

Metilacija DNA u koriokarcinoma

Štenger, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:105:866466>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Štenger

Metilacija DNA u koriokarcinoma

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Štenger

Metilacija DNA u koriokarcinoma

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom višeg asistenta dr.sc. Nina Sinčića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

Popis i objašnjenje kratica

DNA	Deoksiribonukleinska kiselina	deoxyribonucleic acid
GTD	Gestacijska trofoblastična bolest	gestational trophoblastic disease
CHM	Kompletna hidatiformna mola	complete hydatidiform mole
MCR	Minimalne kritične regije	minimal critical region
MR	Magnetska rezonancija	
PET	Pozitronska emisijska tomografija	
hCG	Humani korionski gonadotropin	human chorionic gonadotropin
RNA	Ribonukleinska kiselina	ribonucleic acid
CpG	citozin-gvanin dinukleotidni kompleks	
5mC	5-metilcitozin	
DNMT	metiltransferaza DNA	dna methyltransferase
Cdk	ciklin ovisna kinaza	cyclin dependent kinase
GSTP1	Glutation S - transferaza P1	

1. Sažetak	
2. Summary	
3. Uvod.....	1
4. Koriokarcinom	2
4.1 Epidemiologija.....	2
4.2 Etiologija	3
4.3. Patohistologija i klinička slika	4
4.4. Terapija	5
4.5. Stanične linije iz trofoblasta.....	6
5. Metilacija DNA.....	7
5.1. Epigenetika	7
5.1.1. Epigenetika neoplastičnih procesa	9
5.2. Metilacija DNA	10
5.2.1. Hipermetilacija DNA.....	11
5.2.2. Globalna demetilacija	12
6. Metilacija DNA u koriokarcinomima.....	13
6.1. Epigenetska terapija koriokarcinoma	17
7. Zaključak	18
8. Zahvale	19
9. Literatura	20
10. Životopis.....	28

1. Sažetak

Metilacija DNA u koriokarcinoma

Martina Štenger

Epigenetika je znanstvena disciplina u biologiji koja proučava nasljedne promjene koje nisu uzrokovane promjenom u molekuli deoksiribonukleinske kiseline. Posebna je pažnja usmjerena na važnost epigenetskih mehanizama u regulaciji organizacije kromatina i ekspresiji gena, a čija promjena potaknuta od strane okoliša i vanjskih faktora može potaknuti razvoj tumora aktivacijom onkogeni ili inaktivacijom gena supresora tumora. Najistraženija epigenetska modifikacija je metilacija DNA koja opisuje kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu. Metilacija promotora gena dovodi do heterokromatizacije čime se smanjuje ekspresija gena.

Koriokarcinom je zloćudni tumor epitela korionskih resica, često praćen sa stečenim genomskim abnormalnostima. Najčešće se širi hematogeno, a klinički se očituje oskudnim vaginalnim krvarenjem. Patološko-histološka metoda je zlatni standard u dijagnostici, a terapija se bazira na jednom ili kombinaciji više kemoterapeutika.

Stanice koriokarcinoma pokazuju ukupno povišen stupanj metilacije u promotorskim regijama gena u usporedbi sa stanicama fiziološkog trofoblasta. Hipermetilirani su geni supresori tumora, uključujući gene regulatore staničnog ciklusa, gene zadužene za popravak i zaštitu DNA, apoptozu, staničnu adherenciju i proces metastaziranja. Intenzivno se istražuju lijekovi koji inhibiraju metilaciju DNA poznati kao demetilirajući agensi, od kojih je najpoznatiji decitabin.

Ključne riječi: koriokarcinom, metilacija DNA, epigenetika

2. Summary

DNA Methylation in Choriocarcinoma

Martina Štenger

Epigenetics is the scientific discipline within the field of biology which studies heritable changes that are not caused by a change in a DNA molecule. Special attention is focused on the importance of epigenetic mechanisms in the regulation of chromatin organization and gene expression, and their changes by environmental and external factors can trigger tumor development by activation of oncogenes or inactivation of tumorsuppressors. The most explored epigenetic modification is DNA methylation. It represents a covalent addition of methyl groups to cytosine ring in cytosine-guanine dinucleotide complex. Gene promoter methylation leads to heterochromatization.

Choriocarcinoma is a malignant tumor of epithelial chorionic villi which is often accompanied with acquired genomic abnormalities. It is characterized by early hematogenous spread and clinically manifests with poor vaginal bleeding. Histopathologic diagnosis is the gold standard and the therapy is based on the combination of one or more chemotherapeutic agents

Choriocarcinoma cells show an increased total level of methylation in the gene promoter regions as compared with the physiological trophoblast cells. Tumorsuppressor genes are hypermethylated, including regulators of the cell cycle, the genes responsible for the repair and protection of DNA, apoptosis, cell adherence and the process of metastasis. Drugs that inhibit DNA methylation known as demethylating agents, most notably decitabine, are under extensive research.

Key words: choriocarcinoma, DNA methylation, epigenetic

3. Uvod

Epigenetika je znanstvena disciplina u biologiji koja proučva nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane promjenom u molekuli deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i jedno je od najbrže širećih područja u biomedicini, posebice u istraživanju karcinogeneze. Epigenetski mehanizmi uključuju metilaciju DNA, modifikaciju histona i nekodirajuće ribonukleinske kiseline (RNA), koji su neophodni za stabilnu propagaciju stanja genske aktivnosti kroz mnoge generacije stanica. Osim genske ekspresije, epigenetski mehanizmi igraju važnu ulogu u ostalim staničnim procesima, uključujući staničnu diferencijaciju, apoptozu, popravak DNA te regulaciju matičnosti. U sukladnosti s njihovom ulogom u ključnim staničnim procesima, epigenetski incidenti, epimutacije, vrlo su usko povezani s brojnim bolestima u ljudi, od kojih je najznačajniji svakako karcinom (Feinber & Tycko 2004; Jones & Baylin 2007). Epigenetske promjene su uobičajene u većini, ako ne i u svim zloćudnim novotvorinama.

Ovo područje pokazuje veliki potencijal i pruža nadu u otkrivanje novih preventivskih, dijagnostičkih i terapijskih pristupa. Stoga ne iznenađuje činjenica da se svakim danom publicira sve više radova, a količina znanja eksponencijalno raste.

4. Koriokarcinom

Humana placenta je privremeni, ekstra-embrionalni organ koji olakšava izmjenu plinova te nutrijenata i otpadnih tvari između majke i fetusa (Gauster et al. 2009). Tkivo placente je heterogeno te se sastoji od nekoliko staničnih tipova uključujući stanice trofoblasta (podrijetlom iz trofoektoderma), mezenhimalne stanice (ekstra-embrionalnog i embrionalnog podrijetla), stromalne fibroblaste i ostale stanice. Abnormalnom proliferacijom trofoblasta nastaje skupina bolesti poznata pod nazivom gestacijska trofoblastična bolest (GTD) koja se klasificira u šest kategorija: kompletna hidatiformna mola, parcijalna hidatiformna mola, invazivna mola, tumor ležišta posteljice, koriokarcinom i ostale rijetke trofoblastične promjene.

Koriokarcinom (lat. *choriocarcinoma*) je zloćudni tumor epitela korionskih resica građen od sincicio- i citotrofoblasta. Klinički i prognostički se razlikuje od koriokarcinoma nastalog od teratoma jajnika (Šimunić et al. 2001). Iako spada u grupu rijetkih bolesti placente, istraživanje koriokarcinoma od iznimne je važnosti budući da predstavlja najagresivniji oblik gestacijske trofoblastične bolesti zbog brze lokalne invazije i sposobnosti stvaranja udaljenih metastaza.

4.1 Epidemiologija

Epidemiologija GTD-a nije dovoljno definirana što je posljedica rariteta bolesti te izazova u prikupljanju podataka, izračunavanju i interpretaciji epidemioloških pokazatelja. Na incidenciju čini se utječe geografska regija. Naime najveća pojavnost bolesti zabilježena je u jugoistočnoj Aziji i Japanu (Strohl & Lurain 2014). U nekim zemljama istočne Azije učestalost se kreće oko 1:500 trudnoća, dok je u Vijetnamu,

primjerice, koriokarcinom najčešći maligni tumor ženskih spolnih organa. U SAD-u i Europi značajno je manja i iznosi 1:40000 trudnoća (Šimunić et al. 2001).

Rizični čimbenici za koriokarcinom uključuju dob, etnicitet, kompletnu molarnu trudnoću u anamnezi i krvnu grupu. S napretkom socioekonomskih uvjeta i prehrane, a svakako dijagnostike i zbrinjavanja GTD-a, incidencija trofoblastične bolesti u svijetu je u padu (Strohl & Lurain 2014).

4.2 Etiologija

Kompletna hidatiformna mola (CHM) je trofoblastična bolest uobičajeno uzrokovana razvojem androgenog jajeta čiji genom je isključivo paternalan. Zahvaljujući parentalnom imprintingu, u odsutnosti fetusa razvija se samo trofoblast. CHM je diploidna i nije uočen abnormalni kariotip. On je 46,XX u većini slučajeva, a rijede 46,XY. Glavna komplikacija bolesti je razvoj gestacijskog koriokarcinoma, pravog alograftskog zloćudnog tumora s metastatskim potencijalom. Progresija u koriokarcinom je rijetka u razvijenim zemljama, dočim je u nerazvijenim uobičajena kasnim otkrivanjem i lošom medicinskom skrbi.

Koriokarcinom je često popraćen sa stečenim, moguće etiološkim genomskim abnormalnostima. Pronađeno je četrdeset minimalnih kritičnih regija (MCR) na kromosomima te su identificirani geni kandidati za onkogenezu koriokarcinoma. Prihvaćena je hipoteza da su genske abnormalnosti, povezane sa stečenim kromosomskim abnormalnostima u gestacijskim koriokarcinomima zapravo superponirane na one imprintingom promijenjenih gena tijekom oplodnje (Poaty et al. 2012).

U 50% slučajeva koriokarcinomu prethodi hidatiformna mola, u 25% slučajeva normalna trudnoća, u 22,5% spontani pobačaj, a u 2,5% izvanmaternična trudnoća (Šimunić et al. 2001). Nadalje, otprilike 8 do 30% pacijenata s hidatiformnom molom će razviti gestacijsku trofoblastičnu neoplaziju (Paradinas et al. 2003). Poput ostalih karcinoma u ljudi, neoplastična transformacija trofoblasta je najvjerojatnije višestupanjski proces i uključuje multiple genetske alteracije poput aktivacije onkogeni i inaktivacije gena supresora tumora (Li et al. 2002; Cheung 2003).

4.3. Patohistologija i klinička slika

Histološki, koriokarcinom je karakteriziran bifazičnim, dimorfnim ili bilaminarnim rasporedom stanica trofoblasta bez korionskih resica, strome i krvnih žila. Primarni se tumor nalazi u materijstu i karakteriziran je pojedinačnim ili višestrukim hemoragičnim masama promjera 0,5 do 5 cm koje invadiraju u miometriju uz destrukciju i nekrozu miofibrila i sinusoidno proširenim venama što je podloga za hematogenu diseminaciju tumora (Šimunić et al. 2001).

Apozicijskim rastom kroz stijenku maternice koriokarcinom može zahvatiti pliku latu, mokraćni mjehur i crijeva, a retrogradno vrat maternice, rodnicu i stidnicu. Koriokarcinom se najčešće širi hematogeno. Najčešće metastatske lokalizacije su pluća u 80%, rodnica u 30%, mala zdjelica u 20%, mozak u 10%, crijeva, bubrezi i slezena manje od 5%, te druge lokalizacije u manje od 5% bolesnika (Šimunić et al. 2001).

Patološko-histološka dijagnoza je zlatni standard (Zhao et al. 2006). Ultrazvuk je početna metoda izbora za dijagnozu, a magnetska rezonanca (MR) zdjelice koristi se za procjenu stupnja lokalne invazije. Rentgen pluća se preporuča kao početna radiografska

metoda za određivanje stadija, a kompjuterizirana tomografija (CT) toraksa je potrebna ukoliko je radiogram negativan. Pozitronska emisijska tomografija (18)F-fluorodeoksiglukozom pokazala se korisnom za procjenu aktivnih metastaza (Shanbhogue et al. 2013). CT ili MR mozga potrebno je učiniti u svih pacijenata, iako se zahvaćenost mozga može procijeniti i mjerenjem razina humanog korionskog gonadotropina (hCG) u cerebrospinalnom likvoru (Bakri et al. 1994).

Klinički se koriokarcinom očituje uglavnom oskudnim vaginalnim krvarenjem, te je često kasno dijagnosticiran unatoč ginekološkoj skrbi. U malog broja bolesnica očituje se i neginekološkim simptomima koji ukazuju na mogućnost postojanja metastaza.

