

Rak vrata maternice i metiliranje DNK

Nina Milutin Gašperov,^{1,2} Magdalena Grce¹

¹Laboratorij za molekularnu virologiju i bakteriologiju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb

²Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti

SAŽETAK Rak vrata maternice razvija se dulji niz godina kroz nekoliko stadija cervikalnih intraepitelnih neoplazija do invazivnog karcinoma. Progresija prekanceroznih lezija vrata maternice ovisi uglavnom o prisutnosti trajne infekcije s onkogenim tipovima humanog papiloma virusa (HPV). Osim toga, u progresiji do karcinoma značajnu ulogu imaju epigenetički događaji. Epigenetička promjena, kao metiliranje DNK promotorske regije gena, gdje započinje transkripcija, rezultira utišavanjem mnogih gena. Stoga transkripcijsko utišavanje putem metiliranja DNK ključnih gena koji kontroliraju diobu stanica te tumor-supresorskih gena, ima značajnu ulogu u nastanku raka. Ovaj epigenetički poremećaj prisutan u mnogim karcinomima može biti izliječen nakon tretiranja inhibitorima metiliranja DNK. U raku vrata maternice promijenjeno metiliranje je opisano u više od dvjesto gena, uključujući i tumor-supresorske gene, što znači da bi promjena metiliranja nekih gena mogla biti dobar biljeg promjena vrata maternice. Međutim, za sada promjena metiliranja niti jednog od opisanih gena u potpunosti ne udovoljava kriterijima dovoljne osjetljivosti i specifičnosti za populacijski probir.

KLJUČNE RIJEČI cervikalna intraepitelna neoplazija; epigenetika; humani papiloma virus; neoplazme vrata maternice

Humani papiloma virus (HPV) neupitan je uzročnik raka vrata maternice.¹ Općenito je poznato da je infekcija HPV-om vrlo proširena; u više od 80% slučajeva eliminira se prirodnim putem, a samo mali broj žena zadrži trajnu infekciju koja dovodi do razvoja raka. Epigenetička regulacija ekspresije gena poremećena je u stanicama inficiranim onkogenim tipovima HPV-a. Stoga promijenjeno metiliranje DNK, kao glavna epigenetička promjena, predstavlja važan biljeg progresije bolesti.

KANCEROGENEZA VRATA MATERNICE

Rak vrata maternice razvija se dulji niz godina (deset i više godina), kroz nekoliko stadija koji se citološki i histopatološki mogu dobro razlikovati. Za razvoj raka vrata maternice ključno je nekoliko događaja: kronična infekcija onkogenim tipovima humanog papiloma virusa (HPV), progresija inficiranih stanica u predstadij raka te invazija kroz bazalnu membranu (slika 1).¹

Anogenitalni HPV-i se prenose kontaktom koža-koža ili sluznica-sluznica. Većinu infekcija imunološki sustav uspije prevladati unutar 1-2 godine nakon izlaganja virusu, dok dulja perzistencija visokorizičnih HPV-a dovodi do smanjenja vjerojatnosti da će doći do spontanog nestanka virusa i povećava izgleda za razvoj predstadija raka te samog raka.²

U razvoju raka vrata maternice postoji nekoliko stadija koji se citološki i histopatološki mogu dobro razlikovati. Citološki se promjene pločastog epitela vrata

maternice dijele na SIL (*Squamous Intraepithelial Lesion*) niskog (LSIL, *Low*) i visokog stupnja (HSIL, *High*), dok se histopatološki može razlikovati više stadija: od blažih cervikalnih intraepitelnih neoplazija, CIN1, preko postupno težih, CIN2 i 3, sve do invazivnog karcinoma. U LSIL se uvrštavaju laka displazija (CIN1) i citološke promjene povezane s HPV-infekcijom, a u HSIL se uvrštavaju srednje teška (CIN2), teška displazija (CIN3) i karcinom *in situ* (CIS, *Carcinoma In Situ*).³

