

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marta Jančić

Epigenetika tumora

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marta Jančić

Epigenetics of cancer

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Epigenetika tumora

Marta Jančić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Unatoč svakodnevnom napretku znanosti i medicine, dijagnosticiranje i liječenje najučestalijih bolesti poput tumora još uvijek predstavlja izazov. Iako su tumori tradicionalno smatrani genetičkom bolešću, novija istraživanja ukazuju na ključnu ulogu epigenetike u njihovom nastanku i progresiji. Ključno istraživačko pitanje ovog rada je: Kako epigenetske promjene utječu na nastanak i razvoj tumora? Epigenetske promjene, uključujući metilaciju DNA, regulaciju miRNA te modifikacije histona i kromatina, utječu na ekspresiju gena i druge stanične procese. Tumori mogu nastati pod utjecajem genetičkih ili epigenetskih čimbenika, ili njihovom kombinacijom. Razvoj i progresija mnogih malignih bolesti, poput akutne mijeloične leukemije, usko su povezani s epigenetskim modifikacijama, a nove terapijske metode fokusiraju se na reverzibilnost tih promjena ili njihovu inhibiciju. Osim što su ključne za razvoj budućih strategija liječenja, epigenetske modifikacije također služe kao potencijalni biomarkeri za rano otkrivanje i praćenje napredovanja bolesti.

Ključne riječi: epigenetika, mehanizmi, tumor, akutna mijeloična leukemija, terapija
(16 stranica, 5 slika, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Epigenetics of cancer

Marta Jančić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Despite daily advancements in science and medicine, diagnosing and treating prevalent diseases such as tumors still present significant challenges. Although tumors have been traditionally considered as genetic diseases, recent research highlights the crucial role of epigenetics in their onset and progression. The key research question of this study is: How do epigenetic changes influence the development and progression of tumors? Epigenetic modifications, including DNA methylation, miRNA regulation, histone and chromatin modifications, affect gene expression and subsequent cellular processes. Tumors can arise due to genetic or epigenetic factors, or a combination of both. The development and progression of many malignancies, such as acute myeloid leukemia, are closely linked to epigenetic modifications, with emerging therapeutic approaches focusing on reversing or inhibiting these changes. In addition to being essential for future treatment strategies, the presence of epigenetic modifications in tumors may serve as potential biomarkers for early detection and monitoring disease progression.

Keywords: epigenetics, mechanisms, tumour, acute myeloid leukemia, therapy
(16 pages, 5 figures, 42 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. EPIGENETIKA TUMORA.....	2
3. EPIGENETSKI MEHANIZMI.....	3
3.1. Modifikacije kromatina.....	3
3.1.1. Metilacija DNA	5
3.1.2. Modifikacije histona.....	6
3.2. MikroRNA (miRNA).....	7
4. AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA (AML).....	9
4.1. Epigenetske modifikacije u AML-u.....	10
4.2. H3K9me3.....	11
5. EPIGENETIKA I TERAPIJA.....	13
6. ZAKLJUČAK.....	15
7. LITERATURA.....	16

1. UVOD

Epigenetika (grč. επί- povrh, pokraj; ‘iznad genetike’) je grana genetike koja objašnjava mehanizme koji vode promjeni ekspresije gena, a nisu rezultat promjena u slijedu nukleotida deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (Korać i sur. 2018; Pavlica 2022). Deoksiribonukleotid je građen od: šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze. U molekuli DNA četiri su dušične baze, dvije su purinske: adenin i gvanin, a dvije pirimidinske: timin i citozin (Korać i sur. 2018; Pavlica 2022). Iako epigenetske modifikacije mogu dugoročno utjecati na ekspresiju gena, karakterizira ih to da su reverzibilne. Ovi procesi ključni su za diferencijaciju stanica i regulaciju strukture kromatina te aktivnosti gena od samog početka embrionalnog razvoja. Iako epigenetske promjene mogu imati trajan utjecaj na fenotip jedinke, one nisu uvijek trajne te se tada ne prenose na sljedeće generacije. Epigenetika i srodni genetski mehanizmi ključni su za evoluciju i održavanje specifičnih obrazaca ekspresije gena. Epigenetika se bavi promjenama povezanim s DNA i histonima koje ne uključuju mutacije, već mijenjaju strukturu kromatina, kompleksa DNA i proteina, čineći gene više ili manje dostupnima za proces transkripcije čija je uloga prepisivanje upute sa DNA tj. sinteza mRNA (Pavlica 2022). Regulacija transkripcije gena strogo je kontroliran proces u kojem je DNA povezana s brojnim faktorima transkripcije i histonskim proteinima te tvori strukturu kromatina, pri čemu svaka komponenta ima ulogu u regulaciji ekspresije gena. Epigenetski profil stanice određen je statusom metilacije DNA, kovalentnim modifikacijama histona, strukturom kromatina i nekodirajućom RNA te međusobnom povezanošću svih ovih modifikacija. Uloga ovih modifikacija, bilo promotivna ili inhibicijska, u ekspresiji gena ovisi o vrsti i mjestu same modifikacije. Cilj ovog pregleda je procijeniti epigenetske promjene u normalnim i karcinogenim stanicama, istražiti njihove uzročne čimbenike te razmotriti mogućnosti epigenetske terapije i tretmana.

2. EPIGENETIKA TUMORA

Nedavna istraživanja ukazuju na značajnu ulogu epigenetskih modifikacija u nastanku raka i drugih bolesti, pri čemu su epigenetski mehanizmi široko uključeni u razvoj i tijek mnogih patoloških stanja (Fardi i sur. 2018). Promjene u ekspresiji gena imaju ključnu ulogu u učestalosti bolesti poput tumora, neuroloških poremećaja, mišićne distrofije i lupusa (Fardi i sur. 2018). Epigenetske značajke mijenjaju se tijekom indukcije i progresije tumora, što može dovesti do poremećaja u staničnoj diobi, apoptozi, odgovoru na vanjske podražaje i promjena u ekspresiji gena, što sve može biti rezultat nepravilnosti u sekvenciji DNA tj. genima. Promijenjeni obrasci ekspresije i poremećena funkcija gena ključne su značajke tumorskih bolesti. Tumorigeneza je proces preobrazbe normalne stanice u tumorsku (Pavlica 2022). Epigenetika i genetika surađuju u svim fazama razvoja tumora, što potvrđuje međuodnos između stečenih epigenetskih nepravilnosti i naslijeđenih genetskih promjena. Epigenetika i epigenetske modifikacije sve više se prepoznaju kao važni faktori u razvoju tumora jer kontroliraju brojne biološke procese neophodne za život eukariotskih stanica, pri čemu i najmanja pogreška može rezultirati tumorigenezom. Posebno značajnu ulogu imaju epigenetski procesi koji rezultiraju suzbijanjem ekspresije ključnih regulatornih gena. Ovi procesi se nasljeđuju mitotskim diobama i podliježu sličnim selektivnim pritiscima kao i genetske promjene u nastanku tumora. Iako postoje sličnosti između epigenetskog i genetskog gubitka funkcije gena u razvoju tumora, važno je napomenuti da epigenetske promjene mogu djelovati kao složene mreže, gdje jedna promjena u sekvenciji DNA može izazvati brojne druge epigenetske promjene (Baylin i Jones 2007). Nepravilnosti u epigenetskim procesima rezultiraju složenijim poremećajem signalnih putova nego što je to slučaj kod mutacija gena u tumorigenezi. Epigenetske promjene mogu, kao i genske mutacije, poremetiti višestruke ključne putove povećavajući rizik od nastanka tumora i utječući na njegovu evoluciju od najranijih faza razvoja, iako se tumori najčešće smatraju genetskim bolestima. Abnormalnosti u ekspresiji gena i odgovoru na unutarnje i vanjske signale glavni su faktori nastanka i razvoja tumora, uzrokovani genetskim, metaboličkim te okolišnim čimbenicima. Unatoč brojnim istraživanjima na području epigenetike, uloga epigenetskih procesa poput metilacije DNA, deacetilacije i acetilacije histona u suzbijanju ekspresije gena još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Baradan i sur. 2013). Epigenetika obuhvaća široko područje u genetici tumora, a daljnja istraživanja mogla bi pomoći u otkrivanju specifičnih epigenetskih mehanizama i njihove međusobne povezanosti.

