Ishrana i epigenom

Oršulić, Antonia

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:355952

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Antonia Oršulić

ISHRANA I EPIGENOM

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

ISHRANA I EPIGENOM

Antonia Oršulić

Rad je izrađen: na Odjelu za biologiju

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Sažetak

Prehrana je jedan od najvažnijih okolišnih faktora koji djeluje na ljudski organizam, a posebno prenatalnom razvoju. Hrana biljnog i životinjskog porijekla sadrži važne biološki aktivne tvari koje djeluju na velik broj fizioloških i biokemijskih procesa u organizmu čovjeka. Također, mogu imati velik utjecaj na modeliranje epigenetičkih biljega koji uzrokuju određenu bolest kao što su tumori te njihove modifikacije mogu poslužiti u preventivne i terapeutske svrhe. Unatoč dokazane pozitivne korelacije između biološki aktivnih tvari i prevencije raka putem različitih epigenetičkih mehanizmima, dodatna istraživanja su potrebna kako bi se došlo do novih spoznaja koja će omogućiti razvoj novih metoda i lijekova u terapiji određenog tipa tumora.

Broj stranica: 22

Broj slika: 8

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 44

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: epigenetika, epigenetičke mehanizmi, prehrana, bioaktivne tvari, tumor

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor's thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific area: Natural science

Scientific field: Biology

NUTRITION AND EPIGENOME

Antonia Oršulić

Thesis performed at: Department of Biology

Supervisor: Ph.D. Ivna Štolfa Čamagajevac, assistant prof.

Short abstract

Nutrition is one of the most important environmental factor affecting the human body, especially prenatal development. Food of plant and animal origin contains important biologically active substances that have impact on a large number of physiological and biochemical processes in the human body. They can also have a major influence on the modelling of epigenetic markers that cause certain diseases such as tumours and their modifications can serve in preventive and therapeutic purposes. Despite proven positive correlation between biologically active substances and cancer prevention through various epigenetic mechanisms, additional research is required to point out new findings that will enable the development of new methods and drugs in the therapy of a certain type of tumours.

Number of pages: 22

Number of figures: 8

Number of tables: 1

Number of references: 44

Original in: Croatian

Key words: epigenetics, epigenetic mechanisms, nutrition, bioactive food components, cancer

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Universityof J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Osnovni dio.....2
   2.1. Epigenetika 2
      2.1.1. Epigenetički mehanizmi 2
   2.2. Epigenom i bolesti 7
   2.3. Epigenom i ishrana 8
      2.3.1 Ishrana i prenatalni razvoj.....9
      2.3.2 Biološki aktivne tvari i epigenetički mehanizmi 12
3. Zaključak 17
4. Literatura 18

1. UVOD

Hrana koja se unosi u organizam može biti dobra ili loša za zdravlje čovjeka, tako može poticati nastanak bolesti ili služiti u preventivne i terapeutske svrhe. Upravo ta veza između ljudskog organizma i prehrane je predmet proučavanje sve većeg broja znanstvenih istraživanja. Hrana biljnog i životinjskog porijekla sadrži važne biološki aktivne tvari koje djeluju na velik broj fizioloških i biokemijskih procesa u organizmu čovjeka. Jedan od tih mehanizama su i epigenetičke modifikacije. Epigenom i epigenetika kao znanost se u novije vrijeme sve više razvijaju i nove spoznaje dobivene u tom području pružaju novu perspektivu u liječenju i prevenciji različitih bolesti, s naglaskom na tumore. Osim u prevenciji bolesti i stabilizaciji genoma, epigenetički mehanizmi objašnjavaju kako ishrana, koja je jedan od najvažnijih faktora utječe na prenatalni i postnatalni život čovjeka.

U ovom radu biti će opisani epigenetički mehanizmi kojim prehrana majke ima utjecaj na prenatalno razdoblje razvoja djeteta te kako biološki aktivne tvari iz hrane biljnog porijekla kroz različite epigenetičke mehanizme mogu utjecati na prevenciju i liječenje tumora.

2. OSNOVNI DIO

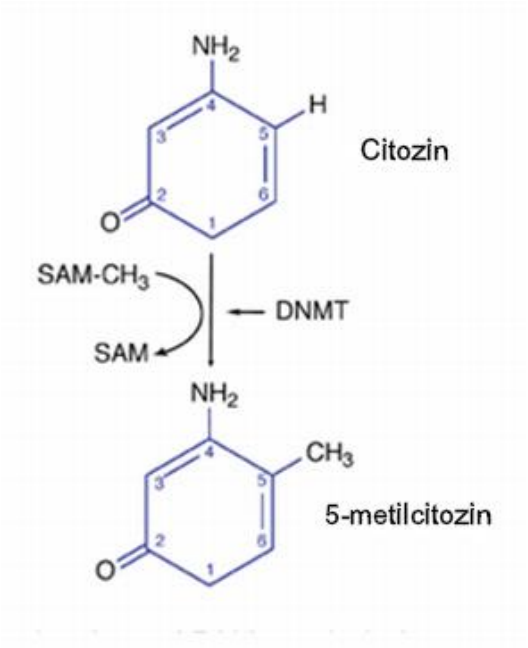
2.1. EPIGENETIKA

C. H. Waddington je bio britanski znanstvenik koji je prvi upotrijebio pojam epigenetika 1942. godine. Epigenetiku je definirao kao granu biologije koja proučava interakciju gena i njihovih produkata te uzrokuje nastanak fenotipa. Razvojem znanosti i genetike djelomično se ova definicija mijenjala. Tako se danas epigenetika definira kao grana biologije koja se bavi proučavanjem mitotičkih i mejotičkih nasljednih promjena u ekspresiji gena, koje ne uzrokuju promjenu u genotipu već fenotipu. Naziv epigenetika sadrži prefiks „epi“ koji je preuzet iz grčkog jezika, a znači na, preko ili izvan i pokazuje nam upravo to svojstvo da se promjene ne događaju u DNA sekvenci već izvan nje. Epigenetičke promjene su normalna i redovna pojava. Omogućuju organizmu da se razvija te prilagodi na unutranje i vanjske podražaje. Kako je genom konzistentan, isti u svim stanicama i predstavlja potpunu genetičku informaciju sadržanu u obliku DNA, on ne može stanicama osigurati prilagodbu na podražaje iz okoline i organizma, jer kada bi se mijenjao narušila bi se genetička informacija i stabilnost. Svake promjene koje se dogode u genotipu su ireverzibilne i trajne. Za razliku od genoma, epigenom je promjenjiv i omogućava organizmu da se prilagodi na različite podražaje. Epigenetičke modifikacije su reverzibilne i uvjetuju promijenjenu ekspresiju određenog dijela genoma, dok preostali dio ostaje inaktivan (Barrero i sur., 2010) . Tri najvažnije uloge epigenetičkih modifikacija su regulacija genske ekspresije, utišavanje mobilnih elemenata i stabilizacija genoma procesima kao što su inaktivacija X kromosoma i genomski utisak. Odgovorne su za stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju, staničnu smrt i prilagodbu stanice na eventualne promjene (Barrero i sur., 2010). Procesi kojima se uspostavlja epigenetički kod su DNA metilacija ili kovalentna modifikacija citozina, postranslacijska modifikacija histona: metilacija, acetilacija, fosforilacija, sumoilacija, ubikvitinacija i RNA interferencija.