Predstadiji raka CIN1-3 definirani su kao histopatološke promjene koje, ako ih se ne liječi, imaju kapacitet potencijalno napredovati u smjeru razvoja karcinoma.¹ Promjena prvog stupnja, CIN1, najčešće je karakterizirana nediferenciranim, promijenjenim stanicama s netipičnom jezgrom, koje zahvaćaju do 1/3 epitela. Progresija ovog stadija u neoplazije višeg stupnja ili rak nije vjerojatna te uglavnom, ove promjene, spontano nestaju. CIN2 predstavlja histopatološke promjene kod kojih abnormalne stanice zauzimaju 2/3 epitela. Kod njih je češće prisutna DNK visokorizičnih tipova HPV-a te je veća vjerojatnost napredovanja u karcinom. CIN3, kao i CIS, je karakteriziran stanicama s genetičkim abnormalnostima, koje gotovo u potpunosti zamijene normalne stanice cervikalnog epitela, ali još ne dolazi do proboja bazalne membrane. Ove promjene su u većini slučajeva povezane s visokorizičnim tipovima HPV-a. Konačno, invazivni karcinom vrata maternice je promjena koja podrazumijeva najveće promjene epitela te proboj promijenjenih stanica kroz bazalnu membranu te širenje.¹

HUMANI PAPILOMA VIRUS

Iako se držalo da su papiloma virusi (PV, *Papilloma Virus*) usko povezani s polyoma virusima, na temelju čega su svrstani u zajedničku porodicu *Papovaviridae*, danas PV i *polyoma* virusi čine zasebne porodice: *Papilloma viridae*, odnosno *Polyomaviridae*.⁴

Do sada je određen slijed nukleotida genoma za više od 100 različitih tipova HPV-a.⁵ Približno 40 tipova inficira sluznicu anogenitalnog područja (tablica 1), a 15 ih je pronađeno u biopsijama raka vrata maternice te su okarakterizirani kao visokorizični (HR, *High Risk*), odnosno onkogeni tipovi HPV-a (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82).⁶ Za razliku od visokorizičnih, niskorizični (LR, *Low Risk*) tipovi (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89) najčešće uzrokuju dobroćudne genitalne bradavice i vrlo ih se rijetko nalazi u stanicama raka vrata maternice.⁶ Izolati određenog tipa čiji se slijedovi nukleotida gena L1 međusobno razlikuju za 2-10%, označavaju se kao podtipovi, a do sad su poznati samo za neke tipove virusa: HPV 5, 8, 20, 34, 44, 54, 68 i 82. Izolati istog tipa označavaju se kao varijante, u slučaju da im se slijed nukleotida gena L1 razlikuje za manje od 2% od referentnog tipa.⁷

Učestalost pojedinih tipova HPV-a u predstadijima raka vrata maternice, te učestalost samog raka, različita je u različitim zemljopisnim područjima.⁸ Incidencija infekcije HPV-om je najveća u Africi i Južnoj Americi, a najmanja u Europi, s razlikama u pojedinim regijama. Učestalost infekcije visokorizičnim tipovima je značajno veća u odnosu na infekciju niskorizičnim tipovima. Također, infekcija je mnogo češća kod mlađih žena u usporedbi sa ženama starije dobi. Istraživanja su pokazala da se svake godine zarazi, nekim od visokorizičnih tipova, 5-15% žena, koje do tada nisu bile zaražene.⁹

Istraživanje na približno 10.000 uzoraka invazivnog karcinoma vrata maternice prikupljenih iz čitavog svijeta, pokazalo je da su najčešći tipovi visokorizičnih HPV-a: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 i 58.¹⁰ Ovo istraživanje je potvrdilo da su HPV-tipovi 16 i 18 dominantno povezani s cervikalnim karcinomom; zajedno uzrokuju gotovo 70% svih cervikalnih karcinoma. DNK HPV-a tipa 16 je češće utvrđena u karcinomima pločastih stanica epitela, dok je DNK HPV-a tipa 18 češća u stanicama adenokarcinoma.¹⁰

U Hrvatskoj je u karcinomima pločastih stanica najučestaliji HPV tipa 16 (52%), a u adenokarcinomima HPV tipa 18 (68%).¹¹ Retrospektivna istraživanja učestalosti HPV-a kod žena, u Hrvatskoj, pokazuju da je najučestaliji HPV tipa 16, s učestalošću 15,9% u žena s promjenama vrata maternice različitog stupnja. Slijede ga tipovi HPV-a: 31, 6/11, 33, 18, 52, 45 te 58.¹²

EPIGENETIČKE PROMJENE

Epigenetika je znanost o funkciji genoma, a ima važnu ulogu u raznolikosti bioloških procesa, kao što su embrionski razvoj, biologija raka, imunološki odgovor i mnogi drugi. Epigenetičke promjene su nasljedne promjene u ekspresiji gena koje ne uključuju promjenu slijeda nu-

TABLICA 1. Epidemiološka klasifikacija anogenitalnih tipova HPV-a prema stupnju rizika za razvoj raka vrata maternice (prema: Muñoz i sur., 2003)⁶

