DNA metilacija gena uključenih u proces implantacije

Rac, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:479631

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Rac

DNA metilacija gena uključenih u proces implantacije

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Ljiljane Šerman i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ljiljana Šerman

POPIS KRATICA

c3	kaspaza 3 (engl. caspase 3)
CDX2	transkripcijski protein CDX2 (engl Caudal-type homeobox protein-2)
CLDN4	protein CLDN4 (engl. Human claudin-4)
CpG	citozin-gvanin dinukleotid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Dnmt	DNA metiltransferaza
EGF	epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor)
GATA3	transkripcijski protein GATA (engl. GATA-binding protein 3)
GPX-3	glutation peroksidaza 3 (engl. Glutathione peroxidase 3)
HAT	histon-acetil transferaza
HB-EGF	faktor rasta HB-EGF (engl heparin-binding epidermal growth factor)
hCG	humani korionski gonadotropin (engl. human chorionic gonadotropin)
hPR	humani progesteronski receptor
IL	interleukin
KLF5	transkripcijski faktor KLF5 (engl. Kruppel-like factor 5)
LIF	inhibitorni faktor leukemije (engl. leukemia inhibiting factor)
MBP	protein koji se veže na CpG dinukleotid (engl. methyl CpG binding protein)
Mdm2	(engl. Mouse double minute 2)
MeCP2	metil CpG- vežući protein 2 (engl. methyl CpG binding protein)
MUC-1	mucin -1
Np95	jezgrin protein 95 (engl. nuclear protein 95)
PAF	faktor aktivacije trombocita (engl. platelets activating factor)
PCNA	nuklearni antigen stanične proliferacije (engl. proliferating cell nuclear antigen)
PKC	protein kinaza C (engl. protein kinaza C)
PPARδ	peroksisom proliferator aktivirani receptor delta (engl. peroxisome proliferator-activated receptors)

PTGS-2 prostaglandinska endoperoksid sintaza 2 (engl. prostaglandin-endoperoxide synthase 2)

SNP jednonukleotidni polimorfizam (engl. single nucleotid polimorphisms)

SOX2 gen koji kodira za transkripcijski faktor SOX2 (engl SRY-related HMG-box gene 2)

TEAD4 transkripcijski protein TEAD4 (engl. TEA domain transcription factor 4)

TEF proteinska obitelj transkripcijskih pojačivaća (engl transcriptional enchancer family)

TF transkripcijski faktor

TFAP2C transkripcijski faktor AP-2 gama (engl. transcription factor AP-2 gamma)

SADRŽAJ

1. **SAŽETAK** .....
2. **SUMMARY** .....
3. **DNA METILACIJA KAO OBLIK EPIGENETSKE REGULACIJE EKSPRESIJE GENA** .. 1
   - **3.1 Epigenetika** 1
   - **3.2. DNA metilacija** 3
4. **IMPLANTACIJA** 5
   - **4.1. Rani embrionalni razvoj** 5
   - **4.2. Implantacija** 6
5. **KAKO GENI REGULIRAJU IMPLANTACIJU?** 10
   - **5.1. Genska regulatorna mreža bitna u razvoju blastociste** 10
   - **5.2. Geni koji sudjeluju u razvoju receptivnog endometrija** 12
6. **DNA METILACIJA GENA TIJEKOM IMPLANTACIJE** 18
7. **ZAHVALE** 22
8. **POPIS LITERATURE** 23
9. **ŽIVOTOPIS** 28

1. SAŽETAK

DNA METILACIJA GENA UKLJUČENIH U PROCES IMPLANTACIJE

Ivana Rac

Epigenetika je znanstvena disciplina koja proučava nasljedne promjene u genskoj ekspresiji i fenotipu, uzrokovane mehanizmima različitim od promjena DNA sekvence. Pri tome se koristi trima epigenetičkim modifikacijama odgovornim za regulaciju genske ekspresije, a to su: DNA metilacija, posttranslacijska modifikacija histona i RNA interferencija. Ovi mehanizmi međusobno se nadopunjuju te formiraju epigenetičku priču jedinstvenu za svaku osobu.

Različiti egzogeni i endogeni faktori, poput okoliša, životnog stila i životne dobi, utječu na ove procese, a njihove promjene mogu biti povezane s razvojem bolesti. DNA metilacija zajedno s posttranslacijskom modifikacijom histona izuzetno je bitna za pravilno odvijanje procesa implantacije. Implantacija je složen proces koji zahtjeva aktivaciju pravih gena u pravo vrijeme kako ne bi nastupio spontani pobačaj. Aktivacija pravih gena u pravo vrijeme nužna je i u postimplantacijskom razdoblju, a bilo kakva promjena u pravilnoj genskoj ekspresiji može dovesti do patologija povezanih s trudnoćom poput zastoja u rastu djeteta i preeklampsije. Procesu implantacije prethodi demetilacija majčinog i očevog genoma nakon čega slijedi val DNA metilacije *de novo* kako bi se stvorio jedinstveni metilacijski obrazac svake osobe. Detaljno poznavanje ovih mehanizama ključno je za razumijevanje neplodnosti uzrokovane pogreškama u tim procesima, a potencijalno nam može pomoći kako u prevenciji spontanih pobačaja tako i patologija vezanih uz trudnoću.

Ključne riječi: epigenetika, DNA metilacija, genska ekspresija, implantacija

2. SUMMARY

DNA METHYLATION OF GENES INVOLVED IN IMPLANTATION

Ivana Rac

Epigenetics is the study of heritable changes in gene expression and phenotype that do not involve changes in the DNA sequence. Basic epigenetic modifications regulating gene activity are DNA methylation, histone post-translational modifications and RNA interference. Those mechanisms complement each other and define the epigenetic story unique for each person. Several endogenous and exogenous factors such as environment, lifestyle and age can affect those mechanisms and their change can be related to the development of the disease. DNA methylation along with histone post-translational modifications is very important in the process of implantation. Implantation is a complex process in which the right genes have to be activated at the right time to avoid spontaneous abortion. The right genes also have to be active in the post-implantation period and any changes in proper gene expression can lead to different pregnancy-associated pathologies such as fetal growth restriction and preeclampsia. The proces of implantation is preceded by demethylation of mother's and father's genomes followed by the wave of methylation *de novo* in order to create a unique pattern of each person. The understanding of these mechanisms is very important because it is a key to understanding infertility caused by mistakes in these processes and can potentially help us prevent spontaneous abortions and different pregnancy-associated pathologies.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, gene expression, implantation

3. DNA METILACIJA KAO OBLIK EPIGENETSKE REGULACIJE EKSPRESIJE GENA

3.1 Epigenetika

Epigenetika je znanstvena disciplina koja proučava reverzibilne nasljedne promjene genske ekspresije koje nemaju u podlozi promjenu slijeda nukleotida unutar molekule DNA. Samo ime epigenetika (grč. epi-na,preko,izvan) govori u prilog ovoj tvrdnji . Epigenetika objašnjava kako vanjski čimbenici djeluju na ispoljavanje različitog fenotipa u osoba koje su genetički jednake poput jednojajčanih blizanaca. Prvi put se spominje 1942. godine (1). Conrad Waddington definira ovu znanost kao područje biologije koje proučava događaje između gena i njihovih produkata što dovodi do određenog fenotipa (2). Izloženost pojedinim okolišnim čimbenicima još u prenatalnom ili ranom postnatalnom razdoblju može biti povezana s povećanim rizikom od kroničnih bolesti u odrasloj dobi (3) .

Tri su glavna epigenetička mehanizma koja djeluju na ekspresiju gena:

1.) DNA metilacija
2.) Posttranslacijska modifikacija histona
3.) RNA interferencija

Ovi mehanizmi međusobno se nadopunjuju i na taj način stvaraju epigenetičku priču tj biljeg jedinstven kod svakog pojedinca. Taj biljeg prenosi se ne samo s jedne diobe na drugu nego i transgeneracijski. Na taj se način egzogeni čimbenici koji djeluju na majku mogu odraziti na sljedeće generacije. Ovi mehanizmi sudjeluju također i u tumorogenezi pa se smatra da su DNA metilacija i modifikacija histona zaslužne za nastajanje tumora u jednakoj mjeri kao i mutacije (4)

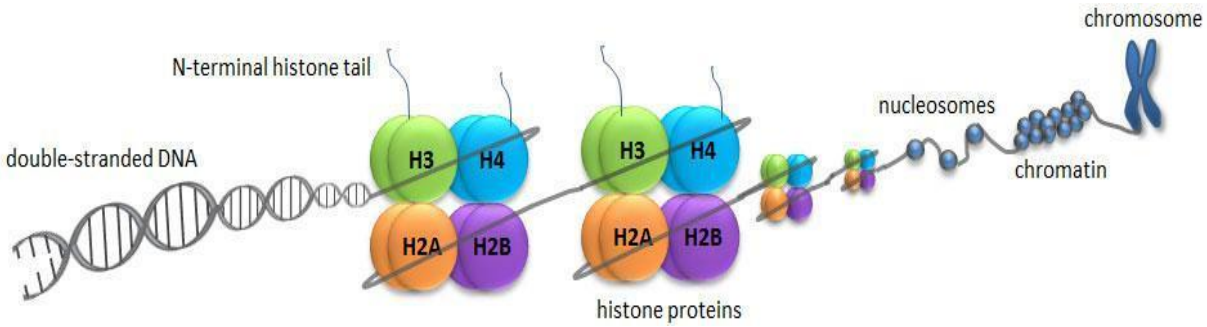
Histoni su pozitivno nabijeni proteini iz obitelji bazičnih proteina koji s namotanom DNA u jezgri formiraju strukturu kromatina (5). Postoje četiri vrste histona: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Dok ostali histoni ulaze u sastav nukleosoma, protein H1 je zaslužan za kompakciju DNA kako bi mogla formirati kromosome i stati u jezgru (6) (***Slika 1***).