Učinak epigenetskih modifikacija na ekspresiju gena ovisi o specifičnoj vrsti modifikacije. Na primjer, metilacija DNA uglavnom ima represivnu ulogu, jer sprječava povezivanje čimbenika vezanja s njihovim ciljnim regijama na DNA, dok istovremeno omogućuje vezivanje specifičnih represorskih kompleksa. S druge strane, modifikacije histona utječu na zbijanje kromatina i regrutiranje različitih efektorskih proteina, što može rezultirati kako potiskujućim, tako i aktivirajućim funkcijama (Florian i Zjablovskaja 2019).

3. EPIGENETSKI MEHANIZMI

Glavni epigenetski mehanizmi koji mijenjaju ekspresiju gena uključuju metilaciju DNA, modifikacije histona i nekodirajuće RNA molekule. Ovi mehanizmi imaju ključnu ulogu u regulaciji gena tijekom stanične diferencijacije i rasta. Epigenetski mehanizmi mogu dovesti do utišavanja gena, što je neophodno za život eukariotskih stanica i važno za procese poput diferencijacije i utiskivanja X kromosoma kod ženki sisavaca. Iako uloga epigenetskih modifikacija još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, istraživanja sugeriraju da imaju mnogo veću ulogu u pravilnom funkcioniranju stanica nego što se ranije smatralo (Baradan i sur. 2013).

Epigenetske modifikacije uključuju suradnju različitih procesa, kao što su metilacija DNA, promjene histona poput acetilacije, i kovalentne modifikacije kromatina. Učinak ovih modifikacija na ekspresiju gena ovisi o njihovoj prirodi. Na primjer, metilacija DNA obično ima represivnu funkciju jer inhibira vezanje transkripcijskih faktora za DNA, dok modifikacije histona mogu imati i aktivirajuću i potiskujuću ulogu. Poremećaji u epigenetskim procesima mogu uzrokovati nastanak tumora kroz različite aberacije u gotovo svim koracima uključenim u pakiranje kromatina. Promjene u ekspresiji gena, uzrokovane epigenetskim događajima, mogu dovesti do nekontroliranog staničnog rasta, što rezultira razvojem i progresijom tumora. Iako se ranije smatralo da su genetske promjene glavni pokretači malignih faza, promjene u stanju kromatina, metilaciji i ekspresiji gena sugeriraju da epigenetske promjene također igraju ključnu ulogu (Baylin i Jones 2007).

Utjecaj epigenetskih promjena trebao bi se uzimati u obzir pri proučavanju raka, jer one mogu doprinijeti aktivaciji onkogeni, utišavanju tumorskih supresora i deregulaciji ključnih signalnih putova. Ova saznanja otvaraju put za daljnje istraživanje epigenetskih mehanizama u terapiji tumora.

Epigenetske aberacije igraju ključnu ulogu u nastanku i razvoju tumora, s potencijalom da doprinesu svim klasičnim obilježjima raka. Novija istraživanja pokazuju da je utišavanje gena dio opsežnih epigenetskih promjena u tumorskim stanicama, koje utječu na putove bitne za rast, razvoj i diferencijaciju matičnih stanica. Više epigenetskih procesa, uključujući metilaciju DNA, modifikacije histona i preoblikovanje nukleosoma, međusobno je povezano, a promjene u tim procesima mogu rezultirati trajnim utišavanjem gena ključnih za tumorigenezu (Baylin i Jones 2007).

3.1. Modifikacije kromatina

Globalne promjene u stanju, sadržaju i pakiranju kromatina prisutne su u tumorskim stanicama, što utječe na ključne putove za obnovu stanica i kontrolu njihovog rasta. Kromatinske aberacije usko su povezane s raznim bolestima, uključujući karcinome. Sekvenciranjem genoma tumorskih stanica otkriveno je da oko 50 % ljudskih karcinoma sadrži mutacije u genima koji

kodiraju proteine kromatina (Bernstein i sur. 2017). Tumorske stanice pokazuju promjene u metilaciji DNA, strukturi kromatina i aktivnostima regulatornih elemenata. Enzimi za remodeliranje kromatina često su neaktivni u mnogim vrstama raka, što rezultira globalnom restrikcijom kromatina. Endogeni i egzogeni podražaji mogu reorganizirati strukturu kromatina u predmalignoj stanici, potičući inicijaciju tumora i ubrzavajući njegovu evoluciju. Aberantna ekspresija ili potiskivanje gena omogućuje stanici da zadobije obilježja raka, što može objasniti različite onkogene podražaje povezane s aberacijama kromatina. Epigenetski defekti mogu pridonijeti mnogim aspektima biologije raka, omogućujući razvoj karakterističnih obilježja raka, poput proliferativnih signala, smanjenja stanične smrti, inaktivacije supresora rasta i metastaziranja (Slika 1). Ta obilježja definirana su kao ključni pokretači tumorigeneze (Altucci i sur. 2018). Deregulacije u epigenomu mogu potencijalno dovesti do razvoja tumora bez genetskog doprinosa, dovodeći u pitanje trenutne teorije i saznanja o tumorigenezi. Istražuje se može li tumorigeneza biti proces temeljen isključivo na epigenetskim promjenama, pri čemu su predispozicije za tumor pod utjecajem međusobno povezanih genetskih, epigenetskih i okolišnih čimbenika. Aberacije epigenoma mogu biti rezultat genskih mutacija modifikatora i remodelatora kromatina ili negenetskih promjena, poput utjecaja starenja, prehrane, metaboličkih stanja i interakcija s tumorskim mikrookruženjem. Funkcionalni ishod epigenetskih promjena na molekularnoj razini ključan je za razumijevanje odnosa epigenetike i tumora. Važno je istražiti kako epigenetske modifikacije mijenjaju strukturu kromatina, utječu na vezanje transkripcijskih faktora i kako su povezane s drugim epigenetskim promjenama, kao što su modifikacije histona. Precizna kontrola ekspresije gena ključna je za normalan razvoj stanice, dok promjene u regulaciji transkripcije mogu dovesti do maligne transformacije i onkogene progresije. Mutacije u epigenetskim modifikatorima mogu rezultirati globalnim promjenama u epigenetskim i transkripcijskim putovima, što može dovesti do razvoja predmalignih i malignih stanja (Florian i Zjablovskaia 2019).