Stupanj rizika	Tip HPV-a
visoki	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
vjerojatno visoki	26, 53, 66, 69
niski	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

kleotida u DNK. Ove promjene uključuju metiliranje DNK te posttranslacijske modifikacije histona, kao što su: metiliranje, acetiliranje, fosforiliranje, ubikvitiniranje te sumoiliranje (slika 2).¹³

Transkripcija gena uvelike ovisi o stanju kromatina. Kromatin čine nukleosomi, koji su sastavljeni od molekule DNK veličine 146 pb, omotane oko srži koju čine po dvije kopije histonskih proteina, H2A, H2B, H3 i H4. Ovi proteini podliježu posttranslacijskim promjenama koje imaju važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije i signalnih puteva.¹⁴

Epigenetički mehanizmi, koji uključuju promjene DNK i histona, rezultiraju nasljednim utišavanjem gena (stanično nasljeđivanje) koji nisu promijenjeni u svom kodirajućem slijedu nukleotida. Kako je proučavanje bolesnog stanja kod čovjeka, u prošlosti, uglavnom bilo usredotočeno na proučavanje genetičkih mehanizama, zanemarena je epigenetička komponenta, za koju je dokazano da ima značajni udio u više patoloških stanja, kao što su: rak, različiti sindromi s kromosomskim nestabilnostima te mentalna retardacija. Stoga je važan razvoj novih dijagnostičkih metoda koje otkrivaju ove promjene, ali i novih lijekova, epigenetičke terapije. Ovaj novi terapijski pristup uključuje lijekove, inhibitore enzima, uglavnom DNK-metiltransferaza (DNMTs, *DNA Methyltransferases*) ili histon-deacetilaza (HDACs, *Histone Deacetylases*), koji mogu mijenjati stanje kromatina ili obrazac metiliranja DNK, sami ili u kombinaciji s drugim lijekovima.¹⁵

Dobrim inhibitorima metiliranja DNK su se pokazali analogi nukleozida: 5-Azacitidin (Vidaza), 5-Aza-2'deoksicitin (Decitabine, Dacogen) i Zebularin. Ovi lijekovi se ugrađuju u DNK stanica koje se dijele i stvaraju kovalentne veze sa sve tri DNK-metiltransferaze što rezultira daljnjim inhibiranjem metiliranja DNK te ponovnom ekspresijom utišanih gena. Za sada su od Američke uprave za hranu i lijekove (FDA, *American Food and Drug Administration*) odobreni lijekovi Vidaza i Decitabine i u upotrebi su u liječenju pacijenata s mijeloidnim displastičnim sindromom (MDS, *Myeloid Displastic Syndrome*) i leukemijama.¹⁶ Nadalje, nekoliko inhibitora histon-deacetilaza je u fazi istraživanja, a fenilmaslačna i valproična kiselina (VPA, *Valproic Acid*) su u kliničkoj upotrebi već neko vrijeme.¹⁷ Kako ovi lijekovi inhibiraju sve deacetilaze, nije u potpunosti jasno je li njihov učinak u liječenju bolesti rezultat inhibiranja histon-deacetilaza ili nekih drugih deacetilaza. U novije

vrijeme dobar učinak u kliničkoj praksi su pokazali hidroksamska kiselina (SAHA, *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*) i depsi-peptid (FR901228, FK228).¹⁸ Najnovija klinička istraživanja su usredotočena na kombinaciju inhibitora DNK-metiltransferaze i histon-deacetilaze, gdje se pokušava postići željeni učinak, ali sa smanjenim dozama obje skupine lijekova.