Histoni podliježu raznim posttranslacijskim modifikacijama koje mijenjaju njihovu interakciju s molekulama DNA i jezgrinim proteinima poput acetilacije, deacetilacije, metilacije i fosforilacije.

Deacetilacijom histona, tj. uklanjanjem acetilne skupine iz repa histona, dolazi do promjene konformacije DNA što onemogućuje vezanje transkripcijskih faktora te posljedično do utišavanja gena (7). Ovaj proces kataliziraju histonske-deacetilaze (HDAC).

Acetilacija je dodavanje acetilne skupine na histonske proteine, što potiče ekspresiju gena te posljedično priječi DNA metilaciju, a provode je histonske-acetil transferaze (HAT) (4). Metilacija histona je dodavanje jedne ili više metilnih skupina s donora na aminokiseline lizin ili arginin pomoću enzima histonske metiltransferaze. Ovisno o tome dodaje li se metilna skupina na lizin ili arginin razlikujemo histon lizin N-metilltransferazu i histon arginin N-metiltransferazu (8). Metilacija histona zastupljena je najviše u histonima H3 i H4. Ukoliko je metiliran arginin, doći će aktivacije gena dok metilacija lizina može dovesti do aktivacije ili utišavanja gena ovisno o broju metilnih skupina (8).

Demetilacija histona podrazumijeva uklanjanje metilnih skupina s arginina ili lizina. Ovaj proces kataliziraju histon demetilaze.



Slika 1. *Namatanje DNA oko histona (H2A, H2B, H3 i H4) te daljnja spiralizacija u kromosome (preuzeto iz (9))*

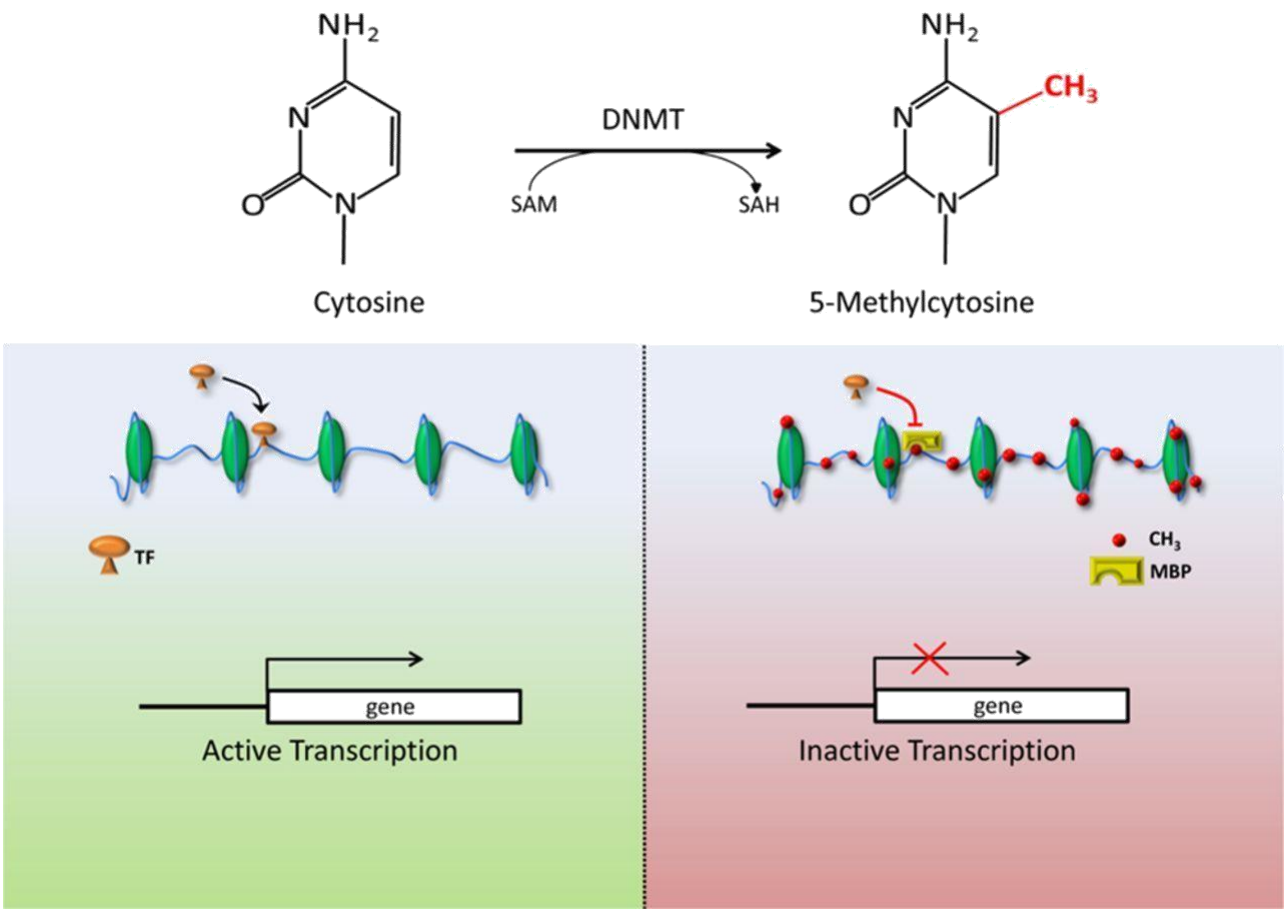
3.2. DNA metilacija

DNA metilacija je dodavanje metilne skupine s donora poput S-adenozil-L-metionina na molekulu DNA, točnije na citozin koji je dio CpG dinukleotida. Prijenosom metilne skupine od donora će nastati S-adenozil homocistein, a od citozina 5-metil citozin (10) (***Slika 2***). Posebna područja unutar našega genoma su CpG otoci koji su najčešće područje metilacije DNA i čine

1-2% genoma (7). To su slijedovi od najmanje 500 parova baza u kojima je udio CpG dinukleotida minimalno 55 % (7). CpG otoci se nalaze u području genskih promotora pa njihova metilacija utječe na transkripciju, translaciju i posljedično ekspresiju gena (11).

DNA metilaciju provode enzimi iz obitelji DNA metiltransferaza (Dnmt). Tri su glavna enzima iz ove porodice koja sudjeluju u metilaciji: Dnmt1, Dnmt3a i Dnmt3b (12). Dnmt3a i Dnmt3b uz pomoć Dnmt3l proteina kataliziraju *de novo* metilaciju tj., metiliraju nemetiliranu DNA pa na taj način uspostavljaju obrazac metilacije tijekom embriogeneze (13). Dnmt1 uz pomoć nuklearnog antigena stanične proliferacije (engl. proliferating cell nuclear antigen; PCNA) i proteina Np95 (engl. nuclear protein, 95 kDa) obnavlja već uspostavljeni obrazac metilacije nakon mitoze (14). Na taj način, nakon diobe stanice, novonastale stanice kćeri imaju isti metilacijski obrazac kao i početna stanica iz koje su nastale**.** Ukoliko je citozin metiliran, na njega će se vezati MeCP2 (engl. methyl cytosine binding protein) koji će onemogućiti vezanje transkripcijskih faktora (7) (***Slika 2***). Metilirani citozin može sam promijeniti konformaciju molekule DNA na koju se potom ne mogu vezati transkripcijski faktori što dovodi do sprječavanja genske ekspresije (7). Također, na metilirani promotor vezuju se transkripcijski represori koji onemogućuju RNA polimerazi da pristupi promotoru (15).

DNA metilacija je ključna za normalnu ekspresiju gena tijekom embriogeneze, no bitna je i u patofiziologiji mnogih bolesti, posebnice zloćudnih bolesti ukoliko su metilacijom utišani npr. tumor supresor geni.



