

# Epigenetske promjene Wnt signalnog puta u tumorima reproduktivnog sustava

---

Janković, Hrvojka

Master's thesis / Diplomski rad

2015

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:771657>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Hrvojka Janković**

**Epigenetske promjene Wnt signalnog puta u  
tumorima reproduktivnog sustava**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na katedri Medicinska biologija pod vodstvom prof.dr.sc.Ljiljane Šerman, dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

# SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	3
1. SAŽETAK.....	4
2. UVOD.....	9
3. WNT SIGNALNI PUT.....	13
4. EPIGENETSKE PROMJENE WNT SIGNALNOG PUTA.....	16
4.1. Utjecaj DACT2 gena na Wnt signalni put.....	16
4.2. Utjecaj epigenetskih promjena APC-2 na Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put.....	19
4.3. Utjecaj promjena Wnt signalnog puta na razvitak kolorektalnog karcinoma.....	21
4.4. Utjecaj mikroRNA-140 na Wnt signalni sustav u ranom stadiju karcinoma dojke.....	24
4.5. Mehanizam djelovanja novih lijekova za karcinom dojke na Wnt signalni put.....	26
4.6. Djelovanje izoflavona na epigenom.....	28
4.6.1. Djelovanje izoflavona na epigenom u dojci.....	30
4.6.2. Djelovanje izoflavona na uterus i endometriju.....	31
4.6.3. Djelovanje izoflavona na epigenom ovarija.....	32
4.6.4. Epigenetske promjene u karcinomu prostate.....	32
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. ŽIVOTOPIS.....	36
7. LITERATURA.....	37
8. ZAHVALA.....	46

## 1. SAŽETAK

Epigenetske promjene Wnt signalnog puta u tumorima reproduktivnog sustava

Hrvojka Janković

Epigenetika proučava nasljedne promjene u ekspresiji gena koje se događaju bez promjena u redosljedu baza molekule DNA. Tri su do danas poznata epigenetska mehanizma: metilacija DNA, modifikacija histona i sinteza malih nekodirajućih RNA. Wnt signalni put se sastoji od heterodimernog receptora sastavljenog od dva tipa transmembranskih proteina na koje se vežu pozitivni ili negativni regulatori staničnog rasta. U slučaju vezanja pozitivnih regulatora, dolazi do translokacije  $\beta$ -katenina u jezgru i aktivacije obitelji o  $\beta$ -kateninu ovisnih transkripcijskih faktora dok vezivanje negativnih regulatora priječi ovaj proces. Jedan od negativnih regulatora Wnt signalnog puta je proteinski produkt gena *DACT2* koji djeluje kao tumor supresor, stoga je njegova ekspresija smanjena u kolorektalnom karcinomu i karcinomima želuca. U ovom preglednom radu dan je sistemski prikaz epigenetskih promjena glavnih aktera Wnt signalnog puta i njihov utjecaj na razvoj tumora s naglaskom na tumore reproduktivnog sustava. Posebnu važnost imaju lijekovi koji se primjenjuju u terapiji navedenih tumora, a čiji se terapijski učinak postiže djelovanjem na epigenetske promjene gena koji kodiraju za glavne proteine Wnt signalnog puta. Izoflavoni koji pripadaju razredu biljnih estrogena, a nalazimo ih u mahunarkama, slanutku i namirnicama od soje, djeluju na signalizaciju putem estrogenskih receptora i mogu modificirati epigenom dojke, uterusa, endometrija, prostate i brojnih drugih organa.

Ključne riječi: Wnt signalni put, epigenetske promjene, tumori reproduktivnog sustava

## SUMMARY

Epigenetic changes of Wnt signaling pathway in tumors of reproductive system

Hrvojka Janković

Epigenetics studies heritable changes in gene expression that are happening without alterations in the underlying DNA sequence. Up to date, there are three known epigenetic mechanisms: DNA methylation, histone modification and synthesis of small non-coding RNA. Wnt signaling pathway comprises from heterodimer receptor composed of transmembrane proteins onto which positive and negative regulators of cellular growth bind. Binding of positive regulators leads to translocation of  $\beta$ -catenin into the nucleus and activation of  $\beta$ -catenin family- depended transcriptional factors, while binding of negative regulators inhibits this process. One of the negative regulators of Wnt signaling pathway is a protein gene product DACT 2. It acts as a tumor suppressor, hence its expression in colorectal cancer and gastric cancer is diminished. This review demonstrates the systemic look on epigenetic changes among the main effectors of the Wnt signaling pathway and their influence on the tumor development, emphasizing the tumors of reproductive system. Drugs applied in the therapy of the aforementioned tumors are of special importance. Their therapeutic effect is accomplished by the influence on epigenetic changes of genes that code for the main proteins of Wnt signaling pathway. Isoflavones that belong to the class of plant derived compounds with estrogenic activity are found in the pulses, chickpeas, and soy products. Beside their action on the signalization via estrogenic receptors they can also modify epigenome of the breast, uterus, endometrium, prostate and various other organs.

Key words: wnt signaling pathway, epigenetic changes, tumors of the reproductive system

## SKRAČENICE

5'-AZC (5-Azacitidin)

ADF (engl. adipocyte-derived fibroblasts)

APC-2 (engl. adenomatosis polyposis coli 2)

AR (engl. androgen-mediated androgen receptor)

ARHI (engl. Aplasia Ras homolog member I)

ATM (engl. ataxia telangiectasia mutated)

BRAF (engl. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)

BRCA (engl. breast cancer 1 and 2, early onset)

BTG3 (engl. B-Cell translocation gene 3)

CAF (engl. cancer-associated fibroblasts)

CamK II (engl. calcium/ calmodulin-dependant kinase II)

CCND1 (engl. cyclin D1)

CDK (engl. cyclin dependent kinase)

CK1 (engl. casein kinase1)

DACT2, Dapper (engl. Dishevelled-associated antagonist of  $\beta$ -catenin)

DAI (engl. daidzein)

DCIS (engl. ductal carcinoma in situ)

DKK (engl. Dickkopf-related protein)

DNA (engl. deoxyribonucleic acid)

DNMT (engl. DNA methyltransferase)

Dvl (engl. Disheveled)

EGFR (engl. epidermal growth factor receptor)

ER (engl. estrogen receptor)

EZH2 (engl. enhancer of zestehomolog 2)

Fzd (engl. Frizzled receptor)

GEN (engl. genistein)

GLY (engl. glycitein)

GSK3 $\beta$  (engl. glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )

HAT (engl. histone acetyltransferase)

HDAC (engl. histone deacetylases)

HOTAIR (engl. HOX antisense intergenic RNA)

HRE (engl. hormon-responsive elements)

HSP (engl. heat shock protein).

IDC (engl. invasive ductal carcinoma)

IF (engl. isoflavones)

lncRNA (engl. long non-coding RNA)

KRAS (engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.)

LOH (eng. loss of heterozygosity)

LRP (engl. low density lipoprotein receptor related co-receptor)

LSD1 (engl. lysine specific demethylase 1)

MLH1 (engl. mutL homolog 1)

MMP (engl. matrix metalloproteinases)

MSI (engl. carcinoma without microsatellite stability)

MSS (engl. colorectal carcinoma with microsatellite instability)

mTOR (engl. mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase))

MYC (c-myc)

NcoA (engl. nuclear co-activator)

NcoR (engl. nuclear co-repressor)

NEUROG1 (neurogenin 1)

NFAT (engl. nuclear factor of activated T cells)

NSAID (engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs)

p16 INK4A (engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)



PCR(engl. polymerase chain reaction)

PKC (engl. protein-kinase C)

PPAR $\gamma$  (engl. peroxisome proliferator activated receptor)

PTEN ( engl. phosphatase and tensin homolog )

RAR $\beta$  (engl. retinoic acid receptor beta)

RASSF1A (engl. Ras-association domain family 1)

RASSF1A (engl. ras association domain family 1 isoform A)

RB-1 (engl. retinoblastoma gene 1)

RISC (engl. RNA induced silencing complex)

RNA (engl. ribonucleic acid)

ROR2 (engl. tyrosine kinase-like orphan receptor)

SERPINB5 (engl. mammary serine protease inhibitor encoding the Maspin protein)

SFRP ( engl. Secreted frizzled-related protein)

Shh (engl. sonic hedgehog)

SiRNA (engl. small interfering RNA)

SOX,SRY (engl. sex determining region Y)

SPRY (engl. sprouty homolog)

SSA (engl. sessile serrated adenoma)

TA (engl. tubular adenoma)

TAM (engl. tumor-associated macrophages)

TCF/ LEF (engl. T cells factors and lymphoid enhancing factors)

TET (engl. ten-eleven translocation)

VEGF (engl. vascular endothelial growth factor)

WIF (engl. Wnt inhibitory factor)

## 2. UVOD

Medicinska genetika jedna je od grana medicine koja se vrlo brzo razvija i napreduje. Zahvaljujući brojnim tehnološkim inovacijama i metodama istraživanja približili smo se otkrivanju brojnih nepoznanica u području genetike i primjeni otkrivenog u kliničkoj praksi. S obzirom na porast broja novooboljelih od zloćudnih novotvorina kako u svijetu tako i na području Republike Hrvatske jasna je potreba za novim znanjima i metodama kako otkrivanja tako i liječenja. Rano otkrivanje povećava mogućnost primjene terapije i pozitivnog ishoda za bolesnika.

Iz podataka u Tablici 1 može se vidjeti kako su ishemijske bolesti srca i cerebrovaskularne bolesti vodeći uzroci smrti u RH u 2010.g. za oba spola. Ono što je posebno zabrinjavajuće je trend rasta novooboljelih od malignih bolesti (Kolčić et Vorko Jović, 2012).

**Tablica1** Incidencija umrlih u 2010. godini prema uzroku smrti. Prema: Kolčić I, Vorko Jović A (2012)

Muškarci	Žene
1. ishemijske bolesti srca	1. ishemijske bolesti srca
2. cerebrovaskularne bolesti	2. cerebrovaskularne bolesti
3. zloćudne novotvorine dušnika, dušnica i pluća	3. insuficijencija srca
4. zloćudne novotvorine debelog crijeva	4. hipertenzivne bolesti
5. kronične bolesti donjeg dišnog sustava	5. zloćudna novotvorina dojke

Epigenetske promjene odnose se na nasljedne promjene u ekspresiji gena ili staničnom fenotipu koje se događaju bez promjena u rasporedu baza DNA. Najčešći

epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, modifikacija histona i sinteza nekodirajućih RNA(Sermanet al. 2012).

