge nekodirajuće RNA (lncRNA), siRNA, male nuklearne RNA (snRNA), male nukleolarne RNA (snoRNA), ribosomske RNA (rRNA), transportne RNA (tRNA), cirkularne RNA (cRNA), s promotorom povezane RNA (pRNA), s

Piwi interagirajuće RNA (piRNA). Ove molekule, kao što je spomenuto, imaju sposobnost reguliranja ekspresije gena putem različitih mehanizama. Primjerice, mogu ciljati kromatin kako bi inducirale inaktivaciju gena kroz izravnu interakciju s drugim epigenetskim faktorima. Također, mogu integrirati s transkripcijskim faktorima kako bi spriječile ili potaknule izražavanje ciljanih gena (Kumar i sur., 2020.).

2.1.4. Bolesti vezane uz epigenetske promjene

Poremećaji u bilo kojoj od tri navedene vrste epigenetskih promjena mogu rezultirati prekomjernom aktivacijom ili utišavanjem gena (Simmons, 2008). Epigenetske promjene povezane su s nastankom karcinoma, što će detaljno biti objašnjeno u nastavku. Osim karcinoma, javljaju se i u drugim bolestima poput dijabetesa, sistemskog eritemskog lupusa, astme i raznih neuroloških poremećaja (Samanta i sur., 2017).

Metilacija DNA ima veliku važnost za funkciju mozga. Istraživanja su pokazala da se kod štakora u hipokampusu nakon učenja povećava ekspresija *DNMT* gena te da inhibicija *DNMT*-a blokira stvaranje memorije. Uz to, dokazana je veza između nekoliko sindroma mentalne retardacije i mutacija u *DNMT* ili genima koji kodiraju za proteine koji prepoznaju metiliranu DNA. Kao primjer sindroma mentalne retardacije može se navesti sindrom imunodeficijencije, nestabilnosti centromera i facijalnih anomalija (ICF sindrom) uzrokovan mutacijom u *DNMT3b*, a najčešći simptomi kojeg su dismorfizam lica, mentalna retardacija i različiti imunski deficiti (Schaefer i sur., 2011). Najintenzivnije proučavani neurološki poremećaj u vezi s epigenetskim promjenama je Rettov sindrom, također povezan s promijenjenom metilacijom DNA. Naime, ovaj poremećaj uzrokovan je mutacijama u proteinu vezanom za metilirani CpG (MeCP2) koji se veže na metiliranu DNA. Sindrom vezan uz X-kromosom, Rubinstein-Taybijev sindrom, Coffin-Lowry sindrom, Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i Huntingtonova bolest također su povezani s poremećajem gena uslijed epigenetskih promjena.

Autoimune bolesti također mogu nastati uz različite promjene u epigenetskim mehanizmima. Na primjer, sistemski eritemski lupus i reumatoidni artritis pokazuju globalnu hipometilaciju promotorskih područja (Samanta i sur., 2017). Konkretno, u pacijenata s reumatoidnim artritisom primijećena je hipometilacija gena *HDAC1* i *HDAC2*, hiperacetilacija histona H3 i H4 te hipometilacija bočnog ogranka lizina na položaju 9 histona u sinovijalnim membranama. Kod pacijenata s multiplom sklerozom otkrivena je hipometilacija DNA u bijeloj tvari središnjeg živčanog sustava. U sistemskom eritemskom lupusu, glavne mete autoimunih

protutijela su hipometilirana apoptotska DNA i modificirani histoni (Moosavi i Ardekani, 2016).

2.2. KARCINOM

Nakupina stanica nastala nekontroliranim diobama je neoplazija ili novotvorevina. Zloćudna (maligna) neoplazija naziva se rak ili kancer. Rak je bolest genske ekspresije u kojoj kompleksne mreže koje reguliraju homeostazu u višestaničnim organizmima postaju poremećene, omogućavajući stanicama da rastu neovisno o potrebama organizma kao cjeline (Baylin i Jones, 2016). Ova bolest posljedica je nakupljanja genskih mutacija uz epigenetske promjene (Lu i sur., 2020). Rak nije jedna bolest, već skupina bolesti koje sve uzrokuju promjenu i nekontroliran rast stanica u tijelu. Vrste raka mogu se klasificirati prema tekućini ili tkivu iz kojeg potječu, ili prema lokaciji u tijelu na kojoj su se prvobitno razvili (Stanford Health Care, 2023).

Rak može uključivati stanice koje nisu međusobno čvrsto povezane (primjerice, u leukemijama) ili neoplazije čvrstog tkiva koje se nazivaju tumori. Karcinom je vrsta raka podrijetlom od epitela, tkiva koje pokriva površine organa ili tijela. Od svih slučajeva raka, karcinomi čine 80 do 90 % (Stanford Health Care, 2023). Epitelni tumor može biti benigni ili maligni. Važno je naglasiti da se termin karcinom (lat. *carcinoma*) koristi za maligne epitelne tumore. U većini slučajeva takvi tumori zadrže neke značajke epitela od kojeg su nastali, pa se onda tako i nazivaju: karcinom pločastih stanica (lat. *carcinoma planocellulare*), karcinom prijelaznog epitela mokraćnoga mjehura ili urotelni karcinom (lat. *carcinoma urotheliale*), adenokarcinom – karcinom epitelnih žlijezdanih stanica probavnog ili dišnog sustava, endometrija i površinskog sloja jajnika te dojke. Maligni tumori solidnih unutarnjih organa nose nazive organa u kojima su nastali, kao npr. hepatocelularni karcinom, karcinom kore nadbubrežne žlijezde ili karcinom bubrega. Sam proces razvoja maligne bolesti pokazuje relativno konstantan broj tipičnih, ali nužnih promjena u postupnoj malignoj transformaciji, koje su zajedničke svim zloćudnim novotvorinama. Te glavne karakteristike progresije od normalne do maligne stanice mogu se sažeti u pet glavnih grupa. Prvu grupu promjena čini stalni poticaj na staničnu proliferaciju, do kojeg dolazi deregulacijom staničnih receptora rasta i njihovih izvanstaničnih čimbenika, kao i unutarstaničnih posrednika, a time postignut stadij kancerogeneze naziva se inicijacija ili transformacija. Druga grupa promjena podrazumijeva izbjegavanje inhibicije proliferacije. Dva glavna mehanizma za postizanje ove promjene su gubitak funkcije proteina/gena odgovornih za inhibiciju stanične diobe, odnosno supresora tumorskog rasta te gubitak kontaktne

stanične inhibicije rasta, što predstavlja promociju kancerogeneze. Abnormalna aktivnost telomeraza omogućuje neograničenu replikaciju kromosoma, te se javlja klonalna ekspanzija promijenjenih stanica. U treću grupu promjena spada izbjegavanje apoptoze, do koje dolazi zbog pomaka ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih staničnih mehanizama. Te dvije skupine promjena rezultiraju tumorskom promocijom. U četvrtu grupu promjena ubraja se razvoj novog krvotoka, odnosno neoangiogeneza, a u petu invazija, metastaziranje i kolonizacija udaljenih organa, što predstavlja stadij progresije (Damjanov i sur., 2018.).