Slika 2. *Povezanost DNA metilacija i genske ekspresije. Metilirani gen regrutira specifične proteine (MBP; engl. methy-CpG-binding protein) pa je nedostupan transkripcijskim faktorima (TF) što dovodi do utišavanja gena (preuzeto iz* (16))

4. IMPLANTACIJA

4.1. Rani embrionalni razvoj

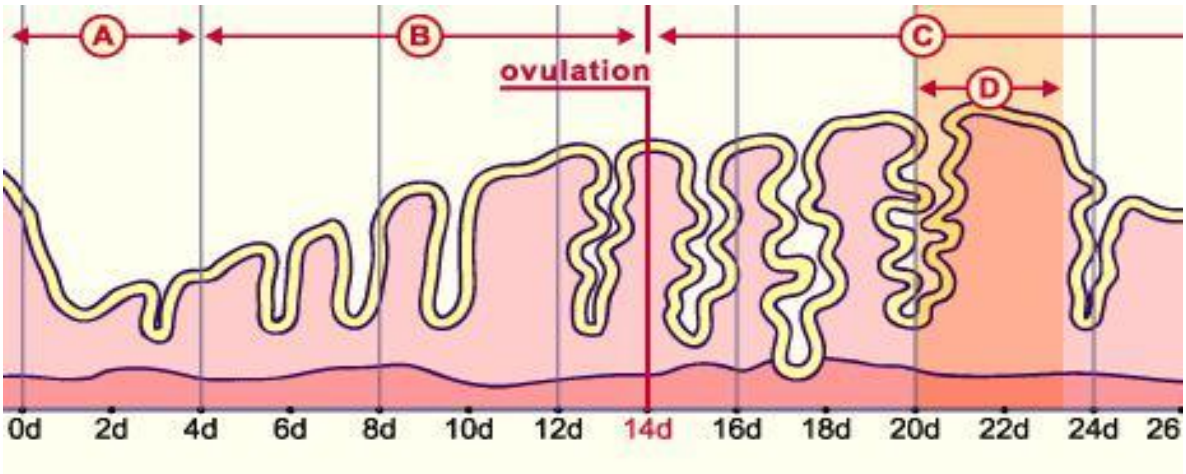
Prva etapa embrionalnoga razvoja zove se brazdanje koje se kod sisavaca odvija sporije pa tako za prvu diobu zigote na dvije blastomere zna proteći i do 12 sati (10). Blastomere se u sisavaca razlikuju već u ovom 2-staničnom stadiju i svaka od njih ima aktivirane specifične gene (17). Do 8-staničnog stadija, blastomere čine rahlu nakupinu – morulu koja je okružena zonom pellucidom. Nakon treće diobe sve se više približavaju jedna drugoj i s vremenom se potpuno međusobno priljube čineći tako kuglastu nakupinu stanica koje su povezane čvrstim spojevima

(engl. gap junctions). Ta promjena naziva se kompakcija (18). U procesu kompakcije stanice na površini postaju polarizirane, dobivaju apikalno-bazalni polaritet s apikalnom domenom okrenutom prema van. Prilikom simetrične diobe ovih stanica, stanice kćeri naslijedit će polarizaciju. Ukoliko je dioba asimetrična, jedna stanica kćer dobiva polarizaciju dok druga ostaje nepolarizirana te prelazi u embrioblast (19). Unutarnje stanice ostaju nepolarizirane. Ova razlika između položaja i polariteta vanjskih i unutarnjih stanica uvjetuje njihovu kasniju različitu diferencijaciju (19). Sljedeći stadij je ulazak morule u maternicu. Kad morula uđe u maternicu, tekućina počinje ulaziti kroz zonu pellucidu i razdvajati stanice (20). Šupljine između stanica počinju se spajati pa procesom koji nazivamo kavitacija nastane velika šupljina blastocela. Malo prije formiranja blastocela, zametak više ne koristi piruvate kao izvor energije već glukozu što povećava potrošnju kisika. Oksidativnom fosforilacijom stvara se potom ATP koji će se iskoristiti za stvaranje blastocela (21). Sve do ovog stadija, geni koji kodiraju za transkripcijske faktore Oct ¾ (engl. octamer-binding transcription factor 4), Nanog i Sox2 (engl. sex determining region Y-box 2), održavali su pluripotentnost stanica i priječili diferencijaciju (19). U ovom trenutku počinjemo govoriti o blastocisti koja je građena od nakupine stanica embrioblasta i vanjskog sloja stanica trofoblasta (22). Od embrioblasta će kasnije nastati zametak, alantois i žumanjčana vrećica, a od trofoblasta posteljica. Zadnji stadij prije implantacije je nestajanje zone pellucide te je sada blastocista spremna za implantaciju.

4.2. Implantacija

Implantacija je jedan od najsloženijih procesa koji se odvija u ljudskom tkivu i zahtijeva usklađenost niza molekularnih mehanizama. Zanimljivo je da uterus nije stalno receptivan za blastocistu već se ona može implantirati samo 19-23. dana menstrualnog ciklusa tj. 6. dan nakon ovulacije, tijekom sekretorne faze. Ovaj period nazivamo "prozor implantacije" ili „implantacijsko okno" kada su endometrij i blastocista međusobno sinkronizirani (23). Sekrecijska faza ciklusa započinje otprilike 2-3 dana nakon ovulacije djelovanjem progesterona kojeg izlučuje žuto tijelo (24). U toj fazi, žlijezde i arterije maternice su zavijene, a tkivo je prožeto tekućinom (24) (***Slika 3***). Zato u endometriju možemo razlikovati tri zone, površinsku (kompaktnu), srednju (spongioznu) i tanku (bazalnu) (24). Blastocista se obično implantira u endometrij prednje ili stražnje stijenke trupa maternice između otvora žlijezda (24).

Stroma endometrija je na mjestu implantacije nabubrila i obiluje krvnim žilama i žlijezdama koje izlučuju sluz i glikogen (25).



Slika 3. *Menstrualni ciklus. A-menstruacija, B-proliferativna faza, C-sekrecijska faza, D-prozor implantacije (preuzeto iz* (26)*)*

Za uspješnu implantaciju nužna je molekularna komunikacija između struktura majke i ploda, kompetentna blastocista te receptivan endometrij. Komunikacija između majke i ploda posredovana je ligandima koje izlučuju obje strane. Blastocista luči ligande koji se vežu na receptore na površini endometrija i obrnuto. Nakon kompakcije, morula počinje na svojoj površini eksprimirati receptore za faktor stimuliranja rasta kolonija (od engl. colony stimulating factor CSF), epidermalni faktor rasta (EGF), leukemija inhibitorni faktor (LIF) i E-kadherin (27). Blastocista proizvodi interleukin 1 (IL-1) koji je bitan za njezinu orijentaciju te faktor aktivacije trombocita (engl. platelets activating factor; PAF) (27). Receptivan endometrij razvija se djelovanjem steroidnih hormona jajnika, progesterona i estrogena (28). Ovi hormoni vežu se na svoje receptore u jezgri epitelnih stanica endometrija te potiču tako njihove morfološke i funkcionalne promjene. Kako bi endometrij postao receptivan stanice endometrija moraju proći kroz svojevrsne modifikacije stanične membrane kojima nastaju izdanci-pinopodi. Pinopodi su prisutni samo na području adhezije blastociste dok je ostatak endometrija normalan (29). Blastocista se veže na receptore koji se nalaze na pinopodima (29). Ti receptori su HB-EGF (eng. heparin-binding epidermal growth factor) i trofinin (30). Stanice endometrija moraju izgubiti apikalno bazalnu polarizaciju (31). Estrogen zajedno s proteinom p53 potiče žlijezde endometrija na proizvodnju LIF-a koji potom odlazi u lumen maternice gdje se veže na receptore na površini endometrija (32). Ovime endometrij postaje receptivan.

Samu implantaciju možemo podijeliti na tri koraka: apozicija, adhezija i invazija (33).

