

Metilacija dna u karcinogenezi

Rastović, Una

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:015523>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

METILACIJA DNA U KARCINOGENEZI

DNA METHYLATION IN CARCINOGENESIS

SEMINARSKI RAD

Una Rastović
Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular Biology
Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. KARAKTERISTIKE METILACIJE DNA.....	3
2.1. DNA-metiltransferaze i regulacija metilacije.....	3
2.2. Učinci metilacije DNA na genom.....	4
2.2.1. Točkaste mutacije.....	4
2.2.2. Regulacija ekspresije gena.....	5
2.2.3. Stabilnost genoma.....	7
3. PROMJENE U RAZINI METILACIJE GENA U KARCINOGENEZI.....	8
3.1. Geni CDKN2A i TP53.....	9
3.2. Gen VHL.....	11
3.3. Gen HPSE.....	12
4. METILACIJA DNA KAO BIOMARKER MALIGNIH BOLESTI.....	13
5. ZAKLJUČAK.....	14
6. LITERATURA.....	15
7. SAŽETAK.....	19
8. SUMMARY.....	20

1. UVOD

Sve informacije koje su potrebne nekome organizmu za život i koje ga definiraju zapisane su u njegovu genomu. Za razvoj organizma i održavanje homeostaze osim funkcionalnih gena važna je i njihova precizna regulacija, čijim narušavanjem, kao i promjenama u genima, dolazi do razvoja raznih patoloških stanja, uključujući i maligne bolesti. Maligne bolesti podrazumijevaju nakupine stanica u organizmu koje nemaju fiziološku funkciju, ali imaju potencijal metastaziranja. Za bilo kakvu promjenu nastalu u genomu stanice ili regulaciji ekspresije gena, koja bi narušila neku od staničnih funkcija, postoje brojni mehanizmi popravka pogreške, kao i mehanizam poticanja apoptoze u slučaju da se pogreška ne može ispraviti. Zbog međusobne povezanosti staničnih procesa neispravljena pogreška može na više razina narušiti održavanje homeostaze stanice te uzrokovati malignu transformaciju. Zajedničke karakteristike stanica malignih tumora uključuju neovisnost o faktorima rasta, neosjetljivost na antiproliferacijske signale, otpornost prema apoptozi, neograničen potencijal za dijeljenje, invazivnost i sposobnost metastaze te induciranje angiogeneze (1).

Promjene u genomu koje dovode do nastanka tumora podrazumijevaju mutacije i epigenetičke promjene poput metilacije DNA. Metilacija citozina uobičajena je pojava u eukariota za koju se pokazalo da doprinosi stabilnosti genoma te utječe na razinu ekspresije gena. Općenito, hipermetilacija promotorskih regija povezuje se s inaktivacijom gena, a hipometilacija s aktivacijom. Razina metilacije genoma regulirana je, a bilo kakve pogreške koje dovode do promjene u metilacijskom statusu mogu prouzročiti nestabilnost genoma ili promijeniti aktivnost gena te tako narušiti različite stanične funkcije. U tumorskim stanicama utvrđene su promjene u razini metilacije koje podrazumijevaju globalnu hipometilaciju genoma i lokalnu hipermetilaciju, najčešće, promotorskih regija određenih gena (2). S obzirom na karakteristike malignih tumora i velik broj poznatih promjena različitih staničnih funkcija u karcinogenezi, analiza regulacije ekspresije gena koji dovode do promjena specifičnih funkcija stanica postala je područje u kojem se zadnjih desetak godina provodi velik broj istraživanja. Najčešći i najviše istražen proces regulacije gena onaj je koji uključuje metilaciju DNA.

2. KARAKTERISTIKE METILACIJE DNA

2.1. DNA-metiltransferaze i regulacija metilacije

Metilacija DNA kod eukariota podrazumijeva reverzibilno kovalentno dodavanje metilne skupine na C-atom citozinskog prstena na 5. položaju posredstvom DNA-metiltransferaza, pri čemu nastaje 5-metilcitozin, 5-mC (3). Kod životinja 5-metilcitozin najčešće se pojavljuje u sljedovima 5'-CG-3', odnosno CpG-dinukleotidima, koji su neravnomjerno raspodijeljeni u genomu. Regije od nekoliko stotina parova baza s povećanom učestalošću najčešće nemetiliranih CpG-dinukleotida nazivaju se CpG-otoci, a njihova precizna definicija ovisi o proučavanom organizmu (4,5). CpG-otoci posebno su česti u promotorskim regijama gena i funkcionalnih nekodirajućih RNA (npr. miRNA), dok je kod čovjeka procijenjeno da približno 70% gena ima promotore bogate CpG-dinukleotidima (5). Utjecaj metilacije na ekspresiju gena intenzivno je proučavan u kontekstu autosomnog genskog utiska i inaktivacije X-kromosoma pri čemu je primijećena metilacija promotora utišanih gena (2,6). U gametogenezi i embriogenezi genom prolazi drastične promjene u razini metilacije nakon čega razina metilacije genoma ostaje relativno stabilna, a sve te kontrolirane promjene imaju važnu ulogu u staničnom rastu i diferencijaciji (5).