2.1.1. Epigenetički mehanizmi

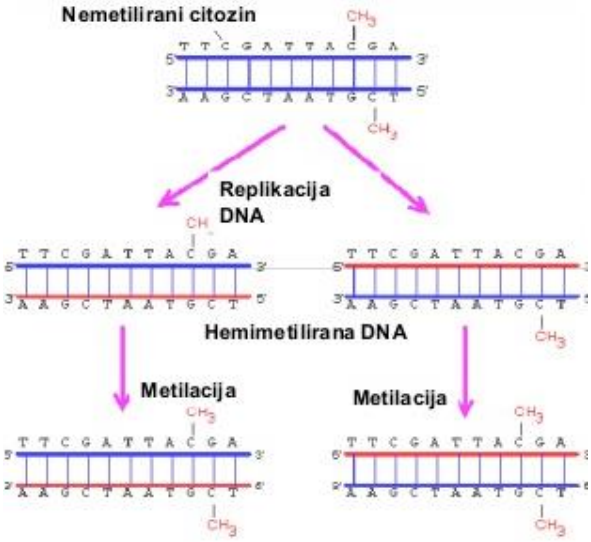
DNA metilacija je najbolje proučeni epigenetički mehanizam. To je čest proces kod sisavaca kojim se stvara stabilni epigenetički trag i prenosi se DNA replikacijom i staničnom diobom (Jang i sur., 2014). Metilacija je kovalentna modifikcija kojom se dodaje metilna skupina, s univerzalnog staničnog metil donora S-adenozil metioinina (SAM), na 5' poziciju citozina CpG (citozin-fosfat-gvanin) dinukleotida i nastaje 5-metilcitozin (Slika 1). Reakciju

katalizira DNMT (DNA-metiltransferaza). Ljudski genom sadrži 4 gena za DNMT koji kodiraju DNMT1, DNMT2, DNMT3A i DNMT3B.



Slika 1. Metilacija citozina (Web 1)

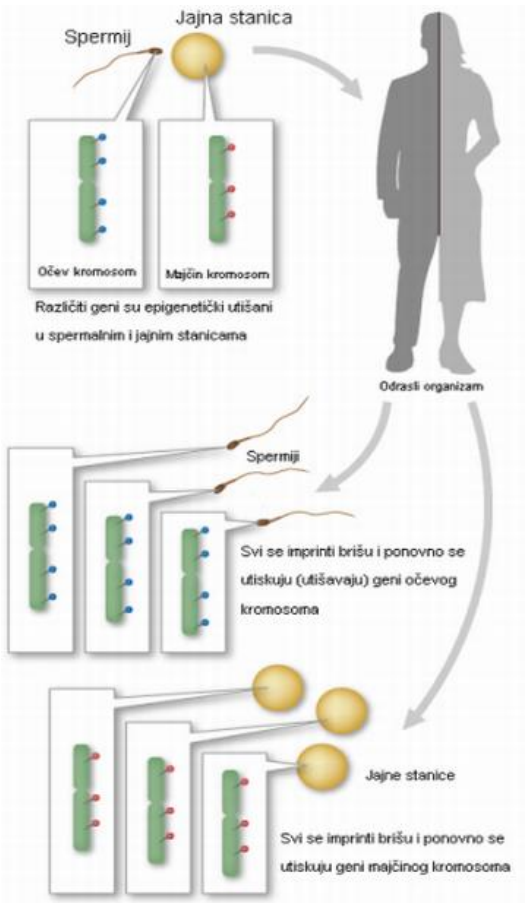
Epigenetička informacija sadržana u metiliranoj DNA se diobom prenosi na stanice kćeri. Tijekom replikacije se ugrađuje nemetilirani citozin umjesto 5-metilcitozina. Nakon sinteze, postreplikacijski enzim DNMT1 metilira hemimetiliranu DNA prema uzorku sa starog lanca na novi. Ovakvim prijenosom metilirane DNA omogućuje se epigenetičko nasljeđivanje (Slika 2).



Slika 2. Prijenos epigenetičkog uzorka na stanice kćeri (Web 2)

U ljudskom genomu CpG dinukleotidi su široko rasprostranjeni. Najveću gustoću imaju u kratkim odsječcima na 5' kraju gena u promotorskim regijama koje su zbog velike gustoće CpG dinukleotida nazvane CpG otocima. To su odsječci DNA dulji od 0,5 kb gdje suma citozina i gvanina čini više od 55% ukupnog broja baza. Ovisno o stanju metiliranosti CpG otoci djeluju kao regulatori transkripcije gena. Tako su hipermetilirani CpG otoci povezani s sprječavanjem transkripcije, a hipometilirani s njenom aktivacijom. Otprilike oko 30- 40% gena u humanom genomu nema CpG otoke u svojim promotorima (Takai i sur., 2002).

DNA metilacija ima važnu ulogu u različitim staničnim procesima. Važna je za normalan razvoj, starenje, stabilizaciju genoma procesima genomskog utiska i inaktivacije X kromosoma, kancerogenezu, represiju ponavljajućih elemenata te ima vrlo velik utjecaj na transkripciju gena. Metilirani citozin prepoznaju i na njega se vežu represorski proteini kao što su CpG MBD (engl. *methyl biding domain*) i MeCP2 (engl. *methly CpG-biding protein*) proteini koji potiču vezanje histon-modificirajućeg kompleksa koji mijenja strukturu kromatina pri čemu on ostaje zatvoren i sprječava vezanje transkripcijskih faktora na molekulu DNA (Bagić, 2015 prema Fuks i sur. 2003). Također DNA metilacija sudjeluje u procesu diferencijacije tkiva. Prilikom diobe i diferencijacije embrijskih matičnih stanica u specifična tkiva, DNA metilacijom se može promijeniti ekspresija gena koja uzrokuje trajne i jednosmjerne promjene i tako onemogućuju stanici povratak u matičnu stanicu. Osim toga metilacijom se postiže i epigenetički fenomen utiskivanja gena. Kada je gen utisnut on je metiliran i nije aktivan. Tako spermij i jajna stanica imaju kromosome koji su različito utisnuti i ovisno o tome isti alel može imati različiti fenotipski učinak. Tijekom gametogeneze se stari utisak briše, a ovisno o spolu se geni ponovo metiliraju tj. utiskuju (Slika 3). Jedan od najboljih primjera genomskog utiska je metiliranje tumor supresorskog gena H19 i IGF2 (engl. *insulin like growth factor*). Tijekom spermatogeneze se specifično metilira H19, a kod oogeneze IGF2. Tako se kod normalnih stanica eksprimira očev IGF2 i majčin H19 gen (Rainier i sur., 1993.).