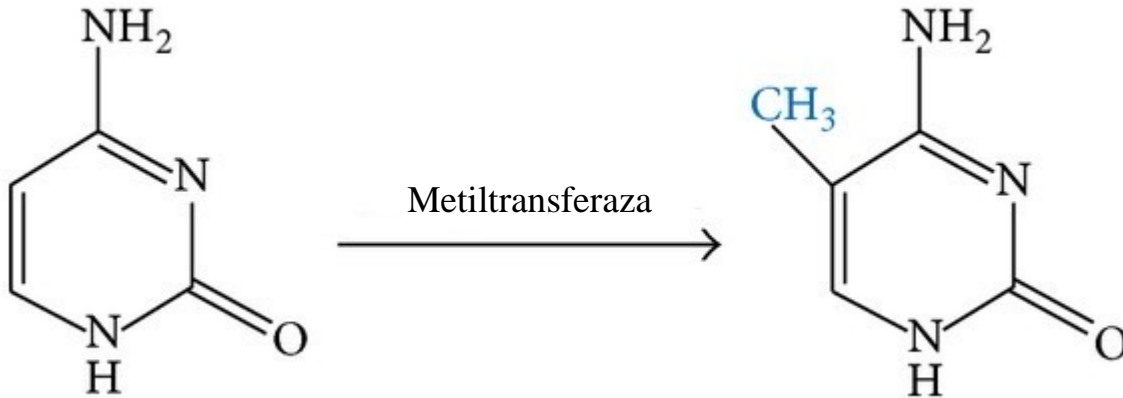
Slika 1. Obilježja raka (Preuzeto i prilagođeno iz Altucci i sur., 2018.)

3.1.2. Metilacija DNA

Metilacija DNA najčešći je epigenetski mehanizam utišavanja ekspresije gena i inhibiranja transkripcije u eukariotskim stanicama. Ona ima važnu ulogu u brojnim staničnim procesima, poput inaktivacije X kromosoma, regulacije embrionalnog razvoja i transkripcije te utišavanja gena tijekom svih faza razvoja kada je potrebno smanjiti ekspresiju određenih gena. Ovaj proces uključuje prijenos metilne skupine na peti ugljik citozina pomoću enzima DNA-metiltransferaze što rezultira stvaranjem 5-metilcitozina (Slika 2). To se događa, najčešće na citozinima koje slijedi gvanin u DNA, sekvencama poznatim kao CpG mjesta ili otoci. Metilacija CpG otoka povezana je s utišavanjem gena, a metilacija promotorskih regija u tim otocima igra ključnu ulogu u nastanku i razvoju tumora, jer može inaktivirati brojne gene u tumorskim stanicama. Istraživanja su pokazala da je sadržaj 5-metilcitozina u genomima tumorskih stanica općenito smanjen. Mehanizam kojim metilacija utišava ekspresiju gena temelji se na tome da specifični transkripcijski čimbenici ili druge regulatorne komponente ne mogu pristupiti promotoru, čime se smanjuje ekspresija gena, dok hipometilacija u tim regijama može potaknuti njihovu ekspresiju.

Poremećaji metilacije DNA povezani su s različitim bolestima, uključujući i tumore, i često predstavljaju prve promjene koje pokreću proces tumorigeneze, pri čemu su obrasci metilacije specifični kod tumora. Hipometilacija je česta pojava u tumorskim stanicama, što može rezultirati i globalnom hipometilacijom DNA, uz istovremenu hipermetilaciju na specifičnim mjestima. Ovakva nepravilna hipometilacija uzrokuje ekspresiju određenih gena poput onkogeni, protoonkogeni koji mutacijom postaju dio puta tumorigeneze (Korać i sur. 2018). Hipermetilacija može dovesti do inhibicije tumor supresorskih gena (*TSG*), gena koji održavaju staničnu diobu na normalnoj razini (Pavlica 2022). Primjerice, mnoge vrste tumora povezane su s abnormalnom metilacijom gena *TSG*, poput *p53* i *p16*, koji su ključni za regulaciju normalnog staničnog rasta i diferencijacije te inhibiraju njihovu ekspresiju. Takav abnormalni fenotip CpG otoka može suprimirati gene za suzbijanje tumora, kao i gene za popravak DNA. Promjene u obrascu metilacije DNA, osobito u CpG otocima, prve su i najvažnije epigenetske aberacije identificirane u tumorskim stanicama. Hipometilacija je često povezana s raznim vrstama tumora, uključujući rak želuca, bubrega, debelog crijeva, gušterače, jetre i pluća. Općenito, metilacija DNA ima ključnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma, pa njezin izostanak može povećati genetsku nestabilnost i uzrokovati mutacije u DNA slijedu. Promjene u uzorku metilacije DNA, koje su povezane s dobi, također mogu biti povezane s nastankom tumora u određenim dijelovima tijela. Postoji snažna povezanost između okolišnih čimbenika i razvoja tumora u kontekstu metilacije DNA. U tumorskim stanicama, niska razina metilacije često je posljedica gubitka metilacije u ponavljajućim sekvencama i demetilacije, koja je faktor selektivne aktivacije gena tijekom procesa diferencijacije. Posebice je važna demetilacija introna, nekodirajuće sekvence eukariotskog gena (Pavlica 2022). Stupanj hipometilacije može se povećavati tijekom razvoja tumora, a progresivne lezije mogu doprinijeti metastaziranju stanica raka. Transkripcija regija s promijenjenim uzorkom metilacije koja rezultira hipometilacijom može uzrokovati oštećenje genoma (Baradan i sur. 2013). Važnost

metilacije DNA u razvoju tumora je očita, a daljnja istraživanja usmjerena su na razumijevanje mehanizama putem kojih druge modifikacije kromatina doprinose tumorigenezi.