Kod sisavaca su pronađena tri enzima s DNA-metiltransferaznom aktivnošću, DNMT1, DNMT3a i DNMT3b pri čemu je donor metilne skupine S-adenozilmetionin. (8). Regulacijski protein DNMT3L posjeduje DNA-metiltransferazne strukturne motive te sudjeluje u uspostavi majčinskog genomskeg utiska uz DNMT3a i DNMT3b, ali samostalan nema katalitičku aktivnost. DNMT1 najzastupljenija je DNA-metiltransferaza koja najčešće metilira hemimetilirana mjesta nastala replikacijom DNA i smatra se odgovornom za održavanje uzorka metilacije, što je omogućeno simetrijom CpG-dinukleotida. U održavanju metilacije sudjeluju proteini UHRF (od eng. *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain*) koji vežu DNMT1 i usmjeravaju je prema hemimetiliranim mjestima (9). Aktivnost DNMT1 esencijalna je u ranom embrijskom razvoju, kao i za genomski utisak i inaktivaciju X-kromosoma (3,8). DNMT3a i DNMT3b mogu metilirati u potpunosti nemetilirana mjesta, kao i ona hemimetilirana, stoga se smatraju odgovornima za metilaciju CpG-a *de novo* (8).

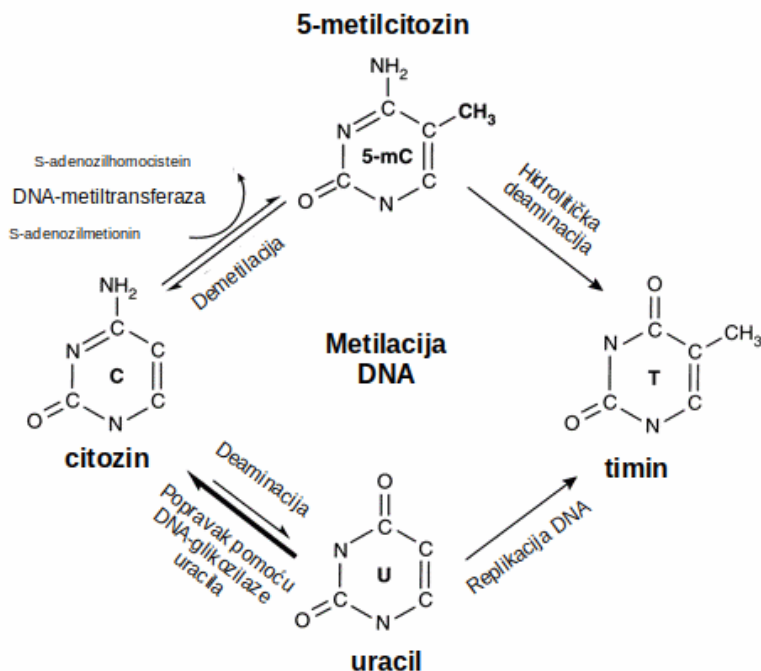
Regulacija aktivnosti DNA-metiltransferaza nije u potpunosti poznata, ali smatra se da ulogu u njoj imaju posttranslacijske modifikacije te da je njihova specifičnost za određene sljedove povezana s interakcijama s malim nekodirajućim RNA (piRNA, miRNA) (10). Razina metilacije DNA razlikuje se između vrsta, a unutar iste vrste razine metilacije variraju u ovisnosti o razvojnem

stadiju organizma i tipu stanica pri čemu razina metilacije određenih gena najčešće može biti povezana sa specifičnim tkivom (3,7). Pokazano je da postoje regije u promotorima koje određuju metilaciju (MDR od eng. *methylation determining regions*) i koje su dovoljne za uspostavu predviđene razine metilacije promotora određenih gena u ovisnosti o razvojnem stadiju i tipu stanica. Regije MDR najvjerojatnije su određene gustoćom CpG-dinukleotida i postojanjem motiva za vezanje DNA, što ukazuje na mogućnost postojanja *trans*-djelujućih faktora koji reguliraju razinu metilacije (11).

2.2. Učinci metilacije DNA na genom

2.2.1. Točkaste mutacije

Spontanom deaminacijom 5-metilcitozina nastaje timin (Slika 1.), a primijećeno je da se deaminacija 5-metilcitozina događa većom učestalošću nego deaminacija citozina (12).