U posljednje vrijeme koriokarcinom se dijagnosticira sve kasnije. Pacijenti nemaju drugih simptoma osim pitanja trudnoće. Unatoč kasnoj dijagnozi, preživljenje i dalje ostaje visoko (Diver et al. 2013).

4.4. Terapija

Pacijenti s koriokarcinomom moraju proći temeljitu obradu prije terapije. U pripremi za liječenje uzimaju se uzorci krvi za procjenu bubrežne i jetrene funkcije, kompletna krvna slika te se određuje osnovna razina hCG-a u serumu. Potrebno je učiniti i radiografsku obradu. Pristup liječenju uzima u obzir stadij bolesti i procjenu rizika. Mnogi pacijenti zahtijevaju liječenje jednim ili kombinacijom kemoterapeutika dočim će neki biti kandidati za promatranje. Iznenađujuće izlječenje žena s metastatskim koriokarcinomom upotrebom isključivo jednog citostatika, metotreksata, prvi put je objavljeno 1956. godine, a u ovom trenutku on ostaje glavni agens u monoterapiji bolesti niskog rizika (Hertz et al. 1956). Žene s gestacijskim koriokarcinomom koje ne pokazuju

zadovoljavajući terapijski odgovor na prvu liniju kemoterapije imaju vrlo lošu prognozu unatoč polikemoterapiji (Berkowitz et al. 1984). Definitivna druga i treća linija terapije tek trebaju biti definirane, a noviji citostatici će se pokazati presudnima.

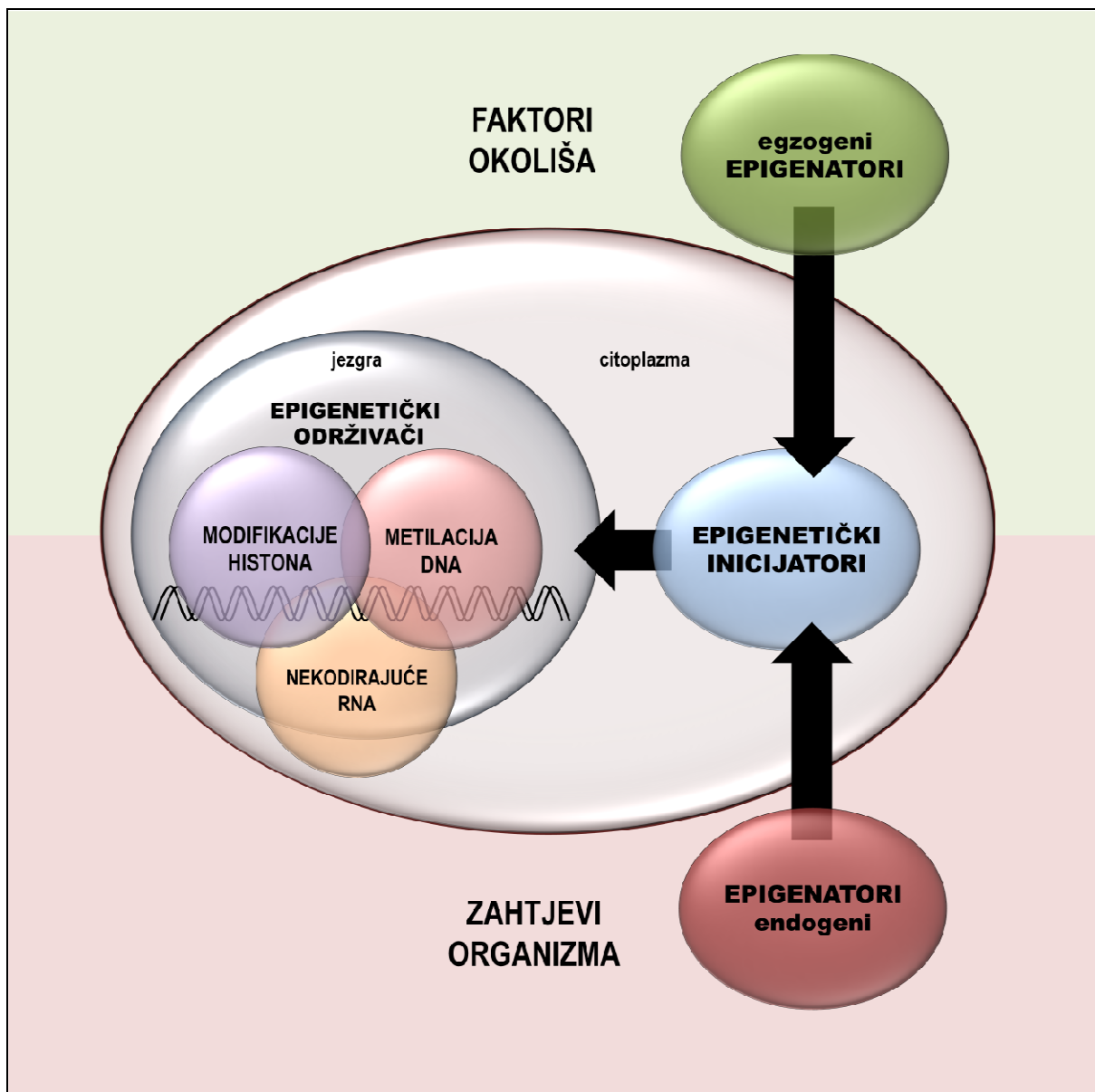
4.5. Stanične linije iz trofoblasta

Stanične linije izvedene iz trofoblasta postale su važno sredstvo za proučavanje razvoja placente i njezine funkcije. Svaka od široko upotrebljavanih staničnih linija ima svoje jedinstveno podrijetlo, funkcionalne karakteristike i antigena svojstva (Hannan et al. 2010). Stanične linije izvedene iz gestacijskih koriokarcinoma su prve koje su razvijene i pokazale su se nezamjenjivim u proučavanju migracije trofoblasta. Naime, za razliku od ostalih tumorskih stanica, pojedine stanične linije izvedene iz gestacijskih koriokarcinoma zadržavaju svoj invazivni potencijal u kulturi (Frank et al. 1999). Postoji više staničnih linija koje su u upotrebi već skoro 40 godina. One uključuju linije JAR, JEG-3, BeWo i AC1M. JAR i JEG-3 linije široko su upotrebljavane u proučavanju molekularnih mehanizama proliferacije i invazivnog potencijala (Hannan et al. 2010).

5. Metilacija DNA

5.1. Epigenetika

Epigenetika predstavlja relativno mladu znanstvenu disciplinu koja se razvila usporedno s razvitkom napredne tehnologije. U novije vrijeme dolazi do njenog brzog napretka te je uključena u gotovo sve grane moderne biomedicine i znanosti o životu općenito. Proizašla je iz hipoteze C.H. Waddingtona, britanskog znanstvenika koji je 1942. godine pokušao objasniti proces manifestiranja genoma u fenotipu jedinke (Waddington 2012), a što općenito odgovara modernome shvaćanju kontrole regulacije ekspresije gena i strukture kromatina. Najprepoznatljiviji epigenetski fenomeni su inaktivacija X kromosoma te ekspresija gena u ovisnosti o roditeljskom podrijetlu (parentalni imprinting) (Turnpenny & Ellard 2011). Predložene su tri razine epigenetskog sustava koje sudjeluju u uspostavi stabilnog nasljednog epigenetskog stanja (epigenom). Izvanstanični signal, koji se naziva epigenator, potječe iz okoliša i može potaknuti početak unutarstaničnog epigenetskog puta. Epigenetski inicijator prima signal od epigenatora te određuje točnu lokaciju u DNA na kojoj identificira lokuse u DNA odnosno gene čijom promjenom ekspresije stanica može odgovoriti na dobivenu informaciju. Epigenetski održivači provode epigenetske promjene, ali i održavaju kromatinsko okruženje u početnim i kasnijim generacijama. (Berger et al. 2009).



Slika 5.1. Epigenetski sustav

Većina epigenetskih promjena uspostavlja se tijekom diferencijacije i održava se stabilnima kroz mnogostruke cikluse dioba, što omogućuje stanicama da imaju različite morfologije i funkcije, a sadrže istu genetsku informaciju. Ova nasljednost uzoraka ekspresije gena posredovana je epigenetskim modifikacijama, koje obuhvaćaju metiliranje citozinske baze u DNA, posttranslacijske modifikacije histonskih proteina kao

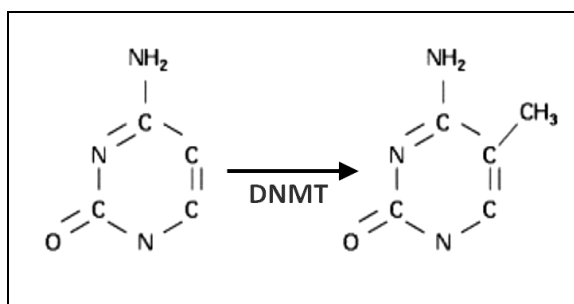
i reorganizacije nukleosoma te RNA i DNA. Neuspjeh pravilnog održavanja nasljednih epigenetskih oznaka može rezultirati neprikladnom aktivacijom ili inhibicijom raznih signalnih puteva i dovesti do bolesti kao što je rak (Sincic & Herceg 2011).

5.1.1. Epigenetika neoplastičnih procesa

Nedavna istraživanja istaknula su važnost epigenetskih mehanizama u regulaciji organizacije kromatina i ekspresije gena te pokazala da njihova promjena od strane okoliša i vanjskih faktora može potaknuti razvoj tumora (Herceg & Vassière 2011). Stanice raka nakupljaju epigenetske nepravilnosti uz brojne genetske izmjene (Jones & Baylin 2002). Te mutacije i epimutacije međudjeluju na svim stupnjevima razvoja raka, radeći zajedno na progresiji bolesti (Jones & Laird 1999). Patološki izmjenjen epigenom pronađen je i u iznimno ranoj fazi razvoja tumora što nameće hipotezu alteriranog epigenoma kao možebitno prvog događaja na putu stanične transformacije u razvoju tumora (Sharma et al. 2010). Epigenom raka karakteriziran je globalnim promjenama metilacije DNA i modifikacije histona kao i promjenom ekspresije kromatin-modificirajućih enzima što sve dovodi do poremećene ekspresije gena i nestabilnosti kromatina (Egger et al. 2004). Epimutacije mogu dovesti do utišavanja gena supresora tumora samostalno i u kombinaciji sa štetnim genetskim mutacijama. U tom slučaju, epimutacija služi kao drugi udarac potreban za inicijaciju raka u skladu s modificiranom teorijom dvostrukog udarca Alfreda Knudsona (Jones & Laird 1999). Epimutacije mogu dovesti do tumorigeneze i aktivacijom onkogeni. Ipak, događaji koji dovode do tih epimutacija nisu još u poznati u cijelosti (Sharma et al. 2010).

5.2. Metilacija DNA

Metilacija DNA je prva opisana i najistraženija epigenetska modifikacija. Predstavlja kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG), čime se citozin pretvara u 5-metilcitozin (5mC) odnosno novu, petu bazu (Lister & Ecker 2009a). Reakciju katalizira enzim DNA metiltransferaza (DNMT) koja katalizira prijenos metilne skupine na peti ugljikov atom citozinskog prstena.



Slika 5.1. Dodavanje metilne skupine na citozinski prsten katalizirano DNMT-om

5mC tvori DNA metilacijski kod, prigušuje transkripciju i sudjeluje u održavanju stabilnog heterokromatinskog stanja. Humani genom sadrži 2-5% CpG-a asimetrične distribucije (Sawan et al. 2008). Postoje i regije bogate CpG dinukleotidima koje se čine imunima na metilaciju (Ehrlich et al. 1982). Takve regije nazivamo CpG otocima. Nalaze se u promotorskim regijama preko 50% gena na koje otpada tek 1% ukupnog genoma (Jones & Liang 2009). Regulacijska uloga ekspresije gena postiže se metilacijom unutar i na rubovima CpG otoka (Irizarry et al. 2009). Ukoliko je promotor gena metiliran, pokreće se mašinerija ostalih epigenetskih modifikacija koje dovode do “zatvorene” strukture kromatina, odnosno heterokromatizacije. Transkripcijskim je faktorima otežan pristup molekuli DNA te ne dolazi do formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa

(De Carvalho et al. 2010; Cedar & Bergman 2009). Obrazac metilacije DNA, odnosno metiloma u normalnih stanica je tkivno specifičan. U tumorskim stanicama metilom je izmjenjen u dva smjera: ukupni gubitak 5mC-a (globalna hipometilacija) i hipermetilacija promotora određenih gena (Feinberg & Tycko 2004; Jones & Baylin 2007). Globalna demetilacija postignuta je demetilacijom uglavnom ponavljajućih sekvenci, transpozona te ostalih nekodirajućih regija genoma. U tumorskim stanicama hipometiliranu DNA nalazimo također unutar promotora gena matičnosti, protoonkogeni/onkogeni, gena staničnog ciklusa, gena inhibitora apoptoze, a hipermetiliranu u promotorima gena supresora tumora, proapoptotičkih gena, gena negativnih regulatora staničnog ciklusa i diferencijacijskih gena (Eden et al. 2003).