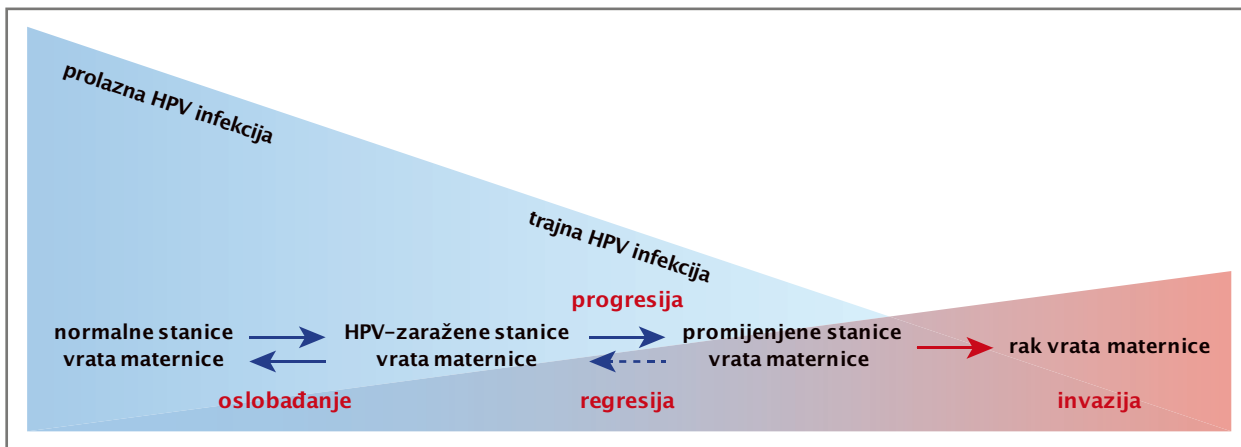
Istraživanje na uzorcima raka vrata maternice je pokazalo da inhibitori DNK-metiltransferaza i histon-

deacetilaza mogu ponovo aktivirati ekspresiju tumorsupresorskih (TS) gena te inducirati hiperacetilaciju histona u ovom karcinomu.¹³

