

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Pavić

**Epigenetski mehanizmi kontrole rasta  
tumora**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Petra Pavić

**Epigenetic tumor growth control  
mechanisms**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa biologije na zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Epigenetski mehanizmi kontrole rasta tumora

Petra Pavić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Epigenetika je područje znanosti koje proučava nasljedne promjene fenotipa uzrokovane djelovanjem epigenetskih mehanizama koji ne uključuju promjenu u sekvenci DNA već promjenu u ekspresiji gena. Uključuju reverzibilne promjene metilacije DNA, modifikacije histona i aktivnost ne kodirajuće molekule RNA. Pogreške unutar mehanizama mogu uzrokovati nastanak invazivnog karcinoma. Karcinom karakterizira neprestana proliferacija i metastaziranje na okolna tkiva. Unatoč dostupnosti brojnih načina liječenja, liječenje karcinoma je dugotrajno i komplicirano. Zbog reverzibilnosti epigenetskih mehanizama razvija se epigenetska terapija lijekovima koji uz korištenje poznatih oblika liječenja kao što su kemoterapija i radioterapija doprinose uspješnom izlječenju. U radu je dat naglasak na epigenetske promjene u nastanku karcinoma kao i upotreba epigenetske terapije u karcinomu dojke i kolorektalnog karcinoma.

Ključne riječi: epigenetika, metilacija, acetilacija, karcinom, epigenetska terapija

(21 stranica, 4 slika, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

### Epigenetic tumor growth control mechanisms

Petra Pavić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epigenetics is a field of science that studies heritable changes in phenotype caused by action of epigenetic mechanisms that do not involve a change in the DNA sequence but a change in gene expression. They include reversible changes in DNA methylation, histone modifications and activity of non-coding RNA molecules. Errors within the mechanisms can cause development of invasive cancer. Cancer is characterized by continuous proliferation and metastasis on surrounding tissues. Despite the availability of numerous treatment methods, treatment is long and complicated. Due to the reversibility of epigenetic mechanisms, epigenetic therapy is being developed which when used in addition to already known forms of treatment like chemotherapy and radiotherapy, contribute to successful treatment outcome. Breast cancer and colorectal cancer are described as examples of the influence of epigenetic modifications in the development of cancer, as well as the use of epigenetic therapy.

Keywords: epigenetics, methylation, acetylation, cancer, epigenetic therapy

(21 pages, 4 figures, 26 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. EPIGENETSKI MEHANIZMI</b> .....	2
2.1. <b>METILACIJA DNA</b> .....	2
2.2. <b>MODIFIKACIJA HISTONA I PREUREĐENJE KROMATINA</b> .....	4
2.2.1. METILACIJA HISTONA .....	4
2.2.2. ACETILACIJA HISTONA .....	4
2.2.3. FOSFORILACIJA HISTONA.....	5
2.3. <b>NE KODIRAJUĆA RNA</b> .....	6
2.3.1. miRNA.....	6
<b>3. EPIGENETIKA I RAZVOJ TUMORA</b> .....	7
3.1. <b>HIPERMETILACIJA I HIPOMETILACIJA DNA</b> .....	7
3.1.1. HIPOMETILACIJA ONKOGENA .....	7
3.1.2. HIPERMETILACIJA TUMOR SUPRESOR GENA.....	7
3.2. <b>MODIFIKACIJA HISTONA I PREUREĐENJE KROMATINA</b> .....	9
3.2.1. ACETILACIJA I METILACIJA HISTONA.....	9
3.3. <b>NE KODIRAJUĆA RNA</b> .....	10
<b>4. EPIGENETSKA TERAPIJA</b> .....	11
4.1. <b>DNMT INHIBITORI</b> .....	11
4.2. <b>HDAC INHIBITORI</b> .....	12
4.3. <b>TERAPIJA KARCINOMA DOJKE</b> .....	13
4.3.1. EPIGENETSKE PROMJENE .....	13
4.3.2. TERAPIJA INHIBITORIMA DNMT .....	14
4.3.3. TERAPIJA INHIBITORIMA HDAC .....	14
4.4. <b>TERAPIJA GASTROINTESTINALNOG KOLOREKTALNOG KARCINOM</b> .....	15
4.4.1. TERAPIJA DNMT I HDAC INHIBITORIMA .....	16
4.4.2. miRNA.....	16
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	17
<b>6. LITERATURA</b> .....	18
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	21

## 1. UVOD

Epigenetika obuhvaća nasljedne izmjene ekspresije gena i organizacije kromatina bez promjene u sekvenci DNA. Epigenetski mehanizmi važni su za normalan razvoj i održavanje ekspresije gena u specifičnim tkivima. Uobičajene epigenetske izmjene su metilacija DNA, modifikacije histona, promjena strukture kromatina i regulacija ne kodirajuće RNA specifično ekspresije microRNA. Mehanizmi su međusobno povezani te zajedno utječu na mijenjanje fenotipa (Sharma i sur., 2009).

Ukoliko nastanu nepravilnosti unutar epigenetskih procesa dolazi do izmijenjene funkcije gena i pojave karcinoma. Karcinom je bolest koju karakterizira neprestana proliferacija stanica i sposobnost metastaziranja, tj. širenja na druga tkiva putem krvotoka ili limfnog sustava. Uzrokovan je akumulacijom epigenetskih promjena uvjetovanim ekstenzivnim genetskim mutacijama (Abdelfatah i sur., 2016). Pojavu i progresiju karcinoma uz genetske mutacije (supstitucije nukleotida, translokacije, delecije i aneuploidija kromosoma) karakteriziraju i abnormalnosti epigenoma. Epigenomom nazivaju se sve epigenetske izmjene prisutne u stanici (Klug i sur. 2019). Na epigenom također mogu imati utjecaj i vanjski faktori kao što su kemijski spojevi u prehrani i okolišu koji mogu aktivirati ili inhibirati dijelove DNA. Zbog reverzibilnosti epigenetskih aberacija razvijaju se novi oblici potencijalne terapije koji svojim djelovanjem nastoje popraviti nastale mutacije u ekspresiji gena tumorskih stanica. Nekolicina epigenetskih lijekova odobrena je za liječenje hemolitičkih karcinoma no većina je i dalje u stadijima istraživanja (Sharma i sur., 2010).