5.2.1. Hipermetilacija DNA

Lokalna (gen specifična) hipermetilacija je definirana kao hipermetilacija promotorske regije gena supresora tumora, a smatra se pokretačem inaktivacije gena, odnosno gubitka njihove funkcije (Jones & Baylin 2007). Hipermetilacija DNA se uobičajeno javlja u CpG otocima (Feinberg & Tycko 2004), ali istraživanja ukazuju da promjene metilacije DNA mogu biti češće oko nego u samim otocima (Irizarry et al. 2009). CpG hipermetilacija promotora gena supresora tumora je jedan od najčešćih epigenetskih događaja u malignim stanicama i jedan od najčešćih mehanizama inaktivacije gena supresora tumora. Ipak, osim CpG-a, pronađene su i CpA sekvence koje služe kao ciljna mjesta DNMT-a i čija metilacija, čini se, prethodi metilaciji CpG otoka (Ramsahoye et al. 2000). Posljedice i uloge epimutacija u CpA dinukleotida u tumorigenezi tek se istražuju.

5.2.2. Globalna demetilacija

Vjeruje se da je gubitak 5mC u visokoponavljajućim sekvencama DNA, koje obuhvaćaju oko polovicu genoma, odgovoran za globalnu hipometilaciju transformiranih stanica. Hipometilacija je prva epimutacija zamijećena u karcinomima prije više od četvrt stoljeća te je dokazana u gotovo svim karcinomima. Ipak, njena uloga ostaje slabo poznata (Feinberg & Vogelstein 1983; Wild & Flanagan 2010). Postoje dokazi da ima važnu ulogu u aktivaciji gena povezanih s tumorskom invazijom i metastaziranjem te nestabilnosti kromatina (Ateeq et al. 2008). Slično kao i hipermetilacija DNA, gubitak metilacije može biti tumor specifičan, odnosno u različitim tumorima mogu specifično biti hipometilirane različite regije genoma (Wermann et al. 2010). Zanimljivo je da se hipometilacija čini ranim događajem u karcinogenezi, iako globalne razine metilacije DNA mogu proći daljnje promjene tijekom tumorske progresije. Globalna razina metilacije u genomskoj DNA pokazala se korisnim biomarkerom rizika od razvoja pojedinog tipa tumora te može biti iskorištena u testiranju rizika i molekularnoj epidemiologiji (Sinčić, Herceg 2011).

6. Metilacija DNA u koriokarcinomima

Placenta je po svojoj prirodi semi-maligno tkivo te djeli mnoge karakteristike s tumorima poput globalne hipometilacije i hipermetilacije gena supresora tumora. Tako već i u zdravoj placenti nalazimo 3% metilirane DNA, što je sličnije tumorskom tkivu (2,5 - 3,5%), nego somatskim stanicama (4 - 5%) (Gama-Sosa et al. 2014). Jednako kao i kod ostalih karcinoma, neoplastična transformacija trofoblasta je višestupanjski proces i uključuje multiple genetske alteracije poput aktivacije onkogeni i inaktivacije gena supresora tumora (Li et al. 2002).

Hipermetilacija promotora je bitan epigenetski mehanizam inaktiviranja gena. Geni supresori tumora, uključujući regulatore staničnog ciklusa (*p16*), gene zadužene za popravak i zaštitu DNA (*Brca1* and *Gstp1*), apoptozu (*Dapk*), staničnu adherenciju i proces metastaziranja (*E-kadherin*, *Timp3*) mogu biti utišani metilacijom promotorskih CpG otoka te doprinjeti karcinogenezi. Dokazno je da je hipermetilacija *E-kadherina* povezana s njegovom slabijom ekspresijom u hidatiformnoj moli (Xue et al. 2003), dok je u koriokarcinomima primjećena hipermetilacija *H19* i *Tfpi* gena (Hubé et al. 2003; Kanduri et al. 2002). Primjećena je povezanost epimutacijske inaktivacije gena *p16* putem metilacije s malignom transformacijom trofoblasta. Štoviše, hipermetilacija *p16* javlja se češće u pacijenata s aktivnom bolesti nego kod onih u regresiji. Hipermetilacija samog promotora *p16* relativno je specifična u predviđanju razvoja neoplazije. Analiza metilacijskog statusa *p16* i *E-kadherina* zajedno dodatno podiže osjetljivost metode. Ipak, metilacijski status samog *E-kadherina*, čini se, ne pokazuje statističku povezanost s kliničkim ishodom (Xue et al. 2004). *P16* kodira za protein koji pripada obitelji inhibitora ciklin ovisnih kinaza (Cdk). Inhibira Cdk 4 i 6 i ciklin D te tako spriječava ulazak stanice u S fazu (Serrano et al. 1993). Metilacijsko utišavanje *p16* pronađeno je kao učestali

događaj u nekim tipovima tumora poput tumora kolona, prostate, jednjaka te u karcinomima gušterače.

Koriokarcinomi pokazuju i gubitak ekspresije gena koji utječu na metastatski potencijal karcinoma, kao što su *Nm23* i *Kiss-1* (Xue et al. 2003). Imaju ulogu regulacije invazije i migratornih svojstava fiziološkog trofoblasta. Podaci upućuju na povezanost ekspresije *Nm23-H1* s proliferacijskom aktivnošću trofoblasta jer razina njegove ekspresije postupno raste iz normalnog trofoblasta, preko hidatiformne mole te je najviša u stanicama koriokarcinoma (Iwase et al. 2001).

Također, dokazana je i smanjena ekspresija tkivnog inhibitornog faktora 2 (*Tfpi-2*). Protein TFPI-2 dio je porodice inhibitornih serinskih proteinaza tipa Kunitz, a može inhibirati različite serinske proteaze uključujući faktor VIIa, faktor Xa, plazmin, tripsin, kemotripsin i plazma kalikrein. Gen *Tfpi-2* identificiran je kao gen supresor tumora, te je opisana hipermetilacija njegovog promotora u stanicama koriokarcinoma (Hubé et al. 2003).

Hipermetilacija *Timp3* detektirana je u koriokarcinomima, ali ne i u hidatiformnim molama te se možda radi o događaju kasno u karcinogenezi (Xue et al. 2004). TIMP3 suprimira rast, inhibira angiogenezu i inducira apoptozu. Inaktivacija transkripcije *Timp3*, putem hipermetilacije, pronađena je u malignijim i invazivnijim fenotipovima karcinoma (Lee et al. 2002). Upravo se zbog toga, gubitak ekspresije *Timp3* u koriokarcinomima povezuje s inaktivacijom više mehanizama supresije tumora.

Hic1 gen (engl. *hypermethylated in cancer 1*), neobičan je po tome što cijeli gen sadrži CpG bogata područja. Djeluje kao regulator rasta i gen supresor tumora. *Hic1* je uobičajeno hipermetilirani i transkripcijski neaktivan u leukemijama, meduloblastomima, karcinomu dojke, prostate i vrata maternice, ali i u hidatiformnoj moli te u koriokarcinomu

gdje se smatra ranim događajem u razvoju GTD-a i jedan je od najčešće metiliranih gena u malignim stanicama (Xue et al. 2004).

Istraživanja provedena na staničnim linijama izvedenima iz trofoblasta pokazuju da one u usporedbi sa stanicama fiziološkog trofoblasta imaju ukupno povišen stupanj metilacije u promotorskim regijama. Tako je u staničnim linijama BeWo i JAG zabilježen 749 gen čiji su promotori bili hipermetilirani dočim je u trofoblastu bilo hipermetilirano tek 33 gena (Novakovic et al. 2011). ASPP1 je jedan iz obitelji P53 apoptoza-stimulirajućih proteina, skupine proteina koji mogu regulirati apoptotsku funkciju divljeg tipa *p53*. U uzorcima koriokarcinoma kao i u staničnim linijama JAR i JEG-3 dokazan je značajan gubitak ekspresije *Aspp1* u usporedbi s normalnim posteljicama. Razina mRNA *Aspp1* značajno korelira s metilacijskim statusom promotora, te je niža aktivnost ASPP1 pronađena u hidatiformnim molama koje su napredovale do koriokarcinoma u usporedbi s onima koje su regredirale (Mak et al. 2011).

Oktamer vezujući transkripcijski faktor 4 (OCT4) i SOX2 su transkripcijski faktori koji imaju ključnu ulogu u održavanju pluripotencije embrionalnih matičnih stanica. OCT4 protein kodiran je genom *Pou5f1* te je od kritične važnosti pri samoobnovi nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica. Zbog toga se OCT4 često koristi kao marker nediferenciranih stanica. Ekspresija *Pou5f1* mora biti precizno regulirana jer će bilo kakva pogreška dovesti do promjene u diferencijaciji. Snižena razina *Pou5f1* mRNA zabilježena je u stanicama JAR i JEG-3 dočim *Sox2* u stanicama koriokarcinoma čemu je uzrok hipermetilacija njihove promotorske regije (Zhang et al. 2008; Li et al 2008).

Glutation S - transferaza pi (GSTP1) je glavni faza II detoksicirajući enzim u većini tipova stanica. Katalizira konjugaciju brojnih hidrofobnih i elektrofilnih spojeva. *Gstp1* je polimorfni gen koji kodira za funkcionalno različite aktivne proteine koji djeluju

na metabolizam ksenobiotika i igraju ulogu u osjetljivosti na rak i druge bolesti. Aberantna ekspresija *Gstp1* povezana je s karcinogenezom i razvojem rezistencije na lijekove. Utvrđeno je da se djelomična metilacija promotora *Gstp1* nalazi u BeWo stanicama (Slonchak et al. 2009).

Primjećena je i hipermetilacija gena supresora tumora *Apc* (engl. *adenomatous polyposis coli*) u svim staničnim linijama izvedenim iz koriokarcinoma (Wong et al. 2008). On kodira za protein koji djeluje kao antagonist Wnt signalnog (protoonkogenog) puta. Također je uključen u staničnu migraciju, adheziju, aktivaciju transkripcije i apoptozu. Ista stvar primjećena je i kod receptora 1,25-dihidroksivitamina D3 (*Vdr*) i retinoidnog X receptora alfa (*Rxra*) čija je ekspresija vrlo niska u odnosu na onu normalne terminske placente (Pospechova et al. 2009).

Gen *Gdf15* (engl. *growth differentiation factor 15*) kodira za koštani morfogenetSKI protein koji spada u skupinu transformirajućih faktora rasta beta te regulira diferencijaciju tkiva, a pokazuje gubitak ekspresije u stanicama koriokarcinoma. Gubitak ekspresije pokazuje i gen *Igfbp3* (engl. *insulin-like growth factor binding protein 3*) koji kodira za istoimeni protein. Nasuprot tome, gen *Ccnb1* (engl. *cyclin B1*), koji kodira za protein s regulativnom funkcijom mitoze, pokazuje intenzivniju transkripciju (Feng et al. 2004).

Gotovo potpuni gubitak metilacije nađen je u *Dnmt1* u JAR, BeWo i JEG-3 staničnim linijama u odnosu na citotrofoblast prvog semestra i tkivo posteljice. Nagađa se da je veća ekspresija *Dnmt1* uključena u nastanak tih tumora. Konzistentne promjene otkrivene su u *Dnmt3L* promotoru s povećanjem metilacije u JEG-3 stanicama i smanjenom razinom u JAR stanicama. Primjećena je povećana aktivnost *Dnmt* gena nezavisno od metilacije promotora. Nagađa se da povećanje *Dnmt1* aktivnosti olakšava aberantnu metilaciju gena supresora tumora povezanu s nastankom raka. Učinkovitost

inhibicije DNMT1 u obnovi aktivnosti supresije tumora, poticanju zastoja staničnog ciklusa i inhibiciji tumorskog rasta (Brueckner et al. 2007) podupire ovu hipotezu.

Povećanje razine metilacije nađeno je i u genima *Sfrp2*, *Hr-1*, *Sim-1*, *Cd44*, *Egr4* i *Dcc-1* u sve tri stanične linije što pruža uvjerljive dokaze za vezu između daljnjeg smanjivanja aktivnosti tih gena i tumorogenih procesa koji dovode do koriokarcinoma (Novakovic et al. 2008).