Slika 3. Proces utiskivanja gena (Web 3)

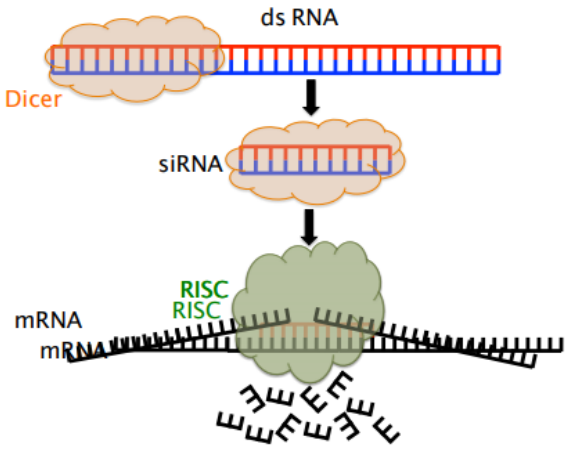
Modifikacije histona su još jedan od epigenetičkih mehanizama s kojim se može regulirati genska ekspresija. Ove posttranslacijske modifikacije N-terminalnih krajeva histona uzrokuju promjenu strukture kromatina koja dovodi do aktivacije ili utišavanja gena. U modifikacije ubrajamo acetilaciju, metilaciju, ubikvitinaciju, sumoilaciju i fosforilaciju (Berger, 2009). Ove reakcije su reverzibilne i njihovom se kombinacijom uspostavlja „histonski kod“, a izvode ih dvije skupine enzima, oni koji stavljaju i oni koji uklanjaju određenu skupinu s N-terminalnog kraja histona. Dva su osnovna efekta ovih modifikacija, a to su cis-efekt kojim se postiže smanjeno vezenje DNA za histon neutraliziranjem histonskog pozitivnog naboja ili promjenom trodimenzionalne strukture histona dodatkom određene skupine i trans-efekt kojim se regrutiraju drugi proteini kao što su npr. HMBP (engl. *histone modification binding proteins*).

Histoni su bazični proteini eukariotskih stanica koji zajedno s molekulom DNA čine kromatin. Osnovna građevna jedinica kromatina je nukleosom. On je izgrađen od histonskog oktamera, kojeg čine parovi histona H2A, H2B, H3 i H4, oko kojeg se omata DNA molekula. Osim histonskog oktamera u smatanju DNA molekule još sudjeluju histoni H1 i H5 koji djeluju kao vezujući proteini. Histoni imaju veliku ulogu u regulaciji pakiranja DNA i kompakciji

kromatina što utječe na transkripcijsku aktivnost. U interfaznoj jezgri kromatin ima dva funkcionalna stanja, a to su eukromatin ili područja aktivnog prepisivanja gena, koji predstavlja način pakiranja u kojem je DNA dostupna transkripciji i heterokromatin ili područja inaktiviranih gena gdje je DNA gusto pakirana i nedostupna za prepisivanje. Upravo se epigenetičkim mehanizmima regulira organizacija kromatina u različitim stanicama i stadijima staničnog ciklusa (Murray i sur., 2009).

Postranslacijskim modifikacijama mijenja se interakcija histona s molekulom DNA i nuklearnim proteinima. Dugi repovi H3 i H4 histona, koji strše izvan nukleosoma, sadrže velik broj lizinskih i argininskih aminokiselinskih ostataka i mogu biti modificirani na nekoliko mjesta. Osim u regulaciji ekspresije, histonske modifikacije imaju ulogu i u drugim biološkim procesima kao što su popravak DNA, replikacija i spermatogeneza. Aktivacija transkripcije postiže se acetilacijom i fosforilacijom, inhibicija sumoilacijom, dok oba efekta mogu imati metilacija i ubikvitinacija ovisno o mjestu koje se modificira (Bagić, 2015). Identificiran je velik broj porodica proteina koje sudjeluju u modifikaciji histona. Među njima su proteini koji sudjeluju u acetilaciji, a to su histon-acetil-transferaze (HAT), koje dodaju acetilnu skupinu s acetil koenzima A na lizinske ostatke i histon-deacetilaze (HDAC), koje ih uklanjaju. U procesu metilacije histon-metiltransferaze (HMT) dodaju jednu ili više metilnih skupina s univerzalnog donora S-adenozil-L-metionina na lizinske ili argininske ostatke, a uklanjaju histon-demetilaze (HDMT)(Cole, 2008).

RNA interferencija (RNAi) je jednostavan i brz mehanizam utišavanja gena eukariota. Osnovni princip ovog mehanizma je razgradnja mRNA molekule u citoplazmi stanice, nakon što je stupila u interakciju sa komplementarnom dvolančanom interferirajućom RNA molekulom. RNAi je jedan od mehanizama obrane od virusa, pridonosi stabilnosti genoma tako što eliminira transpozonske transkripte, zaustavlja sintezu proteina, sudjeluje u regulaciji gena i modifikaciji kromosoma. Mehanizam se odvija u 2 koraka. Prvo se degradiraju dsRNA u male nekodirajuće interferirajuće siRNA, koje imaju manje od 30 nukleotida, enzimom Dicer iz obitelji Rnaza III. Nakon toga se siRNA molekule povezuju s proteinskim kompleksom Argonaut u RISC kompleksom (engl. *RNA-induced silencing complex*) putem kojeg mogu djelovati na ekspresiju gena modificirajući procese transkripcije i translacije (Slika 4).



Slika 4. Mehanizam RNAi (Web 2)

2.2. EPIGENOM I BOLESTI

Iako epigenetičke promjene omogućuju prilagodbu na različite utjecaje, normalan razvoj i zdravlje, one su uzrok mnogih bolesti. Bilo koja aberacija epigenetičke modifikacije može uzrokovati abnormalnu aktivaciju ili utišavanje gena što dovodi do razvoja bolesti. Promjene u DNA metilaciji, osim što mogu uzrokovati tumor, imaju veliku ulogu u razvoju psihičkih i drugih teških poremećaja (Callinan i Feinberg, 2006). Jedan od primjera je Rettov sindrom kojeg karakterizira autistično ponašanje, mentalna retardacija i specifično držanje ruku i gubitak njihove funkcije uzrokovano mutacijom proteina koji se veže na metilirane CpG otoke i gubitkom imprintinga DLX5 koji kodira veliku skupinu proteina odgovornih za pravilan razvoj kosti i zacjeljivanje fraktura (Horike i sur., 2005).

Tumori su drugi najveći uzrok smrti ljudske populacije u svijetu, a nova istraživanja su pokazala kako će se broj oboljelih od tumora povećati za 70% kroz narednih 20 godina (Web 4). Glavna značajka tumora su nepravilnosti u regulaciji genske ekspresije, koje uzrokuju i genetičke i epigenetičke abnormalnosti. Danas znamo da epigenetika i genetika kooperativno djeluju u svim stadijima raka (Jones i Baylin, 2007). Za razliku od genetičkih promjena, epigenetičke su potencijalno reverzibilne zbog čega su epigenom i svi njegovi mehanizmi potencijalni novi cilj u istraživanju intervencijskih strategija koje se koriste u preventivne i terapeutske svrhe (Link i sur., 2010).

Stanice tumora u cijelom genomu imaju aberacije koje se očituju u nizu epigenetičkih biljega, a to su globalna hipometilacija, smanjena aktivnost malih nekodirajućih miRNA (mikro RNA), specifična promotorska hipermatilacija i histonska deacetilacija (Taby i Issa, 2010). Česta epigenetička alternacija kod tumora je globalna hipometilacija. Gubitak metilacije može uzrokovati abnormalnu aktivaciju gena. Ona se pretežno pojavljuje u ponavljajućim

sekvencama koje čine otprilike pola ljudskog genoma, uključuju i pericentromerne i centromerne uzastupno ponavljajuće sljedove. Isto tako može se pojaviti i u promotorima gena (Ehrlich, 2009) te na taj način može aktivirati gene koji su kod normalnih stanica utišani, kao što su onkogeni. Osim aktivacijom normalno utišanih gena, DNA hipometilacija se još povezuje i s reaktivacijom i transpozicijom retrotranspozona, kromatinskom nestabilnošću i gubitkom genskog utiska.