Metilacija DNA je mehanizam kontrole transkripcije gena putem dodavanja metilne skupine na peti ugljikov atom citozina, no ne može se svaki citozin metilirati već samo onaj iza kojega slijedi baza guanin pa govorimo od CpG dinukleotidima. Glavnu ulogu u procesu metilacije imaju enzimi koji mogu dodati metilnu skupinu, a dijelimo ih u dvije osnovne skupine. U prvu skupinu ubrajamo DNA metiltransferazu 1 (DNMT1) odgovornu za održavanje metilacijskog obrasca koji se prenosi s jedne stanice majke na dvije stanice kćeri nastale mitozom, a koja prepoznaje hemimetilirana mjesta te potom metilira novosintetizirani DNA lanac (Serman et al. 2006). Drugu skupinu predstavljaju enzimi DNMT3a i DNMT3b koji su odgovorni za uspostavljanje novog metilacijskog obrasca što je posebno važno tijekom embrionalnoga razvoja. Upravo su ovi enzimi odgovorni za pravilnu aktivaciju gena tijekom diferencijacije stanica što omogućuje pravilan razvoj organizma (Baubec et al. 2015). Jedna od glavnih uloga DNA metilacije, osim regulacije genske transkripcije je stabiliziranje i održavanje inaktivacije gena tijekom embrionalnog razvoja. Osim toga, upravo se metilacija DNA povezuje s pojmom genomskog utiska. Genomski utisak ili genomski imprinting je epigenetski pojam vezan uz nebalansiranu ekspresiju oba roditeljska alela (Baran et al. 2015). Većinom su oba alela (majčin i očev) ekspimirani u diploidnim stanicama. Ekspresija manjeg broja gena (više od 20) ovisi o tome jesu li naslijeđeni od majke ili oca (Cooper et Hausman, 2010). Spontani gubitak metilacije tijekom diobe stanica uzrokovan smanjenjem djelovanja DNMT1-a može dovesti do ponovnog aktiviranja prije utišanih gena. Tijekom karcinogeneze gubitak metilacije doprinosi DNA hipometilaciji naročito u područjima ponavljajućih

sekvenci, povećavajući genomsku nestabilnost i kromosomske aberacije (Barton et al. 2008; Qu et al. 2013).

Drugi oblik epigenetske regulacije ekspresije gena je modifikacija histona poznatija pod nazivom „histonski kod“. Histoni predstavljaju evolucijski konzerviranu skupinu proteina koja ima ulogu u pakiranju DNA molekule u nukleosome, nukleofilamente, solenoide te posljedično u kromatide (Liu et al. 2015). Već se niz godina zna za postojanje enzima uključenih u post-translacijsku modifikaciju histona koji dodaju ili uklanjaju skupine poput metilne ili acetilne što posljedično utječe ne samo na strukturu kromatina već i na njegovu transkripcijsku aktivnost (Tsai et al. 2015).

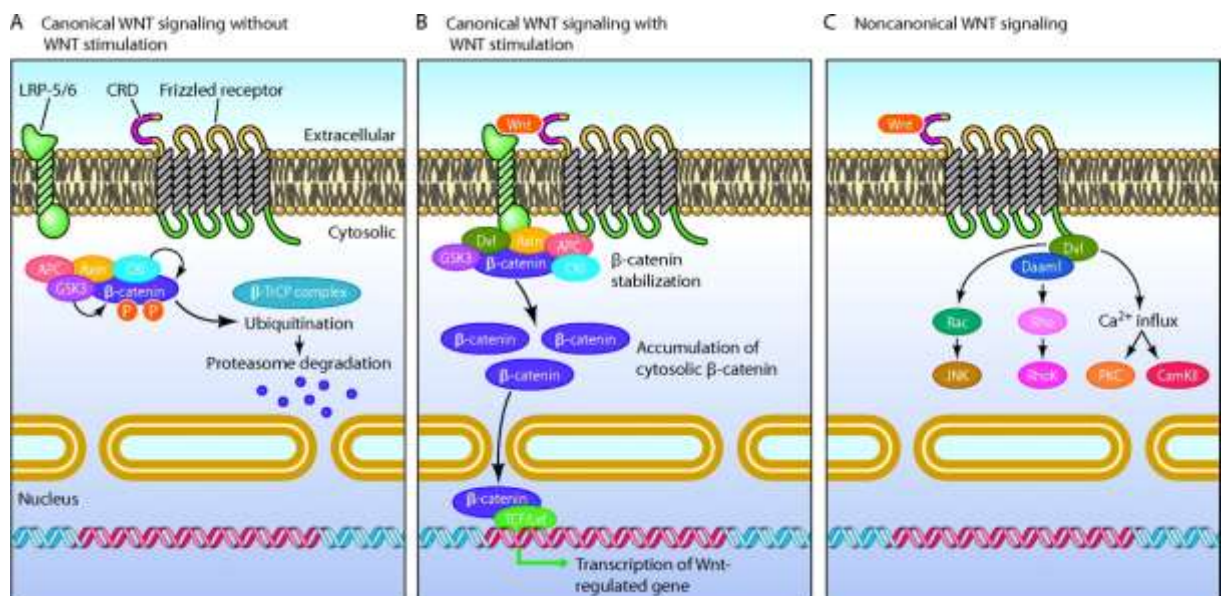
Tako metilacija potiče aktivaciju histonskih deacetilaza čime se poništava djelovanje acetiliranja koje smanjuje pozitivan naboj i vezu između DNA i histona. Posljedica acetiliranja je olakšan pristup aktivatora transkripcije i lakše kretanje nukleosoma duž DNA. Osim acetiliranja, modifikacija histona odvija se putem metiliranja lizinskih i argininskih ostataka te dodatkom ubikvitina na lizinske ostatke. Metilacija lizina dovodi do aktivacije ili supresije genske ekspresije ovisno o područjima koja su metilirana (K4, K9, K27, K36, K79 i H3) i metilacijskom statusu (mono, di ili tri-metilacija). Trimetilacija H3K4 (H3K4me3) je povezana s aktivacijom, a H3K9me2/me3 te H3K27me3 sa supresijom genske aktivnosti (Pudenz et al. 2014).

Prije nešto više od desetljeća, znanstvenici su otkrili male dvostruke RNA molekule koje mogu utjecati na ekspresiju gena bilo na razini transkripcije ili pak na razini translacije pa otuda naziv za ove potonje: male interferirajuće RNA ili od engl. *small interfering RNA* (siRNA) (Mello et Conte, 2004).

To su do 25 nukleotida duge nekodirajuće RNAmolekule koje nastaju obradom duljeg primarnog transkripta putem enzima *Dicer* ribonukleaze. Nastaju male interferirajuće RNA koje se potom vežu na Argonaut protein te tako nastane jezgra kompleksa RISC (engl. *RNA induced silencing complex*). Funkcija tog novonastalog kompleksa je razgrađivanje jednog lanca dvostruke siRNA kako bi se preostali RNA lanac mogao vezati na mRNA i blokirati njenu translaciju (Verdel et al. 2009). U posljednjih nekoliko godina brojne su miRNA bile prepoznate u karcinogenezi i razvitku drugih bolesti. MiRNA može funkcionirati ili kao tumorsupresorska ili kao onco-miRNA stoga su i jasne razlike između miRNA zdravog i bolesnog tkiva. MiRNA mogu poslužiti u dijagnostici i prognozi bolesti, ali i kao ciljno područje djelovanja novih lijekova. Ekspresija lncRNA (engl. *long non-coding RNA*) povećana je u primarnom karcinomu dojke i metastazama te može biti znak progresije bolesti i razvitka metastaza (Pudenz et al.2014)

### 3. WNT SIGNALNI PUT

Tijekom embrionalnog razvoja aktiviraju se brojni signalni putevi, a među njima spominje se i Wnt signalni put (Logan et al. 2004). Interakcija Wnt liganda i pripadajućih receptora aktivira dvije intracelularne signalne kaskade koje se s obzirom na ulogu  $\beta$ -katenina mogu podijeliti na Wnt "kanonski" put i Wnt "nekanonski" put (Varelas et al. 2010).



**Slika 1** Kanonski i nekanonski Wnt signalni put. Prema: T. Néstor H. **Masckauchán** (2006)

Wnt "kanonski put" aktivira se vezanjem brojnih Wnt faktora na jedan od deset vrsta *Frizzled* receptora (Fzd) u prisutnosti LRP-a 5 ili 6 (engl. *low density lipoprotein receptor related co-receptor*) (Clevers 2006). Interakcija liganda i receptora aktivira *Disheveled* (Dvl) protein prisutan u citosolu što rezultira stabilizacijom  $\beta$ -katenina i translokacijom u jezgu. Prilikom interakcije sa TCF/ LEF (engl. *T cells factors and lymphoid enhancing factors*) dolazi do aktivacije ekspresije gena uključenih u

staničnu diferencijaciju i proliferaciju kao što su c-myc (*MYC*), cyclin D1 (*CCND1*), axin2 (*AXIN2*) i mnogih drugih (Verheyen et al. 2002). Kad je Wnt signalni put neaktivan,  $\beta$ -katenin se veže za svoj destruktivski proteinski kompleks koji čine APC i axin te je fosforiliran kinazama GSK3 $\beta$  (engl. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) i CK1 (engl. *casein kinase 1*) (Clevers 2006).

$\beta$ -katenin sadrži 3 glavne domene: N terminalnu domenu koju čine 141 aminokiselina, centralnu (engl. *core*) domenu sastavljenu od 513 aminokiselina te C-terminalnu domenu (107 aminokiselina). Centralna domena omogućuje bolje vezanje sa TCF/LEF ili drugim proteinima (Graham 2000). Mutacija jedne od komponenti Wnt signalnog puta (axina,  $\beta$ -katenina) ili autokrine signalizacije može biti korak u aktivaciji tumorskih stanica, npr. mutacija *APC* gena vodi do inaktivacije proteina. Mutacija fosfoakceptora  $\beta$ -katenina uzrokuje onkogenu aktivaciju (Polakis 2000). Prilikom aktivacije ili inhibicije Wnt "kanonskog" signalnog puta ključan je omjer  $\beta$ -katenina u citosolu i jezgri (Polakis 2000).