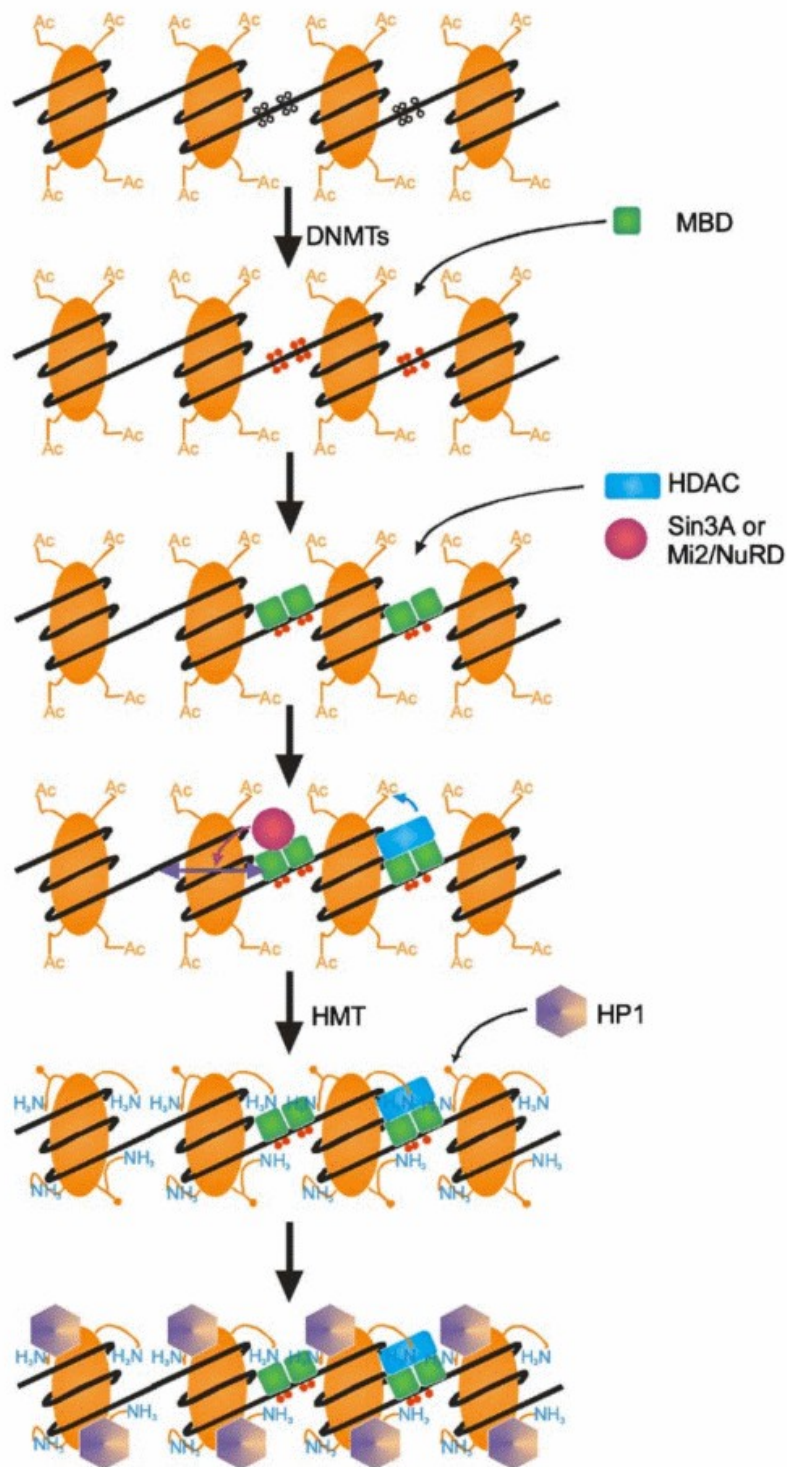


Slika 1. Shema biokemijskog puta metilacije i demetilacije citozina te potencijalnog nastanka točkastih mutacija. Prilagođeno prema Singal i Ginder, 1999. (2).

Smatra se da je upravo učestalost tranzicije citozina u timin posredstvom 5-metilcitozina glavni uzrok niske zastupljenosti CpG-dinukleotida u genomu kralježnjaka, ali i da je uzrok brojnih genetskih poremećaja. Spontana deaminacija citozina najčešće ne dovodi do nastanka točkastih mutacija zato što se nastali uracil prepoznaje i popravlja DNA-glikozilazom uracila (2,13).

2.2.2. Regulacija ekspresije gena

Jedan od načina regulacije ekspresije gena na razini transkripcije uključuje metilaciju DNA. Metilacija citozina mijenja obrazac donora i akceptora vodikovih veza u velikom utoru DNA i time onemogućava vezanje određenih transkripcijskih faktora i inicijaciju transkripcije (13). Drugi način na koji metilacija DNA utječe na ekspresiju gena uključuje proteine s domenom koja veže metilcitozin (MBD, od eng. *methyl-CpG-binding-domain*) koji vezanjem za specifični metilirani slijed mogu imati funkciju transkripcijskih represora ili mogu potaknuti formiranje heterokromatina. Slični su učinci primijećeni djelovanjem proteina s domenom cinkovih prstiju (ZNF, od eng. *zinc finger*) koji mogu vezati metilcitozin (9,14). Proteini s domenom MBD vezani za specifičan slijed DNA mogu mobilizirati velike proteinske komplekse s histonskim deacilazama (HDAC1 i HDAC2) i proteinima za remodelaciju kromatina (npr. sin3a i mi-2) te histonske metilaze (Slika 2.) i posljedično heterokromatinski protein 1, HP1. Deacilirane ϵ -amino skupine lizina u histonima ostvaruju stabilnije interakcije s fosfatnim skupinama DNA te doprinose formiranju heterokromatina, tj. utišavaju transkripciju s kojom je povezana i metilacija lizina 9 na histonu H3 (14). Općenito, učinke metilacije DNA nije moguće promatrati bez konteksta strukture kromatina, tj. histonskih modifikacija.



Slika 2. Epigenetičke promjene koje dovode do inaktivacije gena. DNMT metilira CpG-mjesta (na slici crni kružići: nemetilirano, crveni kružići: metilirano), što omogućava vezanje proteina MBD (na slici zeleno). MBD regrutira kompleks za remodelaciju kromatina (ljubičasto) i histonske acetilaze (HDAC) koje deacetiliraju histone i mobiliziraju histonske metilaze (HMT). Histonske metilaze metiliraju bočne ogranke lizina (na slici narančasti kružići) i tako omogućavaju vezanje proteina HP1. Prilagođeno prema *Teodoridis i sur., 2004. (14)*.