Osim aktivacije onkogena gubitkom metilacije u njihovim promotorima, u epigenomu stanica raka epigenetički se utišavaju pomoću tumor supresorskih geni. To se postiže hipermetilacijom njihovih promotora što uzrokuje gubitak njihove funkcije potiskivanja tumora. Geni koji su podložni hipermetilaciji kod stanica raka su geni koji sudjeluju u popravku DNA, kontroli staničnog ciklusa, apoptozi, diferencijaciji, angiogenezi i metastazi, a to su p15 $^{INK4\beta}$, p16$^{INK4\alpha}$, O^{6}-metilgvanin-metiltransferaze (MGMT), mutL homolog 1 (MLH1), glutation S-transferaze P1 (GSTP1), receptor retinoične kiseline, RASSF1 (engl. *Ras association domain-containing protein 1*) (Verma i sur., 2002). Hipermetilacija može dovesti i do nestabilnosti ponavljajućih sekvenci DNA, kao što su mikrosateliti tako što se hipermetilira gen za oporavak DNA MLH1 što uzrokuje njihovu nestabilnost i može ih produljiti ili skratiti. To se povezuje s mnogobrojnim tumorima kao što su kolorektalni tumori, tumor jajnika i želuca (Trošelj i sur., 2009).

Pojam „histon onko-modifikacije“ uključuje sve posttranslacijske modifikacije histona koje mogu uzrokovati rak. Poremećaji histonske modifikacije mogu dovesti do kancerogeneze upravo zbog toga što uzrokuju narušavanje genomske stabilnosti, potiču abnormalnu ekspresiju gena, smanjuju mogućnost popravka DNA i stabilnost kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Nepravilnosti metilacije i acetilacije H3 i H4 histona uzrokuju inicijaciju i progresiju raka. Tako su česti pokazatelji raka nepravilna trimetilacije Lys na 4 i 27 mjestu H3 histona (H3K4me3 i H3K27me3) i globalni gubitak acetilacije H4K16 i trimetilacije H4K20. Tako gubitak acetilacije ili trimetilacije H4 se pojavljuje u hipometiliranim ponavljujućim DNA sekvencama (Fraga i sur., 2005), a H3K27me3 u hipermetiliranim promotorima tumor supresorski gena (Lin i sur., 2011).

2.3. EPIGENOM I ISHRANA

Prehrana je jedan od najvažnijih okolišnih faktora koji djeluje na epigenom. Iako točan mehanizam djelovanja još u potpunosti nije objašnjen, postoji sve veći broj dokaza koji povezuju način ishrane i određene bioaktivne tvari iz hrane s epigenetičkim promjenama koje

mogu i uzrokovati bolest i služiti u preventivne i terapeutske svrhe. Posebno velik utjecaj prehrana ima tijekom prenatalnog razvoja.

2.3.1 Ishrana i prenatalni razvoj

Za vrijeme prenatalnog razvoja događaju se brze i dinamične promjene uzrokovane staničnom proliferacijom i diferencijacijom. Uspostavlja se stabilni epigenetički kod, barem do odrasle dobi. Globalno demetilirani genom embrija se ponovno metilira što omogućuje genomski utisak i ima veliku ulogu u reguliranju stanične i tkivno specifične transkripcije gena kojom se postiže diferencijacija stanica i tkiva. Bilo koja pogreška tijekom ovog procesa može biti ireverzibilna i imati trajne posljedice u regulaciji genske ekspresije. Zbog toga što fetus ne može učinkovito metabolizirati i detoksificirati toksine u jetri, nema dobro razvijene mehanizme popravka DNA i imunološkog odgovora te ima visoku stopu proliferacije stanica ovaj period razvoja je vrlo osjetljiv na okolišne faktore, pri čemu je jedan od najutjecajnijih majčina prehrana.

Postoji velik broj istraživanja koja proučavaju upravo utjecaj majčine prehrane na razvoj djeteta. Premala ili prevelika izloženost određenim tvarima pokreće epigenetičke mehanizme koji mogu izazvati promjene u ekspresiji gena mijenjajući fenotip djeteta (Bagić, 2015.) i čine ga podložnijim različitim bolestima u odrasloj dobi. U ovakvim istraživanjima, u kojima se proučava nepravilna prehrana trudnice, najčešće se koriste animalni modeli koji se izlažu različitim dijetnim režimima**.**

Jedan od dijetnih režima koji se proučava je prehrana siromašna proteinima. Proteini su važan izvor esencijalnih aminokiselina, među kojima je aminokiselina metionin koja je uključena u biokemijski put SAM (S-adenozilmetionin). Tako prehrana siromašna proteinima kod trudnih štakorica uzrokuje promjene u DNA metilaciji, zbog koje dolazi do globalne hipermetilacije gena jetre njihovih potomaka (Rees i sur., 2000). Daljnja istraživanja su pokazala kako ovaj tip ishrane rezultira promjenama u DNA metilaciji koje uzrokuju promjenu u genskoj ekspresiji koja ostaje stabilna sve do odrasle dobi (Jimenez-Chillaron i sur., 2012). Ovaj način prehrane dovodi do promjene u metilaciji jetrenih gena PPARα (engl. *peroxisomal proliferator-activated receptor-α*), GR (glukokortikoidni receptor) i Lxrα (engl. *liver X receptor-α*). Demetilacijom promotora dolazi do povećane ekspresije ovih receptora koji sudjeluju u regulaciji transkripcije proteina uključenih u metabolizam masti i ugljikohidrata, što kod odraslih jedinki može uzrokovati dislipidemiju, hipertenziju i steatozu jetre. Također, majčinska prehrana siromašna proteinima može djelovati i na druge gene te različitim

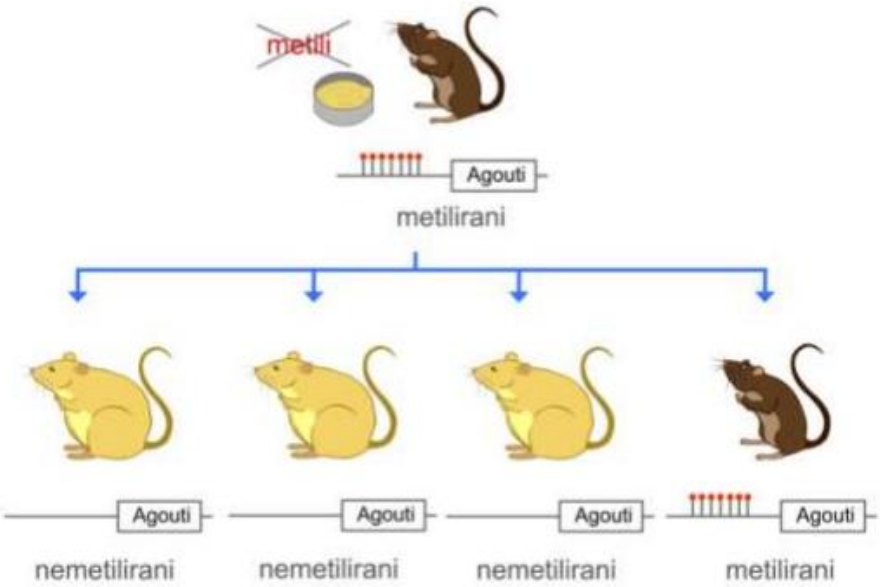
epigenetičkim mehanizmima trajno utjecati na gensku ekspresiju i tako djelomično pridonijeti razvoju pretilosti, rezistentnosti na inzulin i dijabetesa tipa 2 u odraslih jedinki.