6.1. Epigenetska terapija koriokarcinoma

Pažljivo praćenje pacijenata s hidatiformnom molom dovelo je do značajnog pada mortaliteta od koriokarcinoma. Ipak, takav oblik praćenja podrazumijeva učestale kontrole te sustavno mjerenje razine beta hCG u krvi što stvara teret kako pacijentu zbog utjecaja na kvalitetu života tako i cijeloj zajednici zbog potrošnje resursa i opterećenja zdravstvenog sustava. Naime, manje od 30% pacijenata s hidatiformnom molom zahtijeva tako detaljnu skrb. Kada bi pacijenti koji će razviti maligniju formu GTD-a mogli biti identificirani u vrijeme prve dijagnoze (dijagnoze molarne trudnoće) mogao bi se uvelike smanjiti broj nepotrebnih praćenja. Upravo znanstvena istraživanja pokazuju da ishod hidatiformne mole može biti procenjen određivanjem metilacijskog statusa promotora te imunohistokemijskim metodama nakon evakuacije molarne trudnoće. Tako, čini se, mogu biti izdvojeni pacijenti visokog rizika koji bi primali profilaktičnu kemoterapiju. Gen *p16* smatra se kandidatom, ali su potrebna daljnja istraživanja (Xue et al 2004).

Koriokarcinomi pokazuju hipermetilaciju mnogih gena od kojih su za maligni potencijal najvažniji geni supresori tumora te proapoptoski geni koji se ovim

mehanizmom inaktiviraju. Za razliku od genetskih promjena, epigenetske promjene mogu se poništiti farmakološkom intervencijom, te su one prepoznate kao meta za razvijanje tumorske terapije. Budući da metilacija ne mjenja slijed nukleotida u sekvenci DNA, mnogo pažnje usmjereno je na razvoj malih molekula inhibitora DNMT (Ghoshal & Bai 2007). Zbog toga su u istraživanju lijekovi koji inhibiraju metilaciju DNA poznati kao demetilirajući agensi. Tri najčešće korištena katalitička inhibitora DNMT su kemijski analozi citidina: 5-azaC (azacitidin), 5-azaCdR (decitabin) i zebularin (Subramaniam et al. 2014). U istraživanjima je dokazano da stanične linije tretirane 5-aza-2'deoksicitidinom pokazuju povećanu ekspresiju *Rasff1A* (Chiu et al. 2007), *Oct4* (Zhang et al. 2008), *H19* (Ito et al. 2013), *Sox2* (Li et al. 2008) i *Ccnb1* (Feng et al. 2004), dok je ekspresija *Igf2* (Ito et al. 2013), *Gdf15* i *Igfbp3* (Feng et al. 2004) snižena što odgovara metilacijskom profilu fiziološkog trofoblasta.

7. Zaključak

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razvili efikasniji lijekovi te pronašla nova ciljna mjesta njihovog djelovanja. Također, trebamo unaprijediti razumijevanje procesa koji dovode do promjenjenog metilacijskog obrasca.

Kako same promjene u metilaciji DNA ne mogu u potpunosti objasniti razlike između stanica koriokarcinoma i onih placente, postoji potreba za istraživanjem drugih epigenetskih procesa u stanicama trofoblasta.

8. Zahvale

Zahvaljujem svom mentoru dr.sc. Ninu Sinčiću na uloženom trudu, vremenu i korisnim savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studija.

9. Literatura

- Ateeq B1, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA (2008) Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia* 10(3):266-78.
- Bakri Y, Berkowitz RS, Goldstein DP, Subhi J, Senoussi M, von Sinner W, Jabbar FA (1994) Brain metastases of gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 39(3):179.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23:781-3.
- Berkowitz RS, Goldstein DP, Bernstein MR (1984) Modified triple chemotherapy in the management of high-risk gestational trophoblastic tumors. *Gynecol Oncol* 19:173–181.
- Brueckner B, Kuck D, Lyko F (2007) DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 13(1):17-22.
- Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10:295-304.
- Cheung AN (2003) Pathology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:849-868
- Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM (2007) Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol* 170(3):941-50.

- De Carvalho DD, You JS, Jones PA (2010) DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* 20:609-17.
- Diver E, May T, Vargas R, Bernstein M, Goldstein D, Berkowitz R (2013) Changes in clinical presentation of postterm choriocarcinoma at the New England Trophoblastic Disease Center in recent years. *Gynecol Oncol* 130(3):483-6.
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300:455.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10:2709-21.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301(5895):89-92.
- Feinberg AP, Tycko B (2004) History of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4:143-153
- Feng H, Cheung AN, Xue WC, Wang Y, Wang X, Fu S, Wang Q, Ngan HY, Tsao SW (2004) Down-regulation and promoter methylation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 94(2):375-82.
- Frank HG, Funayama H, Gaus G, Schmitz U (1999) Choriocarcinoma-trophoblast hybrid cells: Reconstructing the pathway from normal to malignant trophoblast—Concept and perspectives: A review. *Placenta* 20(1):11-24.

- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 11:6883–6894.
- Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B (2009) Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30 S:49-54.
- Ghoshal K, Bai S (2007) DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 43(6):395–422.
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* 82(2):235-45.
- Herceg Z, Vaissière T (2011) Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 6(7):804-19.
- Hertz R, Li MC, Spencer DB (1956) Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 93(2):361.
- Hubé F, Reverdiau P, lochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y (2003) Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biol Chem* 384(7):1029-34.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41:178-186
- Ito Y, Nativio R, Murrell A (2013) Induced DNA demethylation can reshape chromatin topology at the IGF2-H19 locus. *Nucleic Acids Res* 41(10):5290-302.

- Iwase K, Okamoto T, Nui R, Mizutani S (2001) Expression of nm23-H1 in hydatidiform mole and its relationship with the development of postmolar disease. *Gynecol Obstet Invest* 51(4):228-32.
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683-692
- Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10:805-11.
- Kanduri C, Kanduri M, Liu L, Thakur N, Pfeifer S, Ohlsson R (2002) The kinetics of deregulation of expression by de novo methylation of the h19 imprinting control region in cancer cells. *Cancer Res* 62(16):4545-8.
- Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH (2002) Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 161(3):1015-22.
- Li AS, Siu MK, Zhang H, Wong ES, Chan KY, Ngan HY, Cheung AN (2008) Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Reprod Sci* 15:735–744.
- Li HW, Tsao SW, Cheung AN (2002) Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 23(1):20-31.
- Lister R, Ecker JR (2009a) Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 19:959-66.

- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009b) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315-22.
- Mak VC, Lee L, Siu MK, Wong OG, Lu X, Ngan HY, Wong ES, Cheung AN (2011) Downregulation of ASPP1 in gestational trophoblastic disease: correlation with hypermethylation, apoptotic activity and clinical outcome *Mod Pathol* 24(4):522-32.
- Novakovic B, Rakyan V, Ng HK, Manuelpillai U, Dewi C, Wong NC, Morley R, Down T, Beck S, Craig JM, Saffery R (2008) Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first-trimester cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 14(9):547-54.
- Novakovic B, Wong NC, Sibson M, Ng HK, Morley R, Manuelpillai U, Down T, Rakyan VK, Beck S, Hiendleder S, Roberts CT, Craig JM, Saffery R (2010) DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta. *J Biol Chem* 285(13):9583-93.
- Novakovic B, Gordon L, Wong NC, Moffett A, Manuelpillai U, Craig JM, Sharkey A, Saffery R (2011) Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines: implications and opportunities for understanding trophoblast function. *Mol Hum Reprod* 17(6):344-53.
- Paradinas FJ, Elston CW, Haines M (2003) Gestational trophoblastic diseases. Fox H, Wells M. Haines & Taylor *Obstetrical and Gynaecological Pathology*. London, Churchill Livingstone

- Poaty H, Coullin P, Leguern E, Dessen P, Valent A, Afoutou JM, Peko JF, Candelier JJ, Gombé-Mbalawa C, Picard JY, Bernheim A (2012) Cytogenomic studies of hydatiform moles and gestational choriocarcinoma. *Bull Cancer* 99(9):827-43.
- Pospechova K, Rozehnal V, Stejskalova L, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmund W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V, Pavek P (2009) Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 299(2):178-87.
- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5237-5242.
- Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 642:1-13.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456):704-7.
- Shanbhogue AK1, Lalwani N, Menias CO (2013) Gestational trophoblastic disease. *Radiol Clin North Am.* 51(6):1023-34.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27-36.
- Sinčić N, Herceg Z (2011) DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 23(1):69-76.
- Slonchak AM, Chwieduk A, Rzeszowska-Wolny J, Yu Obolenska M (2009) Transcription regulation in differential expression of the human GSTP1 gene in breast and choriocarcinoma cells. *Ukr Biokhim Zh* 81(4):48-58.

- Strohl AE, Lurain JR (2014) Clinical Epidemiology of Gestational Trophoblastic Disease. *Curr Obstet Gynecol Rep* 3:40-43
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014) DNA Methyltransferases: A Novel Target for Prevention and Therapy. *Front Oncol.* 4:80.
- Šimunić V i suradnici (2001) *Ginekologija*. Zagreb Naklada Ljevak
- Turnpenny PD, Ellard S(2011) *Emeryjeve osnove medicinske genetike*. Zagreb, Medicinska Naklada
- Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41(1):10-3.
- Wermann H, Stoop H, Gillis AJ, Honecker F, van Gurp RJ, Ammerpohl O, Richter J, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH (2010) Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 221(4):433-42.
- Wild L, Flanagan JM (2010) Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta* 1806(1):50-7.
- Wong NC, Novakovic B, Weinrich B, Dewi C, Andronikos R, Sibson M, Macrae F, Morley R, Pertile MD, Craig JM, Saffery R (2008) Methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human placenta and hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Cancer Lett* 268(1):56-62.
- Xue WC, Feng HC, Tsao SW, Chan KY, Ngan HY, Chiu PM, Maccalman CD, Cheung AN (2003) Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer* 13(6):879-88.

- Xue WC, Chan KY, Feng HC, Chiu PM, Ngan HY, Tsao SW, Cheung AN (2004) Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *J Mol Diagn* 6(4):326-34.
- Zhang HJ, Siu MK, Wong ES, Wong KY, Li AS, Chan KY, Ngan HY, Cheung AN (2008) Oct4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Placenta* 29:549–554.
- Zhao J, Xiang Y, Wan XR, Cui QC, Yang XY (2006) Clinical and pathologic characteristics and prognosis of placental site trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 51(12):939-44.

10. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime: Martina Štenger

Datum i mjesto rođenja: 17. svibnja 1989. Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Kaptolska 44, 10000 Zagreb

Email: martinastenger@gmail.com

Obrazovanje

2012. - 2013. Université Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine

56 Rue du Port, Lille

2008. - 2014. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski Fakultet

Šalata 3, Zagreb

2004. - 2008. XV. Gimnazija

Jordanovac 8, Zagreb

1997. - 2004. Završena osnovna glazbena škola „Zlatko Baloković“

Ivanićgradska 41, Zagreb

Instrument: violina

1996. - 2004. Osnovna škola „Davorin Trstenjak“

Krčka 3, Zagreb

Proglašena učenikom generacije

Strani jezici

Engleski

(osnovna škola i završen 7. stupanj Škole stranih jezika „Vodnikova“)

Francuski

(završen 6. stupanj u Francuskoj Alijansi, položen DELF A2)

Njemački (osnovna i srednja škola)

Radno iskustvo

2013.-2014. Demonstrator iz predmeta “Pedijatrija” na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2010.-2012. Demonstrator iz predmeta “Fiziologija” na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2008., 2009. držanje instrukcija za učenike osnovnih i srednjih škola iz matematike i informatike, te solfeggia za učenika osnovnih glazbenih škola

srpanj 2007. ECCOS inženjering

pomoćni poslovi (backup podataka, kodiranje kartica za kontrolu pristupa i registraciju radnog vremena, organizacija elektronskog imenika,...)

Znanja i vještine

Rad na računalu (OS Windows *, OS Linux, uredski alat MS Office, programski jezik C++)

Vozačka dozvola B kategorije

Posebna dostignuća

2010./2011. Dodijeljena dekanova nagrada za najboljeg studenta

2008. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike

2008. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike

2007. Sudjelovanje na međunarodnom informatičkom natjecanju American Computer Science League (ACSL), Huston(TX), SAD (4. mjesto)

2007. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike (6. mjesto)

2007. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike (7. mjesto)

2006. Sudjelovanje na informatičkom natjecanju „Kup Božo Težak“
(3. mjesto)

2005. Sudjelovanje na međunarodnom informatičkom natjecanju American Computer Science League (ACSL), Allentown(PA), SAD (2. mjesto)

2005. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike (6. mjesto)

2004. Natječaj Erato za najljepšu lirsku pjesmu, Međunarodni institut za književnost

Pjesma objavljena u zbirci

Priznanje za doprinos književno-umjetničkom stvaralaštvu mladih u Republici Hrvatskoj

Ostalo

Trenutno plešem salsu i argentinski tango, te se bavim plesom na šipci.

Završila sam tečaj bridža u Bridž klubu „Dr. Jurica Tomljenović“ pri Fakultetu elektrotehnike i računalstva.

U slobodno vrijeme čitam (znanstveno)fantastičnu književnost, pečem kolače te se družim s prijateljima.