2.2.3. Stabilnost genoma

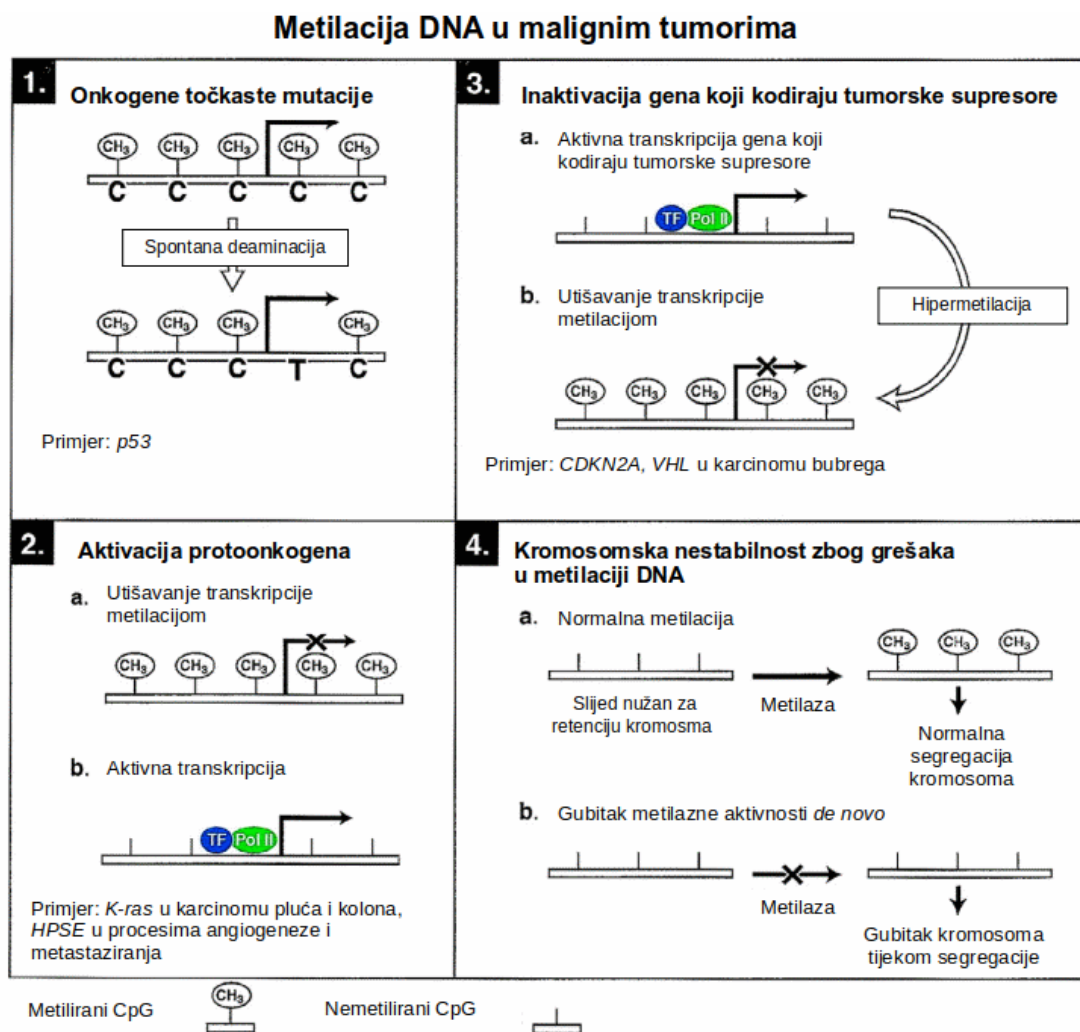
Metilacija citozina uobičajena je nasljedna i reverzibilna modifikacija DNA koja doprinosi održavanju stabilnosti genoma i sprječavanju nastanka genetskih poremećaja. Starenjem se smanjuje učestalost 5-mC u genomu, za što se vjeruje da su odgovorne i pasivna i aktivna demetilacija (15). Pasivna demetilacija podrazumijeva smanjenu aktivnost enzima DNMT1 i gubitak 5-mC tijekom replikacije, dok se aktivna demetilacija događa neovisno o replikaciji. Mehanizam aktivne demetilacije nije u potpunosti poznat, a smatra se da uključuje veći broj enzima i nastanak više intermedijara (16).

U ljudskom genomu visoka razina metilacije primijećena je u ponavljajućim sljedovima koji čine oko dvije trećine genoma i smatra se da je upravo metilacija ključna u inhibiciji ekspresije pokretnih genetičkih elemenata (6,17–19). Smanjenje razine metilacije DNA utvrđeno je kod kromosomskih rearanžmana, nestabilnosti centromernih područja i aneuploidija u tumorima te je pokazano da hipometilacija DNA prethodi oštećenjima genoma kod određenih malignih tumora (15,20). Gubitak aktivnosti DNMT1 povezan je s povećanom stopom mutacija i s konstitutivnom kromosomskom nestabilnošću (20).

3. PROMJENE U RAZINI METILACIJE GENA U KARCINOGENEZI

Karcinom je maligni tumor epitelnih stanica. Nastanku malignih bolesti tijekom dugog vremenskog perioda prethodi niz promjena u genomu koje su poremetile normalnu staničnu aktivnost i regulacijske putove, što je dovelo do nekontroliranog dijeljenja izmijenjenih stanica i formiranja tumorske mase i na kraju omogućilo proces metastaziranja. Dio procesa karcinogeneze uključuje i smanjenu mogućnost popravka greške, što za posljedicu ima povećani potencijal za nastanak novih mutacija.

U stanicama tumora primijećena je globalna hipometilacija genoma i lokalna hipermetilacija najčešće promotorskih regija određenih gena (2). Metilacija DNA u karcinogenezi može imati više uloga (Slika 3.) pri čemu dolazi do sinergističkog efekta. Spontanom deaminacijom 5-metilcitozina nastaju točkaste mutacije koje mogu utjecati na aktivnost ili funkciju gena čiji su produkti uključeni u staničnu regulaciju.