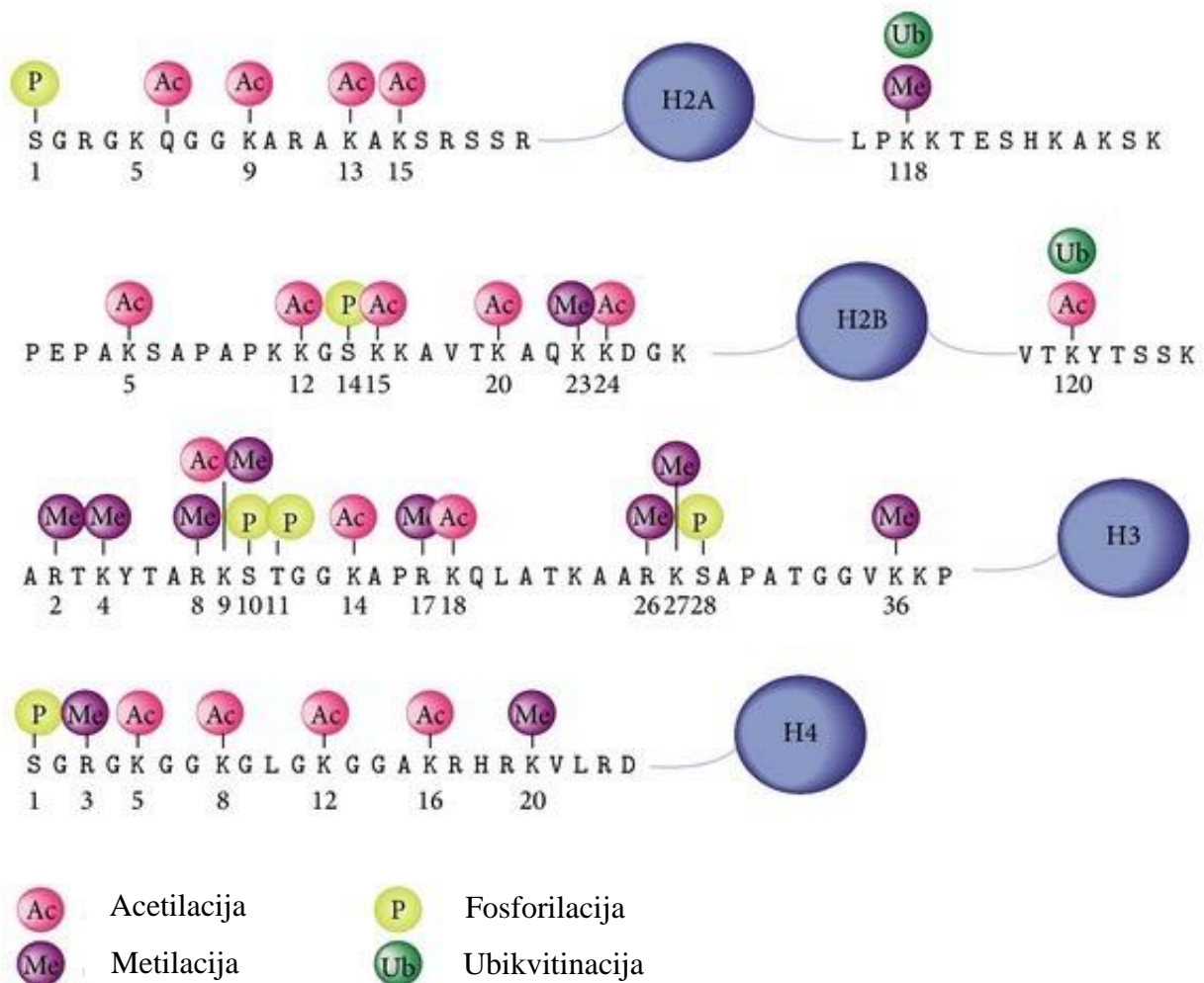


Slika 2. Metilacija citozina (Preuzeto i prilagođeno iz Fardi i sur., 2018)

3.1.3. Modifikacije histona

Kovalentne modifikacije histona predstavljaju jedne od najvažnijih epigenetskih promjena koje kontroliraju aktivnost gena dovodeći do njihove aktivacije ili utišavanja (Pavlica 2022). Histoni, visoko alkalni proteini koji su povezani s DNA i čine strukture poznate kao nukleosomi, podliježu raznim modifikacijama. Ove modifikacije uključuju metilaciju lizina i arginina, citrulinaciju arginina, acetilaciju lizina te fosforilaciju serina, treonina i tirozina. Histoni također mogu biti fosforilirani, ubikvitinirani, metilirani i acetilirani, pri čemu većina ovih modifikacija regulira transkripciju DNA kroz aktiviranje ili inhibiciju gena (Slika 3) (Fardi i sur. 2018). Ove histonske promjene uključuju posttranslacijske modifikacije u histonskim proteinima nukleosoma, što utječe na organizaciju nukleosoma i pakiranje DNA u složenije strukture. Rep N-kraja histona, koji sudjeluje u interakciji između susjednih nukleosoma, može biti podvrgnut raznim modifikacijama koje igraju ključnu ulogu u regulaciji kromatinske strukture (Baradan i sur. 2013). Uz histonske proteine, nehistski proteini također mogu utjecati na konfiguraciju kromatina kroz interakciju s histonima i DNA. Primjerice, kompleksi ovisni o ATP-u mogu uređivati strukturu kromatina pomicanjem i premještanjem nukleosoma. Druga važna skupina proteinskih kompleksa uključuje proteine iz skupina HP1, *Polycomb* i *Trithorax*, koji se vežu za specifično modificirane histone ili DNA, te kataliziraju promjene poput metilacije DNA ili drugih histonskih modifikacija (Baradan i sur. 2013). Različiti putovi mogu povezivati modifikacije histona s razvojem tumora, a u nekim slučajevima ta povezanost može biti i izravna. Razumijevanje metilacije histona evoluiralo je sa saznanjem da se te modifikacije trebaju promatrati kao dinamičke i podložne vanjskim