Volim putovati, stjecati nova znanja i vještine, te stvarati nova poznanstva i prijateljstva.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Štenger

Metilacija DNA u koriokarcinoma

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Štenger

Metilacija DNA u koriokarcinoma

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom višeg asistenta dr.sc. Nina Sinčića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

Popis i objašnjenje kratica

DNA	Deoksiribonukleinska kiselina	deoxyribonucleic acid
GTD	Gestacijska trofoblastična bolest	gestational trophoblastic disease
CHM	Kompletna hidatiformna mola	complete hydatidiform mole
MCR	Minimalne kritične regije	minimal critical region
MR	Magnetska rezonancija	
PET	Pozitronska emisijska tomografija	
hCG	Humani korionski gonadotropin	human chorionic gonadotropin
RNA	Ribonukleinska kiselina	ribonucleic acid
CpG	citozin-gvanin dinukleotidni kompleks	
5mC	5-metilcitozin	
DNMT	metiltransferaza DNA	dna methyltransferase
Cdk	ciklin ovisna kinaza	cyclin dependent kinase
GSTP1	Glutation S - transferaza P1	

1. Sažetak	
2. Summary	
3. Uvod.....	1
4. Koriokarcinom	2
4.1 Epidemiologija.....	2
4.2 Etiologija	3
4.3. Patohistologija i klinička slika	4
4.4. Terapija	5
4.5. Stanične linije iz trofoblasta.....	6
5. Metilacija DNA.....	7
5.1. Epigenetika	7
5.1.1. Epigenetika neoplastičnih procesa	9
5.2. Metilacija DNA	10
5.2.1. Hipermetilacija DNA.....	11
5.2.2. Globalna demetilacija	12
6. Metilacija DNA u koriokarcinomima.....	13
6.1. Epigenetska terapija koriokarcinoma	17
7. Zaključak	18
8. Zahvale	19
9. Literatura	20
10. Životopis.....	28

1. Sažetak

Metilacija DNA u koriokarcinoma

Martina Štenger

Epigenetika je znanstvena disciplina u biologiji koja proučava nasljedne promjene koje nisu uzrokovane promjenom u molekuli deoksiribonukleinske kiseline. Posebna je pažnja usmjerena na važnost epigenetskih mehanizama u regulaciji organizacije kromatina i ekspresiji gena, a čija promjena potaknuta od strane okoliša i vanjskih faktora može potaknuti razvoj tumora aktivacijom onkogeni ili inaktivacijom gena supresora tumora. Najistraženija epigenetska modifikacija je metilacija DNA koja opisuje kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu. Metilacija promotora gena dovodi do heterokromatizacije čime se smanjuje ekspresija gena.

Koriokarcinom je zloćudni tumor epitela korionskih resica, često praćen sa stečenim genomskim abnormalnostima. Najčešće se širi hematogeno, a klinički se očituje oskudnim vaginalnim krvarenjem. Patološko-histološka metoda je zlatni standard u dijagnostici, a terapija se bazira na jednom ili kombinaciji više kemoterapeutika.

Stanice koriokarcinoma pokazuju ukupno povišen stupanj metilacije u promotorskim regijama gena u usporedbi sa stanicama fiziološkog trofoblasta. Hipermetilirani su geni supresori tumora, uključujući gene regulatore staničnog ciklusa, gene zadužene za popravak i zaštitu DNA, apoptozu, staničnu adherenciju i proces metastaziranja. Intenzivno se istražuju lijekovi koji inhibiraju metilaciju DNA poznati kao demetilirajući agensi, od kojih je najpoznatiji decitabin.

Ključne riječi: koriokarcinom, metilacija DNA, epigenetika

2. Summary

DNA Methylation in Choriocarcinoma

Martina Štenger

Epigenetics is the scientific discipline within the field of biology which studies heritable changes that are not caused by a change in a DNA molecule. Special attention is focused on the importance of epigenetic mechanisms in the regulation of chromatin organization and gene expression, and their changes by environmental and external factors can trigger tumor development by activation of oncogenes or inactivation of tumorsuppressors. The most explored epigenetic modification is DNA methylation. It represents a covalent addition of methyl groups to cytosine ring in cytosine-guanine dinucleotide complex. Gene promoter methylation leads to heterochromatization.

Choriocarcinoma is a malignant tumor of epithelial chorionic villi which is often accompanied with acquired genomic abnormalities. It is characterized by early hematogenous spread and clinically manifests with poor vaginal bleeding. Histopathologic diagnosis is the gold standard and the therapy is based on the combination of one or more chemotherapeutic agents

Choriocarcinoma cells show an increased total level of methylation in the gene promoter regions as compared with the physiological trophoblast cells. Tumorsuppressor genes are hypermethylated, including regulators of the cell cycle, the genes responsible for the repair and protection of DNA, apoptosis, cell adherence and the process of metastasis. Drugs that inhibit DNA methylation known as demethylating agents, most notably decitabine, are under extensive research.

Key words: choriocarcinoma, DNA methylation, epigenetic

3. Uvod

Epigenetika je znanstvena disciplina u biologiji koja proučava nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane promjenom u molekuli deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i jedno je od najbrže širećih područja u biomedicini, posebice u istraživanju karcinogeneze. Epigenetski mehanizmi uključuju metilaciju DNA, modifikaciju histona i nekodirajuće ribonukleinske kiseline (RNA), koji su neophodni za stabilnu propagaciju stanja genske aktivnosti kroz mnoge generacije stanica. Osim genske ekspresije, epigenetski mehanizmi igraju važnu ulogu u ostalim staničnim procesima, uključujući staničnu diferencijaciju, apoptozu, popravak DNA te regulaciju matičnosti. U sukladnosti s njihovom ulogom u ključnim staničnim procesima, epigenetski incidenti, epimutacije, vrlo su usko povezani s brojnim bolestima u ljudi, od kojih je najznačajniji svakako karcinom (Feinber & Tycko 2004; Jones & Baylin 2007). Epigenetske promjene su uobičajene u većini, ako ne i u svim zloćudnim novotvorinama.

Ovo područje pokazuje veliki potencijal i pruža nadu u otkrivanje novih preventivskih, dijagnostičkih i terapijskih pristupa. Stoga ne iznenađuje činjenica da se svakim danom publicira sve više radova, a količina znanja eksponencijalno raste.

4. Koriokarcinom

Humana placenta je privremeni, ekstra-embrionalni organ koji olakšava izmjenu plinova te nutrijenata i otpadnih tvari između majke i fetusa (Gauster et al. 2009). Tkivo placente je heterogeno te se sastoji od nekoliko staničnih tipova uključujući stanice trofoblasta (podrijetlom iz trofoektoderma), mezenhimalne stanice (ekstra-embrionalnog i embrionalnog podrijetla), stromalne fibroblaste i ostale stanice. Abnormalnom proliferacijom trofoblasta nastaje skupina bolesti poznata pod nazivom gestacijska trofoblastična bolest (GTD) koja se klasificira u šest kategorija: kompletna hidatiformna mola, parcijalna hidatiformna mola, invazivna mola, tumor ležišta posteljice, koriokarcinom i ostale rijetke trofoblastične promjene.

Koriokarcinom (lat. *choriocarcinoma*) je zloćudni tumor epitela korionskih resica građen od sincicio- i citotrofoblasta. Klinički i prognostički se razlikuje od koriokarcinoma nastalog od teratoma jajnika (Šimunić et al. 2001). Iako spada u grupu rijetkih bolesti placente, istraživanje koriokarcinoma od iznimne je važnosti budući da predstavlja najagresivniji oblik gestacijske trofoblastične bolesti zbog brze lokalne invazije i sposobnosti stvaranja udaljenih metastaza.

4.1 Epidemiologija

Epidemiologija GTD-a nije dovoljno definirana što je posljedica rariteta bolesti te izazova u prikupljanju podataka, izračunavanju i interpretaciji epidemioloških pokazatelja. Na incidenciju čini se utječe geografska regija. Naime najveća pojavnost bolesti zabilježena je u jugoistočnoj Aziji i Japanu (Strohl & Lurain 2014). U nekim zemljama istočne Azije učestalost se kreće oko 1:500 trudnoća, dok je u Vijetnamu,

primjerice, koriokarcinom najčešći maligni tumor ženskih spolnih organa. U SAD-u i Europi značajno je manja i iznosi 1:40000 trudnoća (Šimunić et al. 2001).

Rizični čimbenici za koriokarcinom uključuju dob, etnicitet, kompletnu molarnu trudnoću u anamnezi i krvnu grupu. S napretkom socioekonomskih uvjeta i prehrane, a svakako dijagnostike i zbrinjavanja GTD-a, incidencija trofoblastične bolesti u svijetu je u padu (Strohl & Lurain 2014).

4.2 Etiologija

Kompletna hidatiformna mola (CHM) je trofoblastična bolest uobičajeno uzrokovana razvojem androgenog jajeta čiji genom je isključivo paternalan. Zahvaljujući parentalnom imprintingu, u odsutnosti fetusa razvija se samo trofoblast. CHM je diploidna i nije uočen abnormalni kariotip. On je 46,XX u većini slučajeva, a rijede 46,XY. Glavna komplikacija bolesti je razvoj gestacijskog koriokarcinoma, pravog alograftskog zloćudnog tumora s metastatskim potencijalom. Progresija u koriokarcinom je rijetka u razvijenim zemljama, dočim je u nerazvijenim uobičajena kasnim otkrivanjem i lošom medicinskom skrbi.

Koriokarcinom je često popraćen sa stečenim, moguće etiološkim genomskim abnormalnostima. Pronađeno je četrdeset minimalnih kritičnih regija (MCR) na kromosomima te su identificirani geni kandidati za onkogenezu koriokarcinoma. Prihvaćena je hipoteza da su genske abnormalnosti, povezane sa stečenim kromosomskim abnormalnostima u gestacijskim koriokarcinomima zapravo superponirane na one imprintingom promijenjenih gena tijekom oplodnje (Poaty et al. 2012).

U 50% slučajeva koriokarcinomu prethodi hidatiformna mola, u 25% slučajeva normalna trudnoća, u 22,5% spontani pobačaj, a u 2,5% izvanmaternična trudnoća (Šimunić et al. 2001). Nadalje, otprilike 8 do 30% pacijenata s hidatiformnom molom će razviti gestacijsku trofoblastičnu neoplaziju (Paradinas et al. 2003). Poput ostalih karcinoma u ljudi, neoplastična transformacija trofoblasta je najvjerojatnije višestupanjski proces i uključuje multiple genetske alteracije poput aktivacije onkogeni i inaktivacije gena supresora tumora (Li et al. 2002; Cheung 2003).

4.3. Patohistologija i klinička slika

Histološki, koriokarcinom je karakteriziran bifazičnim, dimorfnim ili bilaminarnim rasporedom stanica trofoblasta bez korionskih resica, strome i krvnih žila. Primarni se tumor nalazi u materijstu i karakteriziran je pojedinačnim ili višestrukim hemoragičnim masama promjera 0,5 do 5 cm koje invadiraju u miometriju uz destrukciju i nekrozu miofibrila i sinusoidno proširenim venama što je podloga za hematogenu diseminaciju tumora (Šimunić et al. 2001).

Apozicijskim rastom kroz stijenku maternice koriokarcinom može zahvatiti pliku latu, mokraćni mjehur i crijeva, a retrogradno vrat maternice, rodnicu i stidnicu. Koriokarcinom se najčešće širi hematogeno. Najčešće metastatske lokalizacije su pluća u 80%, rodnica u 30%, mala zdjelica u 20%, mozak u 10%, crijeva, bubrezi i slezena manje od 5%, te druge lokalizacije u manje od 5% bolesnika (Šimunić et al. 2001).

Patološko-histološka dijagnoza je zlatni standard (Zhao et al. 2006). Ultrazvuk je početna metoda izbora za dijagnozu, a magnetska rezonanca (MR) zdjelice koristi se za procjenu stupnja lokalne invazije. Rentgen pluća se preporuča kao početna radiografska

metoda za određivanje stadija, a kompjuterizirana tomografija (CT) toraksa je potrebna ukoliko je radiogram negativan. Pozitronska emisijska tomografija (18)F-fluorodeoksiglukozom pokazala se korisnom za procjenu aktivnih metastaza (Shanbhogue et al. 2013). CT ili MR mozga potrebno je učiniti u svih pacijenata, iako se zahvaćenost mozga može procijeniti i mjerenjem razina humanog korionskog gonadotropina (hCG) u cerebrospinalnom likvoru (Bakri et al. 1994).

Klinički se koriokarcinom očituje uglavnom oskudnim vaginalnim krvarenjem, te je često kasno dijagnosticiran unatoč ginekološkoj skrbi. U malog broja bolesnica očituje se i neginekološkim simptomima koji ukazuju na mogućnost postojanja metastaza.

U posljednje vrijeme koriokarcinom se dijagnosticira sve kasnije. Pacijenti nemaju drugih simptoma osim pitanja trudnoće. Unatoč kasnoj dijagnozi, preživljenje i dalje ostaje visoko (Diver et al. 2013).