U radu su objašnjene epigenetske promjene zdravih stanica i izmjene epigenoma koje uzrokuju pojavu karcinoma. Uloga mutacija u inicijaciji i progresiji karcinoma te potencijalna uporaba i saznanja o liječenju i prevenciji razvoja karcinoma opisana su na primjeru karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma.

## 2. EPIGENETSKI MEHANIZMI

Pod epigenetske mehanizme ubrajamo metilaciju DNA, kovalentne modifikacije histona i djelovanje ne kodirajućih molekula RNA. Ovi mehanizmi djeluju zajedno i međusobno se nadopunjuju kako bi regulirali strukturu kromatina i ekspresiju gena organizma (Sharma i sur., 2010). Mutacijama dolazi do neravnoteže epigenoma i nastanka staničnih promjena koje mogu dovesti do nastanka tumora (Klug i sur., 2019).

### 2.1. METILACIJA DNA

Najčešća epigenetska promjena koja regulira aktivnost gena je metilacija DNA. Metilacija je proces u kojem dolazi do vezanja metilne skupina s donora S-adenozilmetionina (SAM) na peti ugljikov atom citozina prilikom čega nastaje 5-metilcitozin (5mC) (Slika 1). Reakcija je katalizirana enzimima DNA metiltransferaze (DNMT) (Sharma i sur., 2010). Kod ljudi pronalazimo 5 podtipova: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L (Fardi i sur., 2018). DNMT1 informaciju o metiliranosti prenosi na stanice kćeri, dok DNMT3A i 3B reguliraju *de novo* metilaciju (Bennett i Licht, 2018).

Metilacija je ograničena na mjesta gdje se iza citozina nalazi gvanin nazvanim CpG dinukleotidi. CpG dinukleotidi neravnomjerno su raspoređeni po genomu no najveću koncentraciju imaju u pojedinim regijama DNA, tj. CpG otocima (Armstrong, 2013). CpG otoci imaju važnu ulogu u regulaciji genske transkripcije koja ovisi o njihovoj metiliranosti. CpG otoci su u promotorskim regijama gena važnih za rad stanice (engl. *housekeeping* geni) te u normalnim stanicama nisu metilirani zbog čega dolazi do aktivne transkripcije (Srivastava i Verma, 2002). Kod tumorskih stanica CpG otoci unutar genskih promotora su metilirani što dovodi do promjene strukture kromatina i nemogućnosti stvaranja transkripcijskog kompleksa ni sinteze mRNA zbog čega dolazi do utišavanja gena (Slika 2) (Han i sur., 2019).

Za gensku regulaciju uz metilaciju potrebna je i demetilacija, tj. uklanjanje metilne skupine sa citozina katalizirano enzimima. Demetilacija je ključna za uklanjanje epigenetskih promjena i može biti pasivna ili aktivna. Pasivna demetilacija označava neuspjelo dodavanje metilne skupine na citozin dok se kod aktivne demetilacije uklanja metilna skupine s 5mC (Klug i sur., 2019).





## 2.2. MODIFIKACIJA HISTONA I PREUREĐENJE KROMATINA

Kromatin je struktura koju čine nukleosomi građeni od molekule DNA čvrsto omotane okolo oktamerne jezgre histonskih proteina (H2A, H2B, H3 i H4). Jezgra se sastoji od dva dimera H2A/H2B i tetramera H3/H4 (Jovanovic i sur., 2010). Daljnjim omatanjem molekule DNA nastaju kromosomi. U stanicama je kromatin dinamična struktura i nalazi se u dva oblika: eukromatin i heterokromatin. Otvorena struktura (eukromatin) povezana je s aktivnom ekspresijom gena dok je heterokromatin kondenziran i sprječava transkripciju (Han i sur., 2019). Izmjena kromatinske strukture dovodi do regulacije ekspresije gena (Jovanovic i sur., 2010). Interakcija DNA i transkripcijskih proteina regulirana je preuređenjem strukture kromatina pomicanjem i uklanjanjem nukleosoma pomoću proteinskih kompleksa ili kovalentnim modifikacijama aminokiselina N-terminalnog kraja histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4 (Klug i sur., 2019). N-terminalni kraj histona proteže se van nukleosoma te tvori aminokiselinski rep. Aminokiseline su modificirane proteinima koji dodaju kemijsku skupinu na histon ili pisačima (engl. *writers*), proteinima koji prepoznaju modifikacije ili čitačima (engl. *readers*) i proteinima koji uklanjaju kemijske skupine ili brisačima (engl. *erasers*) (Klug i sur., 2019). Najčešće modifikacije histona su acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvinacija, deaminacija i prolin izomerizacija (Jovanovic i sur., 2010).