Wnt "ne-kanonski" signalni put neovisan je o  $\beta$ -kateninu. Aktiviran je vezanjem Wnt5a liganda na receptor ROR2 (engl. *tyrosine kinase-like orphan receptor*) samostalno ili u kombinaciji sa *Frizzled* receptorom. Druga mogućnost je vezanje liganda Wnt 11 na *Frizzled* receptor te aktivacija Wnt/ kalcij puta koji uključuje CamK II (engl. *calcium/ calmodulin-dependant kinase II*), PKC (engl. *protein-kinase C*) ili NFAT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) (Rao et al. 2010). Vrlo je važno da "ne-kanonski" put može inhibirati "kanonski" oštećujući  $\beta$ -katenin u citoplazmi ili blokirajući formiranje  $\beta$ -katenin/TCF/LEF kompleksa.

Jezgrin  $\beta$ -katenin je indikator aktivnog Wnt signalnog puta što se može vidjeti i u stanicama karcinoma te može biti koristan biomarker kao kod npr. kolorektalnog

karcinoma (Sherz-Shouval et al. 2014). Wnt aktivni signalni put pronađen je i u solidnim tumorima glave i vrata, karcinomu pluća i dojke (Luga et al. 2013). Wnt 5a i Wnt 11 imaju bitnu ulogu u malignoj invaziji induciranoj makrofagima (engl. *macrophage-induced malignant invasion*) (Luga et al. 2013)



## 4. EPIGENETSKE PROMJENE WNT SIGNALNOG PUTA

### 4.1. Utjecaj DACT2 gena na Wnt signalni put

Protein *Dapper* (od engl. *Dishevelled-associated antagonist of  $\beta$ -catenin*) kodiran je genom DACT2 i je jedan je od članova genske obitelji Dact koji su vrlo su bitni regulatori Wnt signalnoga puta. Otkriven je tijekom potrage istraživanja proteina važnih u interakciji s *Dishevelled* (Dvl) proteinom koji je jedan ključanih faktora u Wnt/ $\beta$ -katenin signalnom putu. Dact obitelj ima tri člana koja uključuju gene: *DACT1*, *DACT2* i *DACT3*. Gen *DACT1* nalazi se na kromosomu 14q22.3 i otkriveno je da je metiliran u hepatocelularnom karcinomu. *DACT3* smješten je na kromosomu 19q13.32 i reguliran je modifikacijom histona u kolorektalnom karcinomu. *DACT2* smješten je na kromosomu 6q27 i pokazuje gubitak heterozigotnosti koji karakterističan za mnoge tumor supresorske gene (eng. loss of heterozygosity, LOH) raznim karcinomima.

U istraživanju razvitka i preživljenja pacijenata s karcinomom kolona primijećeno je da *DACT2* djeluje kao tumorsupresorski gen inhibirajući Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put. Utjecaj *DACT2* kao tumora supresora istražen je na 67 pacijenata s potvrđenim karcinomom kolona (36 muškaraca i 31 žena) prosječne dobi 62,7 godina (od 32 do 84 godine). Osim toga odabrano je 12 zdravih osoba iste dobi kao kontrolne skupine. Rezultati istraživanja su pokazali kako je ekspresija *DACT2* bila regulirana hipermetilacijom promotora gena što je dovelo do smanjenog izražaja proteina tog gena, a time i izostanka njegove tumor supresorske uloge. Metilacija gena *DACT2* detektirana je u 43,3% (29 od 67) stanica karcinoma kolona za razliku od zdravog tkiva u kojem nije bilo metilacije. Ponovna ekspresija gena u stanicama

karcinoma kolona dovela je do smanjenog rasta tumora zbog aktiviranja apoptoze i inhibiranja proliferacije stanica *in vivo* i *in vitro*. Efekt supresije tumora putem gena *DACT2* posredovan je blokiranjem Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta što je ključni korak u staničnoj proliferaciji, invaziji i metastaziranju najvećeg broja karcinoma kolona (Yuanzi et al. 2014). U kanonskome Wnt putu Wnt ligand veže se za *Frizzled* receptore ili LRP5/6 (od engl. *low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6*) što vodi do aktivacije Dvl proteina. Aktivirani Dvl protein pokreće Axin i glikogen sintazu kinazu 3 što vodi do aktivacije i stabilizacije  $\beta$ -katenina u jezgri. Protein *DACT2* djeluje kao antagonist Dvl proteina i na taj način blokira aktivaciju  $\beta$ -katenina. Pomoću imunoprecipitacije uočeno je kako je *DACT2* u kontaktu s komponentom TCF (od engl.  *$\beta$ -catenin-T-cell factor*) i LEF (od engl. *lymphoid enhancer binding factor*). Vežući se na nuklearni  $\beta$ -katenin *DACT2* blokira njegovo povezivanje s LEF1 što prekida Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put. Lančana reakcija polimeraze (od engl. *polymerase chain reaction* ili PCR) pokazala je kako su *DACT1* i *DACT3* suprimirani u većini stanica karcinoma kolona. Unatoč tome imunoprecipitacijom nije uočena interakcija tih proteina s  $\beta$ -kateninom (Wang et al. 2014).

U istraživanju epigenetskih promjena gena *DACT2* u karcinomu želuca obuhvaćeno je 167 (122 muškarca i 45 žena) slučajeva primarnog karcinom želuca i 8 slučajeva zdrave sluznice želuca. Prosječna dob ispitanika bila je 63,1 godina (od 28 do 89 godina). Svi uzorci karcinoma bili su klasificirani pomoću TNM klasifikacije. Iz uzoraka stanica karcinoma uzeto je 7 staničnih linija (NCI-N87, BGC-823, AGS, MNK45, NUGC3, MGC803 i SGC-7901). Imunohistokemijom određen je intenzitet ekspresije proteina *DACT2* koji je određen kao 0=negativan, 1=slabo pozitivan, 2=srednje pozitivan i 3=snažno pozitivan. Područje ekspresije proteina *DACT2*

kvantificirano je postotkom obojanosti određenog područja s u odnosu na cijelo tkivo. Prema tome možemo odrediti 4 stupnja ekspresija kao 0=neobojanost (nema ekspresije), 1=1-10% ekspresije, 2=11-50% ekspresije, 3=51-80% ekspresije i 4=više od 80% ekspresije. Da bi se istražila moguća epigenetska regulacija ekspresije gena *DACT2* u karcinomu želuca upotrijebljena je semi-kvantitativne RT-PCR metoda na 7 staničnih linija karcinoma želuca (Yuanzi et al. 2014).

Svi rezultati doveli su do zaključka da je hipermetilacija promotorske regije dovela do gubitka ekspresije gena *DACT2*. Ponovna ekspresija *DACT2* pomoću 5-azacitidina, inhibitora DNA metil transferaze pojavila se samo u jednoj staničnoj liniji, no u ostalim staničnim linijama nije došlo do promjene ekspresije *DACT2* nakon djelovanja 5-azaC što vodi do zaključka da je ekspresija *DACT2* regulirana metilacijom promotorske regije u karcinomu želuca. *DACT2* je metiliran u 55,7% (93 od 167) primarnih karcinoma želuca. Utjecaj ponovne ekspresije *DACT2* na rast stanica u karcinomu želuca dokazan je statistički značajnim smanjenjem broja stanica što ukazuje da *DACT2* inhibira rast stanica u karcinomu želuca. Osim toga *DACT2* djeluje na migraciju stanica što se vidi po statistički značajnom smanjenom broju migriranih stanica (Yuanzi et al. 2014). Ekspresija enzima matriks metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, najvažnijih komponenti povezanih s invazijom karcinoma i migracijom, bila je inhibirana nakon ponovne ekspresije *DACT2* gena (Yuanzi et al. 2014). Utjecaj *DACT2* na stanični ciklus promatran je pomoću protočne citometrije te su rezultati pokazali da *DACT2* smanjuje udio stanica u S fazi, a povećava udio stanica u G2/M fazi (Yuanzi et al. 2014).

Kanonski Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put aktiviran je TCF/LEF proteinima koji djeluju na  $\beta$ -katenin i protoonkogen *C-MYC*. U staničnoj liniji karcinoma želuca reekspresija *DACT2* dovela je do smanjenja  $\beta$ -katenina i *C-MYC*a čime je inhibiran

Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put. Uz to bitan je i utjecaj DACT2 na nekanonski Wnt/c-Jun. Western blotom je detektirano da ponovnom aktivacijom DACT2 dolazi do smanjenje ekspresije c-Juna. Ono što je bitno za samu terapiju karcinoma želuca je povezanost metilacije DACT2 s odgovorom tumora na terapiju 5-FU(5-fluorouracilom) i cisplatinu. Kod 72.pacijenata s karcinomom želuca,u kojih je nakon kirurške resekcije,provedena terapija 5-FU i/ili cisplatinom petogodišnje preživljenje pacijenata s metiliranim DACT2 bilo je 53%, a u onih s nemetiliranim DACT2 preživljenjeje bilo 33% (Yuanzi et al. 2014).

#### **4.2. Utjecaj epigenetskih promjena APC-2 na Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put**

Retinoblastom (RB) je rijedak primarni maligni tumor u dječjoj dobi. Trenutna terapija uključuje enukleaciju, kemoterapiju, krioterapiju i termoterapiju, a u budućnosti postoji mogućnost i epigenetske terapije. Početak razvoja RB-a je gubitak oba alela *RB-1* gena (Zhang et al.2000). Poznata je uloga brojnih onkogeni u razvitku tumora. Za razliku od onkogeni vrlo je malo tumorsupresorskih gena čija nam je uloga u razvitku RB-a poznata. Mutacije gena *RB-1*, *p16 INK4A*, *RASSF1A* i *NEUROG1* mogući su uzroci RB proliferacije (Ohtana-Fujita al 2010; Indovina et al. 2009; Cohen et al. 2008). Hipermetilacija (epigenetsko utišavanje gena) je ključni događaj u tumorigenezi.

Tumorsupresorski gen *APC*(od engl. *adenomatosis polyposis coli*) dobro je proučen i njegova hipermetilacija detektirana je u kolorektalnom karcinomu te karcinomima mokraćnog mjehura i dojke(Oki et Issa, 2006.) Njegov homologni gen *APC-2* igra bitnu ulogu u razvitku karcinoma, ali je uloga hipermetilacije slabije

istražena. APC-2 posjeduje domene koje su u interakciji i reguliraju citoplazmatski  $\beta$ -katenin. U slučajevima kolorektalnog karcinoma ili limfatične leukemije pokazana je hipermetilacija *APC* gena (Ratmatpanah et al. 2009).