4.4. Terapija

Pacijenti s koriokarcinomom moraju proći temeljitu obradu prije terapije. U pripremi za liječenje uzimaju se uzorci krvi za procjenu bubrežne i jetrene funkcije, kompletna krvna slika te se određuje osnovna razina hCG-a u serumu. Potrebno je učiniti i radiografsku obradu. Pristup liječenju uzima u obzir stadij bolesti i procjenu rizika. Mnogi pacijenti zahtijevaju liječenje jednim ili kombinacijom kemoterapeutika dočim će neki biti kandidati za promatranje. Iznenađujuće izlječenje žena s metastatskim koriokarcinomom upotrebom isključivo jednog citostatika, metotreksata, prvi put je objavljeno 1956. godine, a u ovom trenutku on ostaje glavni agens u monoterapiji bolesti niskog rizika (Hertz et al. 1956). Žene s gestacijskim koriokarcinomom koje ne pokazuju

zadovoljavajući terapijski odgovor na prvu liniju kemoterapije imaju vrlo lošu prognozu unatoč polikemoterapiji (Berkowitz et al. 1984). Definitivna druga i treća linija terapije tek trebaju biti definirane, a noviji citostatici će se pokazati presudnima.

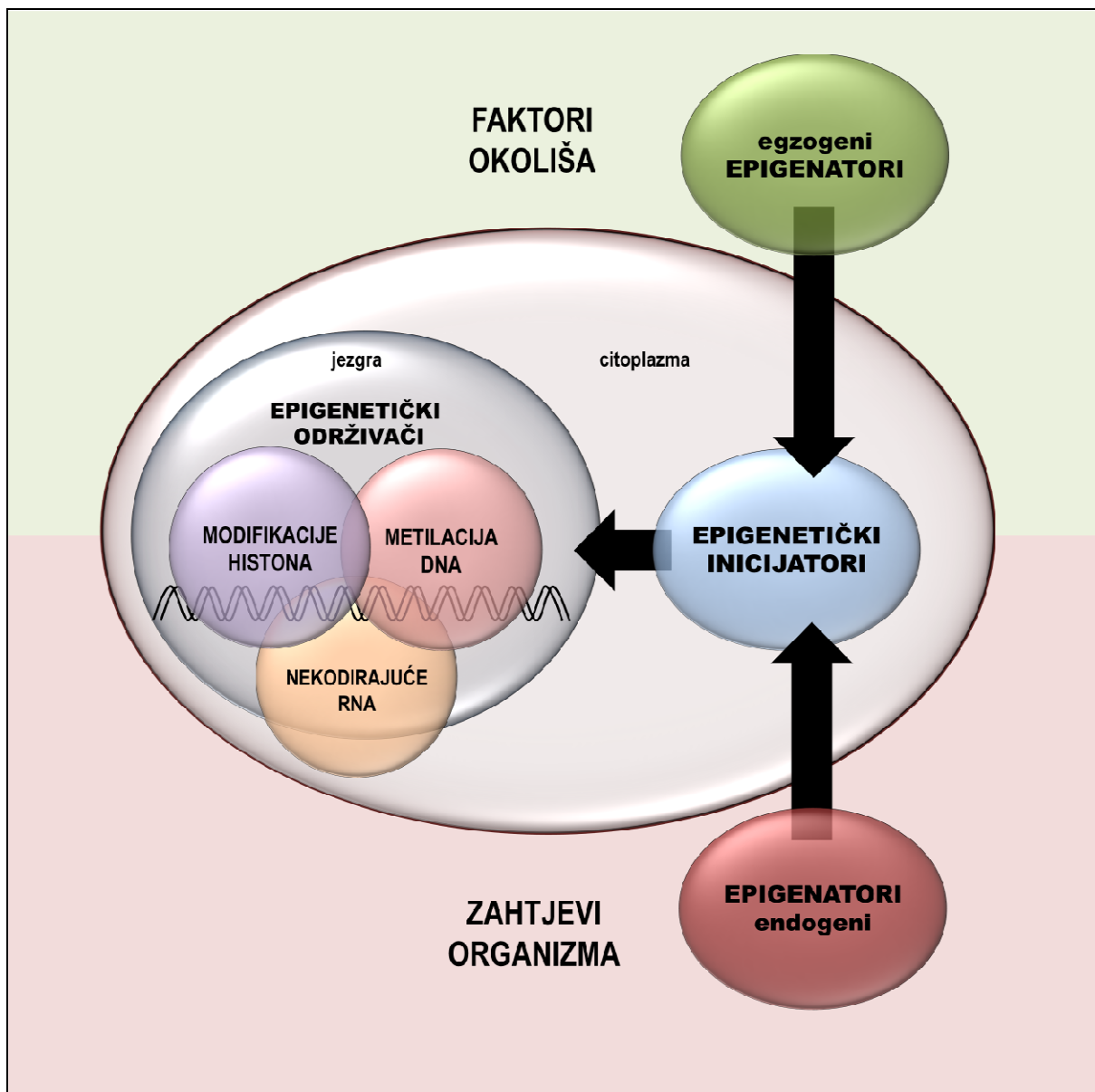
4.5. Stanične linije iz trofoblasta

Stanične linije izvedene iz trofoblasta postale su važno sredstvo za proučavanje razvoja placente i njezine funkcije. Svaka od široko upotrebljavanih staničnih linija ima svoje jedinstveno podrijetlo, funkcionalne karakteristike i antigena svojstva (Hannan et al. 2010). Stanične linije izvedene iz gestacijskih koriokarcinoma su prve koje su razvijene i pokazale su se nezamjenjivim u proučavanju migracije trofoblasta. Naime, za razliku od ostalih tumorskih stanica, pojedine stanične linije izvedene iz gestacijskih koriokarcinoma zadržavaju svoj invazivni potencijal u kulturi (Frank et al. 1999). Postoji više staničnih linija koje su u upotrebi već skoro 40 godina. One uključuju linije JAR, JEG-3, BeWo i AC1M. JAR i JEG-3 linije široko su upotrebljavane u proučavanju molekularnih mehanizama proliferacije i invazivnog potencijala (Hannan et al. 2010).

5. Metilacija DNA

5.1. Epigenetika

Epigenetika predstavlja relativno mladu znanstvenu disciplinu koja se razvila usporedno s razvitkom napredne tehnologije. U novije vrijeme dolazi do njenog brzog napretka te je uključena u gotovo sve grane moderne biomedicine i znanosti o životu općenito. Proizašla je iz hipoteze C.H. Waddingtona, britanskog znanstvenika koji je 1942. godine pokušao objasniti proces manifestiranja genoma u fenotipu jedinke (Waddington 2012), a što općenito odgovara modernome shvaćanju kontrole regulacije ekspresije gena i strukture kromatina. Najprepoznatljiviji epigenetski fenomeni su inaktivacija X kromosoma te ekspresija gena u ovisnosti o roditeljskom podrijetlu (parentalni imprinting) (Turnpenny & Ellard 2011). Predložene su tri razine epigenetskog sustava koje sudjeluju u uspostavi stabilnog nasljednog epigenetskog stanja (epigenom). Izvanstanični signal, koji se naziva epigenator, potječe iz okoliša i može potaknuti početak unutarstaničnog epigenetskog puta. Epigenetski inicijator prima signal od epigenatora te određuje točnu lokaciju u DNA na kojoj identificira lokuse u DNA odnosno gene čijom promjenom ekspresije stanica može odgovoriti na dobivenu informaciju. Epigenetski održivači provode epigenetske promjene, ali i održavaju kromatinsko okruženje u početnim i kasnijim generacijama. (Berger et al. 2009).



Slika 5.1. Epigenetski sustav

Većina epigenetskih promjena uspostavlja se tijekom diferencijacije i održava se stabilnima kroz mnogostruke cikluse dioba, što omogućuje stanicama da imaju različite morfologije i funkcije, a sadrže istu genetsku informaciju. Ova nasljednost uzoraka ekspresije gena posredovana je epigenetskim modifikacijama, koje obuhvaćaju metiliranje citozinske baze u DNA, posttranslacijske modifikacije histonskih proteina kao

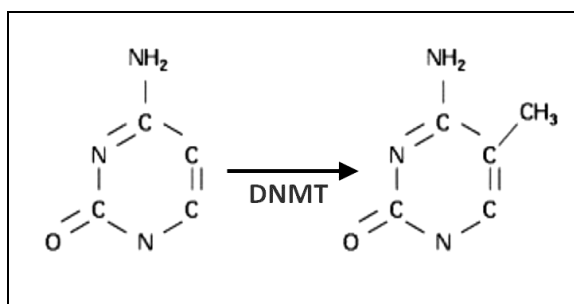
i reorganizacije nukleosoma te RNA i DNA. Neuspjeh pravilnog održavanja nasljednih epigenetskih oznaka može rezultirati neprikladnom aktivacijom ili inhibicijom raznih signalnih puteva i dovesti do bolesti kao što je rak (Sincic & Herceg 2011).

5.1.1. Epigenetika neoplastičnih procesa

Nedavna istraživanja istaknula su važnost epigenetskih mehanizama u regulaciji organizacije kromatina i ekspresije gena te pokazala da njihova promjena od strane okoliša i vanjskih faktora može potaknuti razvoj tumora (Herceg & Vassière 2011). Stanice raka nakupljaju epigenetske nepravilnosti uz brojne genetske izmjene (Jones & Baylin 2002). Te mutacije i epimutacije međudjeluju na svim stupnjevima razvoja raka, radeći zajedno na progresiji bolesti (Jones & Laird 1999). Patološki izmjenjen epigenom pronađen je i u iznimno ranoj fazi razvoja tumora što nameće hipotezu alteriranog epigenoma kao možebitno prvog događaja na putu stanične transformacije u razvoju tumora (Sharma et al. 2010). Epigenom raka karakteriziran je globalnim promjenama metilacije DNA i modifikacije histona kao i promjenom ekspresije kromatin-modificirajućih enzima što sve dovodi do poremećene ekspresije gena i nestabilnosti kromatina (Egger et al. 2004). Epimutacije mogu dovesti do utišavanja gena supresora tumora samostalno i u kombinaciji sa štetnim genetskim mutacijama. U tom slučaju, epimutacija služi kao drugi udarac potreban za inicijaciju raka u skladu s modificiranom teorijom dvostrukog udarca Alfreda Knudsona (Jones & Laird 1999). Epimutacije mogu dovesti do tumorigeneze i aktivacijom onkogeni. Ipak, događaji koji dovode do tih epimutacija nisu još u poznati u cijelosti (Sharma et al. 2010).

5.2. Metilacija DNA

Metilacija DNA je prva opisana i najistraženija epigenetska modifikacija. Predstavlja kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG), čime se citozin pretvara u 5-metilcitozin (5mC) odnosno novu, petu bazu (Lister & Ecker 2009a). Reakciju katalizira enzim DNA metiltransferaza (DNMT) koja katalizira prijenos metilne skupine na peti ugljikov atom citozinskog prstena.



Slika 5.1. Dodavanje metilne skupine na citozinski prsten katalizirano DNMT-om

5mC tvori DNA metilacijski kod, prigušuje transkripciju i sudjeluje u održavanju stabilnog heterokromatinskog stanja. Humani genom sadrži 2-5% CpG-a asimetrične distribucije (Sawan et al. 2008). Postoje i regije bogate CpG dinukleotidima koje se čine imunima na metilaciju (Ehrlich et al. 1982). Takve regije nazivamo CpG otocima. Nalaze se u promotorskim regijama preko 50% gena na koje otpada tek 1% ukupnog genoma (Jones & Liang 2009). Regulacijska uloga ekspresije gena postiže se metilacijom unutar i na rubovima CpG otoka (Irizarry et al. 2009). Ukoliko je promotor gena metiliran, pokreće se mašinerija ostalih epigenetskih modifikacija koje dovode do “zatvorene” strukture kromatina, odnosno heterokromatizacije. Transkripcijskim je faktorima otežan pristup molekuli DNA te ne dolazi do formiranja inicijacijskog transkripcijskog kompleksa

(De Carvalho et al. 2010; Cedar & Bergman 2009). Obrazac metilacije DNA, odnosno metiloma u normalnih stanica je tkivno specifičan. U tumorskim stanicama metilom je izmjenjen u dva smjera: ukupni gubitak 5mC-a (globalna hipometilacija) i hipermetilacija promotora određenih gena (Feinberg & Tycko 2004; Jones & Baylin 2007). Globalna demetilacija postignuta je demetilacijom uglavnom ponavljajućih sekvenci, transpozona te ostalih nekodirajućih regija genoma. U tumorskim stanicama hipometiliranu DNA nalazimo također unutar promotora gena matičnosti, protoonkogeni/onkogeni, gena staničnog ciklusa, gena inhibitora apoptoze, a hipermetiliranu u promotorima gena supresora tumora, proapoptotičkih gena, gena negativnih regulatora staničnog ciklusa i diferencijacijskih gena (Eden et al. 2003).