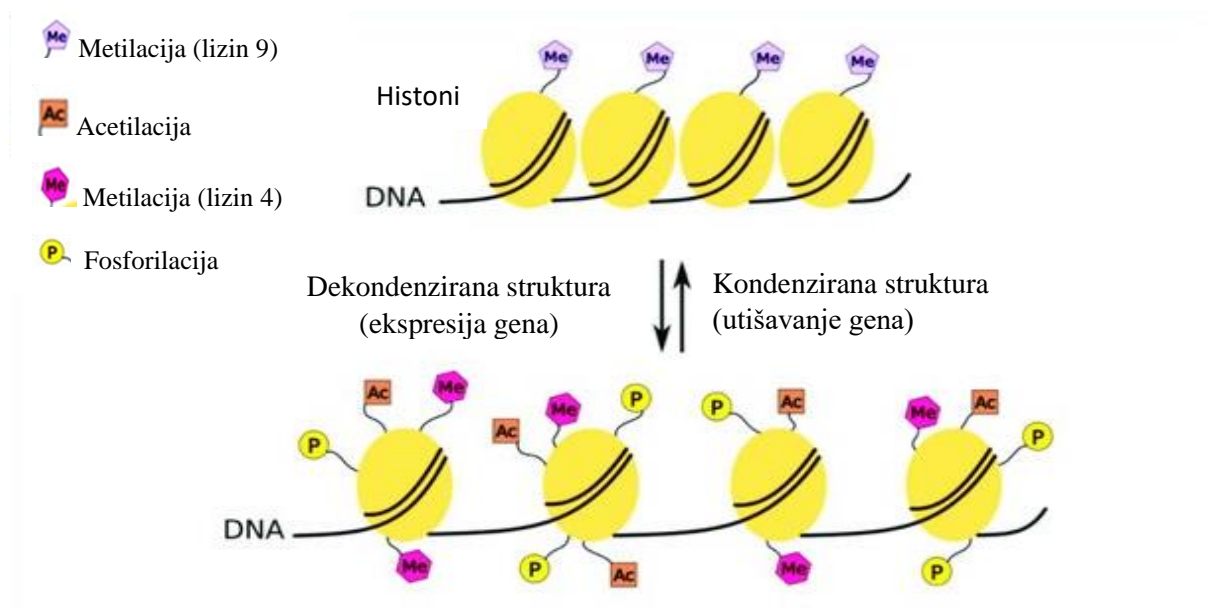
### 2.2.1. METILACIJA HISTONA

Metilacija se pojavljuje na lizinskim i arganinskim ostacima repova H3 i H4 histonskih proteina (Virani i sur., 2012). Dodavanje metilne skupine katalizirano je metiltransferazama specifičnim za pojedinu aminokiselinu. Kod lizina to je lizin-metiltransferaza (KMT) i prolin arginin metil transferaza (PRMT) za arginin. Kod metilacije ne dolazi do promjene naboja histonskih proteina nego izmjene afiniteta za transkripcijske faktore. Ovisno o aminokiselinskom ostatku na koji se veže metilna skupina može doći do aktivacije ili inhibicije transkripcije (Slika 3). Metiliranost pojedinih aminokiselina uklanja se histonskim demetilazama (Han i sur., 2019).

### 2.2.2. ACETILACIJA HISTONA

Acetilacija histonskih proteina proces je u kojemu se acetilnu skupinu dodaje na protein. Regulirana je enzimima: histon acetiltransferazom (HAT) i histon deacetilazom (HDAC). Enzim HAT dodaje acetilnu skupinu na lizin za što koristi acetil CoA kao kofaktor čime

kromatin bude otvoreniji za primanje transkripcijskih faktora. Enzimi HDAC kataliziraju uklanjanje acetilne skupine i zaustavljaju transkripciju (Virani i sur., 2012). Acetilacija pojačava transkripciju gena mijenjanjem naboja histonskih proteina (Slika 3). Vezanjem acetilne skupine neutraliziraju se pozitivno nabijeni histonski proteini i smanjuje se njihova interakcija s negativno nabijenim DNA fosfatima čime se mijenja struktura kromatina (Lu i sur., 2020). Neuravnotežena aktivnost enzima koji sudjeluju u acetilaciji i deacetilaciji uzrokuje netočnu ekspresiju gena i nastanak tumora (Lu i sur., 2020).



Slika 3. Utjecaj histonskih modifikacija na strukturu kromatina. Metilacija lizina utječe na aktivnost ili utišavanje gena, dok acetilacija uvijek dovodi do zaustavljanja transkripcije (preuzeto i prilagođeno iz: Akil i sur., 2020).

### 2.2.3. FOSFORILACIJA HISTONA

Fosforilacija histona slabo je istražena i malo se zna o njezinim ulogama. Odvija se na serinu, treoninu i tirozinu histonskih repova katalizirana kinazama i fosfatazama koje dodaju ili uklanjaju fosfatnu skupinu. Dodatkom fosfatne skupine naboj histonskih proteina postaje negativniji te mijenja strukturu kromatina i dovodi do ekspresije gena (Fardi i sur., 2018).

## 2.3. NE KODIRAJUĆA RNA

Tijekom transkripcije nastaje ne kodirajuća RNA (ncRNA) koja je prepisana s DNA ali nije translirana u protein. Imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, inaktivaciji X kromosoma te usmjeravaju metilaciju DNA i modifikaciju histona (Armstrong, 2013). Mogu uzrokovati karcinogenezu ili imati antitumorski učinak ovisno o tkivu u kojem se nalaze (Jung i sur., 2020). Djeluju na mRNA i onemogućuju translaciju i proizvodnju proteina te tako reguliraju ekspresiju gena. Podijeljene su u skupine prema veličini i funkciji: kratka ncRNA građena od manje od 31 nukleotida i duga ncRNA koja sadrži više od 200 nukleotida. Kratka ncRNA dijeli se na tri podskupine: miRNA (engl. *microRNA*), siRNA (engl. *short interfering RNA*) i piRNA (engl. *piwi - interacting RNA*) (Klug i sur., 2019). O mehanizmima ne kodirajuće RNA nema puno podataka i većina je još u fazi istraživanja.