2.2.1. Genom i epigenom karcinoma

Maligna transformacija stanica povezana je kako s genskim, tako i s epigenetskim promjenama. Te su promjene u većini zloćudnih tumora složene, a nastaju stupnjevito tijekom karcinogeneze (Damjanov i sur., 2018.). Genske promjene koje doprinose razvoju karcinoma utječu na tri glavne skupine gena: protoonkogene odnosno onkogene, tumor-supresorske gene te gene koji sudjeluju u popravku DNA (NCI, 2021).

Protoonkogeni imaju ulogu u normalnom rastu i diobi stanice. No, kada dođe do mutacije ili promjene ekspresije ovih gena na način da postanu aktivniji no što je normalno oni postaju onkogeni, odnosno geni koji uzrokuju tumore, dopuštajući stanicama da rastu i preživljavaju kada ne bi trebale (NCI, 2021). Protoonkogenski proteini mogu se svrstati u nekoliko skupina. Prvu skupinu čine čimbenici rasta. U tu skupinu svrstavaju se epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*, EGF), čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF) i slični proteini. Drugu skupinu čine receptori za čimbenike rasta. U ovu se skupinu svrstavaju proteini iz porodice receptora za epidermalni čimbenik rasta (R-EGF), receptor za čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita (R-PDGF), receptor za čimbenike rasta matičnih stanica (c-KIT) itd. Treću skupinu čine signalne molekule, primjerice RAS, SRC i slični citoplazmatski proteini koji se vežu za G-proteine, aktiviraju GTPazu ili djeluju kao kinaze. Četvrtu skupinu čine molekule koje se vežu na DNA. U tu skupinu spadaju heterodimerni (npr. FOS-JUN) ili neheterodimerni (npr. MYB) aktivatori i regulatori transkripcije DNA. Posljednju skupinu čine regulatori mitotičkog ciklusa, poput raznih ciklina (Damjanov i sur., 2018.). Mutacije u onkogenima u mnogim ljudskim karcinomima često su dominantne i potiču stvaranje raka. Primjerice, ako je gen *RAS* mutiran, onda se povećava ekspresija gena radi poticanja rasta (Baylin i Jones, 2016).

Tumor-supresorski geni su također uključeni u kontrolu rasta i diobe stanice (NCI, 2021). Ovi geni djeluju kao antionkogeni i suprimiraju prekomjernu proliferaciju stanica (Damjanov i sur.,

2018.). Tri klase "mutacija" utječu na potpuni gubitak aktivnosti tumor-supresorskih gena – direktne mutacije u kodirajućoj DNA; gubitak dijelova ili cijelih kopija gena; ili epigenetsko utišavanje, koje će detaljnije biti objašnjeno u nastavku rada. Također, tu su mutacije uz dobitak funkcije (engl. *gain of function*, GOF) uz koje inače tumor-supresorski gen djeluje kao onkogen. Ove mutacije mogu biti sinergističke zbog postizanja konačnog cilja – onesposobljavanja ključnih kontrolnih gena (Baylin i Jones, 2016).

Stanice koje imaju mutacije u genima koji sudjeluju u popravku oštećene DNA često razviju dodatne mutacije u drugim genima te promjene u kromosomima, poput duplikacija i delecija dijelova kromosoma. Ove mutacije mogu dovesti stanice do toga da postanu kancerogene (NCI, 2021).

Aktivacija onkogeni i/ili gubitak funkcije tumor-supresorskih gena smatraju se jednim od čimbenika koji doprinose nastanku tumora i često djeluju zajedno s epigenetskim promjenama (Lu i sur., 2020). Većina karcinoma sadrži mutacije u genima koji kodiraju komponente epigenetskih mehanizama, što rezultira abnormalnostima u epigenomu koje utječu na obrasce ekspresije gena i genomsku stabilnost (Baylin i Jones, 2016; Baylin i Jones 2011). Takvi poremećaji epigenoma uslijed pojave mutacija mogu dovesti do inicijacije i/ili napredovanja karcinoma, kako je prikazano u Tablici 1 (Baylin i Jones, 2016). Epigenetske promjene se preferirano javljaju u stanicama raka jer su reverzibilne i brže regulirane u usporedbi s genskim promjenama (Lu i sur., 2020).

Epigenetske promjene u karcinomu (Slika 2.) mogu javiti neovisno o mutacijama u faktorima koji modificiraju kromatin; epigenom je podložan i oštećenjima i nasljednim promjenama koje su izazvane okolišnim ili fiziološkim događajima (Baylin i Jones, 2016).

Tablica 1. Primjeri ključnih staničnih puteva koji su narušeni u karcinomu genskim i epigenetskim mehanizmima (Baylin i Jones, 2016)

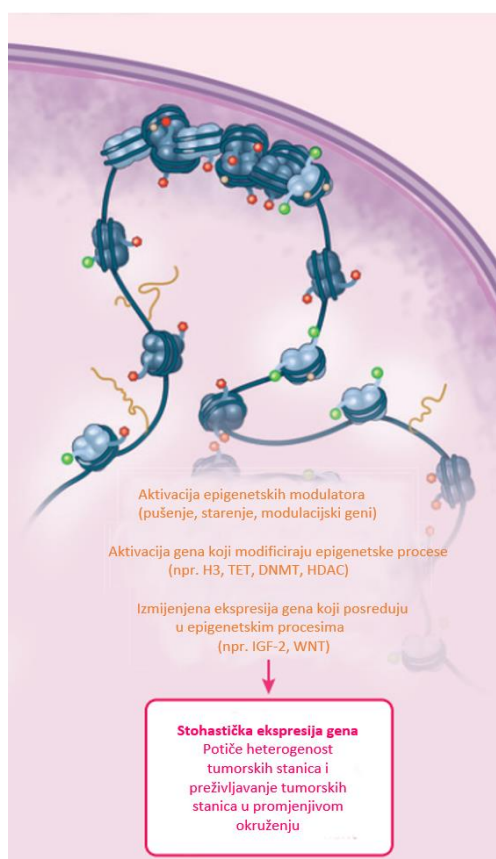
Stanični put	Primjer genske promjene	Primjer epigenetske promjene
Neovisnost o signalima rasta	Mutacije u <i>RAS</i> genu	Metilacija <i>RASSF1A</i> gena
Gubitak osjetljivosti na signale koji sprječavaju rast	Mutacije u TGF- β receptorima	Smanjena regulacija TGF- β receptora
Invazija i metastaza	Mutacija <i>E-kaderina</i>	Metilacija promotora <i>E-kaderina</i>
Neograničen potencijal za replikaciju	Mutacija u <i>CDKN2A</i> i <i>RBI</i> genima	Utišavanje <i>CDKN2A</i> ili <i>RBI</i> metilacijom promotora

Tablica 1. Primjeri ključnih staničnih puteva koji su narušeni u karcinomu genskim i

epigenetskim mehanizmima - nastavak (Baylin i Jones, 2016)

Stanični put	Primjer genske promjene	Primjer epigenetske promjene
Izbjegavanje apoptoze	Mutacija <i>TP53</i>	Metilacija <i>DAPK</i> , <i>ASC/TMS1</i> i <i>HIC1</i>
Kapacitet popravka DNA	Mutacije u <i>MLH1</i> , <i>MLH2</i>	Metilacija <i>GST Pi</i> , <i>O6-MGMT</i> , <i>MLH1</i>