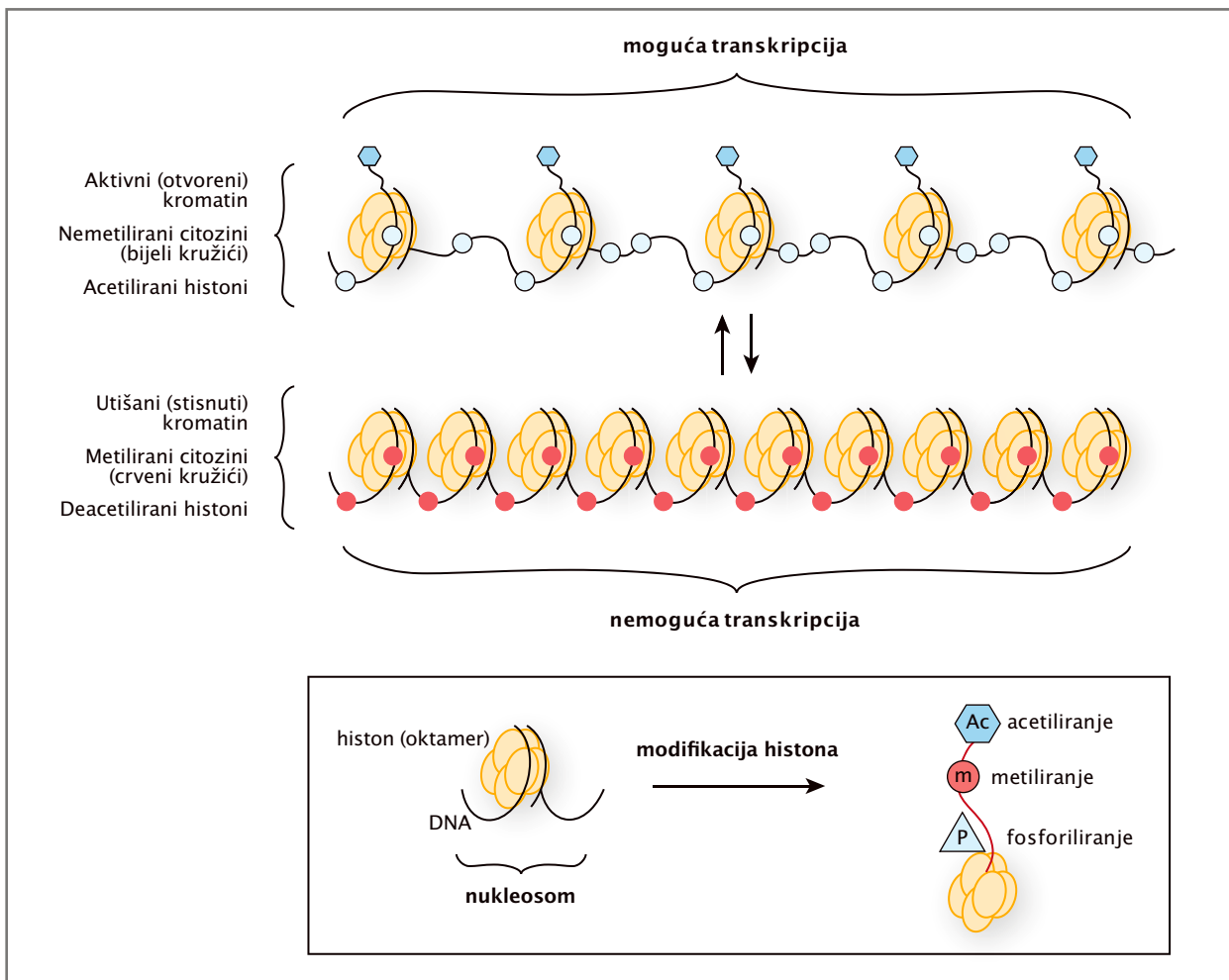
METILIRANJE DNK

Epigenetička promjena koju se najranije povezano s represijom aktivnosti gena jest metiliranje DNK. Prisutno je kod svih eukariota, u različitim omjerima. Metiliranje

SLIKA 1. Shematski prikaz osnovnih koraka u razvoju raka vrata maternice



SLIKA 2. Shematski prikaz epigenetičkih promjena



DNK je kovalentna kemijska promjena koja se uglavnom događa u molekuli DNK na dušičnoj bazi citozin (C) dodavanjem metilne skupine (CH_3) ugljiku na položaju 5 (slika 3). Kod sisavaca se uglavnom događa u dinukleotidima CpG te, u normalnom stanju, nije prisutno u CpG-otocima aktivnih gena.¹⁹ Usporedbom razine metiliranosti DNK i udjela nekodirajuće, ponavljajuće DNK u genomima viših eukariota, utvrđeno je da metiliranje DNK služi uglavnom kao obrambeni mehanizam domaćina u utišavanju stranog genoma. Na ovaj način su utišani transpozoni, virusi te drugi ponavljajući slijedovi DNK.

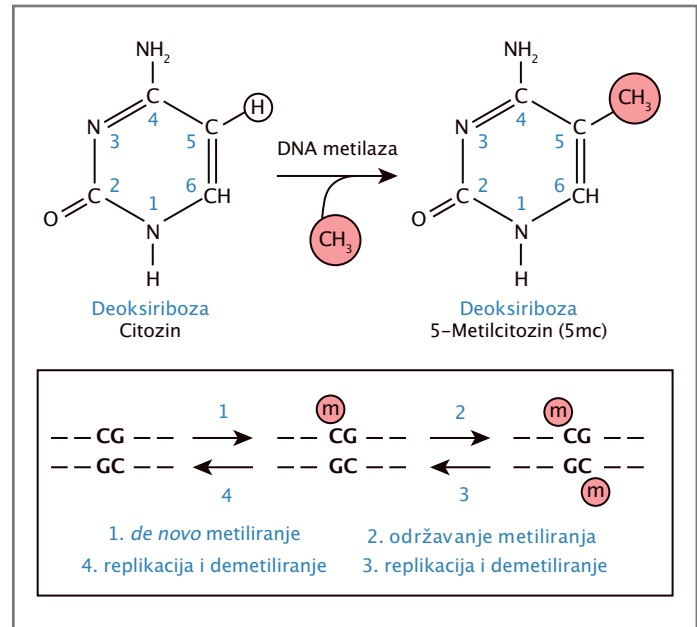
Za metiliranje DNK zadužene su DNK (citozin-5) metiltransferaze (DNMT1, DNMT3a i DNMT3b) koje metiliraju 2% do 4% citozina na položaju 5 smještenom uz gvanozin (CpG). DNMT1 je najzastupljenija, a metilira hemi-metiliranu DNK (slika 3). Ova metiltransferaza je zadužena za održavanje pravilne razine metiliranosti za vrijeme replikacije, a vjerojatno i prilikom popravka DNK. DNMT3a i DNMT3b su zadužene za *de novo* metiliranje za vrijeme embriogeneze, a kako imaju isti afinitet za hemi-metiliranu i nemetiliranu DNK, nazvane su *de novo* metiltransferazama.¹³