Apozicija je prvi kontakt između blastociste i endometrija. Da bi se blastocista mogla prihvatiti za stijenku maternice, stanice strome endometrija moraju proći kroz proces decidualizacije u kojemu se pretvaraju u decidualne stanice s izdancima-pinopodima na površini. Ovoj promjeni prethodi priljev decidualnih leukocita, uglavnom NK stanica i dendtritičnih stanica (34). Te stanice suprimiraju imunološki sustav majke kako nebi reagirao na blastocistu kao na strano tijelo pošto sadrži i očeve gene. Također, ove stanice reguliraju promjene spiralnih arterija i diferencijaciju stanica strome endometrija u decidualne stanice (34). Decidualne stanice razlikuju se od stromalnih po nakupinama glikogena i lipida zbog čega više nalikuju epitelnim nego stromalnim stanicama. Također, jednom kada se transformiraju, decidua stanice počnu lučiti mnoštvo proteina, citokina, faktora rasta, te izvanstanične proteine fibronektin i laminin

(35). Decidualizacija obuhvaća i neke izvanstanične promjene poput odlaganja fibrinoida i glikogena u endometrij te formiranja epitelnih plakova (36). Za vrijeme ove tranzicije, povećan je dotok krvi u endometrij, a žlijezde endometrija se povećavaju te luče glikogen. Na kraju decidualizacije, razlikujemo tri sloja decidualnih stanica. Decidua basalis su decidualne stanice

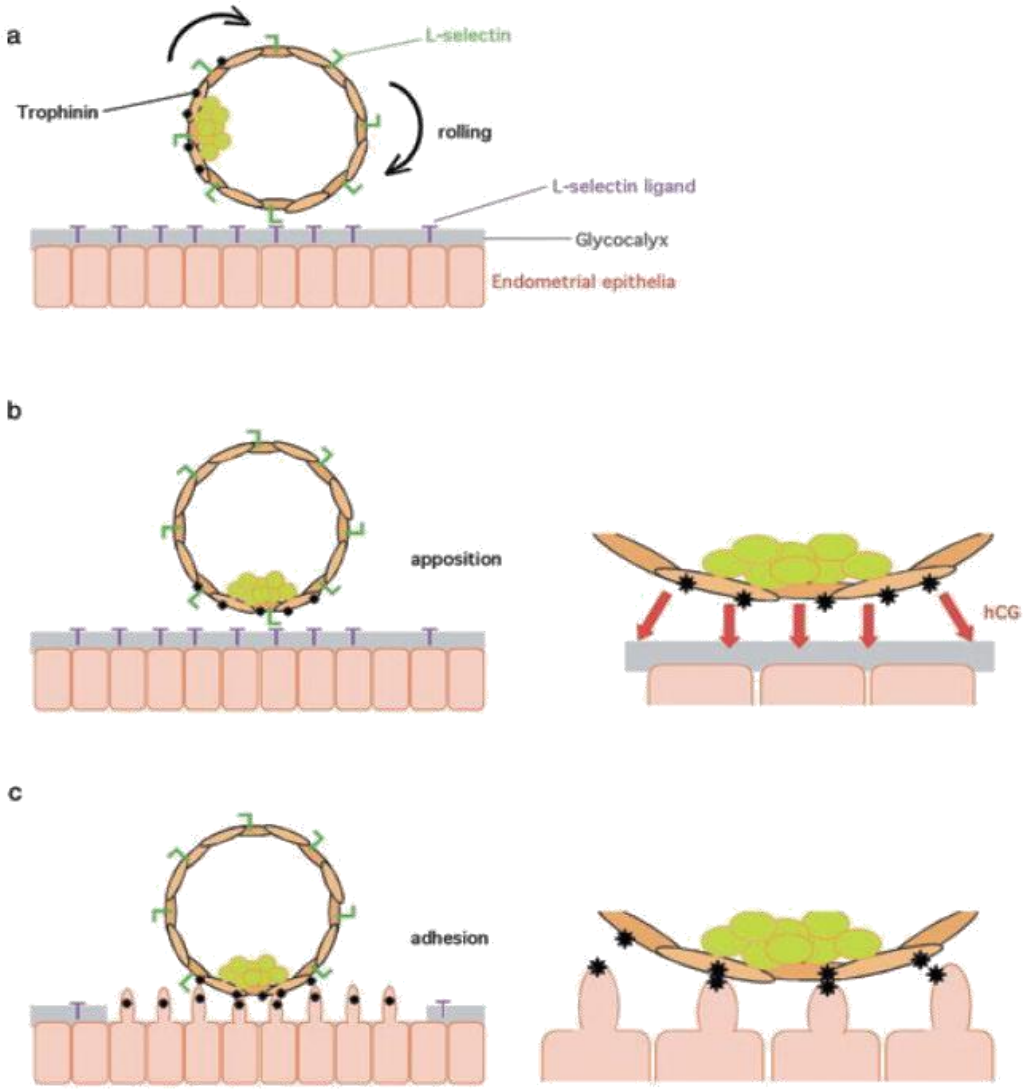
ispod implantirane blastociste (37). Decidua capsularis je endometrij oko blastociste, a decidua parietalis je ostatak endometrija (37).

Decidualizacija započinje na mjestu implantacije pa se potom proširi po endometriju cijele maternice.

Malo prije prihvaćanja blastociste za stijenku maternice, stanice trofoblasta podijele se na citotrofoblast (unutrašnji sloj stanica s jednom jezgrom) i sinciciotrofoblast (vanjski sloj stanica s puno jezgara, ali bez jasnih granica među stanicama). Vili koji su nastali na sinciciotrofoblastu stupaju u kontakt s pinopodima na površini stijenke maternice i L-selektin na stanicama trofoblasta veže se za ugljikohidratne lance na MUC-1 glikoproteinima (38) (***Slika 4.***). Ovaj prvi kontakt blastociste i endometrija nestabilan je pa postoji i dalje vjerojatnost da se blastocista pod djelovanjem tekućina u maternici odvoji od endometrija. Blastocista zato luči hCG koji potiče endometrij na ekspresiju trofinina na površini pinopoda (38). Adhezija kao drugi korak implantacije puno je čvršća veza između blastociste i endometrija te osigurava stabilan položaj blastociste. U adheziji sudjeluju osteopontin, imunoglobulini, integrini, kadherini, trofinin i CD44 (39).

Trofinin je membranski protein, kodiran genom *TRO*, prisutan na površini blastociste i endometrija. Vezanjem trofinina na blastocisti s trofininom na endometriju, pokreće se proliferacija stanica trofoblasta i njihova invazija (***Slika 4.***). Prije stanične adhezije, trofinin moze nakupiti PKC (engl. protein kinaza C), dok nakon stanične adhezije, PKC se oslobađa od trofinina, fosforilira i prenaša u jezgru. U jezgri, PKC se proteolitički razgrađuje pomoću c3 (engl. caspase 3), tamo se akumulira, veze na DNA i inhibira aktivnost DNA polimeraze.
i njezinu translokaciju u jezgru što dovodi do apoptoze stanica endometrija (40).

Nakon što se blastocista prihvatila za stijenku maternice, sinciciotrofoblast počinje invadirati u bazalnu deciduu endometrija. Da bi to bilo moguće, stanice sinciciotrofoblasta moraju lučiti proteolitičke enzime. Uglavnom su to metaloproteinaze koje će razgraditi izvanstanični matriks te na taj način otvoriti put stanicama trofoblasta. Odvijanje ovih procesa omogućeno je uigranom sinergijom niza proteina od kojih su najvažniji transmembranski glikoproteini integrini na membrani trofoblasta i njihovi receptori na stanicama endometrija.



Slika 4. Uloga L-selektina i trofinina u procesu implantacije. (Preuzeto iz (38))

5. KAKO GENI REGULIRAJU IMPLANTACIJU?

Geni su naše roditeljsko nasljeđe koje određuje sve procese u našemu organizmu. Jasno je dakle, da bez uigrane orkestracije niza gena, nema ni uspješne implantacije. Tako se njihova uloga očituje na više razina: utječu na razvoj blastociste, reguliraju transformaciju endometrija, a posebno su važni u međusobnoj komunikaciji između majke i djeteta.

5.1. Genska regulatorna mreža bitna u razvoju blastociste

U ovom poglavlju ću nabrojiti samo neke od gena bitnih za rani razvoj blastociste.

CDX2 (od engl. Caudal-type homeobox protein-2) je transkripcijski faktor kodiran genom *CDX2*, a dio je velike obitelji homeotičkih proteina. Izostankom ekspresije ovoga gena ne može se formirati blastocel što je bitno za tranziciju morule u blastocistu. Također, ovaj transkripcijski faktor potiskuje ekspresiju transkripcijskih faktora Oct4 (od engl. octamer-binding transcription factor 4) i Nanog (41). Oct4 i Nanog su transkripcijski faktori koji održavaju pluripotentnost embrionalnih matičnih stanica (42). Na taj način CDX2 sudjeluje u diferencijaciji blastomera na embrioblast i trofoblast u stadiju blastociste (41).

GATA3 (engl. GATA-binding protein 3) je transkripcijski faktor iz porodice GATA proteina koji su dobili ime po sposobnosti vezanja na DNA sekvencu „GATA“ (9)(43). Njegova uloga i ekspresija slične su proteinu CDX2. Bitan je za razvoj i diferencijaciju stanica trofoblasta. Bitan je u tranziciji morule u blastocistu te regulira transkripciju humanog placentalnog laktogena 1 i ekspresiju gena za proliferin (44).

TEAD4 (engl. TEA domain transcription factor 4) je transkripcijski faktor koji regulira transkripciju gena *Cdx2* i *Gata 3*. Član je obitelji transkripcijskih pojačivača TEF (engl. transcriptional enchancer family). Prvi puta se pojavljuje u 8-staničnom stadiju (21) . Bitan je za formiranje blastocela i prijelaz morule u blastocistu jer održava homeostazu energije bitnu za ovu tranziciju (21). Novija istraživanja pokazuju kako je funkcija ovog proteina bitna isključivo u stanjima povećane oksidativne fosforilacije koja dovodi do povećane koncentracije reaktivnih spojeva kisika (21). U tom slučaju, ovaj protein prevenira oksidativni stres. Ukoliko

su uvjeti normalni, blastocista i trofoblast će se razviti neovisno o ovom proteinu, a Cdx2 i Gata3 će biti izraženi.