5.2.1. Hipermetilacija DNA

Lokalna (gen specifična) hipermetilacija je definirana kao hipermetilacija promotorske regije gena supresora tumora, a smatra se pokretačem inaktivacije gena, odnosno gubitka njihove funkcije (Jones & Baylin 2007). Hipermetilacija DNA se uobičajeno javlja u CpG otocima (Feinberg & Tycko 2004), ali istraživanja ukazuju da promjene metilacije DNA mogu biti češće oko nego u samim otocima (Irizarry et al. 2009). CpG hipermetilacija promotora gena supresora tumora je jedan od najčešćih epigenetskih događaja u malignim stanicama i jedan od najčešćih mehanizama inaktivacije gena supresora tumora. Ipak, osim CpG-a, pronađene su i CpA sekvence koje služe kao ciljna mjesta DNMT-a i čija metilacija, čini se, prethodi metilaciji CpG otoka (Ramsahoye et al. 2000). Posljedice i uloge epimutacija u CpA dinukleotida u tumorigenezi tek se istražuju.

5.2.2. Globalna demetilacija

Vjeruje se da je gubitak 5mC u visokoponavljajućim sekvencama DNA, koje obuhvaćaju oko polovicu genoma, odgovoran za globalnu hipometilaciju transformiranih stanica. Hipometilacija je prva epimutacija zamijećena u karcinomima prije više od četvrt stoljeća te je dokazana u gotovo svim karcinomima. Ipak, njena uloga ostaje slabo poznata (Feinberg & Vogelstein 1983; Wild & Flanagan 2010). Postoje dokazi da ima važnu ulogu u aktivaciji gena povezanih s tumorskom invazijom i metastaziranjem te nestabilnosti kromatina (Ateeq et al. 2008). Slično kao i hipermetilacija DNA, gubitak metilacije može biti tumor specifičan, odnosno u različitim tumorima mogu specifično biti hipometilirane različite regije genoma (Wermann et al. 2010). Zanimljivo je da se hipometilacija čini ranim događajem u karcinogenezi, iako globalne razine metilacije DNA mogu proći daljnje promjene tijekom tumorske progresije. Globalna razina metilacije u genomskoj DNA pokazala se korisnim biomarkerom rizika od razvoja pojedinog tipa tumora te može biti iskorištena u testiranju rizika i molekularnoj epidemiologiji (Sinčić, Herceg 2011).

6. Metilacija DNA u koriokarcinomima

Placenta je po svojoj prirodi semi-maligno tkivo te djeli mnoge karakteristike s tumorima poput globalne hipometilacije i hipermetilacije gena supresora tumora. Tako već i u zdravoj placenti nalazimo 3% metilirane DNA, što je sličnije tumorskom tkivu (2,5 - 3,5%), nego somatskim stanicama (4 - 5%) (Gama-Sosa et al. 2014). Jednako kao i kod ostalih karcinoma, neoplastična transformacija trofoblasta je višestupanjski proces i uključuje multiple genetske alteracije poput aktivacije onkogena i inaktivacije gena supresora tumora (Li et al. 2002).

Hipermetilacija promotora je bitan epigenetski mehanizam inaktiviranja gena. Geni supresori tumora, uključujući regulatore staničnog ciklusa (*p16*), gene zadužene za popravak i zaštitu DNA (*Brca1* and *Gstp1*), apoptozu (*Dapk*), staničnu adherenciju i proces metastaziranja (*E-kadherin*, *Timp3*) mogu biti utišani metilacijom promotorskih CpG otoka te doprinjeti karcinogenezi. Dokazno je da je hipermetilacija *E-kadherina* povezana s njegovom slabijom ekspresijom u hidatiformnoj moli (Xue et al. 2003), dok je u koriokarcinomima primjećena hipermetilacija *H19* i *Tfpi* gena (Hubé et al. 2003; Kanduri et al. 2002). Primjećena je povezanost epimutacijske inaktivacije gena *p16* putem metilacije s malignom transformacijom trofoblasta. Štoviše, hipermetilacija *p16* javlja se češće u pacijenata s aktivnom bolesti nego kod onih u regresiji. Hipermetilacija samog promotora *p16* relativno je specifična u predviđanju razvoja neoplazije. Analiza metilacijskog statusa *p16* i *E-kadherina* zajedno dodatno podiže osjetljivost metode. Ipak, metilacijski status samog *E-kadherina*, čini se, ne pokazuje statističku povezanost s kliničkim ishodom (Xue et al. 2004). *P16* kodira za protein koji pripada obitelji inhibitora ciklin ovisnih kinaza (Cdk). Inhibira Cdk 4 i 6 i ciklin D te tako spriječava ulazak stanice u S fazu (Serrano et al. 1993). Metilacijsko utišavanje *p16* pronađeno je kao učestali

događaj u nekim tipovima tumora poput tumora kolona, prostate, jednjaka te u karcinomima gušterače.

Koriokarcinomi pokazuju i gubitak ekspresije gena koji utječu na metastatski potencijal karcinoma, kao što su *Nm23* i *Kiss-1* (Xue et al. 2003). Imaju ulogu regulacije invazije i migratornih svojstava fiziološkog trofoblasta. Podaci upućuju na povezanost ekspresije *Nm23-H1* s proliferacijskom aktivnošću trofoblasta jer razina njegove ekspresije postupno raste iz normalnog trofoblasta, preko hidatiformne mole te je najviša u stanicama koriokarcinoma (Iwase et al. 2001).

Također, dokazana je i smanjena ekspresija tkivnog inhibitornog faktora 2 (*Tfpi-2*). Protein TFPI-2 dio je porodice inhibitornih serinskih proteinaza tipa Kunitz, a može inhibirati različite serinske proteaze uključujući faktor VIIa, faktor Xa, plazmin, tripsin, kemotripsin i plazma kalikrein. Gen *Tfpi-2* identificiran je kao gen supresor tumora, te je opisana hipermetilacija njegovog promotora u stanicama koriokarcinoma (Hubé et al. 2003).

Hipermetilacija *Timp3* detektirana je u koriokarcinomima, ali ne i u hidatiformnim molama te se možda radi o događaju kasno u karcinogenezi (Xue et al. 2004). TIMP3 suprimira rast, inhibira angiogenezu i inducira apoptozu. Inaktivacija transkripcije *Timp3*, putem hipermetilacije, pronađena je u malignijim i invazivnijim fenotipovima karcinoma (Lee et al. 2002). Upravo se zbog toga, gubitak ekspresije *Timp3* u koriokarcinomima povezuje s inaktivacijom više mehanizama supresije tumora.

Hic1 gen (engl. *hypermethylated in cancer 1*), neobičan je po tome što cijeli gen sadrži CpG bogata područja. Djeluje kao regulator rasta i gen supresor tumora. *Hic1* je uobičajeno hipermetilirani i transkripcijski neaktivan u leukemijama, meduloblastomima, karcinomu dojke, prostate i vrata maternice, ali i u hidatiformnoj moli te u koriokarcinomu

gdje se smatra ranim događajem u razvoju GTD-a i jedan je od najčešće metiliranih gena u malignim stanicama (Xue et al. 2004).

Istraživanja provedena na staničnim linijama izvedenima iz trofoblasta pokazuju da one u usporedbi sa stanicama fiziološkog trofoblasta imaju ukupno povišen stupanj metilacije u promotorskim regijama. Tako je u staničnim linijama BeWo i JAG zabilježen 749 gen čiji su promotori bili hipermetilirani dočim je u trofoblastu bilo hipermetilirano tek 33 gena (Novakovic et al. 2011). ASPP1 je jedan iz obitelji P53 apoptoza-stimulirajućih proteina, skupine proteina koji mogu regulirati apoptotsku funkciju divljeg tipa *p53*. U uzorcima koriokarcinoma kao i u staničnim linijama JAR i JEG-3 dokazan je značajan gubitak ekspresije *Aspp1* u usporedbi s normalnim posteljicama. Razina mRNA *Aspp1* značajno korelira s metilacijskim statusom promotora, te je niža aktivnost ASPP1 pronađena u hidatiformnim molama koje su napredovale do koriokarcinoma u usporedbi s onima koje su regredirale (Mak et al. 2011).

Oktamer vezujući transkripcijski faktor 4 (OCT4) i SOX2 su transkripcijski faktori koji imaju ključnu ulogu u održavanju pluripotencije embrionalnih matičnih stanica. OCT4 protein kodiran je genom *Pou5f1* te je od kritične važnosti pri samoobnovi nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica. Zbog toga se OCT4 često koristi kao marker nediferenciranih stanica. Ekspresija *Pou5f1* mora biti precizno regulirana jer će bilo kakva pogreška dovesti do promjene u diferencijaciji. Snižena razina *Pou5f1* mRNA zabilježena je u stanicama JAR i JEG-3 dočim *Sox2* u stanicama koriokarcinoma čemu je uzrok hipermetilacija njihove promotorske regije (Zhang et al. 2008; Li et al 2008).

Glutation S - transferaza pi (GSTP1) je glavni faza II detoksicirajući enzim u većini tipova stanica. Katalizira konjugaciju brojnih hidrofobnih i elektrofilnih spojeva. *Gstp1* je polimorfni gen koji kodira za funkcionalno različite aktivne proteine koji djeluju

na metabolizam ksenobiotika i igraju ulogu u osjetljivosti na rak i druge bolesti. Aberantna ekspresija *Gstp1* povezana je s karcinogenezom i razvojem rezistencije na lijekove. Utvrđeno je da se djelomična metilacija promotora *Gstp1* nalazi u BeWo stanicama (Slonchak et al. 2009).

Primjećena je i hipermetilacija gena supresora tumora *Apc* (engl. *adenomatous polyposis coli*) u svim staničnim linijama izvedenim iz koriokarcinoma (Wong et al. 2008). On kodira za protein koji djeluje kao antagonist Wnt signalnog (protoonkogenog) puta. Također je uključen u staničnu migraciju, adheziju, aktivaciju transkripcije i apoptozu. Ista stvar primjećena je i kod receptora 1,25-dihidroksivitamina D3 (*Vdr*) i retinoidnog X receptora alfa (*Rxra*) čija je ekspresija vrlo niska u odnosu na onu normalne terminske placente (Pospechova et al. 2009).

Gen *Gdf15* (engl. *growth differentiation factor 15*) kodira za koštani morfogenetSKI protein koji spada u skupinu transformirajućih faktora rasta beta te regulira diferencijaciju tkiva, a pokazuje gubitak ekspresije u stanicama koriokarcinoma. Gubitak ekspresije pokazuje i gen *Igfbp3* (engl. *insulin-like growth factor binding protein 3*) koji kodira za istoimeni protein. Nasuprot tome, gen *Ccnb1* (engl. *cyclin B1*), koji kodira za protein s regulativnom funkcijom mitoze, pokazuje intenzivniju transkripciju (Feng et al. 2004).

Gotovo potpuni gubitak metilacije nađen je u *Dnmt1* u JAR, BeWo i JEG-3 staničnim linijama u odnosu na citotrofoblast prvog semestra i tkivo posteljice. Nagađa se da je veća ekspresija *Dnmt1* uključena u nastanak tih tumora. Konzistentne promjene otkrivene su u *Dnmt3L* promotoru s povećanjem metilacije u JEG-3 stanicama i smanjenom razinom u JAR stanicama. Primjećena je povećana aktivnost *Dnmt* gena nezavisno od metilacije promotora. Nagađa se da povećanje *Dnmt1* aktivnosti olakšava aberantnu metilaciju gena supresora tumora povezanu s nastankom raka. Učinkovitost

inhibicije DNMT1 u obnovi aktivnosti supresije tumora, poticanju zastoja staničnog ciklusa i inhibiciji tumorskog rasta (Brueckner et al. 2007) podupire ovu hipotezu.

Povećanje razine metilacije nađeno je i u genima *Sfrp2*, *Hr-1*, *Sim-1*, *Cd44*, *Egr4* i *Dcc-1* u sve tri stanične linije što pruža uvjerljive dokaze za vezu između daljnjeg smanjivanja aktivnosti tih gena i tumorogenih procesa koji dovode do koriokarcinoma (Novakovic et al. 2008).