RAS – engl. *Rat sarcoma*; *RASSF1A* – engl. *Ras Association Domain Family Member*; *TGF-β* – engl. *Transforming Growth Factor Beta*; *E-cadherin* – engl. *Epithelial cadherin*; *p16 – CDKN2A* – engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*; *pRb – RB1* - engl. *Retinoblastoma 1*; *p53 – TP53* – engl. *Tumor Protein 53*; *DAPK* – engl. *Death-Associated Protein Kinase 1*; *ASC/TMS1 – PYCARD* – engl. *PYD and CARD Domain Containing*; *HIC1* – engl. *Hypermethylated in Cancer 1*; *MLH1* – engl. *MutL Homolog 1*; *GST Pi* – engl. *Glutathione S-Transferase Pi 1*; *O6-MGMT* – engl. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*

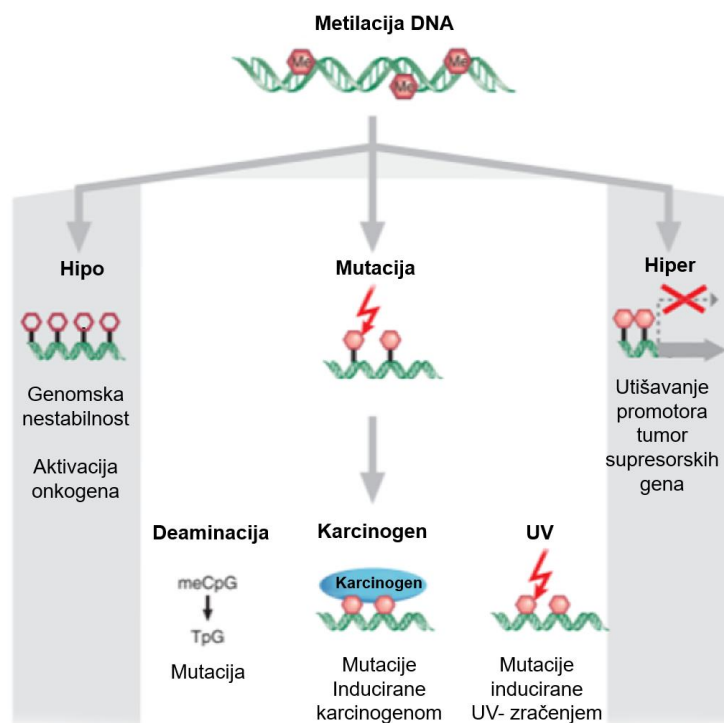


Slika 2. Oblik epigenetske informacije u stanicama karcinoma (prema Feinberg, 2018)

2.2.2. Uloga metilacije DNA u karcinogenezi

Istraživanjem širokog raspona tumorskih genoma, postalo je jasno da je dinamična regulacija metilacije DNA ključni epigenetski mehanizam inicijacije, održavanja te progresije karcinoma (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Metilacija DNA djeluje kao prekidač koji upravlja

genskom ekspresijom, odnosno određuje hoće li biti "uključena" ili "isključena" (Lu i sur., 2020). Tijekom posljednjih 40 godina proveden je velik broj istraživanja koja su pokazala da promjene u uzorcima distribucije 5-metilcitozina mogu razlikovati stanice raka od normalnih stanica. Identificirana su tri glavna puta kojima metilacija CpG može doprinijeti onkogenom fenotipu (Slika 3). Prvo, putem hipometilacije (Baylin i Jones, 2016). Već se desetljećima zna da stanice karcinoma pokazuju gubitak CpG metilacije u regijama gdje je mala gustoća CpG mjesta, u ponavljajućim elementima te retrotranspozonomima (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Ovaj fenomen događa se uz istodobnu lokus-specifičnu hipermetilaciju na CpG otocima i lokusima koji se nalaze u blizini, točnije uz hipermetilaciju promotora tumor-supresorskih gena, koja predstavlja drugi identificirani put kojim metilacija CpG pridonosi onkogenom fenotipu. Treće, moguća je direktna mutagenaza sekvenci koje sadrže 5-metilcitolin putem deaminacije, UV zračenja ili izloženosti drugim karcinogenima (Baylin i Jones, 2016; Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Važno je primijetiti da se sve tri promjene obično istodobno događaju kako bi doprinijele razvoju karcinoma, sugerirajući da je poremećena homeostaza epigenetskih mehanizama ključna za evoluciju ljudskog karcinoma (Baylin i Jones, 2016).



Slika 3. Tri glavna puta kojima metilacija DNA pridonosi onkogenom fenotipu (*prema* Baylin i Jones, 2016)

Iako je hipometilacija CpG bila prvi poremećaj u uzorku metilacije DNA otkriven u karcinomu,

posljedice ove disregulacije u tumorigenezi često su zanemarivane (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Demetilacija DNA doprinosi genomskoj nestabilnosti i povećanju aneuploidije, što su klasična obilježja karcinoma (Ehrlich i Lacey, 2013; Baylin i Jones, 2016). Hipometilacija može biti rani događaj u tumorigenezi i često se detektira u benignoj hiperplaziji. Napredovanjem tumora dolazi do većeg izražaja gubitka metilacije, s obzirom da metastatske lezije posjeduju veću demetilaciju od primarnih tumora. Ova epigenetska modifikacija većinom se događa u intergenskim i intragenskim regijama. Navedena područja u genomu obiluju ponavljajućim i transpozicijskim elementima. Metilacija DNA suprimira ove elemente (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Gubitak metilacije DNA može biti praćen aktivacijom transkripcije omogućavajući transkripciju satelitske DNA, transpozicijskih elemenata (TE) i onkogeni (Baylin i Jones, 2016; Ehrlich i Lacey 2013; Jones i Baylin 2007). Aktivacija ponavljajućih sekvenca DNA može predisponirati genom stanice za rekombinaciju, što potvrđuju povećane frekvencije kromosomske rekombinacije na određenim genomskim područjima, ili može potaknuti ekspresiju obližnjih protoonkogeni (Baylin i Jones, 2016).

Kao primjer utjecaja hipometilacije na razvoj karcinoma mogu se uzeti *LINE1* (engl. *Long Interspersed Nuclear Element 1*) retrotranspozoni, pokretljivi genomske elementi odgovorni za više endogenih mutageni. Insercije *LINE1* mogu značajno utjecati na gensku ekspresiju, a upravo je metilacija DNA ključ utišavanja ovih retrotranspozona. Hipometilacija CpG otoka promotora *LINE1* stimulira prisvajanje strukture eukromatina na alternativnom promotoru protoonkogeni *MET* (*MET – HGFR – engl. Hepatocyte Growth Factor Receptor*), čime dolazi do njegove aktivacije. Hipometilacija *LINE1* također je prepoznata kao indikator tumorske progresije u nekoliko vrsta karcinoma, uključujući karcinom mjehura i bubrega (Lakshminarasimhan i Liang, 2016).

Najbolje razumljiv mehanizam putem kojeg metilacija DNA doprinosi karcinomu je hipermetilacija promotora tumor-supresorskih gena (Baylin i Jones, 2016). Uz genske promjene koje predstavljaju primarni mehanizam, epigenetski procesi poput DNA metilacije služe kao sekundarni mehanizam inaktivacije tumor-supresorskih gena. Hipermetilacija CpG otoka promotora u stanicama raka obrnuto je povezana s ekspresijom gena i rezultira utišavanjem mnogih tumor-supresorskih gena. Utišavanje regulatora staničnog ciklusa i gena za popravak DNA metilacijom pronađeno je u više različitih vrsta karcinoma i često je međusobno isključivo s genskom inaktivacijom gena. Drugim riječima, ako se gen utišao metilacijom, genska inaktivacija istog gena se vrlo vjerojatno neće dogoditi i obrnuto (Lakshminarasimhan i Liang, 2016).