TFAP2C (eng. transcription factor AP-2 gamma) je transkripcijski faktor koji spada u porodicu aktivacijskih proteina 2. On održava pluripotentnost matičnih stanica trofoblasta te je bitan za razvoj placente. Također, ovaj transkripcijski faktor bitan je i za ekspresiju proteina CDX2 (45).

SOX2 (eng. SRY-related HMG-box gene 2) je transkripcijski faktor koji sudjeluje u održavanju pluripotentnosti stanica. U interakciji s Oct4 faktorom potiče aktivaciju Fgf4 (engl. fibroblast growth factor 4), Utf1 (engl. undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) i Fbx15 gena (engl. F-box only protein 15) dok interakcijom s Nanog faktorom regulira transkripciju Rex1 gena (engl. reduced expression 1 gen) (46). Rex 1 gen također održava pluripotentnost stanica embrioblasta (47).

CLDN4 (engl. Human claudin-4) je integralni transmembranski protein usidren u biološku membranu koji formira čvrste međustanične veze (engl. tight junctions) (48). Ove međustanične veze zapravo su kanali koji reguliraju veličinu i naboj molekula koje kroz njih prolaze (49). Ukoliko je povećana ekspresija ovog gena, smanjena je paracelularna provodljivost za natrij, dok provodljivost za klor ostaje nepromijenjena (49) . Jako je važno da transport iona bude dobro reguliran. Transport natrija iz smjera trofoblasta prema blastocelu bitan je za uspostavu ionskog gradijenta koji će dovesti do nakupljanja tekućine unutar šupljine blastocela (50). Na taj način ovaj transkripcijski faktor regulira razvoj blastociste.

5.2. Geni koji sudjeluju u razvoju receptivnog endometrija

Navest ću neke, po meni bitne gene za razvoj receptivnog endometrija.

GPX-3 (engl. Glutathione peroxidase 3) je enzim kodiran genom *GPX-3* kojega ubrajamo u obitelj glutation peroksidaza, a kao aktivno mjesto sadrži selenocistein. Ovi enzimi kataliziraju redukciju vodikova peroksida, lipidnog peroksida i organskog peroksida koristeći glutation kao donor elektrona, dakle imaju antioksidativnu ulogu kojom štite stanicu od oštećenja (48). GPX-3 je najizraženiji u razdoblju implantacijskog okna što govori o njegovoj važnosti u tom procesu (***Tablica 1***). Reaktivni spojevi kisika poput vodikovog peroksida štetni su nusprodukti aerobnog metabolizma i nužno je da budu u ravnoteži s antioksidansima. GPX-3 štiteći stanice endometrija osiguravaju njegovu receptivnost.

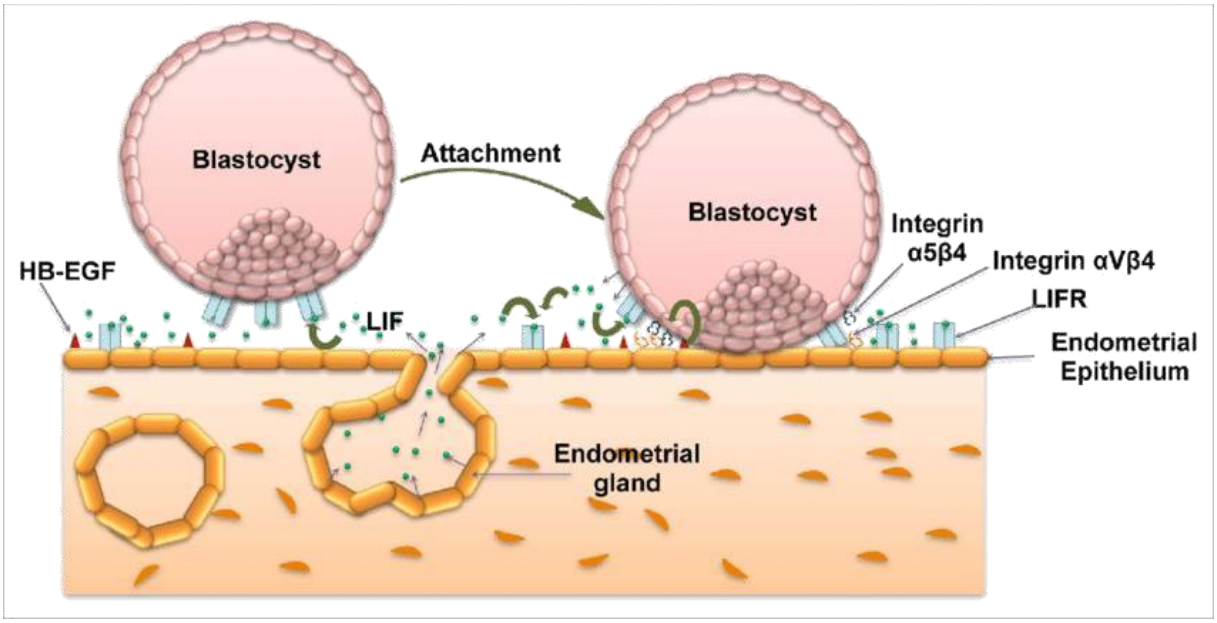
KLF5 (eng. Kruppel-like factor 5) je transkripcijski faktor koji spada u skupinu metaloproteina te sadrži cink prsten kao kofaktor. Eksprimiran je na epitelnim stanicama endometrija neovisno o varijaciji hormona. Istraživanja su pokazala da je prisutan na stanicama endometrija čak i u odsustvu jajnika (51). Također, eksprimiran je i u brojnim drugim organima.

Ovaj transkripcijski faktor omogućava receptivnost endometrija djelujući na ekspresiju COX-2 proteina (52).

Tumor supresor gen *p53* je prisutan u svim stanicama, a glavna mu je uloga u kontroli staničnog rasta (***Tablica 1***). Kodira za transkripcijski faktor p53 koji se kao tetramer veže na molekulu DNA i inhibira daljnji rast stanice. P53 može izazvati smrt stanice aktivacijom gena odgovornih za poticanje apoptoze. Aktivnost tumor supresor gena *p53* pod kontrolom je gena Mdm2 (engl. Mouse double minute 2) (53). Ovaj gen veže se za p53 te dovodi to njegove razgradnje zbog čega se zameci s delecijom gena Mdm2 ne mogu implantirati (53). Zanimljivo je da se spomenuti zameci mogu implantirati samo ako imaju i deleciju gena *p53*. Osim u tumorigenezi, gen *p53* ima ključnu ulogu i u implantaciji gdje inducira aktivnost niz drugih gena potrebnih za njezino normalno odvijanje. Identificirano je više SNP (engl. single nucleotid

polimorphisms) p53 gena te njegovog regulatora Mdm2, ali najviše proučavan je SNP kodona 72 (53). Ovaj SNP može pokrenuti inače na dijete tolerantni majčin imunološki sustav na odbacivanje, a može djelovati i na ekspresiju LIF-a (53).

Jedan od gena koje p53 potiče na ekspresiju je gen ***LIF*** (engl. Leukemia inhibiting factor) čija je aktivnost također veoma bitna za implantaciju. LIF je citokin iz obitelji IL-6 citokina koji se veže na svoj receptor (LIFR) te pokreće aktivacija signalnog puta STAT (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription proteins) (54). LIF sudjeluje u regulaciji većine procesa koji su bitni za implantaciju pa tako utječe na transformaciju endometrija u receptivan oblik, regulira decidualizaciju, rast blastociste i diferencijaciju te invaziju trofoblasta (54). Gen *LIF*, odnosno njegov proteinski produkt, je na stanicama endometrija konstantno izražen no tijekom implantacije njegova je ekspresija pojačana (53) (***Tablica 1***). Pokusi na miševima pokazali su kako mutacije gena *LIF* remete implantaciju dok egzogena injekcija LIF-a resaturira njihov implantacijski kapacitet. Gen *LIF* ima veliku ulogu u implantaciji ne samo miševa već i ljudi no egzogena injekcija ovog faktora u ljudi još nije u potpunosti dokazala navedene pretpostavke. Gen *LIF* kodira za LIF ligand koji izlučuju stanice receptivnog endometrija, a one istovremeno imaju njegov receptor kodiran genom LIFR (55). Isti receptor nalazimo i na blastocisti. Nakon što se blasocista veže svojim receptorom na ligand LIF i sama počinje lučiti LIF koji će potom djelovati na endometrij i trofoblast (55). U vrijeme implantacije na stanicama endometrija eksprimiran je i integrin *αvβ4* dok HB-EGF (engl. heparin-binding epidermal growth factor) jukstakrinim signalom potiče ekspresiju integrina *α5β4* na stanicama trofoblasta, ovi integrini također su bitni u implantaciji (***Slika 5***). Mutacije gena *p53* dovode do aktivacije majčinog imunološkog sustava protiv zametka i smanjene ekspresije gena *LIF* što onemogućava implantaciju.