Cilj istraživanja Beta i suradnika 2014 bio je proučiti hipermetilaciju APC-2 i interakciju s  $\beta$ -kateninom koji je dio Wnt signalnog puta u retinoblastomu. Prikupljeno je 30 uzoraka tumora prilikom enukleacije (u dječjoj dobi) i 3 kontrolna uzorka (odrasla dob) te Y79 stanična kultura. Pomoću PCR metode specifične za metilaciju identificirani su CpG otoci i metilacija u uzorcima RB tumora. Demetilacija i APC-2 ekspresija proučene su uz pomoć 5'-AZC (5-Azacidin). Velik broj Y79 stanica ( $1 \times 10^5$ ) inkubirano je s 5'-AZC-om te je nakon 5 dana ekspresija APC-a analizirana imunofluorescencijom i Western blotom (Beta et al. 2014).

Rezultati istraživanja pokazali su da je APC-2 u 70% RB tumora (21 od 30) bio metiliran. Nakon korištenja 5'-AZC-a na stanicama Y79 došlo je do reekspresije APC-2 što je bilo potvrđeno imunofluorescencijom i Western blotom. Prosječna protočna citometrija pokazala je reekspresiju kod 29,22% stanica koje su bile tretirane 5'-azacidinom. Porast ekspresije gena *APC-2* povezan je sa smanjivanjem razine  $\beta$ -katenina što je jedan od načina kontrole tumorigeneze (Beta et al. 2014). Zato će u budućnosti od velike važnosti u terapiji RB-a biti potencijal *APC-2* kao tumorsupresora bitno uzet u obzir.

### 4.3. Utjecaj promjena Wnt signalnog puta na razvitak kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom jedna je od najčešćih malignih neoplazmi i uzroka smrti u svijetu (Cancer Research UK, Bowel cancer mortality statistics). Više od 90% kolorektalnih karcinoma pokazuje mutacije gena *APC* (adenomatosis polyposis coli) i ostalih Wnt signalnih komponenta koje vode do hiperaktivacije Wnt puta te takve mutacije čine početni događaj razvoja kolorektalnog karcinoma. *APC* je najbitniji negativni regulator Wnt puta; dio je citoplazmatskog kompleksa s proteinom Axinom te dovodi do proteosomske razgradnje Wnt efektoru  $\beta$ -katenina (Bienz et al. 2000). Ako je  $\beta$ -katenin disfunkcionalan kao posljedica mutacije i inaktivacije gena *APC*,  $\beta$ -katenin se akumulira u velikim količinama i translocira u jezgru gdje započinje transkripciju. Jedna od meta transkripcije je protoonkogen *c-MYC* čiji proteinski produkt može voditi do malignosti u miševa i ljudi (van de Wetering et al. 2002). Utjecaj Wnt signalnog puta u inicijaciji kolorektalnog karcinoma je dobro poznat, ali je manje poznato kako je zaslužan za progresiju iz adenoma u karcinom.

Kako povezati hipermetilaciju i utišavanje Wnt antagonista aktivacijom Wnt signalnog puta posljedično progresijom adenoma u karcinom cilj je mnogih znanstvenih radova (Silva et al. 2014).

Svi oni pokazali da je hipermetilacija Wnt antagonista dovela do aktiviranja Wnt signalnog puta tijekom progresije kolorektalnog karcinoma nakon početne Wnt hiperaktivacije uzrokovane mutacijom gena *APC*. Bitna činjenica je da Wnt signalni put treba biti aktivan, ako ne i pospješen, da bi došlo do prelaska adenoma u kolorektalni karcinom (Scholer Dalhired et al. 2011). To podržava prijašnji zaključak da Wnt signalni put nije bitan samo za inicijaciju već i progresiju kolorektalnog karcinoma.

Osim toga, pokazano je da fenotip karakterističan za mnoge tipove karcinoma što označavamo kao CIMP (od engl. *CpG island methylator phenotype*), povezan s pojavom globalne CpG metilacije i mikrosatelitnim nestabilnostima kromosoma ukolorektalnom karcinomu. Hipermetilacija Wnt antagonista *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *DKK2*, *WIF1* i *SOX17* pokazala je tranziciju iz zdravog tkiva u adenome, a metilacija *SFRP1*, *SFRP2*, *DKK2* i *WIF1* pokazala je značajan porast prilikom prelaska adenoma u karcinome (Suzuku et al. 2004., Rawson et al. 2011). Mutacije gena *APC*, *BRAF* i *KRAS* pojavljuju se u raznim tranzicijskim oblicima razvoja adenoma dok je za daljnji razvoj karcinoma bitna metilacija Wnt antagonista.

Nedavna istraživanja pokazala su novi način razvitka karcinoma kolona različit od tradicionalnog razvitka (tubularni adenom – karcinom). Alternativni put nazvan je viloznim putem u kojem se iz sesilnog viloznog adenoma (engl. SSA – *sessile serrated adenoma*) razvija kolorektalni karcinom (Snovel et al. 2005). SSA je klasificiran u novu kategoriju nazvanu vilozni polipi koja uključuje hiperplastične polipe, tradicionalne vilozne adenome i sesilne vilozne adenome (čija je karakteristika vilozna struktura u kriptama epitela). Važnost SSA prepoznata je stoga što mogu biti prekursori mnogih sporadičnih kolorektalnih karcinoma s mikrosatelitnom nestabilnošću (engl. MSI – *microsatellite instability*) (O'Brien et al. 2006). Greške u popravcima vode do akumulacije brojnih somatskih mutacija u sekvencama mikrosatelita. SSA i MSI karcinomi imaju slične osobine kao što su lokalizacija u proksimalnom kolonu, visok *BRAF*, niske *KRAS* mutacije i povećana DNA hipermetilacija. MS – AFLP (engl. *methylation sensitive amplified fragment length polymorphism*) je tehnika koja uključuje detektiranje DNA hipermetilacije i hipometilacije u genomu uspoređujući različite izražaje gena u normalnom i tumorskom tkivu.

U istraživanju Muta i suradnika 2014 uzeti su uzorci tkiva 19 pacijenata sa SSA, 8 s tubularnim adenomom (engl. TA – *tubular adenoma*) i 26 s proksimalnim karcinomom kolona (14 pacijenata s MSI te 12 bez MSI - MSS)(Muto et al.).

Pomoću testa analize varijance - ANOVA stvorene su dvije skupine. Prva uključuje 7 MSS(engl. *carcinoma without microsatellite stability*) karcinoma (58,3%), 2 MSI(engl. *colorectal carcinoma with microsatellite instability*) karcinoma (14,3%) te 7 TA(engl. *tubular adenoma*)(87,5%) adenoma. Drugoj skupini pripalo je 12 MSI karcinoma (85,7%), 5 MSSkarcinoma (41,7%), 1 TA (12,5%) i 19 SSA (engl. *sessile serrated adenoma*) adenoma(100%). Osim toga, druga grupa podijeljena je u dvije podskupine. Prva podskupina (2A) obuhvaćala je MSI karcinome s MLH1 metilacijom i drugu podskupinu(2B) u kojoj se nalazi SSA bez MLH1 metilacije. Uz to prva skupina bila je povezana s *KRAS* mutacijama, a druga s mutacijama gena *BRAF*. Nađena je statistički značajna razlika u metilaciji gena *AXIN2*. *AXIN2* jedna je od bitnih komponenta kompleksa koje regulira razinu  $\beta$ -katenina zajedno s divljim tipom gena *APC*. *AXIN2/Conductin* je identificiran kao homolog *AXIN-a* (Liu et al. 2000). U slučaju kad dolazi do porasta razine  $\beta$ -katenina *AXIN2* blokira taj porast i na taj način djeluje kao njegov inhibitor te ograničava njegov porast. *AXIN2* nađen je jedino u tkivu kolona (Muto et al., 2014). Grupe 2A i 2B-1 pokazale su nisku ekspresiju gena *AXIN2*, a grupa 2B-2 imala je značajno višu razinu ekspresije gena *AXIN2*. Upravo različita razina ekspresije gena *AXIN2* čini podjelu unutar skupine 2B na 2B-1 i 2B-2. Pokazalo se da je ekspresija gena *AXIN2* povezana s metilacijom promotorske regije (Muto et al. 2014). Metilacija promotorske regije dovela je do smanjene ekspresije gena.

Zaključno, identificiran je porast metilacije *AXIN2* gena u procesu razvoja MSI karcinoma iz SSA što sugerira da je smanjena ekspresija *AXIN2* gena putem metilacije povezana SSA – MSI putem razvoja karcinoma (Muto et al. 2014).



Danas postoji nada da će u budućnosti biti pronađen lijek koji će značajno usporiti ili potpuno izliječiti kolorektalni karcinom. Neki od poznatih lijekova djeluju na komponente  $\beta$ -katenin puta djelujući na PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferatoractivated receptor*)(Girnun et al. 2002). PPAR $\gamma$  ima supresivnu aktivnost na rast kolorektalnog karcinoma te ga možemo shvatiti kao biomarker dobre prognoze. Takva skupina lijekova su i NSAID (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) koji djeluju blokirajući  $\beta$ -katenin/TCF put. Aktivna forma vitamina D natječe se s  $\beta$ -kateninom za vezno mjesto na proteinu TCF-u i na taj način blokira daljnju aktivaciju puta (Sabatino et al. 2014.)

#### **4.4. Utjecaj mikroRNA-140 na Wnt signalni sustav u ranom stadiju karcinoma dojke**

Karcinom dojke je heterogena bolest koja uključuje brojne histološke i molekularne podtipove. Promjena zdravih stanica dojke u maligne uzrokovana je akumulacijom brojnih genetskih i epigenetskih promjena. Rani stadij karcinoma dojke DCIS (engl. *ductal carcinoma in situ*) pokazuje genetsku sličnost i ekspresiju proteina kao i invazivni duktalni karcinom IDC (engl. *invasive ductal carcinoma*) što nam pokazuje njihovu povezanost (Lopez-Garcia et al. 2010). Prema histološkoj klasifikaciji DCIS možemo ocijeniti kao niskog, srednjeg ili visokog što označava mogućnost prelaska u IDC (Lopez-Garcia et al. 2010). Trenutno ne postoji dijagnostika kojom bi se moglo predvidjeti prelazak DCIS-a u IDC što bi moglo pomoći terapiji. Lumpektomija i terapija zračenjem danas su najčešći terapijski postupci za DCIS uz korištenje tamoxifena za estrogen receptor pozitivne DCIS karcinome dojke (Burstein et al. 2004). Za razliku od sličnosti genetskih i

epigenetskih promjena mRNA/miRNA ekspresija su značajno različite u IDC i DCIS. Smanjena ekspresija miR-140-3p je primijećena za sve istraživane grupe IDC i DCIS što je dovelo do ideje da se istraži tumorsupresivna uloga (Colinia et al. 2012).