### 2.3.1. miRNA

miRNA su kratke jednolančane molekule RNA koje imaju značajnu ulogu u regulaciji mRNA (Jung i sur., 2020). Komplementarne su mRNA i glavna funkcija im je regulacija ekspresije gena. Vežu se na komplementarnu sekvencu u 3' netranslatiranim regijama (UTR) na mRNA što uzrokuje poremećaje u translaciji gena uključujući i one koji sudjeluju u karcinogenezi kao geni za proliferaciju i apoptozu stanica (Okugawa i sur., 2015; Jung i sur., 2020). Istražuje se uloga miRNA kao biomarkera za ranu detekciju karcinoma (Schröder i sur., 2021).

### **3. EPIGENETIKA I RAZVOJ TUMORA**

Epigenetske promjene važne su za ekspresiju gena normalnih stanica, ali utječu i na aktivnost gena koji sudjeluju u razvoju karcinoma. Ukoliko stanica izgubi kontrolu nad rastom i krene nekontrolirano proliferirati nastaju nakupine stanice ili benigni tumori. Ako se uz proliferaciju stanice odvoje i napadnu druga tkiva nastaje sekundarni tumor, tj. maligni (Klug i sur., 2019). Tumorske stanice imaju velik broj mutacija gena za popravak DNA, apoptozu i signaliziranje stanica kao i onkogeni i tumor supresor gena. Onkogeni potiču diobe stanica i razvoj karcinoma, dok tumor supresor geni suprimiraju karcinogenezu (Han i sur., 2019).

#### **3.1. HIPERMETILACIJA I HIPOMETILACIJA DNA**

Mutacije enzima koji kataliziraju metilaciju DNA usko su povezane s nastankom tumora i metastaziranjem te inhibitori tih enzima služe kao vrsta tretmana za liječenje karcinoma. Također promjene epigenoma mogu se detektirati i koristiti za dijagnozu i predviđanje tijeka bolesti (Han i sur., 2019).

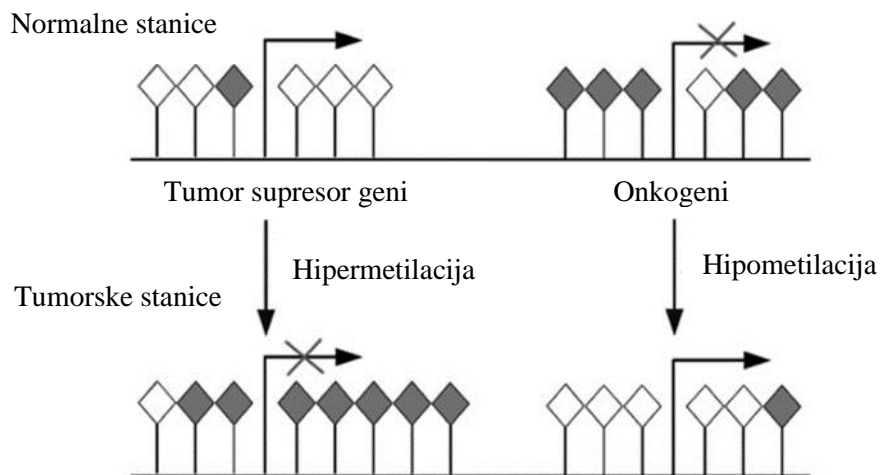
##### **3.1.1. HIPOMETILACIJA ONKOGENA**

Tumorske stanice pokazuju smanjenu metilaciju (hipometilacija) za razliku od normalnih stanica. Budući da stabilni genom karakterizira metilacija, hipometilacija uzrokuje nestabilnost kromosoma i povećane stope genskih mutacija i rekombinacije (Jovanovic i sur., 2010; Fardi i sur., 2018;). Uzrokuje ponovnu aktivnost utišanih onkogeni i nekontroliranu transkripciju, a njihovom ponovnom aktivacijom dolazi do proliferacije stanica benignih nakupina i nastanka tumora (Slika 4) (Esteller, 2008; Fardi i sur., 2018). Također smanjuje kontrolu nad utisnutim genima čime stanice dobivaju nova svojstva rasta.

##### **3.1.2. HIPERMETILACIJA TUMOR SUPRESOR GENA**

Tumorske stanice sadrže regije gena s hipermetiliranim promotorskim regijama, najčešće su to geni za regulaciju staničnog ciklusa, apoptozu, popravak DNA i tumor supresor geni (Cai i sur., 2011). Hipermetilacija povezana je s represijom gena i genomskom neravnotežom i može dovesti do inaktivacije tumor supresor gena i kompaktiranja kromatina (Jovanovic i ostali, 2010). Utišavanje gena hipermetilacijom prisutno je u većini karcinoma u većoj učestalosti nego genske mutacije (Vedeld i sur., 2018). Hipermetilacija CpG otoka tumor

supresor gena smanjuje transkripciju, dok su u normalnim stanicama te regije nemetilirane (Slika 4) (Srivastava i Verma, 2002). Pomoću ovih hipermetiliranih regija CpG otoka koje se nazivaju i CIMP (engl. *CpG island methylator phenotype*) moguća je identifikacija vrste tumora ili predviđanje mjesta metastaziranja (Klug i sur., 2019).



Slika 4. U normalnim stanicama tumor supresor geni su aktivni dok su onkogeni utišani. Hipermetilacijom tumor supresor geni postaju neaktivni, a hipometilacijom onkogenena pojačava se njihova ekspresija (preuzeto i prilagođeno iz: Nowacka-Zawisza i Wiśnik, 2017).

## **3.2. MODIFIKACIJA HISTONA I PREUREĐENJE KROMATINA**

U tumorskim stanicama uz nekontroliranu metilaciju dolazi i do poremećene ekspresije gena enzima HAT i HDAC za histonske promjene i promjenu strukture kromatina (Bennett i Licht 2018). Mutacije enzima uzrokuju izlazak stanica iz kontrole staničnog ciklusa i početak neprestane proliferacije što dovodi do nastanka tumora. Abnormalnosti prilikom deacetilacije histona povezuju se s ranom transformacijom normalnih u tumorske stanice (Klug i sur., 2019).