Kao primjer hipermetilacije u tumorigenezi mogu se uzeti slučajevi sporadičnih karcinoma dojke i jajnika koji pokazuju gubitak ekspresije *BRCA1* (engl. *Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein*) zbog hipermetilacije promotora. Utišavanje gena koji sudjeluju u popravku DNA doprinosi genomskoj nestabilnosti i mutacijama. *MGMT* (engl. *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), koji kodira za enzim odgovoran za uklanjanje alkiliranih radikala na DNA pri popravku, često je hipermetiliran u više vrsta karcinoma, uključujući karcinom debelog crijeva. Supresija *MGMT* hipermetilacijom promotora rezultira povećanom vjerojatnosti genskih mutacija u esencijalnim genima poput *TP53* i *KRAS* (engl. *Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene*). Slično tome, hipermetilacija promotora gena *MLH1* (engl. *MutL Homolog 1*) produkt kojeg sudjeluje u popravku krivo sparenih i nesparenih baza česta je u karcinomima. Inaktivacija *MLH1* metilacijom promotora primarni je mehanizam mikrosatelitske nestabilnosti čime doprinosi patogenezi mnogih vrsta karcinoma, poput karcinoma debelog crijeva i endometrija (Lakshminarasimhan i Liang, 2016).

Ovo je važan mehanizam kojim su geni koji inače sprječavaju razvoj karcinoma nasljedno utišani. Ekspresija stotine gena može biti poremećena hipermetilacijom promotora u pojedinačnom tumoru, a ovaj mehanizam vrijedi za gotovo svaki tip karcinoma (Baylin i Jones, 2016; Baylin i Jones, 2011). Hipermetilaciji su podložni i dodatni geni koji sudjeluju u mnogim ključnim staničnim funkcijama. Istraživanja karcinoma prostate pokazala su da se hipermetilacija dogodila na promotorima *GSTP1* i drugih gena poput *CDKN2A* i *DAPK*, koji sudjeluju u staničnom ciklusu, staničnom metastaziranju, apoptozi i tako dalje (Lu i sur., 2020). Hipermetilirani geni su zbog svog širokog opsega podijeljeni u par skupina. Prva grupa hipermetiliranih gena koja je pronađena u karcinomima sastoji se od onih kod kojih gubitak funkcije jasno ima "pokretačku funkciju" za sve faze razvoja karcinoma. Ta skupina gena zapravo su klasični tumor-supresorski geni, čiji gubitak funkcije uzrokuje tumore. Za njih je također primijećeno da predstavljaju "drugi udarac" potreban da se razvije karcinom (u kontekstu nasljednih tumora), odnosno prvi udarac predstavlja naslijeđena mutacija, dok drugi udarac proizlazi iz gubitka funkcije putem metilacije druge kopije gena. Drugu grupu gena čine oni geni koji su ranije prepoznati kao kandidati za tumor-supresorske gene zbog svoje funkcije, ali nisu često isključeni, što ukazuje da te mutacije nisu prave "pokretačke". Često se nalaze u kromosomskim područjima u kojima se dogodila delecija u stanicama karcinoma. Geni koji ulaze u ovu kategoriju kodiraju proteine koji obavljaju funkcije ključne za sprječavanje napredovanja tumora, kao što su geni koji kodiraju proapoptotičku DAP-kinazu 1, ili faktori koji antagoniziraju WNT signalizaciju. Treća i najveća grupa gena sadrži članove otkrivene

identificiranjem abnormalne hipermetilacije DNA kako u kodirajućim, tako i u nekodirajućim regijama. Usporedbom s genima u prve dvije grupe, izazov je smjestiti ove gene u funkcionalni kontekst napredovanja karcinoma jer je njihova točna uloga još uvijek nepoznata (Baylin i Jones, 2016).

Tablica 2. Skupine hipermetiliranih gena (Baylin i Jones, 2016)

Skupina	Primjer
Poznati tumor-supresorski geni	<i>VHL</i> <i>CDHI</i> <i>MLH1</i> <i>APC</i> <i>RBI</i>
Kandidati za tumor-supresorske gene	<i>RASSF1A</i> <i>MGMT</i> <i>GSTP1</i> <i>DAPK</i>
Geni otkriveni nasumičnom analizom hipermetiliranih gena	<i>HIC1</i> <i>SFRP1</i> <i>BMP3</i>

Metilirani citozini su podložni spontanoj deaminaciji koja rezultira teško popravljivom tranzicijom citozina u timin. Posljedično, gotovo trećina svih nasljednih mutacija i polimorfizama jednog nukleotida pronađena je u metiliranim CpG mjestima. Slično tome, u somatskim stanicama CpG mjesta u genomu pridonose žarištima mutacija, primjerice tranzicijom citozina u timin u tumor-supresorskom genu *TP53* (Lakshminarasimhan i Liang, 2016). Stoga modifikacija DNA pomoću DNMT značajno povećava rizik nastanka karcinoma putem ovog endogenog mehanizma. Metilacija citozina ne samo da povećava spontanu mutagenozu, već može dodatno utjecati na način interakcije DNA s karcinogenima i UV svjetlom (Baylin i Jones, 2016).

2.2.3. Uloga histonskih modifikacija u karcinogenezi

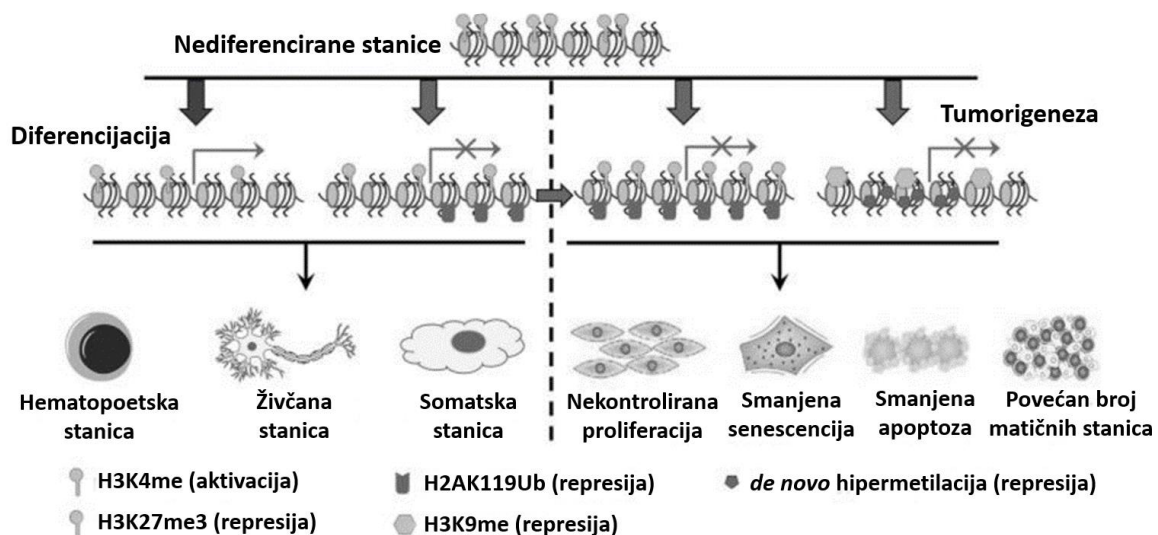
Osim promjena u DNA metilaciji, histonske modifikacije također mogu rezultirati karcinomom (Lu i sur., 2020). Histonske modifikacije imaju ključnu ulogu u ekspresiji gena i popravku DNA. Poremećaji ovih procesa često dovode do razvoja karcinoma (Jones i Baylin, 2007).