Najproučavaniji model majčine ishrane je onaj s deficitom donora metilnih skupina. Riboflavin (B2), pirodoksin (B6), cijanokobalamin (B12), kolin, betain, folat i metionin su tvari koji sadrže metilnu skupinu i sudjeluju u nastanku SAM-a. Tablica 1. prikazuje namirnice koje su bogate ovim bioaktivnim tvarima. S-adenozilmetionin je univerzalni donor metilne skupine u epigenetičkom mehanizmu DNA metilacije i nastaje iz aminokiseline metionin uz utrošak ATP-a (Anderson i sur., 2012).

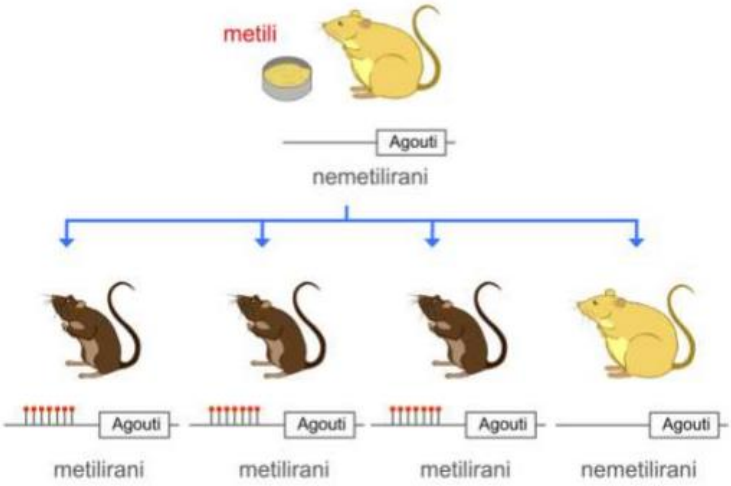
Tablica 1. Popis namirnica s visokim udjelom donora metilne grupe (Bagić, 2015)

Nutrijent	Namirnice
Metionin	Brazilski oraščić, sezam. riba, špinat, meso
Folat	Grahorice, špinat, šparoge, salata
Vitamin B2	Sir, meso, bademi, jaja
Vitamin B6	Sjemenke suncokreta, pistacija, tuna
Vitamin B12	Jetra, riba, žitarice, crveno meso,
Kolin	Žumanjak, jetra, meso
Betain	Špinat, repa, pšenica

Za objašnjenje kako namirnice koje sadrže metilne skupine iz hrane utječu na epigenom, najbolji primjer su istraživanja na napravljena na *Agouti* miševima. Oni kao i drugi sisavci sadrže *agouti* gen. Iako je ovaj gen povezan s bojom krzna, može se eksprimirati i u drugim stanicama. Normalno je ovaj gen metiliran i miševi s utišanim genom imaju smeđe krzno, manji rizik od bolesti i pretilosti u odnosu na miševe koji nemaju utišani gen. Takvi miševi imaju žutu boju krzna, pretili su i skloni obolijevanju od različitih bolesti kao što su dijabetes i rak. Ovakvi eksperimenti su često provođeni na izogenim životinjama, koje su genetički potpuno identične, ali zbog razlike na epigenetičkoj razini poprimaju drugačije fenotipske karakteristike. Glavni faktor koji utječe hoće li *agouti* gen biti metiliran ili ne je dostupnost metilnih skupina. Ako se trudna ženka s utišanim genom i smeđom bojom krzna hrani sa hranom siromašnom metilnim skupinama ona će dati žuto i pretilo potomstvo (Slika 5). Suprotno tome ako hranom bogatom metilnim skupinama hranimo trudnu ženku sa žutom bojom krzna, ona će dati normalno smeđe potomstvo (Slika 6)(Michaud i sur., 1994).



Slika 5. Trudna ženka smeđe boje krzna hranjena hranom siromašnom metilnim skupinama i njezino potomstvo (Preuzeto iz: Bagić, 2015).



Slika 6. Žuta trudna ženka hranjena hranom bogatom metilnim skupinama i njezino potomstvo (Preuzeto iz: Bagić, 2015).

Vrlo važan utjecaj na potomstvo ima kalorijski unos majke. Ako trudnoj ženki štakora smanjimo dnevni unos kalorija za 50 % tijekom zadnjeg tjedna gestacije, njezino potomstvo će imati reduciranu ekspresiju gena *Glut 4* (engl. *glucose transporter 4*) u skeletnim mišićima. Ovaj intramembranski protein je reguliran inzulinom i na njegovu stimulaciju potiče se prijenos glukoze u stanicu. Uzrok ove reducirane ekspresije gena *Glut 4* u skeletnim mišićima su histonske modifikacije koje uključuju deacetilaciju H3K14 i povećanu dimetilaciju H3K9. Ova alternacija doprinosi razvoju otpornosti na inzulin i razvoju dijabetesa. Također se u jetri

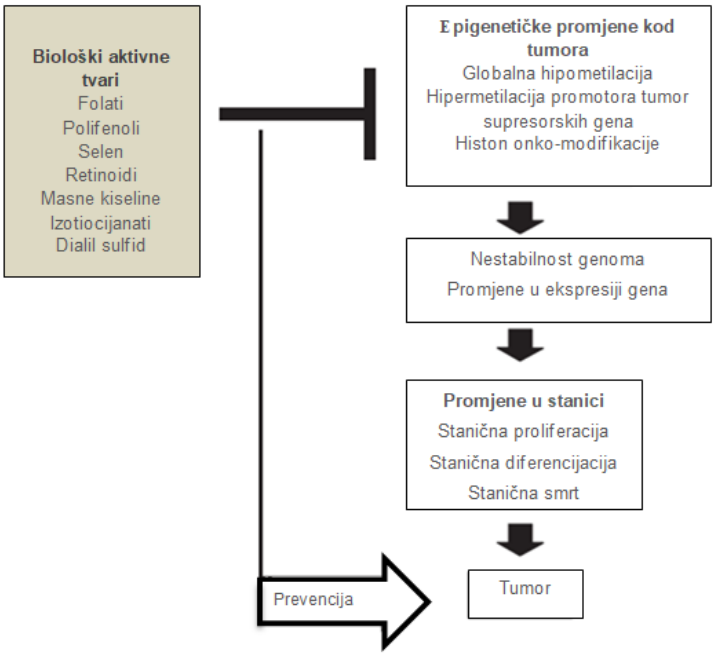
smanjuje dimetilacija H3K9 gena *IGF1* (engl. *insulin like growth factor*) što mijenja njegovu ekspresiju i uzrokuje postnatalno zaostajanje u rastu i povećava rizik od dijabetesa. Ovaj način ishrane je opisan i na ljudskom modelu. Osobe koje su u ranoj fazi trudnoće bile izložene gladi imaju 2 puta veći rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Jang i sur., 2014) , shizofrenije (Susser i sur., 1996) i pretilosti (Stein i sur., 2007). Izložene osobe su također imale veći rizik pojave dijabetesa tipa 2, neovisno o stadiju trudnoće.

