

# CERM

CENTRE OF EXCELLENCE FOR  
REPRODUCTIVE AND  
REGENERATIVE MEDICINE

www.cerm.hr



1917–2017  
100 Years of School of  
Medicine, University  
of Zagreb

# Epigenetika u medicini

**Prof.dr.sc. Floriana Bulić-Jakuš, dr.med.**

Katedra za medicinsku biologiju, Zavod za biologiju  
Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu  
Istraživačka jedinica za reprodukciju i razvoj  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**MOLEKULARNA GENETIKA –  
NOVOSTI U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI**

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI  
Razred za prirodne znanosti  
Odbor za primjenjenu genomiku

16. listopada 2017.

Operational Programme  
Competitiveness  
and Cohesion

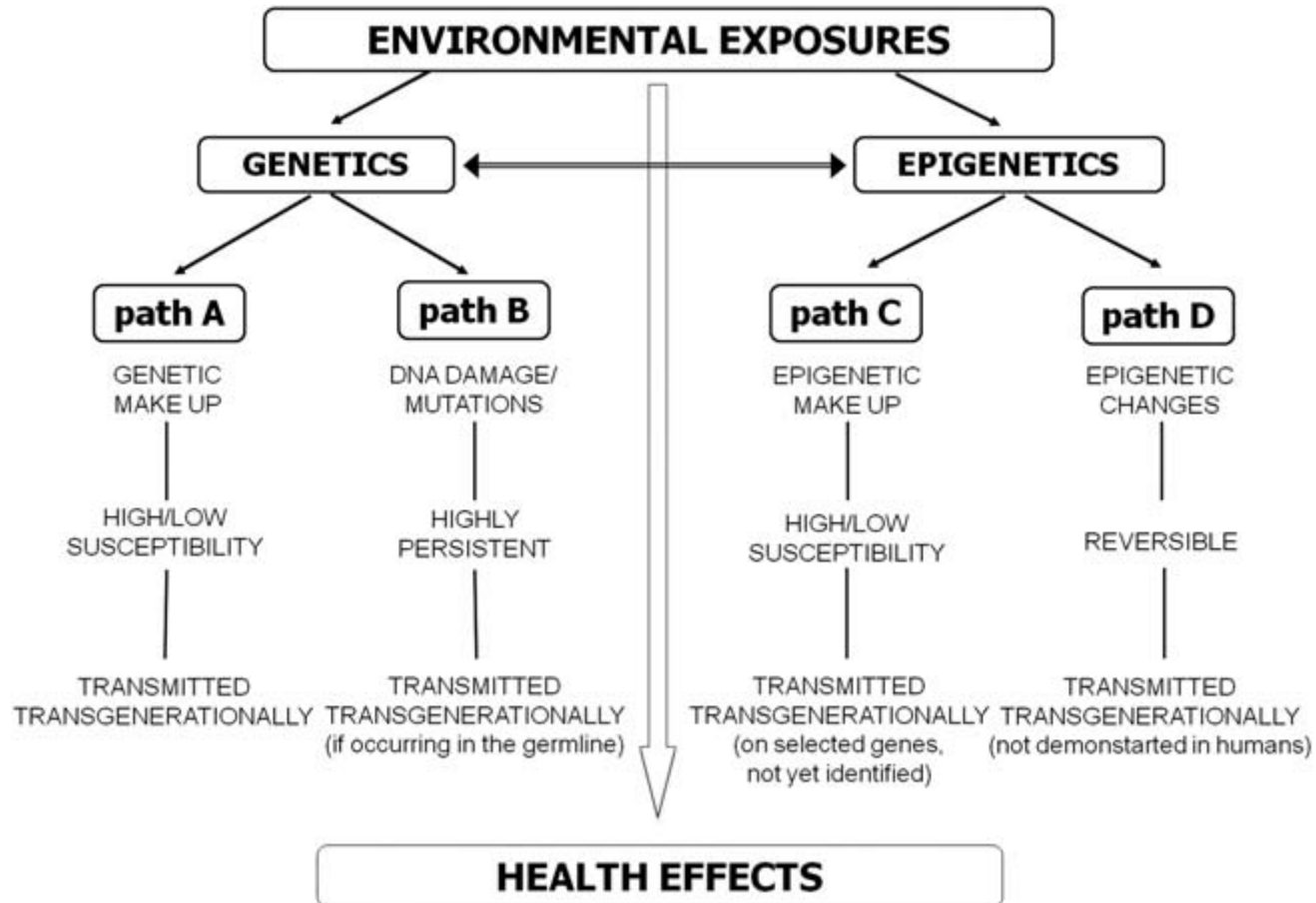
EUROPEAN STRUCTURAL  
AND INVESTMENT FUNDS