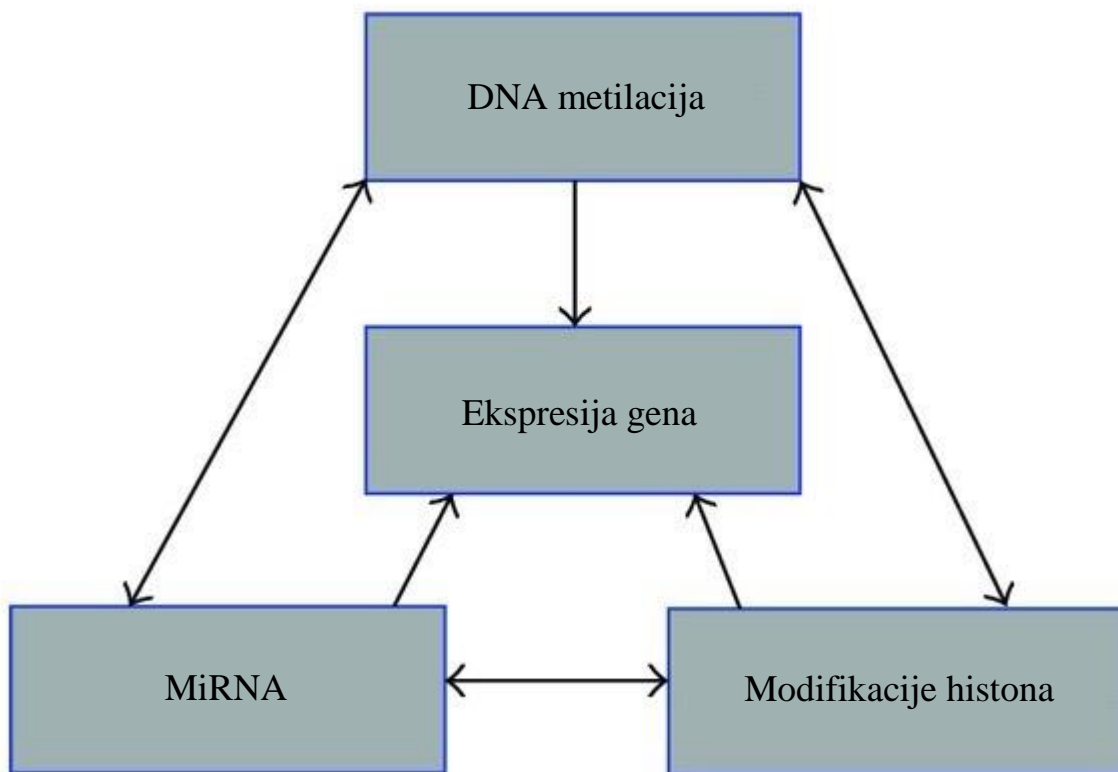
utjecajima, a ne kao statične. Otkriveno je da promjene u metilaciji histona nisu trajne, što je otvorilo nove mogućnosti za istraživanje specifičnih modifikacija histona i njihovog utjecaja na normalan razvoj tkiva i tumorigenezu (Bunschoten i sur. 2019). Povezanost između modifikacija histona i tumora postala je jasnija nakon što su otkrivene korelacije između tumora i metilacije DNA. Poremećaji u metilaciji CpG otoka mogu dovesti do raznih histonskih modifikacija, što može rezultirati različitim vrstama raka. No, promjene u histonima mogu biti i izravno povezane s napredovanjem raka, neovisno o metilaciji CpG otoka (Baradan i sur. 2013).



Slika 3. Metilacije histona (Preuzeto i prilagođeno iz Fardi i sur., 2018)

3.2. MikroRNA (miRNA)

Male nekodirajuće molekule RNA dužine oko 18-24 nukleotida, miRNA, igraju ključnu ulogu u regulaciji gena inhibiranjem translacije mRNA, biosinteze proteina (Pavlica 2022). Ove molekule reguliraju mnoge stanične funkcije, uključujući reprodukciju, diferencijaciju stanica i apoptozu. miRNA također ima važnu ulogu u kontroli metilacije DNA i modifikacije histona, budući da epigenetski mehanizmi poput metilacije promotora gena i acetilacije histona mogu biti pod utjecajem ekspresije miRNA. Također, ekspresija velikog broja gena za miRNA povezana je sa CpG otocima te može biti regulirana metilacijom, pri čemu je hipermetilacija CpG otoka povezana s utišavanjem ekspresije miRNA (Fardi i sur. 2018). Poremećaji u strukturi i funkciji miRNA mogu uzrokovati bolesti jer ove molekule igraju ključnu ulogu u regulaciji staničnih funkcija. Promjene u epigenetskim procesima mogu dovesti do povećanja ekspresije miRNA u tumorskim stanicama, što rezultira poremećajem ravnoteže u genskoj regulaciji zbog složene međusobne ovisnosti između miRNA i epigenetskih procesa (Slika 4). Nenormalna ekspresija miRNA i gubitak njihove odgovarajuće funkcije često su povezani s nastankom, razvojem i napredovanjem tumora, što dovodi do stanične proliferacije i oštećenja mehanizama apoptoze (Fardi i sur. 2018).



Slika 4. Shematski prikaz međusobne ovisnosti epigenetskih mehanizama (Preuzeto i prilagođeno iz Fardi i sur., 2018)

4. AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA (AML)

Poznato je da nekoliko podtipova leukemije nastaje zbog kromosomskih translokacija, poput kronične mijeloične leukemije kod koje u kromosomima leukocita dolazi do recipročne translokacije i uzrok joj je genetska promjena. Akutna mijeloična leukemija (AML) je agresivna hematološka bolest koja se uglavnom odlikuje poremećajem normalnog procesa hematopoeze i blokadom mijeloične diferencijacije, što dovodi do nekontrolirane proliferacije dominantnih klonova leukemijskih matičnih stanica (LSC) i nakupljanja nezrelih mijeloidnih progenitorskih stanica (blasta) u koštanoj srži bolesnika. Statistički, AML je relativno rijedak oblik raka, čineći oko 1,1 % svih novih slučajeva. Ova bolest uglavnom pogađa starije osobe, a dugoročno preživljavanje kod starijih bolesnika s AML-om vrlo je nisko (Florian i Zjablovskaja 2019).

Normalni proces hematopoeze uključuje diferencijaciju i samoobnavljanje hematopoetskih matičnih stanica. Praćenje razvoja i napredovanja krvnih stanica ključan je model za proučavanje promjena u epigenetskom krajoliku i njihovog utjecaja na odluke o sudbini stanica. Nastanak AML-a pripisuje se mutacijama u ključnim staničnim regulatorima, poput epigenetskih i transkripcijskih čimbenika te signalnih gena. AML se razvija iz somatski stečenih mutacija koje daju prednost staničnom rastu nositelja, a prisutnost specifičnih genskih mutacija jedan je od glavnih parametara za identifikaciju bolesnika s AML-om i definiranje protokola liječenja (Florian i Zjablovskaja 2019).

Agresivnost AML-a i uspjeh liječenja ovise o tipu stanica u kojima je leukemija prvotno nastala. Starije hematopoetske stanice često su epigenetski i/ili genetski promijenjene te imaju potpuno drugačije stanične uvjete za razvoj AML-a u usporedbi s mlađim stanicama. Promjene u epigenetskom krajoliku i strukturi jezgre starijih hematopoetskih stanica, posebno hematopoetskih matičnih stanica, mogu pridonijeti razlikama između mlađih i starijih leukemijskih matičnih stanica (LIC-ova). Ove promjene mogu uzrokovati različito ponašanje starijih AML stanica u usporedbi s mlađim stanicama, unatoč prisutnosti istih genetskih promjena.