U genomu sisavaca CpG-mjesta su prisutna u samo 20% od statistički očekivane učestalosti, što znači da daljnji gubitak funkcije ovih mjesta njihovim metiliranjem ima štetne posljedice što se tiče genske funkcije.²⁰ U karcinogenezi je česta pojava globalno hipometiliranje genoma i hipermetiliranje CpG-otoka. Metiliranje CpG-mjesta povezano je sa supresijom aktivnosti gena na dva moguća načina: a) onemogućavajući transkripcijskim faktorima vezivanje na njihova mjesta vezivanja, koja sadrže CpG-mjesto (npr. u slučaju transkripcijskog faktora E2F) ili b) privlačeći proteine s vezujućom domenom za metilirani citozin (npr. MeCP1 i MeCP2, *Methyl-CpG-binding domain Protein 1* i 2, iz obitelji proteina s vezujućom domenom za metilirani citozin, MBD (*Methyl-CpG-Binding Domain*), koji se natječu s transkripcijskim faktorima za mjesta vezivanja u metiliranoj molekuli DNK ili onemogućavaju transkripciju zbog indukcije heterokromatinizacije promotorskog područja.²¹

Normalno stanje genoma je globalna hipermetilacija te hipometilacija promotora TS-gena. U tumorima je ovo stanje narušeno jer dolazi do hipermetilacije ključnih TS-gena i drugih regulatornih gena, dok je cijeli genom hipometiliran.²² Istraživanjem uzoraka raka vrata maternice i njegovih predstadija uočene su mnoge epigenetičke promjene u genomu HPV-a, ali i u genomu stanica domaćina. Ove promjene se u prvom redu odnose na globalno hipometiliranje molekule DNK te hipermetiliranje ključnih TS-gena.

Istraživanja su pokazala da je upravo metiliranje citozina u CpG-otocima koji se nalaze u blizini mjesta početka transkripcije staničnih gena važan događaj, budući da ista promjena DNK na drugim mjestima u genima nema utjecaja na transkripciju.²³ Smatra se da hipermetiliranje promotora staničnih gena može ponekad biti drugi događaj Knudsove teorije te na taj način dovesti do gubitka funkcije drugog alela gena u

SLIKA 3. Princip metiliranja DNK



nasljednim tumorima, gdje je prvi događaj mutacija u germinativnoj liniji. Metiliranje staničnih gena je najviše istraživano kod TS-gena, kod kojih je i uočeno da je metiliranje CpG-otoka u regijama na 5' kraju gena povezano s utišavanjem njihove ekspresije, što je alternativni mehanizam mutacijama u inaktiviranju ovih gena.⁴⁰ Međutim, kasnije je utvrđeno da su metiliranjem promotorske regije značajno promijenjene i ekspresije gena koji su se smatrali potencijalnim TS-genima. Treću skupinu gena, čija je ekspresija utišana zbog hipermetilacije promotora, čine geni kod kojih je promjena nasumično utvrđena, uglavnom metodama analize na mikročipu, a čija funkcija u zloćudnoj progresiji nije u potpunosti razjašnjena.

Prvi TS-gen kod kojeg je utvrđeno utišavanje hipermetiliranjem je gen supresor retinoblastoma, RB (*Retinoblastoma Suppressor*).²⁴ Nakon njega su objavljeni slični pronalasci na raznim TS-genima, među kojima su bili p16, MLH1 (*MutL Homolog 1*), VHL (*Von Hippel-Lindau*) i E-kadherin.²⁵ Ovi i drugi geni s promijenjenim metiliranjem promotora u nekim vrstama karcinoma, poglavito karcinoma debelog crijeva, služili su kao polazište za istraživanja gena s promijenjenim metiliranjem promotora u drugim vrstama raka. Međutim, dokazano je da su u različitim vrstama raka kod ljudi metilirani različiti stanični geni. U istraživanjima raka vrata maternice do sada je proučavano više od 213 potencijalnih biljega čije je metiliranje promijenjeno, ali do danas nisu utvrđeni jednoznačni biljezi progresije ove bolesti.²⁶

U literaturi su se stanični geni CCNA1, CDH1, C13ORF18, DAPK1, HIC1, RAR β 2, hTERT1, hTERT2 i TWIST1 istakli kao najbolji kandidati za biljege predstadija raka vrata maternice, kao i samog raka. Ovi bi se geni mogli svrstati u dvije skupine: a) TS-geni i kandidati za TS-gene (RAR β 2, HIC1, DAPK1) i b) geni uključeni u regulaciju: staničnog ciklusa, transkripcije, proliferacije, apoptoze, invazije, autofagije te popravka

kromosoma (CCNA1, CDH1, C13ORF18, hTERT1, hTERT2, TWIST1).