Mnogi enzimi koji modificiraju histone prepoznati su kao onkogeni ili tumorski supresori (Cao i sur., 2012).

Pri razmatranju uloge histonskih modifikacija u razvoju karcinoma, bitno je spomenuti proteinski kompleks polikomb (engl. *polycomb group*, PcG). Proteini ovog kompleksa su transkripcijski represori koji reguliraju različite biološke procese tijekom embrijskog razvoja, poput diferencijacije i lokalizacije stanica, epigenetske memorije stanice, funkcije matičnih stanica i homeostaze tkiva te pomažu zrelim diferenciranim stanicama da održe svoje karakteristične uzorke ekspresije. Ovaj kompleks sastoji se od dvije podjedinice – PRC1 (engl. *polycomb repressive complex 1*) i PRC2 (engl. *polycomb repressive complex 2*), koje induciraju kovalentne post-transkripcijske histonske modifikacije. Podjedinica PRC1 katalizira monoubikvitinaciju histona H2A na lizinu 119 (H2AK119Ub1), a podjedinica PRC2 katalizira trimetilaciju histona H3 na lizinu 27 (H3K27me3). Obje post-transkripcijske modifikacije histona rezultiraju utišavanjem transkripcije. PcG proteini kontroliraju ekspresiju gena tako što induciraju promjene u strukturi i funkciji kromatina, kojima reguliraju dostupnost genskog materijala regulacijskim proteinima. Heterokromatizacija koju vrši podjedinica PRC2, koja uključuje lokalnu metilaciju histona H3 na lizinu 9 (H3K9me3) ili na lizinu 27 (H3K27me3), ključni je obrazac u nekoliko vrsta karcinoma, uključujući karcinom prostate i debelog crijeva (Wang i sur., 2015). EZH2 (engl. *Enhancer Of Zeste Homolog 2*), funkcionalna enzimska komponenta PRC2, uzrokuje H3K27 metilaciju, a potom metilirani H3K27 može služiti kao oslonac za metilaciju CpG regija, što dovodi do formacije heterokromatina i konačno do utišavanja transkripcije. Vežanje DNMT-a na gene inhibirane s EZH2 ovisi o prisutnosti EZH2. Također, rezultati sekvencioniranja bisulfatom su pokazali da je EZH2 potreban za metilaciju promotora koje reprimira, čime se dolazi do pretpostavke da EZH2 sudjeluje u metilaciji privlačeći DNMT-e (Wei i sur., 2017). Ove represivne oznake kromatina doprinose *de novo* metilaciji DNA povezanoj s karcinomom, te utišavanju gena koji imaju ulogu u normalnoj diferencijaciji i funkciji stanice (Wang i sur., 2015).

U embrijskim matičnim stanicama, geni potrebni za razvoj su označeni specifičnom "bivalentnom domenom" koja se sastoji od aktivirajuće H3K4 oznake i represivne H3K27 oznake. Tijekom diferencijacije, ove bivalentne domene se transformiraju u "monovalentne domene" koje su ili aktivirajuće ili represivne, ovisno o tome koja oznaka je sačuvana. Ovisno o vrsti stanice, određene skupine gena se eksprimiraju ili utišavaju, što u konačnici dovodi do morfološki i funkcionalno različitih stanica (Wang i sur., 2015). Promjena ravnoteže ovih histonskih modifikacija može doprinijeti patogenezi karcinoma (Zhao i Shilatifard, 2019).

Tijekom razvoja karcinoma mijenja se aktivnost PcG proteina kako u diferenciranim, tako i u matičnim stanicama, što rezultira utišavanjem gena formacijom kompaktne strukture kromatina (Slika 4). Utišavanje ekspresije može se postići promjenom aktivnosti PRC kompleksa (engl. *polycomb repressive complex*) na način da utišava gene kojbi trebali biti aktivni, utišavanjem uz pomoć *de novo* hipermetilacije praćene metilacijom H3K9 (Wang i sur., 2015). Osim promjene aktivnosti PcG proteina, kao primjer poremećaja bivalencije u karcinogenezi može se uzeti i podatak da u karcinomu debelog crijeva određeni geni markeri matičnih stanica kao što su *SOX9*, *LGR5*, *ASCL2*, *OLFM4*, *EPHB3*, gube represivnu oznaku (H3K27me3), a posljedično gube i regulaciju ekspresije gena (Lu i sur., 2020).



Slika 4. Epigenetska regulacija PcG proteina tijekom diferencijacije i karcinogeneze (*prema* Wang i sur., 2015)

Osim spomenutih aktivirajućih i represivnih oznaka histona, dobro su karakterizirane i aktivirajuće metilacijske oznake H3K36 te H3K79, te represivna metilacijska oznaka H4K20 (Zhao i Shilatifard, 2019).

PRC1 nije jedini protein koji katalizira monoubikvitinaciju histona. Razina monoubikvitiniranih histona H2A i H2B značajno je smanjena u tumorima prostate i dojke (Cao i sur., 2012). Poznato je da deaktivacija tumorskog supresora *BRCA1* dovodi do raka dojke i jajnika. Žene koje nose mutirani alel *BRCA1* imaju procijenjeni rizik od 87 % za rak dojke i 44 % za rak jajnika do 70-te godine. Protein BRCA1 sadrži RING prstenastu domenu koja sadrži E3 ubikvitin ligazu. H2A i H2B su identificirani kao supstrati za BRCA1 u *in vitro*

testovima (Cao i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da se BRCA1 veže na regije satelitske DNA i katalizira monoubikvitinaciju H2A *in vivo*. Gubitak BRCA1 povezan je s gubitkom ubikvitinacije H2A satelitskih ponavljanja te time i s gubitkom represije transkripcije satelita. Stanice koje nemaju BRCA1 pokazuju oštećenja u organizaciji strukture heterokromatina. Zanimljivo, ekspresija H2A-Ub, imitacije prirodno monoubikvitiranog H2A, u stanicama karcinoma spašava stanice kojima je deaktiviran protein BRCA1 (Cao i sur., 2012; Zhu i sur., 2011). Ti rezultati ukazuju da BRCA1 održava strukturu heterokromatina putem monoubikvitinacije H2A. Nadalje, činjenica da su transkripti satelitske DNA povećani u uzorcima raka dojke koji imaju mutiran *BRCA1*, te odnos između monoubikvitinacije H2A i represije satelitske DNA sugerira da disfunkcija H2Aub ima važnu ulogu u tumorigenezi (Cao i sur., 2012).

2.2.4. Uloga nekodirajućih RNA molekula u karcinogenezi

Varijacije u nekodirajućim RNA molekulama vrlo su česte u stanicama karcinoma (Lu i sur., 2020). Kao što je već spomenuto u poglavlju 2.1.3., nekodirajuće RNA molekule su skupina molekula koje ne kodiraju proteine već imaju regulacijske funkcije (Wei i sur., 2017). U kontekstu karcinoma, u ovom radu fokus se stavlja na male interferirajuće RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) i duge nekodirajuće RNA (lncRNA) molekule (Kumar i sur., 2020).