### **3.2.1. ACETILACIJA I METILACIJA HISTONA**

Acetilacija histona povezana je s aktivacijom transkripcije jer oslabljuje vezu histona s DNA zbog čega su promotori slobodni za transkripcijske faktore i RNA polimerazu. Povećana acetilacija histona povezanih s onkogenima aktivira njihovu transkripciju, dok hipoacetilacija utišava aktivnost tumor supresor gena. Obje aberacije povezuju se s nastankom tumora (Jung i sur., 2020).

Metilacija može uzrokovati inhibiciju ili aktivaciju transkripcije gena ovisno o dijelu aminokiselinskog ostatka koji je metiliran. Mehanizmi važni za normalan rad stanice regulirani su metilacijom, ali također enzimi koji kataliziraju metilaciju (HMT) i demetilaciju (HDM) imaju važnu ulogu u karcinogenezi. Prevelika ili premala ekspresija mijenja cjelokupnu metilaciju histona i time može promijeniti ekspresiju onkogeni ili tumor supresor gena što potencijalno može dovesti do stvaranja karcinoma ili njegov daljnji rast (Jung i sur., 2020).

### **3.3. NE KODIRAJUĆA RNA**

Uloga miRNA u nastanku tumora prvi puta je uočena kod kronične limfocitne leukemije i smanjene ekspresije miR-15 i -16 (Okugawa i sur., 2015). miRNA utječe na regulaciju onkogenih (onko-miRNA) inhibirajući ekspresiju tumor supresor gena ili djeluje tumor supresorski (ts-miRNA) ovisno o komplementarnoj DNA sekvenci (Jung i sur., 2020). Može spriječiti nastanak proteina i potaknuti karcinogenezu nakon transkripcije te ima ulogu u progresiji i metastaziranju karcinoma.

Budući da se nalaze u osjetljivom području genoma mogu biti pod utjecajem brojnih mutacija kao što su točkaste mutacije, delecije, amplifikacije i translokacije. Uočena je povećana metilacija RNA tumorskih stanica (Konno i sur., 2019), ali i prekomjerna ekspresija miRNA (Jung i sur., 2020). Česta netočna ekspresija miRNA u tumorskim stanicama i velika stabilnost u tjelesnim tekućinama daje potencijal za korištenje miRNA kao neinvazivna pretraga za dijagnozu karcinoma (Konno i sur., 2019).



## **4. EPIGENETSKA TERAPIJA**

Trenutno liječenje karcinoma kombinacija je operativnih zahvata, kemoterapije i radioterapije koje ciljano djeluju na stanice koje brzo proliferiraju, tj. tumorske stanice (Klug i sur., 2019). Do nastanka karcinoma dovodi nagomilavanje genetskih i epigenetskih mutacija. Budući da su epigenetske promjene genoma reverzibilne otvara se mogućnosti liječenja epigenetskom terapijom i moguća prevencija karcinoma (Bennett i Licht, 2018). Epigenetske terapija nastoji promijeniti ekspresiju gena pomoću inhibitora enzima koji kataliziraju metilaciju DNA (DNMT) i modifikacije histona (HDAC, HMT i HDM) (Cai i sur., 2011). Spomenuti su inhibitori enzima DNMT i HDAC budući da su najviše istraženi u terapiji karcinoma.

### **4.1. DNMT INHIBITORI**

DNMT inhibitori skupina su lijekova koji inhibiraju rad enzima DNA metiltransferaze u metilaciji DNA. Najčešće mutacije tumorskih stanica su mutacije enzima DNMT3A i DNMT1 koje omogućuju prekomjernu proliferaciju, samoobnovu, migriranje i stvaranje kolonija (Han i sur., 2019). Inhibitori DNMT-a sadrže analoge citozina koji se ugrađuju u molekulu DNA i RNA te nakon replikacije tvore kovalentne spojeve s enzimom DNMT i sprječavaju daljnju metilaciju i proliferaciju tumorskih stanica (Cai i sur., 2011). Zbog ugrađivanja u molekulu DNA ovi lijekovi su izrazito citotoksični i uzrokuju staničnu smrt zbog pojave oštećenja na DNA (Abdelfatah i sur., 2016).

Pozitivna strana im je što nisu specifični samo za jedan oblik karcinoma već se mogu globalno primjenjivati. Dva lijeka su odobrena za uspješno liječenje hemolitičkih karcinoma uzrokovanih hipermetilacijom: 5-azacitadin i decitabin (Cai i sur., 2011). Oba lijeka su na kliničkim ispitivanjima u primjeni liječenja krutih tumora. Zbog velike toksičnosti ovih lijekova razvija se alternativni lijek zebularin sa smanjenom citotoksičnošću (Fardi i sur., 2018). Učinci inhibitora DNMT uvelike su istraživani kao i njihov utjecaj u kombinaciji s inhibitorima HDAC i drugim dostupnim oblicima liječenja (Schröder i sur., 2021).

## 4.2. HDAC INHIBITORI

Inhibicijom enzima HDAC dolazi do akumulacije acetilacije na histonima i popravka staničnih procesa koji su oštećeni u tumorskim stanicama čime inhibiraju rast tumora. Osim epigenetske aktivnosti imaju i citotoksičnu stoga se koriste u malim dozama (Abdelfatah i sur., 2016). Različite vrste inhibitora HDAC istražuju se za liječenje hematoloških i čvrstih tumora (Cai i sur., 2011). Butirat je prvi HDAC inhibitor koji je otkriven da inhibira rast stanica i inducira apoptozu jer uzrokuje hiperacetilaciju H3 i H4.