Pojava AML-a općenito je praćena mutacijama koje dovode do povećane aktivacije signalnih putova i stanične proliferacije. Istraživanja su pokazala da u nastanku i napredovanju AML-a sudjeluju tri skupine mutacija. Mutacije tipa 1 rezultiraju povećanom stopom proliferacije i otpornošću na apoptozu, dok mutacije tipa 2 blokiraju diferencijaciju. Treća skupina mutacija uključuje aberantnu epigenetsku regulaciju. Istraživanja su potvrdila ključnu ulogu epigenetskih modifikacija u hematološkim malignostima, pokazavši da je više od polovice *de novo* AML slučajeva povezano s mutacijama gena koji kodiraju epigenetske regulatore (Bunschoten i sur. 2019).

Razvoj AML-a često slijedi pojavu mijelodisplastičnog sindroma (MDS), hematološkog poremećaja poznatog kao stanje koje prethodi AML-u. Mijelodisplastični sindrom karakteriziran je abnormalnom koštanoj srži i morfologijom krvnih stanica te neučinkovitom hematopoezom s prisutnošću blasta u krvi ili koštanoj srži ispod 20 %. Kada je postotak blasta veći od toga, smatra se da je bolest evoluirala u potpuno razvijenu akutnu mijeloičnu leukemiju. U MDS-u su najčešće

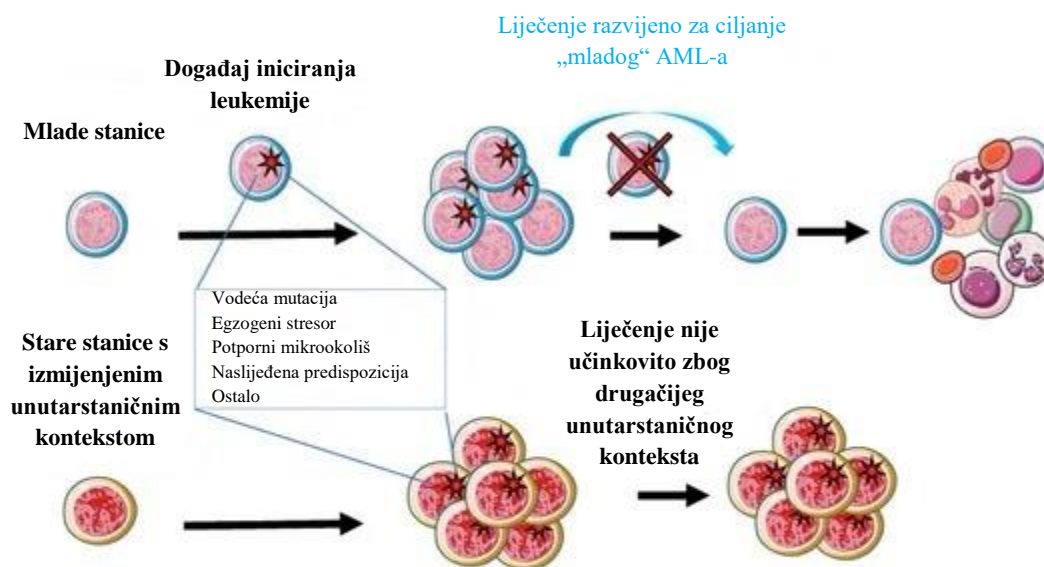
mutirane dvije kategorije gena: faktori spajanja i epigenetski regulatori. Mnogi geni koji su ponavljano mutirani u AML-u također su mutirani u MDS-u, a mutacije epigenetskih modifikatora prisutne su u velikom postotku bolesnika s AML-om, predstavljajući važan dio događaja koji iniciraju ovu bolest (Florian i Zjablovskaja 2019).

4.1. Epigenetske modifikacije u AML-u

Epigenetske modifikacije povezane s akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) uključuju metilaciju i hidroksimetilaciju DNA, acetilaciju histona i metilaciju lizina na histonima. Zanimljivo je da su određene mutacije koje su prisutne u leukemijskim stanicama također pronađene u "normalnim" i funkcionalnim hematopoetskim matičnim stanicama, što ukazuje na postojanje stanica s pre-leukemijskim mutacijama koje kasnije evoluiraju u leukemiju postupnim stjecanjem dodatnih mutacija. Broj mutacija u uzorcima AML-a i normalnim hematopoetskim matičnim stanicama povezan je s dobi pacijenata te je zaključeno da većina mutacija prisutnih u AML stanicama ne pridonosi leukemogenezi. Umjesto toga, različite epigenetske promjene i promjene u ekspresiji epigenetskih regulatora prisutne su u pozadini starijih hematopoetskih matičnih stanica. Također je zabilježeno da stariji pacijenti akumuliraju više mutacija u epigenetskim regulatorima u usporedbi s mlađim pacijentima. Razvoj AML-a i uspjeh njenog liječenja ovise o kombinaciji nekoliko čimbenika, kao što su istodobna prisutnost mutacija, redoslijed njihovog pojavljivanja i unutarstanični kontekst matične stanice (Slika 5) (Florian i Zjablovskaja 2019).

Prisutnost nukleosoma i mogućnost fizičkog pristupa mjestima modifikacije histona identificirani su kao ključni faktori koji utječu na samu modifikaciju histona i kompleksnu mrežu komunikacije koja kontrolira ekspresiju gena i održavanje staničnog identiteta. Brojni enzimi koji rade zajedno, zahtijevajući prisutnost drugih enzima za postizanje željenog učinka, kontroliraju aktivaciju transkripcije dodavanjem post-translacijskih oznaka koje promiču aktivaciju gena i uklanjanjem oznaka koje uzrokuju represiju. Metilacija lizina, kao dio složenih mreža, još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali je poznato da je kod AML-a enzim arginin metiltransferaza PRMT4/5 često prekomjerno eksprimiran i doprinosi blokadi mijeloidne diferencijacije. Acetilacija histonskih kompleksa također je povezana s dodavanjem tri metilne skupine na lizin 9 u histonu H3 (H3K9me3). Smanjena ekspresija proteina TIP60, koji ima ulogu supresora tumora kroz prepoznavanje H3K9me3 i aktivaciju ATM kinaza, važna je u inicijaciji apoptoze oštećenih stanica u AML-u (Bunschoten i sur. 2019).

Mnogi dokazi ukazuju na to da je epigenetska disregulacija uobičajena patološka značajka u ljudskim stanicama raka. Globalne promjene epigenetskog krajolika prevladavaju u malignim stanicama različitih tumora, poput raka prostate, pluća, bubrega i hemopoeze. U blastima pacijenata s AML-om uočene su hipometilacija DNA i hipoacetilacija histona. Mutacije u enzimima koji igraju ulogu u metilaciji DNA, poput DNA metiltransferaze 3-A, mogu dovesti do hematoloških malignih bolesti poput MDS-a i AML-a (Fardi i sur. 2018).