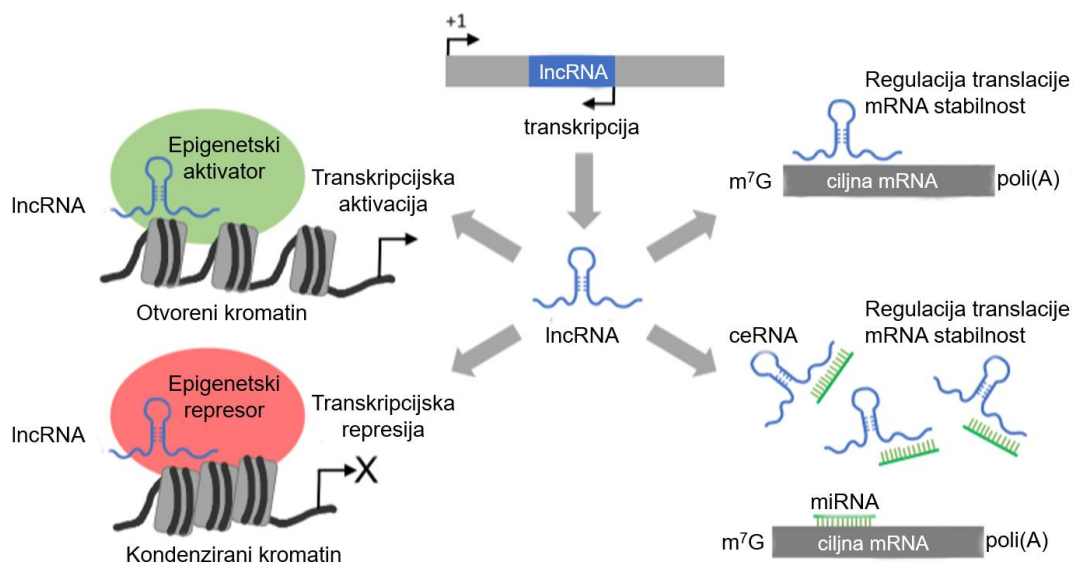
Male interferirajuće RNA (siRNA) su izvedene iz dugih dvolančanih RNA molekula, uključujući RNA molekule dobivene replikacijom virusa, transpozonskom aktivnosti ili genskom transkripcijom. One se cijepaju pomoću enzima Dicer na RNA fragmente duge 19-24 nukleotida, pri čemu su dobiveni RNA fragmenti aktivni kada se spoje s AGO (engl. *Agronaute*) proteinima. Istraživanja su pokazala da siRNA može dovesti do utišavanja transkripcije u stanicama putem metilacije DNA i modifikacija histona. Pokazalo se da siRNA može utišati ekspresiju *EZH2* te potom preokrenuti otpornost na cisplatin, lijek koji se koristi u kemoterapiji kod raka želudca i pluća (Wei i sur., 2017).

MikroRNA (miRNA) molekule su jednolančane RNA molekule duge otprilike 22 nukleotida. miRNA sudjeluju u više procesa u stanici, uključujući staničnu proliferaciju, adheziju, smrt stanice i diferencijaciju. Transkripcijom miRNA nastaje petlja, dvolančana struktura poznata kao primarna mikroRNA (pri-miRNA) u jezgri. pri-miRNA se procesira u jezgri pomoću enzima "Drosha" i njegovog kofaktora "Pasha", čime nastaje pre-miRNA. Nakon toga, pre-miRNA se procesira pomoću enzima "Dicer", kao i siRNA, u zrele miRNA. Kad se nađe u citoplazmi, jedan od dva lanca zrele miRNA uzima AGO protein. Zatim AGO dovodi miRNA

do ciljane mRNA sekvence s kojom se veže te na taj način dolazi do degradacije mRNA ili inhibicije translacije. Postoji veliki broj dokaza uloge miRNA u karcinogenezi. Metastaziranje karcinoma događa se djelomično zbog loše regulacije miRNA molekula. Primjerice, miR-15b i miR-16 su prekomjerno izražene u karcinomu želudca, te označuju lošu prognozu bolesti. Ekspresija miR-15b i miR-16 povezana je s prekomjernom ekspresijom antiapoptičkog proteina BCL2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), što rezultira smanjenom apoptozom stanica raka želudca miRNA mogu djelovati kako onkogeno, tako i tumor-supresorski, što će biti objašnjeno na primjeru miR-21 i miR-34. miR-21 i miR-34 imaju suprotne uloge te se uspostavilo da im je ekspresija izmjenjena u više čvrstih tumora. Prekomjerno izražena miR-21 djeluje onkogeno. Uključena je u održavanje pluripotentnosti i može promovirati epitelno-mezenhimsku staničnu tranziciju. Dodatno, visoke koncentracije miR-21 koreliraju s povećanom proliferacijom tumorskih stanica i invazijom u karcinomu debelog crijeva, te proliferacijom i metastaziranjem karcinoma dojke. miR-34 skupina pokazuje smanjenu ekspresiju u više vrsta karcinoma. Ova skupina se većinom eksprimira u plućima, mozgu te gastrointestinalnom traktu. Djeluje sinergijski s tumor-supresorom p53 u poticanju zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze, čime se inhibira tumorigeneza, zbog čega djeluje tumor-supresorski. Ciljana mjesta djelovanja miR-34 uključuju BCL2, CDK4/6 (engl. *Cyclin-dependent kinase 4 and 6*) te ciklin E2, koji su uključeni u blokiranje apoptoze i poticanje progresije staničnog ciklusa, čime uzrokuju tumorigenezu. Dodatno, niske razine miR-34a su povezane s agresivnim oblikom karcinoma dojke i smanjenom šansom za preživljavanje (Kumar i sur., 2020). Kao primjer tumor-supresora može se uzeti i skupina miR-100 koja utišava ekspresiju EZH2, funkcionalne enzimske komponente PRC2. Ova skupina često je prisutna u niskim koncentracijama u karcinomima, te posljedično dolazi do represije transkripcije (Baylin i Jones, 2011). Važno je napomenuti da neke miRNA molekule imaju dvostruke uloge, čak i u istom tipu raka (Lu i sur., 2020).

Duga nekodirajuća RNA (lncRNA) se transkribira iz kodirajućih ili nekodirajućih sekvenca genoma, čime nastaju RNA molekule duge preko 200 nukleotida koje formiraju specifične trodimenzionalne konformacije koje im omogućuju interakciju sa specifičnim proteinima, poput epigenetskih regulatora. Duga nekodirajuća RNA može regulirati translaciju i stabilnost mRNA ili direktnim vezanjem na ciljane mRNA molekule, ili funkcioniranjem kao kompetitivna endogena RNA molekula (ceRNA) kako bi utišala specifične miRNA molekule (Slika 5). U mnogim vrstama karcinoma dolazi do izmjene transkripcije lncRNA, odnosno transkripcija se odvija na drugačiji način nego što bi se odvijala u normalnoj stanici. Izmjena

transkripcije i/ili mutacija lncRNA molekula olakšava nastajanje tumora i posljedično dovodi do metastaziranja. I pretjerana i nedovoljna ekspresija lncRNA molekula može negativno utjecati na ključna ciljna mjesta u stanici, uključujući i epigenetske regulatore, time mijenjajući ekspresiju brojnih gena (Kumar i sur., 2020). Primjerice, HOTAIR (engl. *HOX antisense intergenic RNA*) je dobro poznata lncRNA i često je prekomjerno izražena u raku želudca, što može imati ulogu u metastaziranju preko idućih mehanizama: spaja se s miR-330 i miR-331-3p kako bi se povećala ekspresija njihovih ciljanih gena; direktno utišava HOXD (engl. *Homeobox gene D*) ili ekspresiju miR-34a; aktivira WNT (engl. *Wingless-related integration site*) / β -katenin signalni put te inducira ubikvitinaciju Runx3 (engl. *Runt-related transcription factor 3*) (Mattick i sur., 2023; Tang i sur., 2022).