MiRNA (microRNA) predstavlja kratku nekodirajuću RNA molekulu kojoj je glavna funkcija regulacija genske ekspresije. Disregulacija miRNA (delecijom ili amplifikacijom miRNA gena, epigenetskim promjenama itd.) očituje se kroz modifikaciju brojnih enzima npr. u slučaju gubitka Dicer proteina dolazi do pojave brojnih karcinoma uključujući i karcinom dojke (Li J. et al. 2014). Interakcijom sa SOX2, SOX9 te Wnt signalnim putevima u matičnim stanicama DCIS miRNA djeluje tumorsupresivno (Zhang et al. 2013).

Matične stanice (engl. *stem cells*) otkrivene su u hematopoetskom tkivu (Hanahan et al. 2011). Predstavljaju subpopulaciju karcinomskih stanica koje imaju mogućnost dijeljenja i diferenciranja u različite stanične linije tumora. Zbog toga imaju veliku ulogu u povratku same bolesti i slabom učinku ili rezistenciji na kemoterapiju (Hanahan et al. 2011). U karcinomima dojke otkrivene su CD44+/CD24 (Al-Hajj et al. 2003). Studije su pokazale kako matične stanice postoje u DCIS lezijama i imaju maligni potencijal. U samom rastu i diobi tih stanica sudjeluju brojni signalni putevi. Notch signalni put tj. promjena sudjeluju u ranom razvitku DCIS-a (Reya et al. 2001). Wnt signalni put sudjeluje u regulaciji proliferacije matičnih stanica (Li et al. 2003).

Prema tome, promjenom tumorsupresorske uloge miR-140 dolazi do aktiviranja SOX2/SOX9/Wnt signalnih puteva te aktivacija matičnih stanica u DCIS-u što vodi do proliferacije i razvitka IDC-a (Li. et al. 2014). Same promjene miR-140 uzrokovane su CpG metilacijom te pojavom estrogen ovisnog elementa u

promotoru miRNA 140. Sva ta saznanja pomažu u razvoju novih terapija koje bi mogle djelovati na matične stanice DCIS-a naročito kod tamoxifen rezistentnih Erα-DCIS lezija (Wolfson et al. 2014).

#### **4.5. Mehanizam djelovanja novih lijekova za karcinom dojke na Wnt signalni put**

Govoreći o liječenju karcinoma dojke najčešće spominjemo 3 pristupa: kirurško uklanjanje, zračenje stanica raka da bi se zaustavio njihov rast i kemoterapija kojom se stanice raka uništavaju ili se inhibira njihova proliferacija. Kirurška i radioterapija još uvijek zahtijevaju pomoćnu kemoterapiju da bi se eradicalale zaostale maligne stanice (Stockler et al. 2011). Lijekovima (Hanahan et al. 2011) su omogućena tri terapijska pristupa: klasična kemoterapija, hormonska terapija (djeluje na receptore i signalne molekule hormona bitne za proliferaciju tumorskih stanica) i specifična terapija koja djeluje na određene signalne puteve (Dadla et al. 2014). Liječenje karcinoma danas je veliki izazov s obzirom da su lijekovi skupi, imaju brojne nuspojave i rezistencija na lijekove je česta naročito u slučaju metastaza. Sve to vodi do potrebe za razvojem novih lijekova.

CAF (engl. *cancer-associated fibroblasts*) imaju glavnu ulogu u proliferaciji i pojavi tumorskih stanica. Djeluje na nekoliko signalnih puteva kao što su Notch molekule koje promoviraju preživljenje tumorskih stanica, proliferaciju i angiogenezu. Osim toga stanice karcinoma proizvode Wnt3a koji djeluje na aktivaciju Wnt/β-katenin puta što pod utjecajem CAF-a inducira fenotipske promjene u ADF (*adipocyte-derived fibroblasts*) rezultirajući migriranjem stanica raka (Ishikava et al. 2014).

S druge strane pojavljuje se i TAM (engl. *tumor-associated macrophages*) koji su bitni negativni prognostički čimbenici i označavaju jedan od kemorezistentnih podtipova karcinoma dojke (Tymoszuk et al. 2014). Nadalje TAM mogu promovirati karcinogenezu i metastaze putem Wnt signalnog puta (Milovanovic et al. 2004). TAM oslobađaju visoke razine liganda Wnt7b, a matične stanice karcinoma potiču stvaranje metastaza putem aktiviranja  $\beta$ -katenin puta. Uz to *in vivo* i *in vitro* studije pokazale su bitnu ulogu Wnt5a u TAM induciranim metastazama i snažnu povezanost između Wnt5a ekspresije u malignim stanicama i broja CD163M2 makrofaga (Bergenfelz et al. 2012). Zbog svega navedenog TAM su potencijalni cilj nove terapije za karcinom dojke. Wnt5a i Wnt11 glavni su čimbenici maligne invazije metastatskog karcinoma dojke aktivirani putem makrofaga (Luga et al. 2013). Salinomycin (LRP6 – low density lipoprotein receptor-related 6 inhibitor) djeluje inhibirajući Wnt/ $\beta$ -katenin i PI3K/Akt/mTOR signalne puteve u karcinomima dojke i prostate.

Pri liječenju karcinoma dojke otkriveni su brojni signalni putevi na koje se može djelovati terapijom kao što su Notch, Wnt, Shh, mTOR čija inhibicija pokazuje obećavajuće rezultate u kliničkim istraživanjima u mono i kombiniranoj terapiji (Di Rocco et al. 2014). Različita ekspresija Wnt signalnih molekula u brojnim tipovima karcinoma dojke pokazuje da će biti potreban razvitak specifične terapije. Isto tako Wnt signalizacija ima veliku ulogu u rezistenciji na klasičnu kemoterapiju uključujući i rezistenciju na tamoxifen što nas upućuje na potrebu kombiniranja terapije Wnt inhibitorima (Nwabo Kamdie et al. 2014).

#### 4.6. Djelovanje izoflavona na epigenom

Izoflavoni (IF), razred biljnih estrogena (fitoestrogeni), nalaze se u brojnim namirnicama kao što su leća, mahunarke, slanutak te namirnice od soje (Bingham et al. 1998). Najpoznatiji izoflavoni su genistein (GEN), daidzein (DAI) i glycitein (GLY). Svojom strukturom nalikuju na endogeni  $17\beta$ -estradiol (E2) s jasnim afinitetom za estrogenske receptore te mogućnošću moduliranja aktivatora i represora ER signalizacije (Hervouet et al. 2013). GEN ima veći kapacitet povezivanja za ER- $\beta$  receptore. World cancer report iz 2014.g. navodi kako unos voća, povrća i biljnih tvari može pridonijeti smanjenju rizika za razvoj određenih podtipova karcinoma (<http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/>). Usporedbom dnevnog unosa izoflavona vidjelo se kako postoji velika razlika između zapadnih i azijskih zemalja (15 mg/dan u Kini, 200 mg/dan u Japanu u odnosu na 3 mg/dan u zapadnim zemljama) (Chen et al. 1999; Cassidy et al. 2000; Keinan-Boker 2002). Incidencija određenih hormonski ovisnih karcinoma, kao što su karcinomi dojke i prostate, niža je u azijskim zemljama nego u zapadnoj Europi. Prema podacima iz 2012. broj oboljelih od karcinoma dojke je 29,1/100000 stanovnika u azijskim zemljama, a 96/100000 u zemljama zapadne Europe (Ferlay et al. 2012). Broj oboljelih od karcinoma prostate je 9,4/100000 stanovnika u azijskim zemljama, a 95/100000 stanovnika u zemljama zapadne Europe. Migracijske studije pokazale su da Azijatkinje koje žive u Americi imaju 60% veći rizik razviti karcinom dojke ako su bile rođene u zapadnim zemljama nego u Aziji (Zigler et al. 1993). Može se zaključiti kako je izlaganje izoflavonima tijekom ranog životnog razdoblja utjecalo na moduliranje morfologije žljezdanog tkiva dojke što je rezultiralo antitumorskom aktivnosti. S obzirom da su mnogi procesi

tijekom ranog razvoja regulirani epigenetskim mehanizmima moguće je da izoflavoni upravo utječu na te mehanizme što vodi do normalnog rasta stanica.

Izoflavoni imaju širok spektar djelovanja doprinoseći prevenciji razvoja karcinoma: vežu slobodne radikale, reguliraju enzime uključene u antioksidaciju, inhibiraju aromatazu koja je ključni enzim u konverziji testosterona u estrogen, inhibiraju staničnu proliferaciju regulirajući kinaze ovisne o ciklinima (engl. *cyclin dependent kinase*, CDK), induciraju apoptozu, inhibiraju angiogenezu putem blokiranja VEGF-a (engl. *vascular endothelial growth factor*) (Steiner et al. 2008).

Epigenetske promjene su nasljedne, ali moguće su reverzibilne varijacije u genskoj ekspresiji koje nisu rezultat promjene DNA. Promjene uključuju DNA metilaciju, modifikaciju histona te nekodirajuću RNA i imaju mogućnost promijeniti gensku ekspresiju kao posljedicu djelovanja endokrinih signala ili izloženosti izoflavonima (Shen et al. 2013). Vežući se za E2 receptore izoflavoni dovode do dimerizacije receptora i aktivacije ili represije putem NcoA (engl. *nuclear co-activator*) ili NcoR (engl. *nuclear co-repressor*). Ti su aktivatori i represori povezani s histonskom acetil-transferazom (HAT) ili histonskom deacetilazom (HDAC) koje su vezane uz hormon-odgovarajući element (HRE - engl. *hormon-responsive elements*) (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*). Sve to rezultira transkripcijom hormonski ovisnih gena. U zdravim tkivima CpG regije promotora su nemetilirane, a intronska područja i ponavljajuće sekvence su metilirane. Enzim MeCP (engl. *methyl-CpG-binding domain containing protein*) veže se za metiliranu DNA i aktivira DNMT (DNA metiltransferaza) i proteine koji modificiraju histone kao što su HDAC i HMT (histonska metiltransferaza) koji podešavaju dostupnost kromatina. TET (engl. *ten-eleven translocation*) proteini su

uključeni u DNA demetilaciju i vode do reaktivacije gena utišanih CpG metilacijom (Chen et al. 1999). Izoflavoni mogu blokirati ekspresiju i aktivnost MeCP, DNMT i HDAC te povećati ekspresiju HAT-a. Osim toga histonska metilacija kontrolirana je HMT-om čije djelovanje pojačava EZH2 (engl. *Enhancer of zestehomolog 2*) (Greathouse et al. 2012).