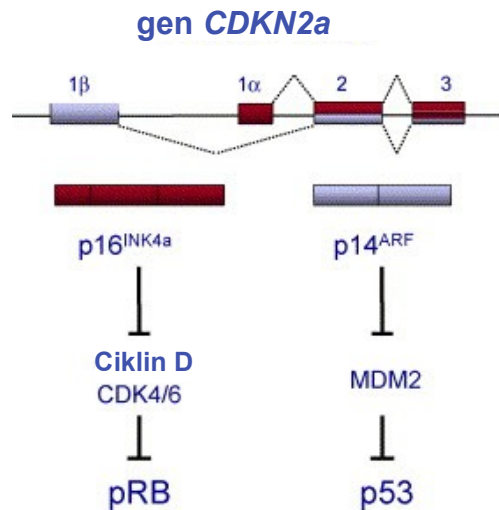
Slika 3. Shematski prikaz uloga metilacije DNA u nastanku malignih tumora. Prilagođeno prema *Singal i Ginder, 1999. (2).*

Demetilacija može aktivirati transkripciju utišanih gena, dok uspostava metilacije *de novo* može dovesti do utišavanja gena koji kodiraju tumorske supresore. Oba procesa, uz nastanak točkastih mutacija, utječu na staničnu regulaciju i dio su karcinogeneze.

3.1. Geni *CDKN2A* i *TP53*

Gen *CDKN2A* nalazi se na kraćem kraku kromosoma 9 i kodira za protein p16-INK4a. Protein p16-INK4a pripada porodici INK4 inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu koji su uključeni u regulaciju prelaska iz G1-faze u S-fazu staničnog ciklusa (21). p16-INK4a ima ulogu negativnog regulatora stanične proliferacije inhibicijom kinaza ovisnih o ciklinu CDK4 i CDK6. Aktivirane kinaze fosforiliraju protein retinoblastoma, pRB, koji tada ne može stvarati kompleks s transkripcijskim faktorom E2F. Slobodan transkripcijski faktor E2F u interakciji s drugim proteinima potiče transkripciju gena koji usmjeravaju stanicu u S-fazu staničnog ciklusa (22). Osim u regulaciji staničnog ciklusa, primijećeno je da p16-INK4a ima ulogu i u drugim staničnim procesima poput angiogeneze, senescencije i apoptoze (23).

Gen *CDKN2A* daje barem tri različita transkripta koji se razlikuju u prvom eksonu. Dva transkripta daju izomorfne proteine koji imaju ulogu inhibitora kinaza CDK4/6, dok treći transkript uspostavlja alternativni okvir čitanja i daje strukturno različit protein s ulogom tumorskog supresora koji se kod ljudi naziva p14^{ARF} (24). Vežanjem na ubikvitinsku ligazu Mdm2 protein p14^{ARF} potiče njezinu degradaciju čime dolazi do stabilizacije proteina p53, a primijećeni su i učinci neovisni o proteinu p53 (21,25). Protein p53 kodiran je genom *TP53* smještenim na kraćem kraku kromosoma 17 (26). Protein p53 ima oligomerizacijsku domenu i domenu vezanja za DNA, a u stanici ima ulogu transkripcijskog aktivatora. U uobičajenim uvjetima u stanici nalazi se u niskim koncentracijama s vremenom poluraspada od 20 min, a za aktivnost funkcije ovog proteina potreban je signal uzrokovan hipoksijom, smanjenom razinom ribonukleotidnih trifosfata, oštećenjem DNA, dvolančanim lomovima ili intermedijarima u popravku DNA (27). Kroz aktivaciju transkripcije ciljanih gena protein p53 važan je regulator staničnog ciklusa, popravka DNA, apoptoze, senescencije i angiogeneze (27,28). Utvrđena je učestalost mutacija gena *TP53* u tumorima od 50-55%, a dio tih mutacija uzrokovane su spontanom deaminacijom 5-mC (13,29).



Slika 4. Shematski prikaz gena *CDKN2A* i okvira čitanja za p16-INK4a (crveno) i p14^{ARF} (sivo). Svaki protein ima specifičan prvi ekson koji se spaja sa zajedničkim drugim eksonom, ali u alternativnom okviru čitanja. p16-INK4a inhibira kinaze CDK 4 i CDK6, što za posljedicu ima izostanak fosforilacije proteina retinoblastoma, pRB. p14^{ARF} inhibira razgradnju proteina p53 posredovanu ubikvitinskom ligazom Mdm2. Prilagođeno prema *Sharpless, 2005.* (30).

Inaktivacija putova p53 i pRB različitim mehanizmima događa se u gotovo svim tumorima kod čovjeka, što ukazuje na važnost točne genske upute i precizne regulacije ekspresije gena *CDKN2A* (30). Približno 50% tumora u čovjeka, uključujući karcinom glave i vrata, jednjaka, žučnih puteva, jetre, pluća, dojke, mjehura, bubrega, debelog crijeva, ali i glioblastom, limfom, melanom i akutnu mijeloičnu leukemiju ima inaktiviran gen *CDKN2A* (23,31). Mehanizam inaktivacije gena *CDKN2A* najčešće podrazumijeva gubitak oba alela i inhibiciju transkripcije uspostavljenu metilacijom CpG-dinukleotida u promotoru *de novo* (31). Zbog specifične organizacije genskog lokusa i često združene inaktivacije, teško je razlučiti doprinose pojedinačnih proteinskih produkata u nastanku tumora. Primijećena je promijenjena metilacija promotora s kojeg nastaje transkript za protein p14^{ARF} u karcinomu debelog crijeva neovisno o utišavanju transkripcije za protein p16-INK4a, dok je u melanomu primijećena veća promjena u količini proteina uključenih u putove p53 i pRB (32,33).