Prehrana majke s visokim udjelom masti također može utjecati na DNA metilaciju i gensku ekspresiju potomaka. Tako alternacija gena povezanih s dopaminom i opioidom mogu utjecati na ponašanje kojim se preferira ukusna hrana i na taj način potiče debljanje (Vucetic i sur., 2009). Ovaj način ishrane utječe i na smanjenje metilacije i povećanje ekspresije jednog od regulatora prolaska kroz G1 fazu staničnog ciklusa Cdkn1a (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*), što uzrokuje promjene u proliferaciji stanica jetre i njezinoj veličini te doprinosi razvoju masne jetre. Aagaard-Tillery sa svojim suradnicima (2008) je provela istraživanje na ženkama Japanskih makakija koje su tijekom trudnoće hranjene hranom s visokim udjelom masti. To je kod potomaka je uzrokovalo povećanje acetilacije H3K14 histona i fenotipski se eksprimiralo trostrukim povećanjem jetrenih triglicerida i razvojem nealkoholne masne jetre.

Ishrana majke tijekom prenatalnog života, pogotovo u prvom tromjesečju, može epigenetičkim mehanizmima trajno promijeniti gensku ekspresiju somatskih stanica svoga djeteta. Štoviše, dokazano je da tumori mogu imati fetalno porijeklo i to potvrđuje sve veći broj istraživanja, a najbrojnija su o tumoru dojke koji je jedan od najučestalijih tumora u ženskoj populaciji (Web 4).

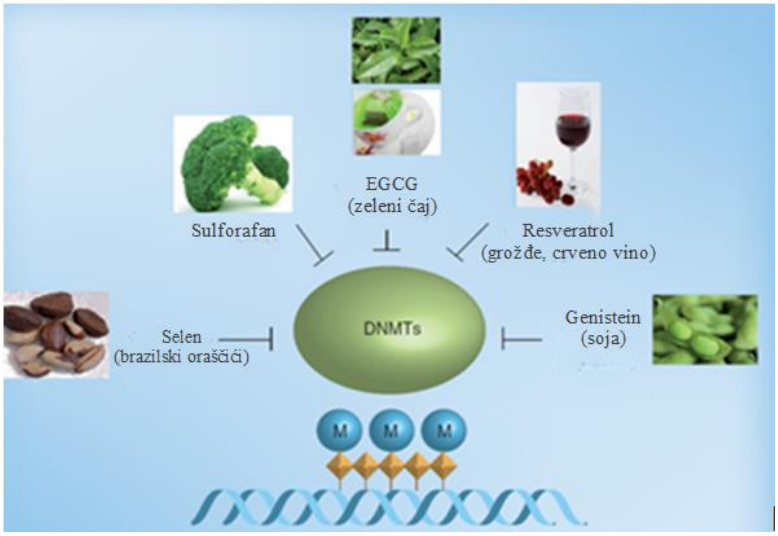
2.3.2. Biološki aktivne tvari i epigenetički mehanizmi

Biološki aktivne tvari su nenutritivni sastojci koje u organizam unosimo hranom biljnog i životinjskog porijekla. Fiziološki su aktivne i sudjeluju u mnogim procesima u organizmu. Mnoge imaju antioksidacijska, protuupalna, antimikrobna, a danas je sve veći broj dokaza koji potvrđuju da imaju i antikancerogena svojstva. Biološki aktivne tvari mogu utjecati i na epigenetičke mehanizme i to na one koji uzrokuju kancerogenezu kao što su globalna DNA hipometilacija, hipermetilacija promotora tumor supresorskih gena i onko-modifikacije histona (Slika 7) zbog čega se sve više koriste u preventivne svrhe. Djelovanje većine biološki aktivnih tvari na prevenciju tumora ovisi o periodu konzumiranja, količini i bioraspoloživosti.



Slika 7. Utjecaj bioaktivni tvari na epigenetičke mehanizme (Preuzeto iz: Ong i sur., 2011)

Sve je veći broj dokaza da biološki aktivne tvari mogu utjecati na globalnu i gen-specifičnu DNA metilaciju. To postižu kroz nekoliko mehanizma: donori su metilne skupine koja je potrebna za sintezu SAM-a i pravilnu metilaciju, reguliraju upotrebu metilnih skupina i tako utječu na aktivnost DNMT i enzima koji sudjeluju u regulaciji biokemijskog ciklusa metionina.



Slika 8. Prikaz bioaktivnih tvari iz hrane koje djeluju kao inhibitori DNMT i kroz epigenetičke modifikacije utječu na ekspresiju gena (Preuzeto iz: Hardy i sur., 2011)

Veliku ulogu na naš organizam imaju polifenoli. Oni biljci služe za zaštitu od fotosintetskog stresa, reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*) i obranu od nametnika. Zeleni čaj sadrži velik broj različitih polifenola, od kojih su najbrojniji katehini kojima pripada epigalokatehin-3-galat (EGCG) koji na DNA metilaciju ima najveći utjecaj i djeluje kao inhibitor DNMT. Fang i sur. (2007) su potvrdili inhibitornu ulogu EGCG u staničnim linijama raka jednjaka (KYSE 150), debelog crijeva (HT29), prostate (PC3) i dojke (MCF-7 i MDA-MB-231). Inhibicija DNMT kod ovih staničnih linija je povezana demetilacijom i ponovnom aktivacijom promotra tumor supresorskog gena koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa $p16^{INK\ 4a}$, RARβ (receptor retinoične kiseline β) koji sudjeluje u regulaciji staničnog rasta i diferencijaciji, MGMT (O-6-metilgvanin-DNA-metiltransferaza) koji kodira protein popravka DNA uključen u staničnu obranu od mutageneze, hMLH1 tumor supresorski gen koji sudjeluje u regulaciji popravka DNA i GSTP1 (glutation S-transferaza P1) koji sudjeluje u ksenobiotskom metabolizmu. Također kod MCF-7 stanične linije tumora dojke je utvrđeno da EGCG može demetilacijom promotora inhibirati ekspresiju telomeraze reverzne transkriptaze (hTERT). Demetilacijom promotora telomeraze omogućeno je da se na njega veže transkricijski respresor E2F1 i onemogući ekspresiju (Berletch i sur., 2008). Tretiranjem stanica melanoma iz linije A431 s 20 μM EGCG 6 dana smanjena je globalna DNA metilacija, reaktivirani su tumor supresorski geni p16 i p21, a količina mRNA koje kodiraju DNMT, DNMT 3A i DNMT 3B se smanjila te na taj način se smanjuje i njihova aktivnost (Nandakumar i sur., 2011).

Kemopreventivna svojstva pokazuje izoflavon izoliran iz soje, genistein. On ponovno aktivira utišane tumor supresorske gene demetilacijom njihovih promotora i djelomičnom inhibicijom DNMT. Tretmanima na stanicama raka jednjaka stanične linije KYSE510 demetilacijom promotora i inhibicijom DNMT je reaktivirao ekspresiju tumor supresorskih gena $p16^{INK\ 4a}$, *RARβ* i *MGMT* (Fang i sur., 2005). Inhibicijom DNMT i MBD2 (engl. *Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*) proteina koji prepoznaje i veže se za metilirane CpG otoke, postigla se demetilacija promotora i reaktivacija tumor supresorskog gena *BTG3* (engl. *B-cell translocation gene 3*) koji ima antiproliferirajuća svojstva te zaustavlja rast stanica raka bubrega u staničnim linijama A498, ACHN i HEK -293 (Majid i sur., 2009).

Antikancerogeno djelovanje pokazuje i kurkumin. To je flavonoid koji se nalazi u korijenu kurkume (lat. *Curcuma longa*). Istraživanje na MV4-11 ljudskim stanicama leukemije je pokazalo da kurkumin sudjeluje u kovalentnom blokiranju katalitičkog tiolata na C1223 podjedinci DNMT 1 uzrokujući globalnu hipometilaciju DNA u ovim stanicama (Liu i sur., 2009).