Slika 5. Mehanizmi regulacije gena duge nekodirajuće RNA (lncRNA) (prema Kumar i sur., 2020)

2.2.5. Terapija usmjerena na epigenetiku

S obzirom na važnost epigenetske regulacije u raku, terapija usmjerena na epigenom postaje privlačna strategija liječenja raka. Stoga bi epigenetsko liječenje moglo koristiti pacijentima koji boluju od raka kao monoterapija ili kombinirano s drugim trenutnim terapijama (Lu i sur., 2020). Kao što je već spomenuto, vrlo teško se događa reverzija genskih promjena, za razliku od epigenetskih promjena koje su lako reverzibilne i mogu se farmakološki modulirati. Otkriveno je mnogo malih molekula koje ciljaju ključne epigenetske promjene i koje se zajednički nazivaju

epigenetski lijekovi ili epi-lijekovi, te se razvijaju novi spojevi koji utječu na epigenetske oznake u terapiji raka (Costa i sur., 2023).

Identificiranjem epigenetskih mehanizama koji su prisutni u različitim vrstama raka otkriveni su novi lijekovi i terapije. Epigenetski mehanizmi vraćaju normalan uzorak acetilacije histona i metilacije DNA, ili induciraju poželjne promjene u količini nekodirajućih RNA u stanici. Inhibitori DNMT i HDAC pokazuju sinergistički učinak. Epigenetski lijekovi su odgovorni za reaktivaciju tumor-supresora, čime se vraća normalna funkcija stanice (Ghasemi, 2020).

Na tržištu lijekova se događa utrka u pronalasku potencijalnih inhibitora epigenetskih modifikatora. Potencijalni spojevi koji moduliraju epigenetske enzime, poput inhibitora TET i izocitrat dehidrogenaza (IDH) trenutno su u procesu razvoja za terapiju raka. Također, brojni inhibitori histon-modificirajućih enzima dodana su u antikancerogene terapije, poput inhibitora histonskih deacetilaza, histonskih metiltransferaza (HMT, engl. *Histone Methyltransferase*), histonskih acetiltransferaza (HAT, engl. *Histone Acetyltransferase*), histonskih demetilaza (engl. *Histone Demethylase*) itd. (Costa i sur., 2023).

Vorinostat je prvi epigenetski lijek koji je odobrila FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Pripada skupini inhibitora histonske deacetilaze i koristi se kao sredstvo za liječenje akutnog oblika T-staničnog limfoma. Inhibicijom HDAC-a smanjuje razinu acetiliranih histona i nehistonskih proteina. Djeluje na način da potiče staničnu apoptozu i sprječava angiogenezu. U kliničkim studijama pacijenata oboljelih od akutnog T-staničnog limfoma došlo je do poboljšanja kliničke slike i odgode daljnje progresije bolesti (Šimatović, 2018).

Potencijalna nova terapija za rak koja u pretkliničkim istraživanjima koristi inhibitore EZH2 lizin metiltransferaze pokazuje odlične rezultate, posebno u kombinaciji s radioterapijom i kemoterapijom, primjerice cisplatinom, gefitinibom i tamoxifenom. Druga klasa epigenetskih lijekova su inhibitori bromodomene i ekstra-terminalne domene (BETi, engl. *Bromodomain and Extraterminal Domain Inhibitors*). Oni čitaju oznake na histonima te prepoznaju acetilirani lizin, na koji se potom vežu. Odgovorni su za privlačenje transkripcijske mašinerije i aktivaciju gena (Costa i sur., 2023).

Kombinirano korištenje epigenetskih lijekova s konvencionalnom terapijom postaje sve važnije zbog svojeg potencijala za povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na klasičnu kemoterapiju čime dolazi do poboljšanja terapijskog učinka. Ovakve terapije pokazuju povećanu učinkovitost i podnošljivost, zahtijevajući niže doze svakog agensa i smanjujući nuspojave uzrokovane konvencionalnim terapijama. Primjerice, korištenje decitabina, inhibitora DNMT1, u kombinaciji s karboplatinom pokazalo je odlične učinke na karcinom jajnika u

usporedbi s konvencionalnom terapijom, zbog toga što se povećava osjetljivost stanica karcinoma. Decitabin je epigenetski lijek odobren 2006. godine za korištenje u liječenju mijeloplastičnih sindroma, poznat pod nazivom Dacogen[®]. Ovaj lijek je analog nukleozida citidina, u kojem je ugljikov atom u pirimidinskom prstenu na poziciji 5 zamijenjen dušikom. Pokazalo se da korištenjem malih doza može uzrokovati demetilaciju DNA ireverzibilnim vezanjem DNMT1. Još jedan primjer kombinirane terapije je trostruka primjena belinostata, karboplatina i paclitaxela, koja se u fazi II kliničkih ispitivanja pokazala korisnom za pacijentice oboljele od karcinoma jajnika. Dodatna prednost ove kombinirane terapije je to što su je pacijentice dobro podnijele. Belinostat je treći inhibitor histon deacetilaze kojeg je odobrila američka agencija za hranu i lijekove FDA za korištenje u liječenju T-staničnog limfoma. Inhibitori histon deacetilaza povećavaju acetilaciju histona, što dovodi do ekspresije bitnih gena koji kontroliraju stanični rast i smrt (Costa i sur., 2023).

Nedavno je predloženo da ciljane molekule terapije postanu nekodirajuće RNA kako bi se riješila rezistentnost na terapiju. Fokus ovog pristupa je inhibiranje specifičnih nekodirajućih RNA molekula ako su prekomjerno izražene ili vraćanje normalne funkcije nekodirajućih RNA molekula kojima je smanjena ekspresija. Primjerice, ciljana inhibicija miR-221/222 pomoću anti-miR-221 i anti-miR-222 imala je sinergistički učinak stimulirajući osjetljivost stanica na cisplatin u karcinomu dojke (Costa i sur., 2023).