#### 4.6.1. Djelovanje izoflavona na epigenom u dojci

Prekliničke *in vitro* i *in vivo* studije istražuju potencijalni kemoprotektivni učinak izoflavona. Istraživanja u štakora rasvijetlila su protektivni učinak GEN-a (genisteina) pogotovo u hormonski ovisnim tumorima i karcinomima (Taylor et al. 2009). Nedavni pregledi podataka o intervencijama pokazali su da konzumacija soje može biti povezana sa smanjenim rizikom pojave karcinoma i mortaliteta (Fritz et al. 2013). Iako je konzumacija soje sigurna, visoke doze iznad 100 mg na dan nisu preporučene za oboljele od karcinoma dojke (D'Adamo et Rowland, 2012). Studije pokazuju kako izoflavon regulira epigenetske mehanizme uključujući histonsku acetilaciju i DNA metilaciju *in vivo* i *in vitro* (Hong et al. 2004). Epigenetski mehanizmi pridonose smanjenju ER ekspresije u ER negativnim karcinomima dojke (Hervouet et al. 2013). Budući da ti tumori ne odgovaraju na terapiju antiestrogenima kao što je tamoxifen reaktivacija ER ekspresije može biti bitan korak za borbu s bolešću (Li et al. 2013). Tumorsupresorski geni *BRCA1* i *BRCA2* (od engl. *breast cancer 1 and 2, early onset*) su uključeni mehanizme DNA popravka i često su mutirani u karcinomu dojke (Bosviel et al. 2012). Tretman izoflavonima izaziva demetilaciju CpG otoka promotora *ATM* (engl. *ataxia teleangiectasia mutated*), *APC* (engl. *adenomatous polyosis coli*), *PTEN* fosfataza i *SERPINB5* (engl. *mammary serine protease inhibitor*

*encoding the Maspin protein*) gena i slabom reekspresijom proteina u tri stanične linije karcinoma dojke (Xie et al. 2014). U staničnim linijama MCF7 i MDA-MB-231 karcinoma dojke visoke koncentracije geniesteina reduciraju DMNT1 ekspresiju proteina i aktivnost (Xie et al. 2014). Uz to došlo je do demetilacije promotora i reekspresije 4 tumorsupresorska gena: *ATM* (engl. *ataxia telangiectasia mutated*, bitna poveznica s kinazama u staničnom ciklusu), *APC* (antagonist Wnt signalnog puta), *PTEN* fosfataza i *SERPINB5* (*mammary serine protease inhibitor encoding the Maspin protein*). Danas se najviše istraživanja radi naprojektu u suradnji s DGF-om (njem. *Deutsche Gessellschaft Forschung*, engl. *German Research Foundation*) te tehničkim sveučilištem u Dresdenu gdje se analiziraju promjene metilacijegenomske DNA u žlijezdama dojke štakora i tumorskom tkivu (Sonnet et al. 2013).

#### 4.6.2. Djelovanje izoflavona na uterus i endometrij

Karcinom endometrija je najčešći tip karcinoma maternice. Najčešće se pojavljuje nakon menopauze i vezan je uz debljinu i izloženost estrogenu (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*). Mnogobrojne studije dovele su do pitanja može li izloženost fitoestrogenu rezultirati promjenom metilacije DNA. Guerrero-Bosagna je sa suradnicima objavio 2008. godine studiju u kojoj je promatrana promjena DNA metilacije u jetri i gušterači (Guerrero-Bosagna et al. 2008). Odabrana su tri gena kao markeri za analizu. *ACTA1* (skeletalni alfa-aktin) koji je bio metilirani zbog djelovanja izoflavona što je bilo izraženo više u jetri nego u gušterači. Drugi analizirani marker bio je *ER $\alpha$*  i kod njega nije primijećena razlika u



metilaciji kod djelovanja izoflavona u jetri. Treći je bio *c-fos* koji nije bio metiliran niti u jednom tkivu (Guerrero-Bosagna et al. 2008).

Osim toga ekspresija retinoidnog receptora ( $RAR\beta$ ) je smanjena u mnogim karcinomima glave i vrata, pluća, jednjaka, vrata maternice, a epigenetski mehanizmi tj. metilacija promotora igraju glavnu ulogu u njihovoj inaktivaciji (Greathouse et al. 2012). GEN u količini od 20  $\mu$ M tijekom 6 dana dovela je do smanjene metilacije promotora gena  $RAR\beta 2$  u SiHa stanicama karcinoma cerviksa i porastu glasničke RNA za isti gen  $RAR\beta 2$  (Jha et al. 2010).

#### 4.6.3. Djelovanje izoflavona na epigenom ovarija

Onkogeni miR-27a uključena je u razvoj rezistencije na doxorubicin u karcinomu dojke. Isto tako pokazano je da je miR-27a pojačano izražena u karcinomima ovarija (Xu et al. 2013). Djelovanje GEN-a dovelo je do smanjenja proliferacije i migracije stanica putem djelovanja tumorsupresorskog gena  $SPRY2$  (sprout 2) koji je meta miR-27a. GEN djeluje na razinu miR-27a ne samo u tumorima reproduktivnog sustava nego i u melanomu (Sun et al. 2009).

#### 4.6.4. Epigenetske promjene u karcinomu prostate

Tijekom 2012. godine više od 1,1 milijuna muškaraca oboljelo je, a 307 tisuća umrlo je od karcinoma prostate (Ferlay et al. 2002). Rizični faktori su dob, pripadnost etničkoj skupini, a primijećena je i sličnost različitog broja oboljelih s obzirom na

geografsku regiju kao i kod karcinoma dojke (Kimura et al. 2012). Povezanost između unosa soje i karcinoma prostate promatrana je u brojnim studijama.

Nastanak karcinoma prostate uzrokovan je akumulacijom genetskih i epigenetskih promjena. AR (engl. *androgen-mediated androgen receptor*) najbitnija je poveznica između djelovanja hormona i signala i karcinoma prostate. GEN dovodi do povećanja HAT-a (p300,CBP itd.) što vodi do hiperacetilacije histona H3 i H4 u regiji promotora gena *p21* i *p16* te posljedično do njihove ekspresije i apoptoze (Majid et al. 2008) Uz to, GEN dovodi do smanjene razine HDAC6 što vodi do porasta acetilacije HSP90 (engl. *heat shock protein 90*). Budući da HSP90 funkcionira kao AR šaperon, acetilacija dovodi do disocijacije HSP90 i AR-a te razgradnje AR-a u proteosomima. Uz to aktivacija HAT-a pomoću GEN-a povezana je i ponovnom ekspresijom gena *BTG3* (engl. *B-Cell translocation gene 3*) u karcinomu prostate (Majid et al. 2010). U zdravim stanicama BTG3 djeluje negativno na E2F-1 signal i često je utišan u karcinomu prostate DNA hipermetilacijom (Majid et al. 2010).

Istražen je i utjecaj izoflavona i njegove kombinacija HDAC inhibitorom vorinostatom te DNMT inhibitorom decitabinom (Vardi et al. 2010). Primijećeno je kako je kombinacija *GSTRP1*, *EPHB* i *RASSF1A* gena s vorinostatom bila uspješnija u djelovanju na epigenetske promjene Wnt puta u stanicama karcinoma prostate (Vardi et al. 2010). GEN je povećao ekspresiju HAT1 proteina i HA3K9 acetilaciju promotorskih regija gena *APC*, *SOX7*, *SFRP1*, *SFRP2*, *DKK* i *WIF1* (Phillip et al. 2012).

MiR-145 je tumorsupresorska miR čija je funkcija smanjena metilacijom promotora (Phillip et al. 2012). GEN u kombinaciji s decitabinom doveo do je

reekspresije miR-145. Još jedna miRNA, miR-151, pokazala je djelovanje GEN-a tj. došlo je do povećane ekspresije miR-151 (Zaman et al. 2010).

GEN ima mogućnost povećanja miR-574-3p i smanjenje ekspresije lncRNA HOTAIR (engl. *HOX antisense intergenic RNA*). MiR-574-3p djeluje na EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), HAT p300 koji prilikom smanjenja ekspresije dovodi do smanjene proliferacije i invazije stanice karcinoma pankreasa (Chiyomaru et al. 2013). lncRNA HOTAIR u interakciji sa LSD1 (engl. *lysine specific demethylase 1*) vodi do epigenetskog utišavanja brojnih gena. lncRNA HOTAIR je povišen u različitim tipovima karcinoma (prostata, dojka, jetra, gušterača itd. i povezan je sa slabijim preživljenjem i metastazama u karcinomu dojke (Tsai. et al. 2010).

ARHI (engl. *Aplasia Ras homolog member 1*) je mali G protein sa tumorsupresorskom aktivnošću. Niska ekspresija ARHI-ja povezana je s kraćim očekivanim trajanjem života oboljelih od karcinoma pankreasa (Dalai et al. 2007). Niske razine pronađene su i u karcinomu prostate, a pojačana ekspresija dovela je do inhibicije proliferacije stanica i blokiranja invazije aktivirajući apoptozu. GEN u koncentraciji 50  $\mu$ M dovelo je do povećane razine ARHI-ja što dovodi do zaključka da je aktivnost tog proteina regulirana epigenetskim promjenama na koje utječe GEN (Chen et al. 2011).