Selen je esencijalni mikroelement. Nalazimo ga u brazilskim oraščićima i u mesu piletine, junetine i divljači. Pokazuje antioksidativna i pro-apoptotička svojstva. Može se pojaviti u obliku selemetionina, selenocisteina, selenata i selenita. Eksperimenti na životinjama i staničnim kulturama su pokazali da ometa DNA metilaciju čime očituje antikancerogeno djelovanje. Nedostatak selena u prehrani može uzrokovati globalnu hipometilaciju. Istraživanje na mužjacima štakora sorte Fisher 344 pokazala su da kod štakora, koji u svojoj prehrani nisu imali selena, DNA stanica jetre i debelog crijeva je bila hipometilirana u odnosu na kontrolnu skupinu koja je primala određenu dozu selena (Davis i sur., 2000). Osim globalne hipometilacije, nedostatak selena uzrokuje metilaciju promotora tumor supresorskih gena p16 i p 53 koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa. Selen ima kemopreventivnu funkciju u raku debelog crijeva kod ljudi. On inhibira DNMT i zaustavlja DNA metilaciju. Djelujući na AP-1-regulatornu regiju DNMT1 zaustavlja njezinu ekspresiju što je dokazano u eksperimentu na staničnoj liniji HT29 adenokarcinoma (Davis i sur., 2002).

Retinoidi također djeluju antikancerogeno, a to postižu epigenetičkim promjenama genske ekspresije. Na proces DNA metilacije utječu putem biokemijskog ciklusa metionina. U jetri štakora koji su bili tretirani trans-retinoičnom kiselinom povećala se ekspresija i aktivnost enzima glicin N-metiltransferaze koji sudjeluje u regulaciji metabolizma metilnih skupina u jetri. Povećana aktivnost ovog enzima uzrokuje hipometilaciju DNA jetrenih stanica (Rowling i sur., 2002). U signalnom putu retinoida glavnu ulogu imaju CRBP 1 (engl. *cellular retinol-binding protein 1*) koji djeluje kao unutarstanični transporter retinola i receptor RARβ koji su kod nekoliko vrsta staničnih linija raka utišani hipermetilacijom njihovih promotora.

Biološki aktivne tvari, osim na DNA metilaciju mogu djelovati i na postranslacijske modifikacije histona. Velik broj ovih tvari djeluje na HDAC, enzim koji uklanja acetilne skupine s N-terminalnih krajeva H3 i H4 histona. Zbog toga što mogu aktivirati epigenetički utišan gen, djelujući na enzime koji uspostavljaju histonsku modifikaciju, kao što su histon acetiltransferaza, deaacetilaza, metilatransferaza i demetilaza, imaju veliku ulogu prevenciji i terapiji raka.

Butanoat ili maslačna kiselina je najmanji poznat inhibitor HDAC (HDACi). Svojom karboksilnom grupom se veže za cinkov atom u aktivnom mjestu HDAC i na taj način ga inhibira. Utjecaj maslačne kiseline je najbolje objašnjen na primjeru gena $p21^{WAF1}$ koji kodira protein inhibitor ciklin ovisne kinaze i Bax gena koji aktivira apoptozu. Tretiranjem Colo-320 ljudskih stanica raka debelog crijeva maslačnom kiselinom došlo je do aktivacije $p21^{WAF1}$ zbog povećane acetilacije histona H3 i H4 u promotoru gena (Chen i sur., 2004), dok u HCT116 liniji

stanica došlo do aktivacije i ekspresije oba gena što je rezultiralo zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2 fazi i aktivacijom apoptoze.

Već prije spomenuti spoj EGCG utječe na ekspresiju tumora osim kroz mehanizam DNA metilacije i putem histonske modifikacije što rezultira aktivacijom tumor supresorskih gena. Ovaj polifenol djeluje kao HDACi i poveća stopu acetilacije u ljudskim melanoma stanicama A431. Acetilira lizinske ostatak na 5, 12 i 16 mjestu histona H4 i 9 i 14 mjestu H3 (Nandakumar i sur., 2011). na sličan način djeluje i genistein iz soje.

Kikuno i suradnici (2008) istraživali su utjecaj genisteina na stanice raka prostate LNCaP i PC3. Utvrdili su da genistein mijenja acetilaciju i deacetilaciju H3K9 tumor supresorskih gena *PTEN* (engl. *phosphate and tensin homolog*) i *CYLD* (engl. *CYLD lysine 63 deubiquitinase*). Povećava acetilaciju H3K9 u tumor supresorskom genu *p53* i *FOXO3a* (engl. *forkhead box O3*) koji potiče apoptozu kroz ekspresiju gena koju u njoj sudjeluju i uzrokuje njihovu ekspresiju i smanjuje deacetilaciju promotora posredovanu SIRT1 (sirtuin1).

U HDACi spadaju i sulforafan, izotiocijanat izoliran iz brokule. On djeluje kao HDACi u stanicama raka prostate, dojke i debelog crijeva. Istraživanja na različitim linijama stanica tumora prostate, potvrdila su HDAC inhibicijsku ulogu sulforafana zbog koje je došlo do povećane ekspresije tumor supresorskog gena *p21* i *BAX* (engl. *BCL2 associated X*), zaustavljanja staničnog ciklusa i inicijacije apoptoze. Sličan rezultat dobiven je i na stanicama tumora dojke gdje je došlo do zaustavljanja stanične proliferacije, ali isto tako je došlo do demetilacije hTERT zbog aktivacije kromatina acetilacijom H3K9 i H4 histona te demetilacije H3K9 i H3K27 (Ong i sur., 2011).

Spoj dialil sulfid iz luka je još jedan inhibitor HDAC. Mehanizam je isti kao i kod svih do sad navedenih bioaktivnih tvari, njegovom inhibicijom se postiže povećanje acetilacije H3 i H4. U Coco i HT29 tumorskim stanicama debelog crijeva, dnevni unos alil disulfida uzrokuje povećanu ekspresiju gena $p21^{WAF1}$ koja zaustavlja stanični ciklus prije prelaska restrikcijske točke G2 faze (Druesne i sur., 2006). I drugi organosulfurni derivati kao što su dialil disulfid i S-alil merkaptocistein su se pokazali kao iznimno dobri inhibitori HDAC (Nian i sur., 2009).

3. ZAKLJUČAK

Prehrana je jedan od najvažnijih okolišnih faktora koji djeluje na organizam. Važna je u svim životnim stadijima ljudskog života, a posebno prenatalnom razvoju, kada stvara gotovo stabilni epigenetički kod koji se zadržava cijeli život. U prenatalnom razvoju najvažniju ulogu u razvoju embrija ima prehrana majke koja putem različitih epigenetičkih mehanizama mijenja ekspresiju gena. Epigenom odrasle jedinke je manje podložan epigenetičkim promjenama uzrokovanim okolišnim faktorima, ali one mogu imati utjecaj ako se akumuliraju tijekom dužeg vremenskog perioda.

Sve je veći broj znanstvenih istraživanja koja potvrđuju da biološki aktivne tvari iz hrane biljnog i životinjskog porijekla imaju značajnu ulogu u ljudskom organizmu. Sudjeluju u gotovo svim fiziološko-biokemijskim procesima i mogu imati velik utjecaj na modeliranje epigenetičkih biljega koji uzrokuju određenu bolest kao što su tumori te njihove modifikacije mogu poslužiti u preventivne i terapeutske svrhe.