Uz pregršt dokaza za funkciju proteina p16-INK4a kao tumorskog supresora, opisana je i njegova prekomjerna ekspresija u tumorima povezanim s infekcijom HPV-om. U njima prekomjerna ekspresija proteina p16-INK4a nastaje kao odgovor na razgradnju proteina pRB, a u tumorima nastalim neovisno o infekciji HPV-om pretpostavlja se da prekomjerna ekspresija nastaje u sklopu odgovora na senescenciju induciranu onkogenom ili zbog izmijenjenog puta pRB (23).

3.2. Gen *VHL*

Somatske mutacije gena za tumorski supresor von Hippel-Lindau (*VHL*), kao i embrijska inaktivacija koja dovodi do nastanka von Hippel-Lindauova sindroma, povezani su s nastankom karcinoma bubrega, hemangioblastoma i drugih tumora. Gen *VHL* nalazi se na kraćem kraku kromosoma 3, a proteinski produkt, p*VHL*, pojavljuje u dva izoformna oblika od kojih oba imaju funkciju tumorskog supresora (34).

U tumorima povezanim s inaktivacijom gena *VHL* opisana je dobra razvijenost krvnih žila, kao i prekomjerna proizvodnja faktora angiogeneze poput faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF, od eng. *vascular endothelial growth factor*) i eritropoetina (35,36). Pokazano je da p*VHL* sudjeluje u regulaciji gena koji su povezani s odgovorom na hipoksiju tako da inhibira njihovu transkripciju u uvjetima normalne zasićenosti tkiva kisikom (37). Način regulacije aktivnosti gena induciranih hipoksijom pomoću proteina p*VHL* složen je proces koji uključuje ubikvitinaciju ovisnu o kisiku i proteolitičku razgradnju monomera kompleksa transkripcijskog faktora induciranih hipoksijom (HIF, od eng. *hypoxia-inducible factor*) (38). Pretpostavlja se da p*VHL* posjeduje i druge funkcije u stanici, neovisne o regulaciji proteina HIF, a utvrđeno je i da ostvaruje interakcije s izvanstaničnim matriksom i citoskeletom te da njegov nedostatak u specifičnim eksperimentalnim uvjetima onemogućava usmjeravanje stanice u G0-fazu staničnog ciklusa (34).

Ekspresija gena *VHL* opisana je i u embrijskim i zrelim tkivima i nije ograničena na organe koje zahvaća von Hippel-Lindauov sindrom (34). Miševi kojima je uklonjen gen *VHL* nisu vijabilni, a osobe s von Hippel-Lindauovim sindromom zapravo su heterozigoti (39). U karcinomima bubrega u kojima je detektirana hipermetilacija CpG-otoka u promotoru gena *VHL* najčešće nije pronađena mRNA tog gena, pa se pretpostavlja da je hipermetilacija dovela do inaktivacije gena (40).

3.3. Gen *HPSE*

Gen *HPSE* nalazi se na duljem kraku kromosoma 4, a kodira za enzim heparanazu. Heparanaza razgrađuje proteoglikane heparanskog sulfata i modulator je izvanstaničnog matriksa i faktora rasta pridruženih proteoglikanima heparanskog sulfata (41). U uvjetima homeostaze heparanaza je prisutna u stanicama citotrofoblasta, kerationocitima, trombocitima i aktiviranim stanicama imunskog sustava pri čemu ima važnu ulogu u prijenosu stanica krvlju te u invaziji bazalne membrane epitelnim stanicama tijekom razvoja embrija. Razgradnjom proteoglikana heparanskog sulfata i oslobađanjem pridruženih faktora rasta, poput faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) i osnovnog faktora rasta fibroblasta (bFGF, od eng. *basic fibroblast growth factor*), heparanaza indirektno sudjeluje u procesima morfogeneze tkiva i angiogeneze, a često je prisutna u karcinomima i određenim slučajevima akutne mijeloične leukemije (41).

Pokazano je da prekomjerna ekspresija gena *HPSE* tumore s niskim metastatskim potencijalom pretvara u visoko-invazivni oblik u eksperimentalnim životinjama (42). Budući da lanci heparanskog sulfata vežu raznovrsne proteine i osiguravaju prianjanje velikog broja bioaktivnih molekula na staničnu površinu i izvanstanični matriks, degradacija proteoglikana heparanskih sulfata ima negativne posljedice na strukturu i integritet tkiva. Stanična adhezija i pokretljivost ovise o interakcijama stanica s izvanstaničnim matriksom, a narušavanje tih interakcija koje uzrokuje heparanaza pospješuje odvajanje i prijenos stanica krvlju, kao i prodor epitelnih stanica u bazalnu membranu i druga tkiva (41).

Utvrđeno je da su razlike u prisustvu heparanaze u tumorima popraćene promjenama u metilacijskom statusu promotora gena *HPSE*. Stanice malignih tumora koje imaju aktivnu heparanazu imaju barem jedan alel gena *HPSE* nemetiliranog promotora, a u stanicama u kojima su promotori oba alela metilirani nije pronađen ni protein ni njegova mRNA. Upotrebom demetilacijskih agensa (5-azacitidin i 5-aza-2'-deoksicitidin) u stanicama koriokarcinoma čovjeka (stanice JAR) i stanicama glioma štakora C-6 utvrđena je demetilacija promotora alela *HPSE* i prisustvo heparanaze (41).