## 5. ZAKLJUČAK

Tijekom studija mnogo puta su predavači spominjali individualni pristup pacijentu. Umjesto ustaljenih algoritama i protokola koji su se dugi niz godina protezali kroz većinu grana medicine, došlo je do zaokreta u pristupu i liječenju. Dijagnostičke i terapijske metode sada se prilagođavaju svakom pacijentu ponaosob uzimajući u obzir obiteljsku anamnezu, navike, tijek razvoja bolesti i pripadajuće komorbiditete. Mnogi negativni učinci terapije, naročito za maligne bolesti, doveli su do razmišljanja kako bi se terapijski učinci mogli unaprijediti tako da sam učinak u što većem opsegu ne djeluje na zdravo tkivo i posljedično ga ne ošteti. Upravo su navedeni razlozi velika prednost i razlog istraživanja i razvitka genske terapije. Djelovanjem na neke od gena koji su zajednički za sprječavanje ili razvitak zloćudnih novotvorina može se utjecati na velik broj malignih bolesti. Istražujući literaturu prilikom pisanja rada uočila sam velik broj istraživanja koja proučavaju nove mogućnosti genske terapije karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma. Iako su sve maligne bolesti zaslužile jednaku zastupljenost u terapiji zbog velikog broja novooboljelih i sve više oboljele mlađe populacije razumljiva mi je pozornost koju je liječenje tih dvaju karcinoma izazvalo. Vjerujem da će i u budućnosti genska terapija donijeti nove mogućnosti za sve oboljele kako od malignih, tako i od drugih bolesti za koje ne postoji zadovoljavajuća terapija.

## 6. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12.8.1990. godine u Zagrebu. Maturirala sam 2009. godine u VII. gimnaziji te upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam u projektu DSS (Dubrovnik Summer School) 2013., 2014. i 2015. godine kao članica Organizacijskog odbora. Nagrađena sam za istoimeni projekt Rektorovom nagradom. Uz to, članica sam SSHLZ-a (Studentska sekcija Hrvatskog liječničkog zbora) i EMSA-e (European Medical Student Association).

## 7. LITERATURA

1. Baran Y, Subramaniam M, Biton A, Tukiainen T, Tsang EK, Rivas MA, Pirinen M, Gutierrez-Arcelus M, Smith KS, Kukurba KR, Zhang R, Eng C, Torgerson DG, Urbanek C; GTEx Consortium, Li JB, Rodriguez-Santana JR, Burchard EG, Seibold MA, MacArthur DG, Montgomery SB, Zaitlen NA, Lappalainen T. (2015) The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. *Genome Res.* 2015 May 7. pii: gr.192278.115. [Epub ahead of print]
2. Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. (2008) DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol.* 2008 Apr;109(1):129-39. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.12.017. Epub 2008 Jan 29.
3. Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, Schmidt J, Burger L, Krebs AR, Akalin A, Schübeler D. (2015) Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature.* 2015 Apr 9;520(7546):243-7. doi: 10.1038/nature14176. Epub 2015 Jan 21.
4. Bergenfelz C, Medrek C, Ekström E, Jirstrom K, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. (2012) Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J Immunol* 2012; 188: 5448-5458 [PMID: 22547701 DOI: 10.4049/jimmunol.1103378]
5. Beta M, Chitipothu S, Khetan V, Biswas J, Krishnakumar S. (2014) Hypermethylation of Adenomatosis Polyposis Coli-2 and its Tumor Suppressor Role in Retinoblastoma. *Curr Eye Res.* 2014 Sep 10:1-10.[Epub ahead of print]
6. Bienz M, Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000,103:311–320
7. Bingham, S.A.; Atkinson, C.; Liggins, J.; Bluck, L.; Coward, A. (1998) Phyto-oestrogens: Where are we now? *Br. J. Nutr.* 1998, 79, 393–406.
8. Bosviel, R.; Dumollard, E.; Dechelotte, P.; Bignon, Y.J.; Bernard-Gallon, D. (2012) Can soy phytoestrogens decrease DNA methylation in BRCA1 and BRCA2 oncosuppressor genes in breast cancer? *OMICS* 2012, 16, 235–244. Ž
9. Cancer Research UK, Bowel cancer mortality statistics. [<http://www.cancerresearchuk.org/cancerinfo/cancerstats/types/bowel/http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/bowel/mortality/#By>]
10. Cassidy, A.; Faughnan, M. (2000) Phyto-oestrogens through the life cycle. *Proc. Nutr. Soc.* 2000, 59, 489–496.

11. Chen, Y.; Zaman, M.S.; Deng, G.; Majid, S.; Saini, S.; Liu, J.; Tanaka, Y.; Dahiya, R. (2011) MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 2011, 4, 76–86.
12. Chen, Z.; Zheng, W.; Custer, L.J.; Dai, Q.; Shu, X.O.; Jin, F.; Franke, A.A. (1999) Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr. Cancer* 1999, 33, 82–87.
13. Chintagumpala M, Chevez-Barrios P, Paysse EA, Plon SE, Hurwitz R. (2007) Retinoblastoma: review of current management. *Oncologist* 2007;12:1237–1246
14. Chiyomaru, T.; Yamamura, S.; Fukuhara, S.; Yoshino, H.; Kinoshita, T.; Majid, S.; Saini, S.; Chang, I.; Tanaka, Y.; Enokida, H.; *et al.* (2013) Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic HOTAIR. *PLoS One* 2013, 8, e70372.
15. Clevers H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127: 469-480 [PMID: 17081971 DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.018]
16. Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N. (2008) Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res* 2008;86:201–206.
17. Cooper G. M., Hausmann R. E. (2010) Stanica: Molekularni pristup, Zagreb, Medicinska naklada
18. D'Adamo, C.R.; Sahin, A. (2014) Soy foods and supplementation: A review of commonly perceived health benefits and risks. *Altern. Ther. Health Med.* 2014, 20, 39–51.
19. Dadla A, Tannenbaum S, Yates B, Holle L. (2014) Delayed hypersensitivity reaction related to the use of pegfilgrastim. *J Oncol Pharm Pract* 2014 Jul 3; Epub ahead of print [PMID:24993705]
20. Dalai, I.; Missiaglia, E.; Barbi, S.; Butturini, G.; Doglioni, C.; Falconi, M.; Scarpa, A. (2007) Low expression of ARHI is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors. *Neoplasia* 2007, 9, 181–183.
21. DiRocco DP, Bisi J, Roberts P, Strum J, Wong KK, Sharpless N, Humphreys BD. (2014) CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306: F379-F388 [PMID: 24338822 DOI: 10.1152/ajprenal.00475.2013]

22. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. (2012) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Available online: <http://globocan.iarc.fr> (accessed on 22 July 2014).
23. Fritz, H.; Seely, D.; Flower, G.; Skidmore, B.; Fernandes, R.; Vadeboncoeur, S.; Kennedy, D.; Cooley, K.; Wong, R.; Sagar, S.; *et al.* Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: A systematic review. *PLoS One* 2013, 8, e81968.
24. Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. (2010) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* 2000; 103: 885-896 [PMID: 11136974 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00192-6]
25. Greathouse, K.L.; Bredfeldt, T.; Everitt, J.I.; Lin, K.; Berry, T.; Kannan, K.; Mittelstadt, M.L.; Ho, S.M.; Walker, C.L. (2012) Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* 2012, 10, 546–557.
26. Hervouet, E.; Cartron, P.F.; Jouvenot, M.; Delage-Mourroux, R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics* 2013, 8, 237–245.
27. Hong, T.; Nakagawa, T.; Pan, W.; Kim, M.Y.; Kraus, W.L.; Ikehara, T.; Yasui, K.; Aihara, H.; Takebe, M.; Muramatsu, M.; *et al.* (2004) Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 317, 259–264.
28. IARC. *World Cancer Report 2014*, 1st ed.; Stewart, B.W., Wild, C.P., Eds.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2014.
29. Indovina P, Acquaviva A, De Falco G, Rizzo V, Onnis A, Luzzi A, *et al.* (2009) Downregulation and aberrant promoter methylation of p16INK4A: a possible novel heritable susceptibility marker to retinoblastoma. *J Cell Physiol* 2009;223:143–150.
30. Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, Takamatsu K, Kunihiro S, Ishii H, Nishikata T. (2014) Simultaneous expression of cancer stemcell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells. *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1570-1578 [PMID: 25089665 DOI: 10.3390/cancers6031570]
31. Jha, A.K.; Nikbakht, M.; Parashar, G.; Shrivastava, A.; Capalash, N.; Kaur, J. (2010) Reversal of hypermethylation and reactivation of the RARbeta2 gene by natural compounds in cervical cancer cell lines. *Folia Biol. (Praha)* 2010, 56, 195–200.



32. Keinan-Boker, L.; Peeters, P.; Mulligan, A.; Navarro, C.; Slimani, N.; Mattisson, I.; Lundin, E.; McTaggart, A.; Allen, N.; Overvad, K.; *et al.* (2002) Soy product consumption in 10 European countries: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* 2002, 5, 1217–1226.
33. Kikuno, N.; Shiina, H.; Urakami, S.; Kawamoto, K.; Hirata, H.; Tanaka, Y.; Majid, S.; Igawa, M.; Dahiya, R. (2008) Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* 2008, 123, 552–560.
34. Kimura, T. (2012) East meets West: Ethnic differences in prostate cancer epidemiology between East Asians and Caucasians. *Chin. J. Cancer* 2012, 3, 421–429.
35. Kolčić I, Vorko Jović A (2012) Epidemiologija, Zagreb, Medicinska naklada
36. Li, Y.; Meeran, S.M.; Patel, S.N.; Chen, H.; Hardy, T.M.; Tollefsbol, T.O. (2013) Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Mol. Cancer* 2013, 12, 9.
37. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN (2000) Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000, 26:146–147.
38. Liu Y, Liang X, Yang R. (2015) Identification of peculiar and common Effects of histone Modifications on transcription. *J Theor Biol.* 2015 May 19. pii: S0022-5193(15)00222-2. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.04.040.
39. Liu Y, Liang X, Yang R. (2015) Identification of peculiar and common Effects of histone Modifications on transcription. *J Theor Biol.* 2015 May 19. pii: S0022-5193(15)00222-2. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.04.040.
40. Logan CY, Nusse R.(2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810 [PMID: 15473860]
41. Luga V, Wrana JL. (2013) Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res* 2013; 73: 6843-6847 [PMID: 24265274 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1791]