- * Akumulacija mutacija
- Epigenetske promjene
- Gubitak stanične i epitelne polarizacije
- Promjene u strukturi kromatina
- Ostalo

Slika 5. Shematski prikaz utjecaja starosti stanica na leukemijsku transformaciju (Preuzeto i prilagođeno iz Florian i Zjablovskaja, 2019)

4.2. H3K9me3

Trimetilacija lizina 9 na histonu H3 (H3K9me3) posttranslacijska je modifikacija uključena u regulaciju širokog spektra bioloških procesa, uključujući stvaranje heterokromatina, kondenziranih regija kromatina koje najčešće nisu transkripcijski aktivne (Pavlica 2022). Smanjenje globalne razine H3K9me3 dokazano je povezano s ishodom AML-a, a istraživanja su pokazala da je smanjena razina H3K9me3 u starijim mišjim i ljudskim hematopoetskim matičnim stanicama povezana sa smanjenjem ekspresije SUV39H1, jednog od glavnih enzima uključenih u stvaranje heterokromatina (Florian i Zjablovskaja 2019). H3K9me3 ima važnu ulogu ne samo u zloćudnim stanjima, već i u normalnom staničnom razvoju. Ova modifikacija histona sudjeluje u regulaciji apoptoze, autofagije, popravka DNA, samoobnavljanja, transkripcije, latencije virusa, utiskivanja genoma te starenja stanice. Kao represor gena, H3K9me3 održava stanični identitet i genomsku stabilnost uspostavljanjem velikih domena heterokromatina, čime se sprječava neželjena rekombinacija i uvođenje mutacija (Bunschoten i sur. 2019).

Unatoč mnogim istraživanjima, uloge H3K9me3 unutar stanica još uvijek nisu potpuno razjašnjene, no čini se da su višestruke i složene, uključujući širok raspon staničnih procesa koji sudjeluju u očuvanju genomske stabilnosti. H3K9me3, kada se veže s proteinom HP1, utječe na daljnje epigenetske modifikacije, održavajući heterokromatin. HP1 može uzrokovati daljnje taloženje H3K9me3 regrutiranjem enzima metiltransferaze SUV39H1, što vodi širenju H3K9me3 kroz DNA i omogućuje uspostavu većih domena heterokromatina. Pomna regulacija H3K9me3 i heterokromatina je ključna jer je HP1 također odgovoran za olakšavanje pristupa genima unutar heterokromatina, omogućujući prilagodbu stanice na promijenjene ili nove uvjete. H3K9me3 je visoko reguliran tijekom normalne diferencijacije i samoobnavljanja hematopoetskih matičnih stanica. Povezan je s napredovanjem metastaza i somatskim mutacijama koje ostaju nepromijenjene u metastazama, a globalne promjene u statusu metilacije H3K9 pridonose selektivnoj prednosti tumora, povećanoj sposobnosti preživljavanja i otpornosti na liječenje metastaza (Bunschoten i sur. 2019). U AML blastima uočeno je smanjenje H3K9me3 u središnjim promotorskim regijama, što rezultira promjenama u regrutiranju faktora transkripcije i modifikaciji strukture kromatina. Ove promjene metilacije H3K9 povezane su s inaktivacijom tumorskih supresorskih gena, dereguliranom proliferacijom i blokadom diferencijacije. Nakon uspješnog liječenja, H3K9me2 se uklanja iz tumorskih supresora (Bunschoten i sur. 2019).

U AML-u, nestabilnost kromosoma i mutageneza mogu biti potaknuti velikim dijelovima H3K9me2, što mijenja transkripciju i utišava tumor-supresorske gene. Glavni regulatorni aparat koji upravlja razinama H3K9me3 sastoji se od metiltransferaza i demetilaza. Ove enzime dodatno reguliraju "čitači", "pisači" i "brisači" histonskih oznaka, koji uspostavljaju i održavaju proces transkripcije. Male promjene u ovim enzimima mogu značajno utjecati na nastanak bolesti. Istraživanja se trenutno fokusiraju na razvoj inhibitora malih molekula ciljajući histon metiltransferaze ili demetilaze koje su povezane s onkogenom regulacijom H3K9me3 u AML-u. Histonske oznake poput H3K9me3 imaju dinamičku kontrolu i jedinstven povratni sustav koji omogućuje prepoznavanje, promjenu i održavanje epigenetskih modifikacija. Funkcije "pisača" i "brisača" histonskih modifikacija nisu isključive, što znači da oni imaju sposobnost dinamičkog mijenjanja epigenetskog krajolika. Enzimi kao što je obitelj KDM4 ističu se kao važni regulatori onkogene transkripcije u AML-u. Iako H3K9me3 nije jedini oblik metilacije histona koji utječe na epigenomski i genomski krajolik AML-a, njegova razina u promotorima gena korelira s ishodom bolesti u oko 70 % slučajeva (Bunschoten i sur. 2019).

Za precizniji odabir terapije i bolje razumijevanje regulatornih putova H3K9me3, potrebno je dodatno istražiti ovu dinamičku oznaku. Promjene u globalnom epigenomu putem metilacije histona mogu dovesti do preciznije klasifikacije bolesti kod pacijenata s AML-om. Trenutno se razvijaju nove terapije koje ciljaju specifične H3K9me3 metiltransferaze ili demetilaze, no selektivnost tih terapija predstavlja izazov koji tek treba riješiti. S obzirom na to da petogodišnja stopa preživljavanja pacijenata s AML-om iznosi manje od 40 %, stalni naponi u identificiranju novih mehanizama razvoja AML-a te mutacija koje pokreću bolest i sudjeluju u njenom napredovanju od ključne su važnosti.