4. METILACIJA DNA KAO BIOMARKER MALIGNIH BOLESTI

Rano otkrivanje malignih bolesti pokazalo se ključno za učinkovitost medicinskih postupaka i preživljenje oboljelih. Specifične markere teško je detektirati u ranim fazama razvoja malignih tumora jer imaju dugu fazu latencije i ne pokazuju klinički značajne markere u ranim stadijima (43). Pojedini tumori, ovisno o smještaju u organizmu, mogu u tjelesne tekućine u neposrednoj blizini izlučivati razne produkte kao npr. DNA raspadnutih tumorskih stanica (44). Osim što predstavlja neinvazivan pristup u dijagnostici, korištenje slobodno cirkulirajuće DNA (cfDNA, od eng. *circulating free DNA*) iz krvne plazme može pružiti informacije o tumorima teško dostupnima za konvencionalne medicinske postupke (44). Neovisno o načinju uzorkovanja tumorske DNA, analiza promjena u metilaciji gena koje bi upućivale na maligne promjene podrazumijeva poznavanje gena koji pokazuju promjene u metilacijskom statusu u specifičnim malignim bolestima. Danas su poznati brojni geni metiliranih promotora u tumorskim stanicama koji imaju potencijal postati dijagnostički i prognostički markeri (44). Izazov u ovom pristupu u dijagnostici malignih bolesti predstavlja pronalazak gena koji su u pojedinim tumorima utišani hipermetilacijom promotora, a koji imaju nemetilirane promotore u normalnim stanicama.

Nasuprot potrazi za pojedinačnim genima čija je funkcija u tumorskim stanicama izmijenjena uslijed promjena u razini metilacije regulacijske regije, drugi pristup u dijagnostici malignih bolesti baziran na promjenama u metilaciji DNA u obzir uzima čitav genom, odnosno svojstvo tumorskih stanica da najčešće pokazuju globalnu hipometilaciju genoma i lokalnu hipermetilaciju (2). Zbog hidrofobne prirode i većih dimenzija 5-metilcitozina u odnosu na citozin, metilacija DNA utječe na njezina fizikalno-kemijska svojstva pri čemu raspodjela 5-metilcitozina (nalaze li se ravnomjerno raspoređeni duž DNA ili u klasterima) također ima ulogu. Ovo svojstvo omogućava razlikovanje DNA tumorskih i netumorskih stanica po topljivosti i afinitetu prema metalnim površinama poput zlata te potencijalni razvoj univerzalnih testova za maligne bolesti (45).

5. ZAKLJUČAK

Nastanak malignih tumora osim mutacija uzrokuju i promjene u regulaciji ekspresije gena poput promjena u metilaciji promotora. Budući da tumori s promijenjenom metilacijom DNA i dalje sadržavaju funkcionalne gene, pokušava se razviti terapijske postupke specifične za maligne tumore koji bi omogućavali kontroliranu demetilaciju ili metilaciju kako bi se stanice vratile u prvobitno stanje. U uvjetima homeostaze u stanici vlada ravnoteža između procesa metilacije i demetilacije, stoga takav pristup u liječenju nailazi na izazove u osiguravanju specifičnosti inducirane demetilacije ili metilacije. Demetilacija metilacijom utišanih gena koji kodiraju tumorske supresore, npr. *VHL*, može ispraviti nastalu grešku, ali sporadično može doći do demetilacije drugih utišanih gena, npr. *HPSE*, čija bi aktivacija povećala sposobnost metastaziranja.

Kod analize metilacije DNA u karcinogenezi treba imati na umu da opažene korelacije između promjena u statusu metilacije, ekspresije gena i opaženog fenotipa ne moraju nužno predstavljati inicijaciju maligne transformacije. Regulacija aktivnosti DNA-metiltransferaza i aktivne demetilacije nije u potpunosti objašnjena i s trenutnim saznanjima nije moguće utvrditi je li za nastanak tumora odgovoran poremećaj u metilaciji ili je sam poremećaj u metilaciji odgovor na druge promjene u stanici. Osim toga, razina metilacije i utjecaj na ekspresiju gena ne mogu se promatrati izdvojeno od drugih epigenetičkih mehanizama i stanja kondenziranosti kromatina.

6. LITERATURA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000.;100(1):57–70.
2. Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. *Blood*. 1999.;93(12):4059 LP – 4070.
3. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*. 2008.;9(6):465-76.
4. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002.;99(6):3740–5.
5. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006.;103(5):1412–7.
6. Baylin SB. Tying It All Together: Epigenetics, Genetics, Cell Cycle, and Cancer. *Science*. 1997.;277(5334):1948 LP – 1949.
7. Haaf T. Methylation Dynamics in the Early Mammalian Embryo: Implications of Genome Reprogramming Defects for Development. U: *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. str. 13–22.
8. Neidhart M. DNA Methylation – Introduction. U: *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Elsevier; 2016. str. 1–8.
9. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2013.;38(1):23–38.
10. Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*. 2011.;12(7):647–56.
11. Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D. Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*. 2011.;43(11):1091–7.
12. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic acids research*. 1980.;8(7):1499–504.
13. Rideout WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*. 1990.;249(4974):1288 LP – 1290.
14. Fillion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez P-A. A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 2006.;26(1):169–81.

15. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, i ostali. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*. 2006.;9(3):199–207.
16. Roldán-Arjona T, Ariza RR. DNA Demethylation. U: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6365/>
17. Zheng Y, Joyce BT, Liu L, Zhang Z, Kibbe WA, Zhang W, i ostali. Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. *Nucleic acids research*. 2017.;45(15):8697–711.
18. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009.;1(2):239–59.
19. de Koning APJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD. Repetitive Elements May Comprise Over Two-Thirds of the Human Genome. *PLoS Genetics*. 2011.;7(12):e1002384.
20. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997.;94(6):2545 LP – 2550.
21. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: Structure, functions and status in cancer. *International Journal of Cancer*. 2010.;127(10) 2239–47.
22. Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science (New York, NY)*. 1992.;258(5081):424–9.
23. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, i ostali. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011.;30(18):2087–97.
24. Robertson KD, Jones PA. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene*. 1999.;18(26):3810–20.
25. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998.;92(6):725–34.
26. Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, i ostali. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005.;19(18):2122–37.
27. Levine AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997.;88(3):323–31.
28. Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *Journal of Molecular Medicine*. 2007.;85(11):1175–86.
29. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørliie T, i ostali. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic acids research*. 1994.;22(17):3551–5.

30. Sharpless NE. INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005.;576(1–2):22–38.
31. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer research*. 1995.;55(20):4525–30.
32. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Research*. 2000.;60(1):129–33.
33. Sharpless NE, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 2003.;22(20):3092–8.
34. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004.;22(24):4991–5004.
35. Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer research*. 1994.;54(15):4233–7.
36. Burk JR, Lertora JJ, Martinez IRJ, Fisher JW. Renal cell carcinoma with erythrocytosis and elevated erythropoietic stimulatory activity. *Southern medical journal*. 1977.;70(8):955–8.
37. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005.;6(8):597–610.
38. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999.;399(6733):271–5.
39. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, Grinberg A, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997.;94(17):9102–7.
40. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994.;91(21):9700–4.
41. Shteper PJ, Zcharia E, Ashhab Y, Peretz T, Vlodaysky I, Ben-Yehuda D. Role of promoter methylation in regulation of the mammalian heparanase gene. *Oncogene*. 2003.;22(49):7737–49.
42. Vlodaysky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 1999.;5(7):793–802.

43. Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Frontiers in molecular biosciences*. 2015.;2:13.
44. Leygo C, Williams M, Jin HC, Chan MWY, Chu WK, Grusch M, i ostali. DNA Methylation as a Noninvasive Epigenetic Biomarker for the Detection of Cancer. *Disease markers*. 2017.;2017:ID3726595
45. Sina AAI, Carrascosa LG, Liang Z, Grewal YS, Wardiana A, Shiddiky MJA, i ostali. Epigenetically reprogrammed methylation landscape drives the DNA self-assembly and serves as a universal cancer biomarker. *Nature Communications*. 2018.;9(1):4915.

7. SAŽETAK

Nastanak karcinoma podrazumijeva inaktivaciju gena za tumorske supresore i aktivaciju protoonkogena, što za posljedicu ima pojavu obilježja malignih tumora koja uključuju neograničen i nekontroliran rast i dijeljenje stanica, sposobnost invazije u okolna tkiva, formiranje metastaza te indukciju angiogeneze. U karcinogenezi osim mutacija u DNA jednak značaj imaju i epigenetički mehanizmi. U stanju homeostaze u stanici prevladava ravnoteža između metilacije i demetilacije DNA, dok je u tumorima primijećena globalna hipometilacija genoma te lokalna hipometilacija u odnosu na neizmijenjene stanice. Lokalna hipermetilacija najčešće se događa u promotorskim regijama i povezana je s inaktivacijom gena, a globalna hipometilacija doprinosi kromosomskoj nestabilnosti koja dovodi do kromosomskih rearanžmana koji uključuju aneuploidije, translokacije i delecije. 5-metilcitozin pospješuje nastanak točkastih mutacija spontanom deaminacijom posredujući pritom u tranziciji citozina u timin. Osim inaktivacije gena metilacijom, po stanicu je jednako nepovoljna aktivacija utišanih gena demetilacijom. Na primjerima proteina p16-INK4a, p14^{ARF}, p53, pVHL i heparanaze prikazana je umreženosti staničnih procesa čiji poremećaji dovode do nastanka tumora i doprinose malignosti.

Cilj ovog rada bio je prikazati obilježja metilacije DNA i njezin utjecaj na genom te na primjerima poznatih promjena u statusu metilacije u karcinomima ukazati na važnost metilacije kao pokretača malignih promjena, ali i na potencijal koji posjeduje za dijagnostičke i terapijske svrhe.

8. SUMMARY

Carcinoma development includes tumour suppressor gene inactivation and proto-oncogene activation which provide the tumour with malignant characteristics such as unlimited and unregulated cell growth and division, ability to invade surrounding tissues and form metastasis as well as to induce angiogenesis. Epigenetic mechanisms in carcinogenesis are equally important as mutations in DNA. In homeostasis there is a balance between DNA methylation and demethylation within a cell, while in tumour cells global hypomethylation and local hypermethylation have been observed. Local hypermethylation most commonly affects promoter regions and is associated with gene inactivation while global hypomethylation contributes to chromosomal instability as it is associated with chromosomal rearrangements which lead to aneuploidy, translocations and deletions. Moreover, 5-methylcytosine increases the rate of point mutations for spontaneous deamination and causes cytosine to thymine transversions. Both methylation driven gene inactivation and demethylation of silenced genes represent risk for tumour development. The role of p16-INK4a, p14^{ARF}, p53, pVHL proteins and heparanase illustrate the complexity of cellular processes whose dysregulation leads to tumorigenesis and affect the malignancy.

The aim of this work was to show the characteristics of DNA methylation and consequential effects on the genome, as well as to emphasize the importance of DNA methylation in carcinogenesis. Using known examples of DNA methylation changes in carcinoma, the aim was to show its potential as diagnostic and prognostic marker.