Gen CCNA1 kodira za ciklin A1, protein koji pripada visokokonzerviranoj obitelji ciklina, čiji članovi su karakterizirani periodičkim pojavljivanjem u velikim količinama kroz stanični ciklus. U raku vrata maternice promotor ovog gena je metiliran u 60% slučajeva,²⁷ 85%,²⁸ te u 93% slučajeva raka vrata maternice.²⁹

Gen CDH1 kodira za kadherin 1, tip 1 ili E-kadherin (epitelni). Gubitak funkcije gena CDH1 pridonosi malignoj progresiji, na način da dolazi do povećanja proliferacije, invazije i/ili metastaziranja. Promotor gena CDH1 često je nađen metiliran u uzorcima raka vrata maternice, u 51% slučajeva.³⁰ Učestalost metiliranja promotora ovog gena od 20% u raku vrata maternice i statistička značajnost ga ističe kao mogući biomarker rizika za razvoj ove bolesti.³¹ Meta-analizom rezultata 51 studije istraživanja metiliranosti 68 različitih gena, samo je gen CDH1, uz CADM1 i RAR β , pokazao povišenu razinu metiliranja u raku vrata maternice kroz sve studije.³²

Gen C13ORF18, smješten na kromosomu 13, otvorenom okviru čitanja 18 (*Chromosome 13 Open Reading Frame 18*) kodira za nekarakterizirani protein od 662 aminokiseline. Smatra se da ovaj protein ima interakcije s proteinima uključenim u stanični rast i apoptozu, transkripcijskim faktorima koji se vežu na mjesta GC u promotoru, proteinima uključenim u kontrolu staničnog ciklusa te mnogim drugima, kao i onima uključenim u regulaciju autofagije. U raku vrata maternice promotor ovog gena je metiliran u 65% slučajeva,²⁸ a zajedno s genima JAM3, EPB41L3 i TERT u 94% slučajeva raka vrata maternice.³³

Gen DAPK1 kodira za proteinsku kinazu tipa 1 povezanu sa smrću (*Death-Associated Protein Kinase 1*), koja je pozitivni posrednik programirane stanične smrti inducirane gama-interferonom. U raku vrata maternice promotor ovog gena je metiliran u 57% slučajeva³⁴ te 60% slučajeva, s većom učestalošću metiliranja u raku pločastih stanica nego u adenokarcinomu.³⁵

Gen HIC1, hipermetiliran u raku (*Hypermethylated*

In Cancer 1), funkcionira kao regulator rasta i represor transkripcije te je kandidat za TS-gen.³⁶ Promotor gena HIC1 nađen je metiliran u uzorcima raka vrata maternice s različitom učestalošću; 22%(49), 24%(50) te u 32% slučajeva raka pločastih stanica i čak 63% slučajeva adenokarcinoma.³⁷

Gen RAR β 2 kodira za receptor β tipa 2 za retinoičnu kiselinu (*Retinoic Acid Receptor β 2*), koja je član obitelji receptora tiroid-steroidnih hormona. Gen RAR β 2 se ubraja u TS-gene. Metaanalizom rezultata 51 studije istraživanja metiliranja 68 različitih gena, gen RAR β je imao povišenu razinu metiliranja u raku vrata maternice kroz sve studije.³² Hipermetiliranost promotora ovog gena je povezana s lošijom prognozom same bolesti.³⁰

Geni hTERT1 i hTERT2 (*Telomerase Reverse Transcriptase*) kodiraju za različite izoforme reverzne transkriptaze telomeraze čovjeka. Nepravilna regulacija ekspresije telomeraze u somatskim stanicama može upućivati na karcinogenezu. Promotor gena hTERT je metiliran u 82% slučajeva raka vrata maternice, dok nije nađen metiliran u predstadijima ovog raka.³⁸ Međutim, u jednoj studiji je nađen metiliran u 66% ukupnog broja slučajeva raka, ali i u predstadijima, s učestalošću od 46%, te u normalnim obriscima, s učestalošću od 27%.³⁹

Gen TWIST1 (*TWIST homolog 1*) kodira za protein koji je homolog 1 gena *twist*. U više od 50% slučajeva raka vrata maternice utvrđena je hipermetilacija promotora gena TWIST1 te se smatra ranim događajem u inicijaciji progresije tumora.⁴⁰

ZAKLJUČAK

Uz svega dosad navedenog može se zaključiti da je od velike važnosti u budućnosti povezati područje raka vrata maternice, HPV-a i metiliranosti DNK, te odrediti najbolje biljege promjena koje prethode raku vrata maternice, a naposljetku i samog raka. Svakako bi promijenjeni stupanj metiliranja DNK stanica domaćina, ali i samog HPV-a, a najvjerojatnije oboje, mogao biti značajan biljeg koji bi trebao, u budućnosti, imati primjenu u dijagnostici, ali i praćenju ove bolesti.