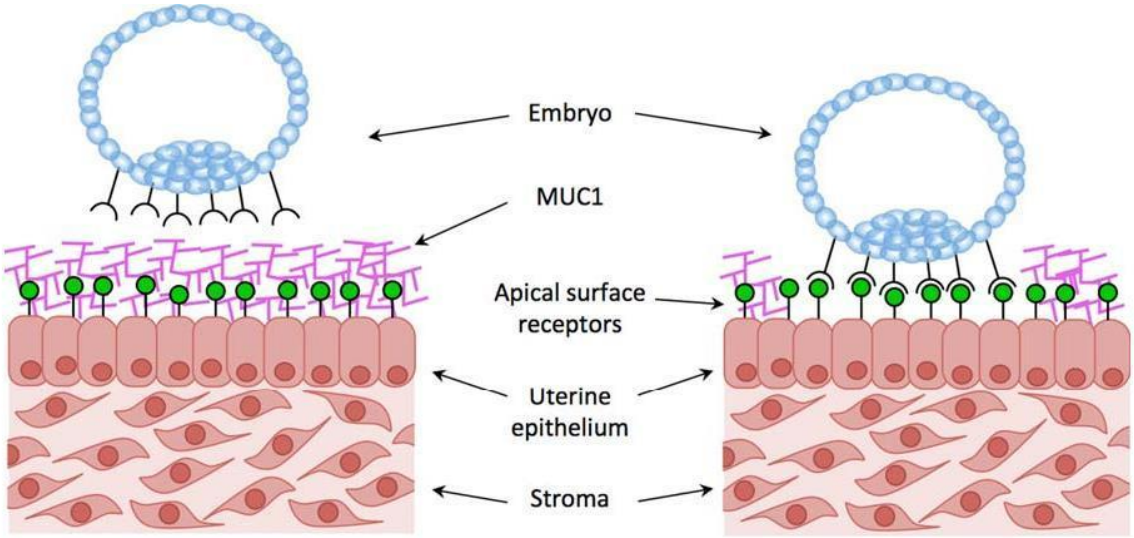
Slika 5. *Ekspresija LIF liganda i receptora na endometriju i blastocisti. (Preuzeto iz* (55)*)*

PTGS-2 (engl. prostaglandin-endoperoxide synthase 2) gen kodira za enzim COX-2 (***Tablica 1***). Mutacija ovog gena povezana je s nemogućnošću odvijanja procesa implantacije. COX-2 enzim odgovoran je za sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Prostaglandini povećavaju vaskularnu propusnost i potiču angiogenezu na mjestu implantacije za vrijeme implantacije i decidualizacije tj. diferencijacije endometrijskih stanica maternice u decidualne (56). Najbitniji prostaglandin koji sudjeluje u implantaciji je PGI2 (engl. prostaglandin I2) (57).

On se veže na nuklearni receptor PPARδ (engl. peroxisome proliferator-activated receptors). PPARδ nakon toga mora proći kroz heterodimerizaciju s RXR (retinoid X receptor) što privlači transkripcijske koaktivatore kao što su SRC-1 (engl. steroid receptor coactivator-1) i CBP (engl. CREB-binding protein) te se na taj način regulira ekspresija gena (57). Istraživanja na miševima pokazala su kako se karbaprostaciklin cPGI može vezati na nulearni receptor PPARδ te dovesti do istog mehanizma ukoliko COX-2 ekspresija nedostaje (57).

MUC-1 (engl. mucin -1) gen kodira za transmembranski glikoprotein mucin-1 koji se nalazi na stanicama endometrija. Mucin-1 sudjeluje u formiranju glikoproteinske ovojnice epitelnih stanica maternice koja djeluje protuimplantacijski jer štiti stijenku maternice od djelovanja proteolitičkih enzima nužnih za ovaj proces (58). Također, mucin-1 onemogućava adheziju

zametka na epitelne stanice maternice. Upravo zbog ovih razloga, ekspresija gena *MUC-1* tijekom "prozora implantacije" treba biti snižena. Međutim, uočeno je kako je ekspresija ovog glikoproteina za vrijeme prozora implantacije snižena samo u području implantacije dok je na ostatku endometrija njegova ekspresija povećana za vrijeme srednje sekretorne faze i prozora implantacije (59) (***Slika 6.***). Uz gen MUC-1, u ovu skupinu ubrajamo i gen MUC-4 koji kodira za glikoprotein mucin-4. Istraživanjima na populaciji tajlanđanki uočeno je kako je ovaj glikoprotein uključen u razvoj endometrioze te na taj način indirektno smanjuje mogućnost implantacije (60).



Slika 6. *Ekspresija proteina MUC1 je smanjena tijekom otvaranja implantacjiskog prozora na mjestu adhezije blastociste (slika desno) jer MUC1 sakriva adhezijske molekule bitne za ovaj proces (slika lijevo)* (58)*. (Preuzeto iz* (58)*)*

hPR (engl. human progesterone receptor) gen kodira za progesteronski receptor (PR) (***Tablica 1***). PR pripada obitelji nuklearnih receptora s transkripcijskom aktivnosti (61). Ovi receptori mogu aktivirati i suprimirati ekspresiju gena (61). Dvije su izoforme ovog receptora: hPRA i hPRB (53). Za normalan proces implantacije bitan je omjer tih izoformi. Dominantnija izoforma u procesu implantacije je hPRA (62). PR se u slobodnom obliku nalazi u citoplazmi, vezan na proteinske šaperone (61). Nakon vezanja progesterona, receptor se dimerizira pa zajedno s ligandom ulazi u jezgru kako bi regulirao ekspresiju gena (61). Ovaj receptor djeluje putem različitih signalnih puteva te na taj način utječe na implantaciju i decidualizaciju (61). Navedeni receptor ujedno aktivira decidualni marker IGFB-1 (engl. Insulin-like growth factor-binding protein-1) te i na taj način potiče decidualizaciju stanica (62).

Hox gen (engl. homeobox). Članovi obitelji Hox gena, koji sudjeluju u implantaciji su *HOXA10* i *HOXA11* (33) . Hox geni zaslužni su za stvaranje receptivnog endometrija koji je ključan za implantaciju. Istraživanja na miševima pokazala su kako se u srednjoj i kasnoj sekretornoj fazi njihova ekspresija povećava da bi potaknuli razvoj pinopoda te sekreciju integrina beta 3 i IGFBP-1 (engl. Insulin-like growth factor-binding protein 1) (33) (***Tablica 1***). Ovakav nalaz smanjenog implantacijskog potencijala u izostanku ekspresije ovih gena nalazimo i u ljudi (33).

SSPI (engl. secreted phosphoprotein 1) gen kodira za protein ekstracelularnog matriksa, osteopontin. Ekspresija ovog proteina povećana je u srednjoj i kasnoj sekretornoj fazi, a nalazi se na stanicama endometrija, posebno u okolici pinopoda (58) (***Tablica 1***). Osteopontin se veže na αvβ3 integrinske receptore na endometriju i blastocisti te na taj način sudjeluje u apoziciji i adheziji (63). Također, ovaj protein eksprimiran je i na makrofazima unutar strome endometrija te potiče proliferaciju i migraciju stanica tijekom invazije trofoblasta (63).

NK specifičan gen kodira za uNK stanice (engl. uterine natural killer cell). Njegova ekspresija povećana je u sekretornoj fazi (64) (***Tablica 1***). NK stanice proizvode citokine, kemokine i angiogenetske faktore nužne za stvaranje receptivnog endometrija i implantaciju (64). One čine više od 70% decidualnih leukocita u ranoj trudnoći (64).

Gen Interleukin 15 je gen koji kodira za citokin IL-15 (***Tablica 1***). Ovaj citokin bitan je prvenstveno za funkciju NK stanica u stromi endometrija (65). Istraživanja su pokazala kako su miševi bez ovog gena plodni, ali bez funkcije uNK stanica (engl. uterine natural killer cells), nepravilnih spiralnih arterija i decidualnih stanica (65).