Lijekovi odobreni za liječenje hematoloških karcinoma su vorinostat, panobinostat i romidepsin te su na kliničkim ispitivanjima za liječenje krutih tumora (Bennett i Licht, 2018). Vorinostat potiče popravak epigenetskih aberacija kromatina i ponovnu aktivaciju tumor supresor gena (p21) jer uzrokuje apoptozu i povećava osjetljivost stanica na kemoterapiju (Bennett i Licht, 2018). Sintetski ili prirodni HDAC inhibitori koriste se kod tumora koji pokazuju preveliku aktivnost HDAC enzima ili HAT mutacija (Bennett i Licht, 2018).

Liječenje solidnih tumora komplicirano je zbog postranog učinka lijekova na zdrave stanice jer demetilacija i acetilacija nisu specifične samo za tumorske stanice. Budući da su solidni tumori heterogeni i sadrže stalno obnavljajuće matične stanice koje dovode do rezistencije na kemoterapiju koristi se kombinacija lijekova kako bi se stanice dediferencirale i senzibilizirale na terapiju (Mohammad i sur., 2019).

### 4.3. TERAPIJA KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke jedan je od najčešće dijagnosticiranih karcinoma kod žena. Unatoč unaprjeđenju liječenja stopa smrtnosti je i dalje visoka. Većina epigenetskih lijekova ciljano utječe na metilaciju DNA i modifikacije histona. Iako obećavajuće trenutno su svi oblici epigenetske terapije u stadiju istraživanja te niti jedna vrsta nije odobrena za kliničko liječenje. Budući da liječenje karcinoma dojke zahtjeva multidisciplinarnu terapiju koja uključuje operativne zahvate, tretman radijacijom i kemoterapiju (Cai i sur., 2011) samostalno korištenje epigenetskih lijekova ne pokazuje rezultate već se potencijalno mogu koristiti u kombinaciji s drugim metodama liječenja kako bi se smanjila rezistencija tumorskih stanica i povećala uspješnost terapije (Lustberg i Ramaswamy, 2011; Brown i sur., 2022).

#### 4.3.1. EPIGENETSKE PROMJENE

Nastanku tumora prethodi metilacija genoma i modifikacija histona. Česte hipermetilacije i hipometilacije gena uzrokuju transformaciju zdravih stanica u tumorske. Enzimi DNMT1 i DNMT3B imaju povećanu ekspresiju kod karcinoma dojke (Lustberg i Ramaswamy, 2011).

Do hipermetilacije i utišavanja gena dolazi kod gena pod utjecajem estrogena (ESR1 i PR), apoptoznih gena (HOXA5 i TMS1), gena za popravak DNA (BRCA1, p53 i MLH1) i gena za inhibiciju staničnog ciklusa (p16 i RASSF1A) (Srivastava i Verma, 2002). Metilacije tumor supresor gena RAR $\beta$ 2 i RASSF1A, rani su epigenetski događaji u nastanku karcinoma dojke (Jovanovic i sur., 2010). Korištenje epigenetske terapije za popravak promjena nastalih metilacijom i histonskih acetilacija ima potencijala u liječenju karcinoma dojke (Cai i sur., 2011).

Povećana sveukupna acetilacija i metilacija histona povezana je s većom genskom aktivnosti te je uočena u stanicama karcinoma dojke. Neke od čestih modifikacija su deacetilacija lizina 16 i trimetilacija lizina 20 na histonu H4, utišavanje gena metilacijom lizina 9 i aktivacija gena metilacijom lizina 4 i 27 na H3. Gubitak trimetilacije lizina 27 na H3 (H3K27) ukazuje na negativni prognostički indikator (Lustberg i Ramaswamy, 2011).

#### 4.3.2. TERAPIJA INHIBITORIMA DNMT

Inhibitori DNMT koriste se za liječenje hematoloških karcinoma no u kombinaciji s već poznatim oblicima liječenja ili inhibitorima HDAC pokazuju zadovoljavajuće rezultate i kod karcinoma dojke (Cai i sur., 2011).

Azacitidin i decitabin nisu pokazali uspjeh u liječenju kao monoterapija već u kombinaciji s inhibitorima HDAC (Schröder i sur., 2021). Ova vrsta terapije zbog heterogenosti karcinoma dojke i agresivnosti bolesti ne djeluje na sve podtipove. Zebularin je manje toksičan za stanice i pokazao je učinak u inhibiciji DNMT jer uzrokuje povećanje ekspresije tumor supresor gena p21 i smanjenje ekspresije ciklina D (Jovanovic i sur., 2010).

Iako pokazuju dobre rezultate ovi lijekovi imaju veliku citotoksičnost. Budući da se ugrađuju u DNA postoji mogućnost da potencijalno imaju mutageno djelovanje te se stoga traže alternative. Uočeno je da anestetik prokain i njegov derivat procainamid imaju demetilacijsku aktivnost i dovode do ponovne ekspresije utišanih tumor supresor. Oba spoja vežu se za CpG otoke i ne ugrađuju se u DNA sekvencu što ih čini boljim alternativama za liječenje (Jovanovic i sur., 2010).

#### 4.3.3. TERAPIJA INHIBITORIMA HDAC

Kombinacija HDAC inhibitora vorinostata, koji smanjenjem acetilacija histona i uzrokovanjem apoptoze utječe na stanični ciklus, paklitaksela i bavacizumaba pokazali su uspješnost liječenja kod pacijenata s metastaziranim karcinomom dojke. Samostalna primjena lijekova nije pokazala poboljšanje kliničke slike no kombiniranjem s kemoterapijom dovodi do smanjenja rezistencije tumora na liječenje (Munster i sur. 2011). Valproična kiselina inače lijek za epilepsiju jedini je klinički dostupan inhibitor HDAC s antitumorskim djelovanjem. Zaustavlja proliferaciju stanica i uzrokuje hiperacetilaciju histona te dokazano smanjuje rast tumora kao i metastaziranje (Cai i sur., 2011; Abdelfatah i sur., 2016).