Cervical cancer and DNA methylation

SUMMARY *Cervical cancer develops gradually over many years through several stages ranging from cervical intraepithelial neoplasia to invasive cancer. The progression of cervical precancerous lesions essentially depends on the presence of persistent infection with oncogenic types of human papillomavirus. In addition, epigenetic events play a significant role in the development and progression of cancer in general. Epigenetic changes, such as DNA methylation in the promoter region of genes where transcription is initiated, results in inactivation and silencing of many genes. Transcriptional silencing through DNA methylation of critical growth regulators and tumour suppressor genes plays a major role in cancer. This deregulated epigenetic event in cancer can be reversed by DNA methylation inhibitors. In cervical cancer, altered DNA methylation is described for more than 200 genes, including tumour suppressor genes, representing potential biomarkers of cervical lesions. However, for now, change in methylation of any of the described gene does not fully meet the criteria of sufficient sensitivity and specificity for population screening.*

KEY WORDS *cervical intraepithelial neoplasm; epigenetics; human papillomavirus; uterine cervical neoplasms*

LITERATURA

- IARC. IARC Handbooks of Cancer Prevention Volume 10: Cervix Cancer Screening. Lyon, France: IARC Press; 2005.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
- Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T, Audy-Jurković S, Ljubojević N. The classification of cytologic findings of cervix uteri "Zagreb 2002": The Modification of the "Zagreb 1990" and "NCI Bethesda System 2001" Classifications. *Gynaecol Perinatol*. 2003;12(4):148-53.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
- Doorbarr J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-41.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S1-6.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89(1):101-5.
- Munoz N, Méndez F, Posso H, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2077-87.
- De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-56.
- Hadzisejdić I, Simat M, Bosak A, Krasević M, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer and precursor lesions. *Coll Antropol*. 2006;30(4):879-83.
- Milutin-Gašperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Coll Antropol*. 2007;31 Suppl 2:89-96.
- Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer*. 2005;4:38.
- Chakravarthy S, Park YJ, Chodaparambil J, Edayathumangalam RS, Luger K. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett*. 2005;579(4):895-8.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
- Vigna E, Recchia AG, Madeo A, et al. Epigenetic regulation in myelodysplastic syndromes: implications for therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20(4):465-93.
- Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):662-4.
- Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(5):659-71.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986;321(6067):209-13.
- Schorderet DF, Gartler SM. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(3):957-61.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):461-7.
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002;21(35):5400-13.
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21(2):163-7.
- Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*. 1989;83(2):155-8.
- Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med*. 2001;134(7):573-86.
- Eijssink JJ, Yang N, Lendvai A, et al. Detection of cervical neoplasia by DNA methylation analysis in cervico-vaginal lavages, a feasibility study. *Gynecol Oncol*. 2011;120(2):280-3.
- Ongenaert M, Wisman GB, Volders HH, et al. Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking. *BMC Med Genomics*. 2008;1(1):57.
- Yang N, Eijssink JJ, Lendvai A, et al. Methylation markers for CCNA1 and C13ORF18 are strongly associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in cervical scrapings. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(11):3000-7.
- Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongson S, et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer*. 2006;6(1):55.
- Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer*. 2003;2(1):24.
- Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(10):2782-9.
- Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol*. 2009;112(2):293-9.
- Eijssink JJ, Lendvai A, Derogowski V, et al. A four-gene methylation marker panel as triage test in high risk human papillomavirus positive patients. *Int J Cancer [Internet]*. 2012;
- Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(4):273-82.
- Yang HJ, Liu VW, Wang Y, et al. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2004;93(2):435-40.
- Wales MM, Biel MA, el Deiry W, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*. 1995;1(6):570-7.
- Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2001;7(7):1982-6.
- Widschwendter A, Gatttringer C, Ivarsson L, et al. Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(10):3396-400.
- Iliopoulos D, Oikonomou P, Messinis I, Tsezou A. Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. *Oncol Rep*. 2009;22(1):199-204.
- Missaoui N, Hmissa S, Trabelsi A, et al. Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*. 2011;207(1):37-42.

ADRESA ZA DOPISIVANJE

Dr. sc. Magdalena Grce, znanstvena savjetnica

Laboratorij za molekularnu virologiju i bakteriologiju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut „Ruđer Bošković“

Bijenička 54, 10000 Zagreb

E-mail: grce@irb.hr

Telefon: +385 1 4561 110