6.1. Epigenetska terapija koriokarcinoma

Pažljivo praćenje pacijenata s hidatiformnom molom dovelo je do značajnog pada mortaliteta od koriokarcinoma. Ipak, takav oblik praćenja podrazumijeva učestale kontrole te sustavno mjerenje razine beta hCG u krvi što stvara teret kako pacijentu zbog utjecaja na kvalitetu života tako i cijeloj zajednici zbog potrošnje resursa i opterećenja zdravstvenog sustava. Naime, manje od 30% pacijenata s hidatiformnom molom zahtijeva tako detaljnu skrb. Kada bi pacijenti koji će razviti maligniju formu GTD-a mogli biti identificirani u vrijeme prve dijagnoze (dijagnoze molarne trudnoće) mogao bi se uvelike smanjiti broj nepotrebnih praćenja. Upravo znanstvena istraživanja pokazuju da ishod hidatiformne mole može biti procenjen određivanjem metilacijskog statusa promotora te imunohistokemijskim metodama nakon evakuacije molarne trudnoće. Tako, čini se, mogu biti izdvojeni pacijenti visokog rizika koji bi primali profilaktičnu kemoterapiju. Gen *p16* smatra se kandidatom, ali su potrebna daljnja istraživanja (Xue et al 2004).

Koriokarcinomi pokazuju hipermetilaciju mnogih gena od kojih su za maligni potencijal najvažniji geni supresori tumora te proapoptoski geni koji se ovim

mehanizmom inaktiviraju. Za razliku od genetskih promjena, epigenetske promjene mogu se poništiti farmakološkom intervencijom, te su one prepoznate kao meta za razvijanje tumorske terapije. Budući da metilacija ne mijenja slijed nukleotida u sekvenci DNA, mnogo pažnje usmjereno je na razvoj malih molekula inhibitora DNMT (Ghoshal & Bai 2007). Zbog toga su u istraživanju lijekovi koji inhibiraju metilaciju DNA poznati kao demetilirajući agensi. Tri najčešće korištena katalitička inhibitora DNMT su kemijski analozi citidina: 5-azaC (azacitidin), 5-azaCdR (decitabin) i zebularin (Subramaniam et al. 2014). U istraživanjima je dokazano da stanične linije tretirane 5-aza-2'deoksicitidinom pokazuju povećanu ekspresiju *Rasff1A* (Chiu et al. 2007), *Oct4* (Zhang et al. 2008), *H19* (Ito et al. 2013), *Sox2* (Li et al. 2008) i *Ccnb1* (Feng et al. 2004), dok je ekspresija *Igf2* (Ito et al. 2013), *Gdf15* i *Igfbp3* (Feng et al. 2004) snižena što odgovara metilacijskom profilu fiziološkog trofoblasta.

7. Zaključak

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razvili efikasniji lijekovi te pronašla nova ciljna mjesta njihovog djelovanja. Također, trebamo unaprijediti razumijevanje procesa koji dovode do promjenjenog metilacijskog obrasca.

Kako same promjene u metilaciji DNA ne mogu u potpunosti objasniti razlike između stanica koriokarcinoma i onih placente, postoji potreba za istraživanjem drugih epigenetskih procesa u stanicama trofoblasta.

8. Zahvale

Zahvaljujem svom mentoru dr.sc. Ninu Sinčiću na uloženom trudu, vremenu i korisnim savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studija.

9. Literatura

- Ateeq B1, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA (2008) Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia* 10(3):266-78.
- Bakri Y, Berkowitz RS, Goldstein DP, Subhi J, Senoussi M, von Sinner W, Jabbar FA (1994) Brain metastases of gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 39(3):179.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23:781-3.
- Berkowitz RS, Goldstein DP, Bernstein MR (1984) Modified triple chemotherapy in the management of high-risk gestational trophoblastic tumors. *Gynecol Oncol* 19:173–181.
- Brueckner B, Kuck D, Lyko F (2007) DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 13(1):17-22.
- Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10:295-304.
- Cheung AN (2003) Pathology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:849-868
- Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM (2007) Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol* 170(3):941-50.

- De Carvalho DD, You JS, Jones PA (2010) DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* 20:609-17.
- Diver E, May T, Vargas R, Bernstein M, Goldstein D, Berkowitz R (2013) Changes in clinical presentation of postterm choriocarcinoma at the New England Trophoblastic Disease Center in recent years. *Gynecol Oncol* 130(3):483-6.
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300:455.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10:2709-21.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301(5895):89-92.
- Feinberg AP, Tycko B (2004) History of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4:143-153
- Feng H, Cheung AN, Xue WC, Wang Y, Wang X, Fu S, Wang Q, Ngan HY, Tsao SW (2004) Down-regulation and promoter methylation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 94(2):375-82.
- Frank HG, Funayama H, Gaus G, Schmitz U (1999) Choriocarcinoma-trophoblast hybrid cells: Reconstructing the pathway from normal to malignant trophoblast—Concept and perspectives: A review. *Placenta* 20(1):11-24.

- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 11:6883–6894.
- Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B (2009) Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30 S:49-54.
- Ghoshal K, Bai S (2007) DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 43(6):395–422.
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* 82(2):235-45.
- Herceg Z, Vaissière T (2011) Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 6(7):804-19.
- Hertz R, Li MC, Spencer DB (1956) Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 93(2):361.
- Hubé F, Reverdiau P, lochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y (2003) Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biol Chem* 384(7):1029-34.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41:178-186
- Ito Y, Nativio R, Murrell A (2013) Induced DNA demethylation can reshape chromatin topology at the IGF2-H19 locus. *Nucleic Acids Res* 41(10):5290-302.

- Iwase K, Okamoto T, Nui R, Mizutani S (2001) Expression of nm23-H1 in hydatidiform mole and its relationship with the development of postmolar disease. *Gynecol Obstet Invest* 51(4):228-32.
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683-692
- Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10:805-11.
- Kanduri C, Kanduri M, Liu L, Thakur N, Pfeifer S, Ohlsson R (2002) The kinetics of deregulation of expression by de novo methylation of the h19 imprinting control region in cancer cells. *Cancer Res* 62(16):4545-8.
- Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH (2002) Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 161(3):1015-22.
- Li AS, Siu MK, Zhang H, Wong ES, Chan KY, Ngan HY, Cheung AN (2008) Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Reprod Sci* 15:735–744.
- Li HW, Tsao SW, Cheung AN (2002) Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 23(1):20-31.
- Lister R, Ecker JR (2009a) Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 19:959-66.

- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009b) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315-22.
- Mak VC, Lee L, Siu MK, Wong OG, Lu X, Ngan HY, Wong ES, Cheung AN (2011) Downregulation of ASPP1 in gestational trophoblastic disease: correlation with hypermethylation, apoptotic activity and clinical outcome *Mod Pathol* 24(4):522-32.
- Novakovic B, Rakyan V, Ng HK, Manuelpillai U, Dewi C, Wong NC, Morley R, Down T, Beck S, Craig JM, Saffery R (2008) Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first-trimester cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 14(9):547-54.
- Novakovic B, Wong NC, Sibson M, Ng HK, Morley R, Manuelpillai U, Down T, Rakyan VK, Beck S, Hiendleder S, Roberts CT, Craig JM, Saffery R (2010) DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta. *J Biol Chem* 285(13):9583-93.
- Novakovic B, Gordon L, Wong NC, Moffett A, Manuelpillai U, Craig JM, Sharkey A, Saffery R (2011) Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines: implications and opportunities for understanding trophoblast function. *Mol Hum Reprod* 17(6):344-53.
- Paradinas FJ, Elston CW, Haines M (2003) Gestational trophoblastic diseases. Fox H, Wells M. Haines & Taylor *Obstetrical and Gynaecological Pathology*. London, Churchill Livingstone

- Poaty H, Coullin P, Leguern E, Dessen P, Valent A, Afoutou JM, Peko JF, Candelier JJ, Gombé-Mbalawa C, Picard JY, Bernheim A (2012) Cytogenomic studies of hydatiform moles and gestational choriocarcinoma. *Bull Cancer* 99(9):827-43.
- Pospechova K, Rozehnal V, Stejskalova L, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmund W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V, Pavek P (2009) Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 299(2):178-87.
- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5237-5242.
- Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 642:1-13.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456):704-7.
- Shanbhogue AK1, Lalwani N, Menias CO (2013) Gestational trophoblastic disease. *Radiol Clin North Am.* 51(6):1023-34.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27-36.
- Sinčić N, Herceg Z (2011) DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 23(1):69-76.
- Slonchak AM, Chwieduk A, Rzeszowska-Wolny J, Yu Obolenska M (2009) Transcription regulation in differential expression of the human GSTP1 gene in breast and choriocarcinoma cells. *Ukr Biokhim Zh* 81(4):48-58.

- Strohl AE, Lurain JR (2014) Clinical Epidemiology of Gestational Trophoblastic Disease. *Curr Obstet Gynecol Rep* 3:40-43
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014) DNA Methyltransferases: A Novel Target for Prevention and Therapy. *Front Oncol.* 4:80.
- Šimunić V i suradnici (2001) *Ginekologija*. Zagreb Naklada Ljevak
- Turnpenny PD, Ellard S(2011) *Emeryjeve osnovne medicinske genetike*. Zagreb, Medicinska Naklada
- Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41(1):10-3.
- Wermann H, Stoop H, Gillis AJ, Honecker F, van Gurp RJ, Ammerpohl O, Richter J, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH (2010) Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 221(4):433-42.
- Wild L, Flanagan JM (2010) Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta* 1806(1):50-7.
- Wong NC, Novakovic B, Weinrich B, Dewi C, Andronikos R, Sibson M, Macrae F, Morley R, Pertile MD, Craig JM, Saffery R (2008) Methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human placenta and hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Cancer Lett* 268(1):56-62.
- Xue WC, Feng HC, Tsao SW, Chan KY, Ngan HY, Chiu PM, Maccalman CD, Cheung AN (2003) Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer* 13(6):879-88.

- Xue WC, Chan KY, Feng HC, Chiu PM, Ngan HY, Tsao SW, Cheung AN (2004) Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *J Mol Diagn* 6(4):326-34.
- Zhang HJ, Siu MK, Wong ES, Wong KY, Li AS, Chan KY, Ngan HY, Cheung AN (2008) Oct4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Placenta* 29:549–554.
- Zhao J, Xiang Y, Wan XR, Cui QC, Yang XY (2006) Clinical and pathologic characteristics and prognosis of placental site trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 51(12):939-44.

10. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime: Martina Štenger

Datum i mjesto rođenja: 17. svibnja 1989. Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Kaptolska 44, 10000 Zagreb

Email: martinastenger@gmail.com

Obrazovanje

2012. - 2013. Université Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine

56 Rue du Port, Lille

2008. - 2014. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski Fakultet

Šalata 3, Zagreb

2004. - 2008. XV. Gimnazija

Jordanovac 8, Zagreb

1997. - 2004. Završena osnovna glazbena škola „Zlatko Baloković“

Ivanićgradska 41, Zagreb

Instrument: violina

1996. - 2004. Osnovna škola „Davorin Trstenjak“

Krčka 3, Zagreb

Proglašena učenikom generacije

Strani jezici

Engleski

(osnovna škola i završen 7. stupanj Škole stranih jezika „Vodnikova“)

Francuski

(završen 6. stupanj u Francuskoj Alijansi, položen DELF A2)

Njemački (osnovna i srednja škola)

Radno iskustvo

2013.-2014. Demonstrator iz predmeta “Pedijatrija” na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2010.-2012. Demonstrator iz predmeta “Fiziologija” na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2008., 2009. držanje instrukcija za učenike osnovnih i srednjih škola iz matematike i informatike, te solfeggia za učenika osnovnih glazbenih škola

srpanj 2007. ECCOS inženjering

pomoćni poslovi (backup podataka, kodiranje kartica za kontrolu pristupa i registraciju radnog vremena, organizacija elektronskog imenika,...)

Znanja i vještine

Rad na računalu (OS Windows *, OS Linux, uredski alat MS Office, programski jezik C++)

Vozačka dozvola B kategorije

Posebna dostignuća

2010./2011. Dodijeljena dekanova nagrada za najboljeg studenta

2008. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike

2008. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike

2007. Sudjelovanje na međunarodnom informatičkom natjecanju American Computer Science League (ACSL), Huston(TX), SAD (4. mjesto)

2007. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike (6. mjesto)

2007. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike (7. mjesto)

2006. Sudjelovanje na informatičkom natjecanju „Kup Božo Težak“
(3. mjesto)

2005. Sudjelovanje na međunarodnom informatičkom natjecanju American Computer Science League (ACSL), Allentown(PA), SAD (2. mjesto)

2005. Sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike (6. mjesto)

2004. Natječaj Erato za najljepšu lirsku pjesmu, Međunarodni institut za književnost

Pjesma objavljena u zbirci

Priznanje za doprinos književno-umjetničkom stvaralaštvu mladih u Republici Hrvatskoj

Ostalo

Trenutno plešem salsu i argentinski tango, te se bavim plesom na šipci.

Završila sam tečaj bridža u Bridž klubu „Dr. Jurica Tomljenović“ pri Fakultetu elektrotehnike i računalstva.

U slobodno vrijeme čitam (znanstveno)fantastičnu književnost, pečem kolače te se družim s prijateljima.

Volim putovati, stjecati nova znanja i vještine, te stvarati nova poznanstva i prijateljstva.