#### **4.4. TERAPIJA GASTROINTESTINALNOG KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Gastrointestinalni karcinom (GK) uključuje pojavu bolesti u cijelom probavnom sustavu od jednjaka do debelog crijeva i rektuma od kojih su kolorektalni karcinom i karcinom želuca najčešći. Većina pacijenata s ranom fazom GK je asimptomatska što povećava rizik dijagnoze kasnijih stadija bolesti gdje su opcije liječenja limitirane (Vedeld i sur., 2018). Ovo poglavlje fokusira se na epigenetske promjene i primjenu epigenetske terapije na kolorektalnom karcinomu.

Razvoj kolorektalnog karcinoma započinje nakupljanjem mutacija u premalignim polipima na zdravom epitelu kolona ili rektuma koji imaju potencijal razvoja u maligni adenokarcinom i metastaziranje na okolna tkiva (Bardhan i Liu, 2013; Fernandes Durso i sur., 2017). Epigenetske promjene doprinose karcinogenezi i progresiji bolesti, a najviše je istražena aberantna metilacija DNA. Kod kolorektalnog karcinoma uočeno je postojanje regija CIMP velike gustoće hipermetiliranih CpG dinukleotida i mutacija onkogeni BRAF i KRAS (Abdelfatah i sur., 2016). Utišavanje gena MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 (Okugawa i sur., 2015) za popravak DNA hipermetiliranjem događa se rano tijekom formiranja tumora i uzrokuje akumulaciju pogrešaka u replikaciji DNA (Klug i sur. 2019). Budući da se metilacija može detektirati postala je važna kao neinvazivni biomarker za ranu detekciju i predviđanje ishoda liječenja (Vedeld i sur., 2018). Geni koji se koriste kao biljezi za identifikaciju CIMP regija su CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1 (Fernandes Durso i sur., 2017).

Iako kemoterapija pokazuje dobre rezultate dolazi do neuspješnosti liječenja kolorektalnog karcinoma zbog aberacija epigenoma koje uzrokuju rezistenciju na lijekove 5-fluorouracil, oxaliplatin i irinotekan. Svi pokušaji liječenja epigenetskim lijekovima bili su neuspješni. Naime ovakav tip terapije u kontroliranim dozama ima veću ulogu u senzibilizaciji stanica na tradicionalne oblike liječenja (Baretti i Saba Azad, 2018). Stoga se predlaže liječenje kombinacijom inhibitora i tradicionalnih načina liječenja jer epigenetska terapija može poništiti rezistenciju stanica na kemoterapiju i poboljšati ishode liječenja (Abdelfatah i sur., 2016; Baretti i Saba Azad, 2018).

#### 4.4.1. TERAPIJA DNMT I HDAC INHIBITORIMA

Liječenje inhibitornim lijekovima nije dovoljno učinkovito za korištenje u kliničkom liječenju no pokazuje značajnu ulogu u senzibilizaciji tumora i poboljšanju liječenja kemoterapijom i zračenjem (Mohammad i sur., 2019). Rezistencija tumora uzrokovana liječenjem česta je pojava no regulacijom epigenetskih mehanizama inhibitorima DNMT i HDAC tumorske stanice mogu se senzibilizirati na citotoksični učinak lijekova (Abdelfatah i sur., 2016).

5-azacitadin, decitabin i zebularin pokazuju djelovanje u kombinaciji s kemoterapijom i dobro se toleriraju. Decitabin i 5-azacitadin uzrokuju osjetljivost stanica i smanjenje rezistencije na kemoterapiju citotoksikom 5-florouracilom (5-FU) na rezistentnim tumorima (Jung i sur., 2020).

Vorinostat u kombinaciji s kemoterapijskim lijekovima FOLFOX (folna kiselina, fluorouracil i oxaliplatin) i FOLFIRI (folna kiselina, fluorouracil i irinotekan) imaju minimalni učinak (Jung i sur., 2020). No inhibitori HDAC imaju utjecaj na inhibiciju proteina za popravak DNA i time stanice senzibiliziraju na zračenje. Korištenje vorinostata prije radioterapije pozitivno djeluje na liječenje i smanjenje veličine tumora. Također uporaba panobinostata uzrokuje veću osjetljivost i smanjenje rezistencije na kemoterapiju u rezistentnim tumorima (Jung i sur., 2020).

#### 4.4.2. miRNA

miR-17-5p, -21-5p i -200c-3p pojačano su metilirane u tumorskim stanicama. Detekcija metilacija miRNA koristi se za rano otkrivanje gastrointestinalnih bolesti (Konno i sur., 2019). miR-17-92a, -135b, -143 i -145 reguliraju mehanizme koji dovode do karcinogeneze. Aktivnost miR-143 inhibirana je kod kolorektalnog karcinoma koji u zdravim stanicama sprječava rast. Protein p53 inaktiviran je kod invazivnih karcinoma i reguliran je miR-34a/b/c, -133a, -143, i -145 (Jung i sur., 2020). Aberantne miRNA izlučuju se u krv i probavni sustav te su lako dostupne kao neinvazivni biomarkeri. Kao biomarkeri za kolorektalni karcinom koriste se miR-21, -92a i -17-3p no za kvalitetniju dijagnozu potrebna je kombinacija više biomarkera (Okugawa i sur., 2015).