5. EPIGENETIKA I TERAPIJA

Istraživanja i rasprave o važnosti epigenetskih promjena u bolestima, posebno u nastanku i progresiji tumora, ističu potencijal za korištenje tih novih saznanja kao strategije u terapiji malignih bolesti. Epigenetski mehanizmi kontroliraju aktivaciju signalnih putova i gena, što ih čini ključnima u pronalasku i određivanju najboljih pristupa praćenju bolesti i njenom liječenju. Epigenetske modifikacije ne samo da mogu inicirati pojavu bolesti, već također igraju ulogu u predviđanju kliničkih ishoda i procjeni rizika od bolesti. One su potencijalni izvori za dijagnozu i praćenje bolesti. Nova saznanja u epigenetici unapređuju razumijevanje načina na koji ove promjene sudjeluju u ranim stadijima tumorigeneze, uključujući i ulogu matičnih stanica. Tumorske stanice pokazuju globalne promjene u konstituciji kromatina, pri čemu cijeli epigenom i važne stanične funkcije podliježu epigenetskoj deregulaciji. Reverzibilnost epigenetskih promjena omogućuje njihovo vraćanje u prethodno normalno stanje, što epigenetske promjene čini važnim metama u kliničkoj prevenciji i liječenju tumora i sličnih zloćudnih bolesti. Na primjer, metilacija DNA, posebno u CpG otocima, može se koristiti kao marker za rano otkrivanje tumora, praćenje napredovanja bolesti i predviđanje odgovora na liječenje. Ovaj pristup omogućuje rano otkrivanje tumora kroz detekciju metilirane DNA u plazmi i serumu krvi. Daljnja istraživanja molekularne regulacije kromatina u normalnim i abnormalnim uvjetima mogu otvoriti put za korištenje terapija koje ciljaju matične stanice raka ili miRNA. Rastuće razumijevanje epigenetskih mehanizama može dovesti do razvoja strategija za prepravljanje epigenetskih abnormalnosti i postizanje kontrole nad tumorima. Epigenetska terapija, iako obećavajući pristup za liječenje različitih malignih bolesti, još uvijek se suočava s izazovima. To uključuje prepoznavanje gena koji pokreću bolest, a koji su stimulirani, kao i razvoj preciznih epilijekova koji ciljaju specifične epigenetske enzime. Razvoj znanja o epigenetskim biomarkerima, primjena i razvoj epilijekova nove generacije te modeli koji predviđaju pojavu i razvoj bolesti, značajno unapređuju razumijevanje i korištenje epigenetike u prognozi, dijagnozi i liječenju tumora. Integracija saznanja o genomu i epigenomu može dovesti do naprednijih dijagnostičkih i prognostičkih alata, kao i do individualiziranih tretmana prilagođenih svakom pacijentu. Za to je potrebno usklađivanje postojećih i novih informacija koje pomažu u identifikaciji epigenetskih promjena odgovornih za nastanak bolesti ili njezin napredak.

U istraživanju epigenetskih promjena, posebno u tretmanima za akutnu mijeloičnu leukemiju, pažnja se posvećuje epigenetskoj oznaci H3K9me3. Ova oznaka ima potencijal kao terapijska meta u AML-u. Bolje razumijevanje regulatornih puteva koji upravljaju ovom epigenetskom oznakom, kao i složenih mreža drugih mehanizama modifikacija, ključno je za precizno ciljanje ključnih molekularnih mehanizama povezanih s AML-om. Nove terapijske metode sve više se fokusiraju na razvoj snažnijih i selektivnijih inhibitora koji ciljaju poznate enzime H3K9 metiltransferaze i demetilaze, ključne u nastanku i napretku akutne mijeloične leukemije. Razumijevanje putova kojima ti enzimi postaju deregulirani u AML-u i pronalaženje načina za njihovo ciljanje ključni su za unapređenje liječenja ove bolesti. Širok raspon enzima

uključen je u uspostavu, prepoznavanje i uklanjanje epigenetske oznake H3K9me3, a s obzirom na reverzibilnu prirodu ove trimetilacije, ona predstavlja atraktivan terapijski cilj.

Iako su metilacije histona reverzibilne, specifični obrasci metilacije DNA uzrokovani deregulacijom metiltransferaza i demetilaza povezani su s fenotipom AML-a. Razvoj specifičnih inhibitora koji mogu ciljati ove enzime može otvoriti nove mogućnosti za liječenje. Istražuje se da li specifičan potpis koji ostavlja modifikacija histona može biti učinkovit pri predviđanju ishoda bolesti, što bi moglo biti ključno za uspostavu ciljanog liječenja (Fardi i sur. 2018). Osim toga, post-translacijski regulatorni proteini sve se više prepoznaju kao potencijalne terapijske mete zbog njihove uloge u regulaciji epigenetskih promjena. Trenutno su istraživanja usmjerena na kombinaciju sintetske, organske i peptidometričke kemije kako bi se stvorio širok spektar inhibitora sposobnih za ciljanje enzima koji reguliraju epigenetske modifikacije, s ciljem poboljšanja trenutne prognostičke dijagnoze AML-a putem uključivanja epigenetskih čimbenika i genetičkih markera.

6. ZAKLJUČAK

Iako su tumori prvenstveno genetičke bolesti, utjecaj epigenetike i epigenetskih promjena na njihov nastanak i razvoj je neosporiv. Igrajući ključnu ulogu u inicijaciji i regulaciji mnogih staničnih procesa, epigenetski mehanizmi su se pokazali kao nezamjenjivi i ključni za normalno funkcioniranje stanica. Razumijevanje ovih složenih mehanizama omogućuje razvoj novih terapijskih strategija koje ciljaju specifične epigenetske markere i enzime, poput H3K9 metiltransferaza i demetilaza, kako bi se postigla učinkovitija terapija u liječenju. Mogućnost inhibicije takvih enzima povezanih s razvitkom tumora doprinijela bi razvoju učinkovitijih i individualiziranih terapijskih strategija u budućnosti, što je od velike važnosti s obzirom na zabrinjavajuću statistiku vezanu uz preživljavanje bolesnika s AML-om. Unatoč izazovima u razvoju epigenetske terapije, ona predstavlja obećavajući smjer za poboljšanje ishoda liječenja AML-a i drugih malignih bolesti, naglašavajući potrebu za kontinuiranim istraživanjem i inovacijama u ovom području. Daljnja istraživanja usmjerena na razumijevanje epigenetike i epigenetskih mehanizama pružaju temelje za nove terapijske strategije te novi pristup u onkologiji.

7. LITERATURA

Altucci L., Dell'Aversana C., Nebbioso A., Paolo Tambaro F. 2018. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genet** 14(6): e1007362
<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007362>

Baradan B., Farshdousti Hagh M., Ghavikfekr Fakhr M. 2013. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. **Hindawi Publishing Corporation** 2013: 317569
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3884803/>

Baylin B. S., Jones A. P. 2007. The Epigenomics of Cancer. **Cell** 128(4): 683-692
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894624/>

Bernstein E. B., Flavahan A. W., Gaskell E. 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science** 357(6348): eaal2380 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5940341/>

Bunschoten P. R., Hoose A., Huang X., Jorgensen G. H., Liskamp M. J. R., Massett E. M., Monaghan L., Pirvan P. 2019. The Emerging Role of H3K9me3 as a Potential Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Oncology** 9
<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00705/full>

Fardi M., Majid Farshdousti H., Saeed S. 2018. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. **ScienceDirect** 5(4): 304-311
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6303480/>

Florian M. C., Zjablovskaja P. 2019. Acute Myeloid Leukemia: Aging and Epigenetics. **Cancers** 2020 12(1), 103 <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/1/103>

Korać P., Pavlica M., Petrović B., Vraneša A. 2018. Genetički leksikon (Genetikon)
https://genetikon.biol.pmf.hr/5_rezultati.html

Pavlica M. 2022. Mrežni udžbenik iz genetike <https://www.genetika.biol.pmf.hr/>