Tablica 1. *Geni čija ekspresija je pojačana tijekom procesa implantacije*

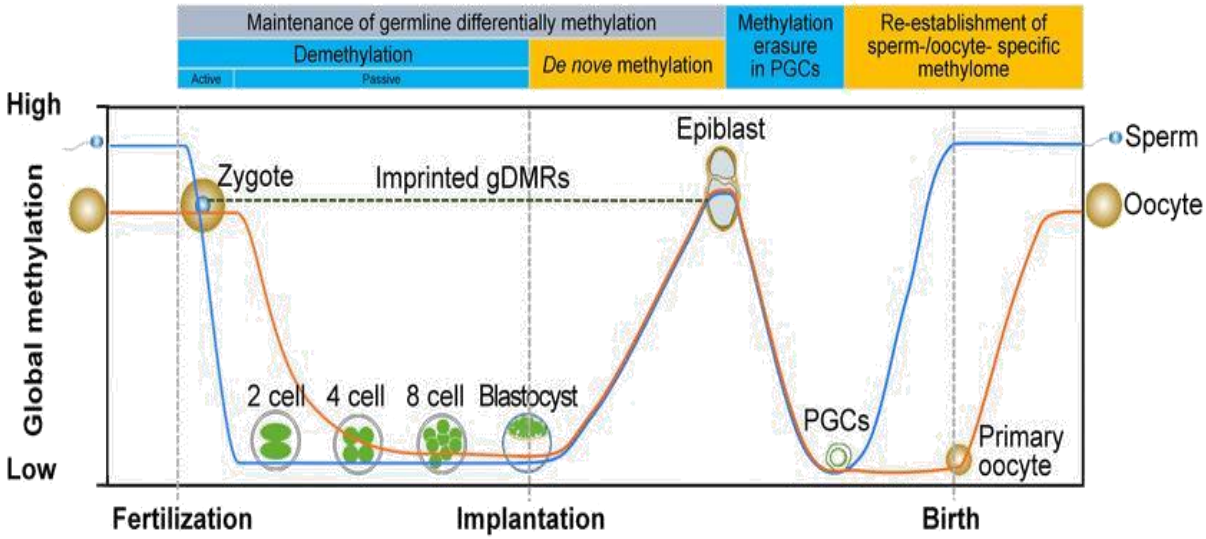
Gen kratica	**Produkt**	**Referenca**
GPX-3	Glutation peroksidaza 3	(48)
P53	Tumor supresor gen p53	(53)
LIF	Leukemia inhibiting factor	(53)
PTGS-2	COX-2	(57)
HOX	Hox	(33)
SPP1 (secreted phosphoprotein 1)	Osteopontin	(63)
IL-15	Interleukin 15	(65)
NK- specific gene	uNK stanice	(64)
hPR	Progesteronski receptor	(61)

6. DNA METILACIJA GENA TIJEKOM IMPLANTACIJE

Sudbina svake stanice ovisi o obrascu ekspresije njezinih gena budući da sve stanice jedne jedinke posjeduju isti genetski materijal. Ti obrasci ekspresije gena nastaju epigenetskim mehanizmima i omogućavaju diferencijaciju stanica. Mogućnosti istraživanja molekularnih mehanizama tijekom implantacije i regulacije razvoja ljudskog trofoblasta su sužene zbog etičkih razloga, pa je većina istraživanja rađena na miševima i majmunima (66). Majmuni su se pokazali kao najbolji modeli jer su svojom genetičkom strukturom i embriologijom veoma slični ljudima (67).

Nakon oplodnje, očeva i majčina DNA razlikuju se u stupnju metilacije. Genom spermija je izrazito metiliran dok je genom jajne stanice gotovo nemetiliran. Zato 3 do 6 sati nakon oplodnje, očeva DNA prolazi kroz aktivni i snažni demetilacijski proces, dok majčina DNA prolazi kroz pasivnu sporiju demetilaciju. U 2-staničnom stadiju zigota je već dosta demetilirana, a samo 44,6 % citozina je metilirano (67). Paralelno s demetilacijom, u majmuna se događa se i remetilacija (67). Ova je tvrdnja potvrđena i u ljudi (67). U 8-staničnom stadiju razina remetilacije je veća od demetilacije tako da je u ovom dijelu embrionalnog razvoja 52,7 % CpG otoka metilirano (67). U tom stadiju je posebno izražena remetilacija gena povezanih s oksidativnom fosforilacijom (67). U 8-staničnom stadiju dokazana je metilacija i drugih gena uključenih u metaboličke procese što nam govori kako je regulacija metaboličkih procesa zaista ključna. U stadiju morule, tj. 16-staničnom stadiju, razina metilacije opet pada (42,2%) (67).

Kada morula dođe do stadija blastociste, razina metilacija je veoma niska (68). Nakon toga započinje *de novo* metilacija u stanicama embrioblasta djelovanjem enzima Dnmt3a i Dnmt3b. (***Slika 7.***)



Slika 7. *Dinamika DNA metilacije prije i nakon oplodnje (preuzeto iz* (69) *)*

Posebnu skupinu gena predstavljaju "utisnuti" ili imprintani geni čija ekspresija ovisi o tome jesu li naslijeđeni od majke ili od oca (70). Prvi utisnuti gen (engl. imprinting), gen za inzulinu sličan čimbenik rasta 2 (engl. insulin-like growth factor 2, Igf2) otkriven je 1991. godine. Tada su DeChiara i suradnici uočili da ciljana mutacija ovoga gena dovodi do patuljastog rasta u heterozigota, ali samo kada se radi o očevom genu (a ne i o majčinom). Smanjenje rasta novorođenčadi bilo je identično u heterozigota s mutiranim očevim genom kao i u recesivnih homozigota, ukazujući da na aktivnost gena *Igf2* utječe samo otac (71).

Imprintani geni ne prolaze kroz ove obrasce demetilacije nakon oplodnje. Oni zadržavaju metilacijske obrasce naslijeđene od roditelja. U genomu ljudi i miša identificirano je otprilike 40 imprintanih gena (72) . Neki od gena navedeni su u ***Tablici 2***.

Tablica 2. *Imprintani geni (imprinting gene catalogue of the University of Otago, New Zealand) (Preuzeto iz (73), tablica prevedena na hrvatski)*

Gen	Puno ime gena	Vrsta	Lokacija na kromosomu	Smisleni transkript alela	Besmisleni transkript alela
WT1	Wilms tumor gene	Čovjek	11p13	Individualno	Nepoznato
ZNF215	Zinc Finger Protein 215 gene	Čovjek	11p15	Majčin	Nepoznato
KCNQ1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1 gene	Čovjek	11p15.5	Majčin	Očev
ZNF127	Zinc Finger Protein 127 gene	Čovjek	15q11–13	Očev	Nepoznato
UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A gene	Čovjek	15q11–13	Majčin	Očev
Nesp	Novel erythropoiesis stimulating protein gene	Miš	Distalni dio kromosoma 2	Majčin	Očev
Copg2	Coatomer subunit gamma-2 gene	Miš	Proksimalni dio kromosoma 6	Majčin	Očev
Zfp127 (*Znf127*)	Zinc Finger Protein 127 gene	Miš	Centralni dio kromosoma 7	Očev	Očev
Igf2	Insulin Like Growth Factor 2 gene	Miš	Distalni dio kromosoma 7	Očev	Očev
Igf2r	Insulin Like Growth Factor 2 Receptor gene	Miš	Proksimalni dio kromosoma 17	Majčin	Očev

Nakon implantacije, u blastocisti započinje val *de novo* metilacije koji će osigurati pravilnu diferencijaciju stanica (69).

Obrasci DNA metilacije razlikuju se u djece rođene nakon IVF-a (engl. in vitro fertilization) i djece začete prirodnim putem (74). Djeca rođena nakon potpomognute oplodnje pokazuju veću incidenciju prirođenih malformacija (spina bifida, cerebralna paraliza, malformacije

kardiovaskularnog sustava) od djece začete prirodnim putem (75) kao i veću incidenciju poremećaja vezanih uz genomski imprinting poput sindroma Angelman, Beckwith–Wiedemann i Prader–Willi (76). Međutim, različitost u tehnikama i načinima potpomognute oplodnje, onemogućavaju donošenje konačnog zaključka o utjecaju IVF-a na DNA metilaciju i imprinting (76).

DNA metilacija u procesu implantacije još uvijek je poprilično neistražena tema i mnogo je neodgovorenih pitanja. Za sada smo jedino sigurni kako je razumijevanje ovog i drugih epigenetskih i genetskih mehanizama u procesu implantacije veoma bitno ne samo za razumijevanje neplodnosti i liječenje iste, već i za reproduktivno zdravlje vrste u cijelosti.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med. na pomoći, savjetima, pristupačnosti, prijateljskom pristupu, uloženom vremenu i vođenju kroz ovaj rad.

Također, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i velikom strpljenju tijekom studiranja.