## **5. ZAKLJUČAK**

Aberacije epigenetskih mehanizama i poremećaji rada enzima koji ih reguliraju zahvaćaju somatske stanice i uzrokuju razvoj malignih tumora. Procesu poput metilacije DNA, modifikacije histona i aktivnosti ne kodirajuće RNA zaslužni su za transformaciju zdravih stanica u tumorske. Zbog reverzibilnosti mutacija promatrane su kao moguće nove vrste terapije. Razvijeni epigenetski lijekovi pokazuju odlične rezultate u kliničkim istraživanjima te su neki odobreni za liječenje karcinoma ili služe za senzibilizaciju tumorske stanice na liječenje radijacijom, citotoksičnom kemoterapijom ili imunoterapijom. Sama kombinacija lijekova za liječenje solidnih tumora još nije dovoljno istražena te su potrebna daljnja istraživanja. Unatoč tome epigenetski lijekovi u kombinaciji s već dostupnim oblicima terapije imaju veliki potencijal kao novi pristup u liječenju karcinoma.

## 6. LITERATURA

- Abdelfatah, E., Kerner, Z., Nanda, N., i Ahuja, N. (2016). Epigenetic therapy in gastrointestinal cancer: the right combination. *Therapeutic advances in Gastroenterology* 9(4): 560-579.
- Akil, A. S. A. S., Jerman, L. F., Yassin, E., Padmajeya, S. S., Al-Kurbi, A., i Fakhro, K. A. (2020). Reading between the (Genetic) Lines: How Epigenetics is Unlocking Novel Therapies for Type 1 Diabetes. *Cells* 9(11): 2403.
- Armstrong, L. (2014). Epigenetics. Garland Science, str. 29 – 65.
- Bardhan, K., i Liu, K. (2013). Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers* 5(2): 676–713.
- Baretti, M., i Azad, N. S. (2018). The role of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Current problems in cancer* 42(6): 530–547.
- Bennett, R. i Licht, J. (2018). Targeting Epigenetics in Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58: 187-207.
- Brown, L. J.; Achinger - Kawecka, J.; Portman, N.; Clark, S.; Stirzaker, C.; Lim, E. (2022). Epigenetic Therapies and Biomarkers in Breast Cancer. *Cancers* 14(3): 474.
- Cai, F. F., Kohler, C., Zhang, B., Wang, M. H., Chen, W. J., i Zhong, X. Y. (2011). Epigenetic therapy for breast cancer. *International journal of molecular sciences* 12(7): 4465–4487.
- Esteller M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 35(11): 1148–1159.
- Fardi, M., Solali, S., i Farshdousti Hagh, M. (2018). Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes and diseases* 5(4): 304–311.
- Fernandes Durso, D., Giulia Bacalini, M., Faria Do Valle, Í., Pirazzini, C., Bonafé, M., Castellani, G., Maria, A., Faria, C., Franceschi, C., Garagnani, P., i Nardini, C. (2017). Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(8): 12820-12830.
- Han, M., Jia, L., Lv, W., Wang, L., i Cui, W. (2019). Epigenetic Enzyme Mutations: Role in Tumorigenesis and Molecular Inhibitors. *Frontiers in oncology* 9: 194.
- Jovanovic, J., Rønneberg, J. A., Tost, J., i Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular oncology* 4(3): 242–254.



- Jung, G., Hernández - Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., i Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 17(2): 111–130.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., Killian, D. (2019). Concepts of Genetics, Global Edition. Pearson, str. 471-491, 617-636.
- Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., Motooka, D., Okuzaki, D., Kawamoto, K., Mizushima, T., Eguchi, H., Takiguchi, S., Satoh, T., Mimori, K., Ochiya, T., Doki, Y., Ofusa, K., Mori, M., i Ishii, H. (2019). Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nature Communications* 10(1): 3888.
- Lu, Y., Chan, Y. T., Tan, H. Y., Li, S., Wang, N., i Feng, Y. (2020). Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular cancer* 19(1): 79.
- Lustberg, M. B., i Ramaswamy, B. (2011). Epigenetic therapy in breast cancer. *Current Breast Cancer Reports* 3(1): 34–43).
- Mohammad, H. P., Barbash, O. i Creasy, C. L. (2019). Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nature Medicine* 25(3): 403–418.
- Nowacka-Zawisza, M. i Wiśnik, E. (2017). DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer (Review). *Oncology Reports* 38(5): 2587 - 2596.
- Okugawa, Y., Grady, W. M., i Goel, A. (2015). Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology* 149(5): 1204–1225.
- Schröder, R., Illert, A. L., Erbes, T., Flotho, C., Lübbert, M., i Duque-Afonso, J. (2022). The epigenetics of breast cancer - Opportunities for diagnostics, risk stratification and therapy. *Epigenetics* 17(6): 612–624.
- Virani, S., Colacino, J. A., Kim, J. H., i Rozek, L. S. (2012). Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR journal* 53(3-4): 359–369.
- Sharma, S., Kelly T. K., i Jones P. A. (2009). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31(1): 27–36.
- Vedeld, H. M., Goel, A., i Lind, G. E. (2018). Epigenetic biomarkers in gastrointestinal cancers: The current state and clinical perspectives. *Seminars in cancer biology* 51: 36–49.

Verma, M., i Srivastava, S. (2002). Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Oncology* 3(12): 755–763.

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 07.11.2000. godine. Zagrebačku Osnovnu školu Bukovac završila sam 2015. godine. Maturirala sam 2019. godine u X. Gimnaziji „Ivan Supek“ u Zagrebu, smjer Opća gimnazija sa skupinom predmeta na engleskom jeziku i iste godine upisala studij biologije na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu. Članica sam Udruge studenata biologije BIUS te sam u akademskoj godini 2021./2022. odrađivala praksu u laboratorijima za epigenetiku BioCentra na projektima s naglaskom na epigenetiku i gensku regulaciju. U istoj akademskoj godini dobila sam STEM stipendiju Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Govorim talijanski i engleski jezik za čije poznavanje mi je dodijeljen Cambridge internacionalni certifikat (IGCSE).