Iako većina rezultata pokazuje pozitivnu korelaciju između biološki aktivnih tvari i prevencije raka putem različitih epigenetičkih mehanizmima, potrebno je još dodatnih znanstvenih istraživanja koje će objasniti mehanizam djelovanja pojedinačnih komponenti bioloških aktivnih tvari i njihovih kombinacija kako bi se došlo do novih spoznaja koje će dovesti do uspješnije prevencije i novih metoda u terapiji određenog tipa tumora.

4. LITERATURA

Aagaard-Tillery, K.M, Grove, K., Bishop., J., Ke, X., Fu, Q., McKnight R., Lane R.H. 2008. Development origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. Journal of Molecular Endocrinology 41: 91-102.

Anderson, P. V., Kerr, B. J., Weber, T. E., Ziemer, C. J., Shurson, G. C., 2012. Determination and prediction of digestible and metabolizable energy from chemical analysis of corn coproducts fed to finishing pigs. Journal of Animal Science 90 (4): 1242-1254.

Bagić, I. 2015. Utjecaj majke na epigenom djeteta. Medicinski fakultet, Zagreb, 1-8.

Barrero, M.J., Boue, S., Belmonte, J.C.I. 2010. Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. Cell Stem Cell 7(5): 565-570.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., Shilatifard, A. 2009. An operational definition of epigenetics. Genes & Development 23: 781-783.

Berletch, J.B., Liu, C., Love, W.K., Andrews, L.G., Katiyar, S.K., Tollefsbol, T.O. 2008. Epigenetic and genetic mechanisms contributeto telomerase inhibition by EGCG. Journal of Cellular Biochemistry 103: 509-519.

Callinan, P. A. and Feinberg, A. P. 2006. The emerging science of epigenomics. Human Molecular Genetics 15 (1): 95-101.

Chen, Y.X., Fang, J.Y., Zhu ,H.Y., Lu, R., Cheng, Z.H., Qiu, D.K. 2004. Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. World Journal of Gastroenterology 10: 2643-2646.

Cole, P.A. 2008. Chemical probes for histone-modifying enzymes. Nature Chemical Biology 4: 590-7.

Davis, C.D., Uthus, E.O. 2002. Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. Journal of Nutrition 132: 292-297.

Druesne, N., Pagniez, A., Mayeur, C., Thomas, M., Cherbuy, C., Duée, P.H., Martel, P,, Chaumontet, C. 2004. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. Carcinogenesis 25:1227-1236.

Ehrlich, M. 2009. DNA hypomethylation in cancer cells. Epigenomics 1: 239–259.

Fang, M., Chen, D., Yang, C. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. Journal of Nutrition 37: 223S-228S.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., Esteller, M. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nature Genetics 37: 391-400.

Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., Kouzarides, T. 2003. The methyl-CpG binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. Journal of Biological Chemistry 278: 4035-4040.

Hardy, T.M., Tollefsbol, T.O. 2011. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. Epigenomics 3(4): 503-18.

Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J.F., Kohwi-Shigematsu, T. 2005. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. Nature Genetics 37: 31-40.

Jang, H., Serra, C. 2014. Nutrition, Epigenetics, and Diseases, Clinical Nutrition Research 3: 1-8.

Jiménez-Chillarón, J.C., Díaz., R, Martínez, D., Pentinat, T., Ramón-Krauel, M., Ribó, S., Plösch, T. 2012. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. Biochimie 94(11): 2242-63.

Jones, P.A, Baylin, S.B. 2007. The epigenomics of cancer. Cell 128(4): 683-92.

Kikuno, N., Shinna, H., Kawamoto, K., Hirata, H., Tanaka, Y., Majid, S., Igawa, M, Dahiya, R. 2008. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. International Journal of Cancer 123: 552-560.

Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature 366: 362-365.

Lin, Y.W., Chen, H.M., Fang, J.Y. 2011. Gene silencing by the polycomb group proteins and associations with cancer. Cancer Investigation 29: 187-195.

Link, A., Balaguer, F., Goel, A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. Biochemical Pharmacology 80: 1771-1792.

Liu, Z., Xie, Z., Jones, W., Pavlovicz, R.E., Liu, S., Yu, J., Li, P.K., Lin, J., Fuchs, J.R., Marcucci, G., Li, C., Chan, K.K. 2009. Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. Bioorganic & Medical Chemistry Letters 19: 706-709.

Majid, S., Dar, A.A., Ahmad, A.E., Hirata, H., Kawakami, K., Shahryari, V., Saini, S., Tanaka, Y., Dahiya, A.V., Khatri, G., Dahiya, R. 2009. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. Carcinogenesis 30: 662-670.

Michaud EJ, van Vugt MJ, Bultman, S.C. 1994. Differential expression of a new dominant agouti allele (Aiapy) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. Genes & Development 8(12): 1463-1472.

Murray, J., Farrington, D., Sekol, I., Olsen, R.F. 2009. Effects of parental imprisonment on child antisocial behaviour and mental health: a systematic review. Campbell Systematic Reviews: 4: 1-105.

Nandakumar, V., Vaid, M., Katiyar, S.K. 2011. (–)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. Carcinogenesis 32: 537-544.

Nian, H., Delage, B., Ho, E., Dashwood, R.H. 2009. Modulation of histone deacetylase activity bydietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds. Environmental and Molecular Mutagenesis 50: 213-221

Prates Ong, T., Moreno, F.S, Ross, S.A. 2011. Targeting the Epigenome withBioactive Food Components for Cancer Prevention. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics 4: 275-292.

Rainier, S., Johnson, L.A., Dobry, C.J., Ping, A.J., Grundy, P,E., Feinberg, A.P. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. Nature 362: 747-9.

Rees, W.D., Hay, S.M., Brown, D.S., Antipatis C., Palmer R.M. 2000. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses, Journal of Nutrition 130: 1821-1826.

Rowling, M.J, McMullen, M.H., Schalinske, K.L. 2002. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. Journal of Nutrition 132: 365-369.

Stein, A.D., Kahn, H.S., Rundle, A., Zybert, P.A., van der Pal-de Bruin, K., Lumey, L.H. 2007. Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation:

evidence from the Dutch famine. The American Journal of Clinical Nutrition 85(3): 869-76.

Susser, E., Neugebauer, R., Hoek, H.W., Brown, A.S., Lin, S., Labovitz, D., Gorman, J.M. 1996. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. Archives of General Psychiatry 53(1): 25-31.

Taby, R., Issa, J-P.J. 2010. Cancer epigenetics.CA Cancer Journal Clinicians 60(6): 376-392 .

Takai, D., Jones, P.A. 2002. Comprehensive analys of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. National Academy of Science USA 99: 3740-3745.

Trošelj, G. K., Kujundžić, N. R., Grbeša, I. 2009. Medicina. 45: 127-135.

Verma, M., Srivastava, S. 2002. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. The Lancet Oncology 3: 755-763.

Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E., Reyes, T.M. 2010. Maternal High-Fat Diet Alters Methylation and Gene Expression of Dopamine and Opioid-Related Genes. Endocrinology 151(10): 4756-4764.

Web 1: http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/
Web 2: http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2015-16/Farmacija/Molekularna%20biologija%20s%20genetikom/Predavanje%236a_RNAi.pdf
Web 3: http://www.genecards.org
Web 4: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/