42. Magee, P.J.; Rowland, I. (2012) Soy products in the management of breast cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2012, 6, 586–591.
43. Majid, S.; Dar, A.A.; Shahryari, V.; Hirata, H.; Ahmad, A.; Saini, S.; Tanaka, Y.; Dahiya, A.V.; Dahiya, R. (2010) Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer* 2010, 116, 66–76.
44. Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, Holcombe RF. (2004) Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25: 1337-1342 [PMID:15492823 DOI: 10.3892/ijo.25.5.1337]
45. Muto Y, Maeda T, Suzuki K, Kato T, Watanabe F, Kamiyama H, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F, Alonso S, Perucho M, Rikiyama T. (2014) DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC Cancer*. 2014 Jun 25;14:466. doi: 10.1186/1471-2407-14-466.
46. Néstor Masckauchán T, Kitajewski J (2006) Wnt/Frizzled Signaling in the Vasculature: New Angiogenic Factors in Sight. *Physiology* Published 1 June 2006 Vol. 21 no. 3, 181-188 DOI: 10.1152/physiol.00058.2005
47. Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, Tagne RS, Amvene JM, Muller JM, Krampera M, Lukong KE. (2014) New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. *World J Clin Cases*. 2014 Dec 16;2(12):769-86. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.769. Review.
48. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farraye FA (2006) Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006, 30:1491–1501.
49. Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K. (2010) Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *J Cell Physiol* 2010;223:143–150.
50. Oki Y, Issa JP. (2006) Review: recent clinical trials in epigenetic therapy. *Rev Recent Clin Trials* 2006;1:169–182.
51. Parker, L.P.; Taylor, D.D.; Kesterson, J.; Metzinger, D.S.; Gercel-Taylor, C. (2009) Modulation of microRNA associated with ovarian cancer cells by genistein. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2009, 30, 616–621.

52. Phillip, C.J.; Giardina, C.K.; Bilir, B.; Cutler, D.J.; Lai, Y.H.; Kucuk, O.; Moreno, C.S. (2012) Genistein cooperates with the histone deacetylase inhibitor vorinostat to induce cell death in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2012, 12, 145.
53. Polakis P (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851 [PMID: 10921899 DOI: 10.1101/gad.14.15.1837]
54. Pudenz M, Roth K, Gerhauser C. (2014) Impact of soy isoflavones on the epigenome in cancer prevention. *Nutrients*. 2014 Oct 15;6(10):4218-72. doi: 10.3390/nu6104218.
55. Qu Y, Dang S, Hou P. (2013) Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta*. 2013 Sep 23;424:53-65. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.002. Epub 2013 May 10.
56. Rao TP, Kühl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010; 106: 1798-1806 [PMID: 20576942]
57. Rawson JB, Manno M, Mrkonjic M, Daftary D, Dicks E, Buchanan DD, Younghusband HB, Parfrey PS, Young JP, Pollett A, Green RC, Gallinger S, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B (2011) Promoter methylation of Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 is associated with opposing tumor subtypes in two large populations of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* 2011, 32:741–74.
58. Sabatino L, Pancione M, Votino C, Colangelo T, Lupo A, Novellino E, Lavecchia A, Colantuoni V. (2014) Emerging role of the  $\beta$ -catenin-PPAR $\gamma$  axis in the pathogenesis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7137-51. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7137. Review.
59. Scherz-Shouval R, Santagata S, Mendillo ML, Sholl LM, Ben-Aharon I, Beck AH, Dias-Santagata D, Koeva M, Stemmer SM, Whitesell L, Lindquist S (2014) The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell* 2014; 158: 564-578 [PMID: 25083868 DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.045]
60. Scholer-Dahirel A, Schlabach MR, Loo A, Bagdasarian L, Meyer R, Guo R, Woolfenden S, Yu KK, Markovits J, Killary K, Sonkin D, Yao YM, Warmuth M, Sellers WR, Schlegel R, Stegmeier F, Mosher RE, McLaughlin ME (2011) Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:17135–17140.
61. Serman A, Simon F, Fabijanovic D, Serman L. (2012) Epigenetic control of cell invasion - the trophoblast model. *Biomol Concepts*. 2012 Dec;3(6):487-94. doi: 10.1515/bmc-2012-0019.

62. Serman A, Vlahović M, Serman L, Bulić-Jakus F. (2006) DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Coll Antropol.* 2006 Sep;30(3):665-71
63. Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB (2008) Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB. *World J Gastroenterol* 2008;14: 595–600.
64. Shen, H.; Laird, P.W. (2013) Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013, 153, 38–55.
65. Silva AL, Dawson SN, Arends MJ, Guttula K, Hall N, Cameron EA, Huang TH, Brenton JD, Tavaré S, Bienz M, Ibrahim AE. (2014) Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer.* 2014 Nov 29;14:891. doi: 10.1186/1471-2407-14-891.
66. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP (2005) Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol* 2005, 124:380–391.
67. Sonnet, M.; Baer, C.; Rehli, M.; Weichenhan, D.; Plass, C. (2013) Enrichment of methylated DNA by methyl-CpG immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* 2013, 971, 201–212.
68. Steiner, C.; Arnould, S.; Scalbert, A.; Manach, C. (2008) Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: New perspectives opened by nutrigenomics. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 78–108.
69. Stockler MR, Harvey VJ, Francis PA, Byrne MJ, Ackland SP, Fitzharris B, Van Hazel G, Wilcken NR, Grimison PS, Nowak AK, Gainford MC, Fong A, Paksec L, Sourjina T, Zannino D, GebSKI V, Simes RJ, Forbes JF, Coates AS. (2011) Capecitabine versus classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as first-line chemotherapy for advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4498-4504 [PMID:22025143 DOI:10.1200/JCO.2010.33.9101]
70. Sun, Q.; Cong, R.; Yan, H.; Gu, H.; Zeng, Y.; Liu, N.; Chen, J.; Wang, B. (2009) Genistein inhibits growth of human uveal melanoma cells and affects microRNA-27a and target gene expression. *Oncol. Rep.* 2009, 22, 563–567.
71. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004, 36:417–422.

72. Taylor, C.K.; Levy, R.M.; Elliott, J.C.; Burnett, B.P. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: A review of *in vitro*, preclinical, and clinical studies. *Nutr. Rev.* 2009, *67*, 398–415.
73. Tsai YJ, Tsai T, Peng PC, Li PT, Chen CT. (2015) Histone acetyltransferase p300 is induced by p38MAPK after photodynamic therapy: The therapeutic response is increased by the p300HAT inhibitor, anarcadic acid. *Free Radic Biol Med.* 2015 May 19. pii: S0891-5849(15)00220-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.009
74. Tymoszyk P, Evens H, Marzola V, Wachowicz K, WasmerMH, Datta S, Müller-Holzner E, Fiegl H, Böck G, van Rooijen N, Theurl I, Doppler W. (2014) In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *Eur J Immunol* 2014; 44: 2247-2262 [PMID: 24796276 DOI: 10.1002/eji.201344304]
75. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002, 111:241–250.
76. Vardi, A.; Bosviel, R.; Rabiau, N.; Adjakly, M.; Satih, S.; Dechelotte, P.; Boiteux, J.P.; Fontana, L.; Bignon, Y.J.; Guy, L.; *et al.* (2010) Soy Phytoestrogens Modify DNA Methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 Promoter in Prostate Cancer Cells. *In Vivo* 2010, *24*, 393–400.
77. Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, Sakuma R, Pawson T, Hunziker W, McNeill H, Wrana JL, Attisano L. (2010) The Hippo pathway regulates Wnt/ beta-catenin signaling. *Dev Cell* 2010; 18: 579-591 [PMID: 20412773 DOI: 10.1016/j.devcel.2010.03.007]
78. Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. (2004) Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. MELLO, C.C. and CONTE, D., JR. (2004). Revealing the world of rna interference. *Nature* 431: 338-342. *Int J Dev Biol.* 2009;53(2-3):245-57. doi:10.1387/ijdb.082691av.
79. Verheyen EM, Gottardi CJ (2010) Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn* 2010; 239: 34-44 [PMID: 19623618 DOI: 10.1002/dvdy.22019]

80. Wang S, Dong Y, Zhang Y, Wang X, Xu L, Yang S, Li X, Dong H, Xu L, Su L, Ng SS, Chang Z, Sung JJ, Zhang X, Yu J. (2014) DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene*. 2014 Jul 14;0. doi: 10.1038/onc.2014.201. [Epub ahead of print]
81. Wolfson B, Eades G, Zhou Q. (2014) Roles of microRNA-140 in stem cell-associated early stage breast cancer. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):591-7. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.591. Review.
82. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*; AICR: Washington, DC, USA, 2007.
83. Xie, Q.; Bai, Q.; Zou, L.-Y.; Zhang, Q.-Y.; Zhou, Y.; Chang, H.; Yi, L.; Zhu, J.-D.; Mi, M.-T. (2014) Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2014, 53, 422–431.
84. Xu, L.; Xiang, J.; Shen, J.; Zou, X.; Zhai, S.; Yin, Y.; Li, P.; Wang, X.; Sun, Q. (2013) Oncogenic MicroRNA-27a is a target for genistein in ovarian cancer cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2013, 13, 1126–1132.
85. Yeo W, Chung HC, Chan SL, Wang LZ, Lim R, Picus J, et al. (2012) Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group. *J Clin Oncol* 2012;30:3361–3367.
86. Yu Y, Yan W, Liu X, Jia Y, Cao B, Yu Y, Lv Y, Brock MV, Herman JG, Licchesi J, Yang Y, Guo M. (2014) DACT2 is frequently methylated in human gastric cancer and methylation of DACT2 activated Wnt signaling. *Am J Cancer Res*. 2014 Nov 19;4(6):710-24.eCollection 2014.
87. Zaman, M.S.; Chen, Y.; Deng, G.; Shahryari, V.; Suh, S.O.; Saini, S.; Majid, S.; Liu, J.; Khatri, G.; Tanaka, Y.; et al. (2010) The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2010, 103, 256–264.
88. Ziegler, R.G.; Hoover, R.N.; Pike, M.C.; Hildesheim, A.; Nomura, A.M.Y.; West, D.W.; Wu-Williams, A.H.; Kolonel, L.N.; Horn-Ross, P.L.; Rosenthal, J.F.; et al. (1993) Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85, 1819–1827.

## **8. ZAHVALA**

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci pruženoj tijekom studiranja i pisanja ovog rada jer bez njih ništa ne bi bilo ostvareno. Posebno zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Ljiljani Šerman koja je svojim savjetima pomogla nastanku ovog rada.