8. POPIS LITERATURE

1. Waddington CH. The epigenotype. Endeavour. 1942;18–20.
2. Waddington CH. Towards a Theoretical Biology. 1969;2:106–28.
3. Galloway DA, Laimins LA, Division B, Hutchinson F. HHS Public Access. 2016;8(4):87–92.
4. Baković T. Najvažniji mehanizmi epigenetike. 2016;
5. https://www.nature.com/scitable/definition/histone-histones-57.
6. Geoffrey M. Cooper REH. Stanica: Molekularni pristup. 2010.
7. Tro KG, Kujund RN, Grbe I. EpigeneΘ ka i fi ziologija gena EpigeneΘ cs and gene physiology. 45(2):127–35.
8. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/histone-methylation.
9. https://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/.
10. Kaphingst KA, Persky S, Lachance C. NIH Public Access. 2010;14(4):384–99.
11. Gómez-Martín C, Lebrón R, Oliver JL HM. Prediction of CpG Islands as an Intrinsic Clustering Property Found in Many Eukaryotic DNA Sequences and Its Relation to DNA Methylation. In: Methods in Molecular Biology. 2018.
12. Cui D XX. DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. Int J Mol Sci. 2018;
13. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H TS. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. J od Biol Chem. 2004;27816–23.
14. Meilinger D, Fellinger K, Bultmann S, Rothbauer U, Bonapace IM, Klinkert WE, Spada F LH. Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. EMBO Rep. 2009;1259–64.
15. Serman A, Vlahović M, Serman L, Bulić-Jakus F. DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. Coll Antropol. 2006;30(3):665–71.
16. Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. Circ Res. 2017;118(1):119–31.
17. Svoboda P. Long and small noncoding RNAs during oocyte-to-embryo transition in mammals. Biochem Soc Trans. 2017;1117–24.
18. Sozen B, Can A DN. Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. Dev Biol. 2014;73–83.
19. Sergio Menchero, Julio Sainz de Aja MM. Cell fate in mammalian development. In: Cell fate in mammalian development. p. 60–74.
20. Eckert JJ, Velazquez MA FT. Cell signalling during blastocyst morphogenesis. Adv Exp Med Biol. 2015;1–21.
21. Kaneko KJ, DePamphilis ML. TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. Development [Internet]. 2013;140(17):3680–90. Available from:

http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.093799

22. Serman A SL. Development of placenta in a rodent--model for human placentation. Front Biosci (Elite Ed). 2011;(3):233–9.

23. Šerman Lj. ŠA. Uloga glikoproteina u procesima implantacije i placentacije. Gynaecol Perinatol. 2006;82–8.

24. T.W.Sadler. First week of development:Ovulation to implantation. In: Langman's Medical Embryology. 2012. p. 39–41.

25. https://www.britannica.com/science/implantation-reproduction-physiology.

26. http://www.embryology.ch/anglais/gnidation/etape02.html.

27. http://www.embryology.ch/anglais/gnidation/molecul01.html.

28. Esteves SC, Khastgir G, Shah J, Murdia K, Gupta SM, Rao DG, et al. Association between progesterone elevation on the day of human chronic gonadotropin trigger and pregnancy outcomes after fresh embryo transfer in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9(APR):1–10.

29. Bentin-Ley U1, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF HT. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. Hum Reprod. 1999;515–20.

30. Fukuda MN, Sugihara K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. J Obstet Gynaecol Res [Internet]. 2008;34(2):129–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412772%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2726777%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2726777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

31. Thie M, Fuchs P, Denker H-W. Epithelial cell polarity and embryo implantation in mammals. Int J Dev Biol [Internet]. 1996;40(1):389–93. Available from: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8735953&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/D59DE1F3-E6DD-462E-A834-67D086EBF2C3

32. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Implantation_LIF.jpg.

33. Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: Molecular mechanisms and clinical treatment. Hum Reprod Update. 2011;17(2):242–53.

34. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. The up side of decidual natural killer cells: New developments in immunology of pregnancy. Immunology. 2014;141(4):490–7.

35. https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/decidualization.

36. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Implantation#Decidua_Secreted_Factors.

37. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/User:Z5014754#cite_note-PMID11900887-2.

38. Carson D, Bagchi I, Dey S, Enders A. Embryo implantation. Developmental [Internet]. 2000;34(2):129–36. Available from: http://www.cabdirect.org/abstracts/20000110124.html

39. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Implantation#Adhesive_Interactions.

40. Tamura N, Sugihara K, Akama TO, Fukuda MN. Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC-δ. Cell Cycle. 2011;10(1):135–43.

41. Strumpf D1, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F RJ. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. 2005;2093–102.

42. Loh YH1, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B NH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet. 2006;431–40.

43. https://en.wikipedia.org/wiki/GATA_transcription_factor.

44. Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD LD. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. Development. 1997;907–14.

45. Zubing Cao,1 Timothy S. Carey,1 Avishek Ganguly,2 Catherine A. Wilson,1 Soumen Paul 2 and Jason G. Knott. Transcription factor AP-2γ induces early Cdx2 expression and represses HIPPO signaling to specify the trophectoderm lineage. Development. 2015;1606–1615.

46. Keramari M, Razavi J, Ingman KA, Patsch C, Edenhofer F, Ward CM, et al. Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. PLoS One. 2010;5(11).

47. Masui S, Ohtsuka S, Yagi R, Takahashi K, Ko MSH, Niwa H. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. BMC Dev Biol. 2008;8:1–12.

48. Riesewijk A. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. Mol Hum Reprod [Internet]. 2003;9(5):253–64. Available from: https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gag037

49. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. J Clin Invest. 2001;107(10):1319–27.

50. Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. Dev Biol. 2007;312(2):509–22.

51. Text SI, Plus S, Es U, Rp P, Hplc A, Superflow QN, et al. Supporting Information. 2009;(1):1–5.

52. Sun X, Zhang L, Xie H, Wan H, Magella B, Whitsett JA, et al. Kruppel-like factor 5 (KLF5) is critical for conferring uterine receptivity to implantation. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2012;109(4):1145–50. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1118411109

53. Mojarrad M, Hassanzadeh-Nazarabadi M, Tafazoli N. Polymorphism of genes and implantation failure. Int J Mol Cell Med [Internet]. 2013;2(1):1–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3920519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

54. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: Roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. Sci World J. 2014;2014.

55. Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. Jak-Stat [Internet].

2013;2(4):e25155. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/jkst.25155

56. Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM DS. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. J od Biol Chem. 2002;29260–7.

57. Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARδ. Genes Dev. 1999;13(12):1561–74.

58. Davidson LM, Coward K. Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev. 2016;108(1):19–32.

59. Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortíz ME, Croxatto H JC. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. Biochem Soc Trans. 2001;153–6.

60. Chang CY, Chang HW, Chen CM, Lin CY, Chen CP, Lai CH, et al. MUC4 gene polymorphisms associate with endometriosis development and endometriosis-related infertility. BMC Med [Internet]. 2011;9(1):19. Available from: http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/19

61. Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. Mol Cell Endocrinol. 2012;357(1–2):108–18.

62. Edalat F. NIH Public Access. 2012;40(6):1301–15.

63. White FJ, Burghardt RC, Hu J, Joyce MM, Spencer TE, Johnson GA. Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. Reproduction. 2006;132(6):919–29.

64. Gaynor LM, Colucci F. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. Front Immunol. 2017;8(APR).

65. Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. Reprod Biomed Online [Internet]. 2007;15(6):728–39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60541-X

66. Šerman Lj, Vlahović M, Šijan M, Bulić-Jakuš F, Šerman A, Sinčić N, Matijević R, Jurić-Lekić G KA. The impact of 5-azacytidine on placental weight , glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. Placenta. 2007;28:803–11.

67. Gao F, Niu Y, Sun YE, Lu H, Chen Y, Li S, et al. De novo DNA methylation during monkey pre-implantation embryogenesis. Cell Res [Internet]. 2017;27(4):526–39. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/cr.2017.25

68. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplanatation embryos. Genes Dev. 2014;28(8):812–28.

69. Hongbo Liu, Song Li, Xinyu Wang YZ. DNA methylation dynamics: Identification and functional annotation. Brief Funct Genomics.

70. O'Doherty AM, O'Shea LC, Sandra O, Lonergan P, Fair T FN. Imprinted and DNA methyltransferase gene expression in the endometrium during the pre- and peri-implantation period in cattle. Reprod Fertil Dev. 2017;1729–38.

71. DeChiara TM, Robertson EJ EA. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II

gene. Cell. 1991;849–59.

72. Paulsen M, Ferguson-Smith A. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. J Pathol. 2001;195(1):97–110.

73. http://igc.otago.ac.nz/home.html.

74. Yves Menezoa, Kay Elderb, Moncef Benkhalifaa BD. DNA methylation and gene expression in IVF. Reprod Biomed. 2010;20(6):709–10.

75. Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, de Klerk N BC. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2013;330–53.

76. Lazaraviciute G, Kauser M1, Bhattacharya S, Haggarty P BS. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. Hum Reprod Update. 2014;840–52.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 2.2.1993. godine u Zagrebu.

Završila sam Opću gimnaziju u Sesvetama. Medicinski fakultet upisala sam 2012. godine. Tijekom studija sudjelovala sam na projektima studentskih sekcija EMSA i CroMSIC. Bila sam

član organizacijskog odbora projekta Dubrovnik Summer School 2017. godine. Član sam studentske sekcije za neuroznanost te studentske sekcije za pravilnu prehranu. Radila sam kao demonstratorica na Katedri za fiziku i biofiziku 2 godine.

Govorim engleski, francuski i njemački jezik.