Epigenetski lijekovi koriste se i u kontekstu imunoterapije. Oni su alternativna strategija za personaliziranije liječenje tumora, jer mogu povećati osjetljivost tumora na inhibitore imunosnih točaka i staničnu terapiju, a pored toga i aktiviraju stanice imunosnog sustava i mehanizme koji bi se aktivirali kad bi organizam bio zaražen virusom. Trenutno se provodi nekoliko kliničkih istraživanja na različitim vrstama tumora koja koriste epigenetske lijekove samostalno ili u kombinaciji s lijekovima koji se koriste u imunoterapiji. Ove kombinacije su pokazale potencijal za korištenje u kliničkom liječenju karcinoma. Istraživanje kolorektalnog karcinoma na modelu miševa s tumorskim CT26 stanicama pokazalo se korisnim za terapiju kada je niska doza decitabina primjenjena zajedno s anti-PD-1 protutijelom. Ova kombinacija rezultirala je smanjenom razinom metilacije u tumorskim stanicama i dužim vremenom preživljenja modelnih životinja nakon tretmana decitabinom. Modelne životinje su duže preživljavale zbog toga što se smanjila metilacija promotorskih regija u tumorskim stanicama, a samim tim i omogućila transkripcija tumor-supresora. Ovi rezultati pokazali su moguću korist blokade PD-1 uz male doze decitabina koju treba provjeriti budućim kliničkim istraživanjima, što otvara put za korištenje demetilirajućih agenasa kao pomoćnih lijekova pri liječenju

pomoću inhibitora kontrolnih točaka imunskog sustava. Provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja radi procjene učinaka kombinacije epigenetskih inhibitora i imunoterapije, što stvara nadu za učinkovitije tretmane i nadilaženje ograničenja trenutnih pristupa (Costa i sur., 2023).

3. ZAKLJUČCI

Karcinom koristi epigenske mehanizme, koji su predviđeni za normalni razvoj i zdravlje, za potrebe svoje inicijacije, progresije i invazije, u kombinaciji s genskim promjenama. Iako su karcinomi iznimno kompleksne bolesti, u srži imaju jednostavan cilj – potaknuti ekspresiju onkogeni, te utišati ili potpuno ukloniti tumor-supresorske gene i gene za popravak DNA. Epigenetski mehanizmi omogućuju tumorskim stanicama prednost nad normalnim stanicama koristeći tri glavna epigenetska mehanizma (metilacija DNA, histonske modifikacije i djelovanje nekodirajućih RNA), koja djeluju istovremeno i povezano. Kada su epigenetske modifikacije takve da omogućuju ekspresiju onkogeni i represiju tumor-supresora, stanice počinju imati drugačiju transkripciju no što je normalna, brže se razmnožavaju i prerastu normalne stanice. Epigenetske i genske promjene su međusobno usko povezane. Dok će genske promjene uzrokovati promjene u komponentama epigenetskog mehanizma, epigenetske promjene mogu uzrokovati mutacije, što je pokazano na primjeru hipermetiliranih tumor-supresorskih gena koji imaju visoke predispozicije za mutacije citozina u CpG regijama, čime dolazi do gubitka funkcije tumor-supresora.

Iako su iznimno kompleksne, epigenetske promjene su reverzibilne i lakše ih je popraviti nego genske promjene. Iz tog razloga se razvijaju epigenetski lijekovi, koji su trenutno u fazama ispitivanja, a za sada pokazuju obećavajuće rezultate na povećavanje osjetljivosti stanica na ostale terapije, poput kemoterapije i imunoterapije.

4. POPIS LITERATURE

- Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, Bülow V, Harb H, Alhamdan F, i sur. (2018) Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* **14**, 39. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0259-4>
- Baylin SB, Jones PA (2016) Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* **11**, 726–734.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* **23**, 781. <https://doi.org/10.1101/GAD.1787609>
- Cacabelos R, Tellado I, Cacabelos P (2019) The Epigenetic Machinery in the Life Cycle and Pharmacoepigenetics. U: Cacabelos R (ured.) Pharmacoepigenetics, Volume 10 in Translational Epigenetics, Academic Press, str. 1–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813939-4.00001-2>
- Cao J, Yan Q, Lin H-K, Liu Y (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol* **2**, 26. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00026>
- Chen JJ, Stermer D, Tanny JC (2022) Decoding histone ubiquitylation. *Front Cell Dev Biol* **10**, 968398. doi: 10.3389/fcell.2022.968398
- Costa PM da S, Sales SLA, Pinheiro DP, Pontes LQ, Maranhão SS, Pessoa C do Ó, i sur. (2023) Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. *Front Cell Dev Biol* **11**. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2023.1116805/FULL>
- Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M (2018) Patologija, 5. izd., Medicinska naklada, Zagreb.
- Ehrlich M, Lacey M (2013) DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Adv Exp Med Biol* **754**, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_2/COVER
- Feinberg AP (2018) The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. *N Engl J Med* **378**, 1323–1334. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1402513>
- Ghasemi S (2020) Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *Pharmacogenomics J* **20**, 367–379. <https://doi.org/10.1038/s41397-019-0138-5>

- Gujral P, Mahajan V, Lissaman AC, Ponnampalam AP (2020) Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* **18**, 84. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00637-5>
- Jin B, Li Y, Robertson KD (2011) DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer* **2**, 607. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- Jones PA, Baylin SB (2007) The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.01.029>
- Kumar S, Gonzalez EA, Rameshwar P, Etchegaray JP (2020) Non-coding RNAs as mediators of epigenetic changes in malignancies. *Cancers (Basel)* **12**, 1–32, 3657. <https://doi.org/10.3390/cancers12123657>
- Lakshminarasimhan R, Liang G (2016) The role of DNA methylation in cancer. *Adv Exp Med Biol* **945**, 151–172. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_7
- Loscalzo J, Handy DE (2014) Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* **4**, 169–174. <https://doi.org/10.1086/675979>
- Lu Y, Chan YT, Tan HY, Li S, Wang N, Feng Y (2020) Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular Cancer* **19**, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01197-3>
- Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen LL, et al. (2023) Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023 24:6 24, 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Moosavi A, Ardekani AM (2016) Role of epigenetics in biology and human diseases. *Iran Biomed J* **20**, 246–258.
- NCI (2021) What is cancer? NCI-National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Pristupljeno 22. kolovoza 2023.
- Rossetto D, Avvakumov N, Côté J (2012) Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* **7**, 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/EPI.21975>
- Samanta S, Rajasingh S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J (2017) Epigenetic dysfunctional

- diseases and therapy for infection and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 518–528.
- Schaefer A, Tarakhovsky A, Greengard P (2011) Epigenetic mechanisms of mental retardation. *Prog Drug Res* **67**, 125-146. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8989-5_7
- Simmons D (2008) Epigenetic Influences and Disease | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/epigenetic-influences-and-disease-895/>.
Pristupljeno 16 June 2023.
- Slack JMW (2002) Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nat Rev Genet* **3**, 889–895. <https://doi.org/10.1038/nrg933>
- Stanford Health Care (2023) <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-types.html>. Pristupljeno 22. kolovoza 2023.
- Šimatović D (2018) Epigenetski lijekovi (završni rad), Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Tang S-Y, Zhou P-J, Meng Y, Zeng F-R, Deng G-T (2022) Gastric cancer: An epigenetic view. *World J Gastrointest Oncol* **14**, 90-109. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i1.90>
- Wang W, Qin J-J, Voruganti S, Nag S, Zhou J, Zhang R (2015) Polycomb Group (PcG) Proteins and Human Cancers: Multifaceted Functions and Therapeutic Implications. *Med Res Rev* **35**, 1220–1267. <https://doi.org/10.1002/med.21358>
- Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS (2017) Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep* **37**, 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
- Zhao Z, Shilatifard A (2019) Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol* **20**, 245. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1870-5>
- Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, Nederlof PM, i sur. (2011) BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin mediated silencing. *Nature* **477**, 179. <https://doi.org/10.1038/NATURE10371>

Izjava o izvornosti

Ja Ana Udženija izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.