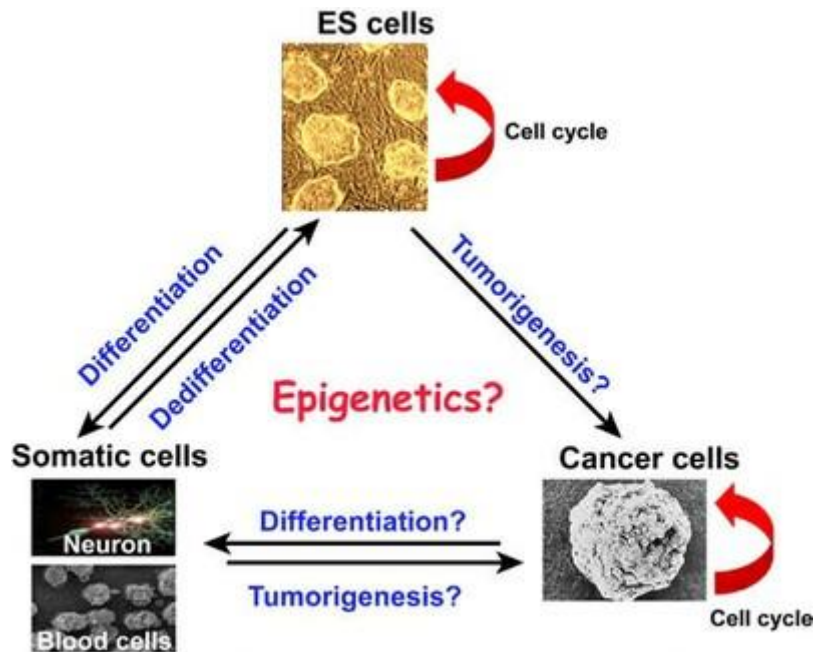
TOGETHER TO EU FUNDS



EUROPEAN UNION

- Biologija definira epigenetiku kao proučavanje **mitotički ili mejotički nasljedne promjene genske ekspresije ili staničnog fenotipa**
- Promjene su prouzrokovane mehanizmima koji **NE MIJENJAJU sekvencu DNA** (promjena DNA sekvence: mutacija)
- EPIGENETIKA: epigenom, epigenetski potpisi (*signatures*) epigenetske oznake (*marks*), **epimutacije**
- Epimutacije: **stabilne**- temelj dijagnostike  
**reverzibilne**- temelj terapije





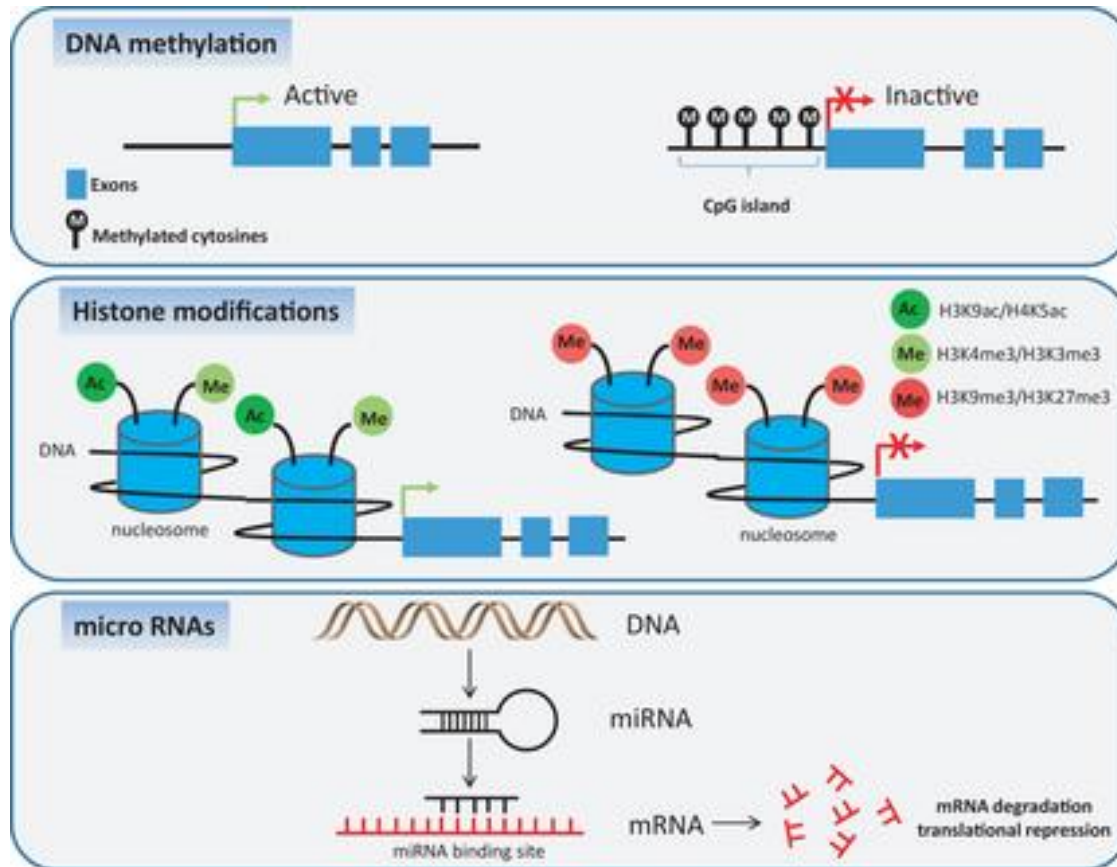
Yanming Wang, 2017 The Pennsylvania State University

<http://bmb.psu.edu/directory/yuw12>

**Akademik N. Škreb Tumori bez mutacija? Lijec Vjesn. 1981, 103:204-207** eksperimentalni teratokarcinom miša dobiven presađivanjem normalne gastrule u ektopični okoliš- promjena genske ekspresije vodi raku.

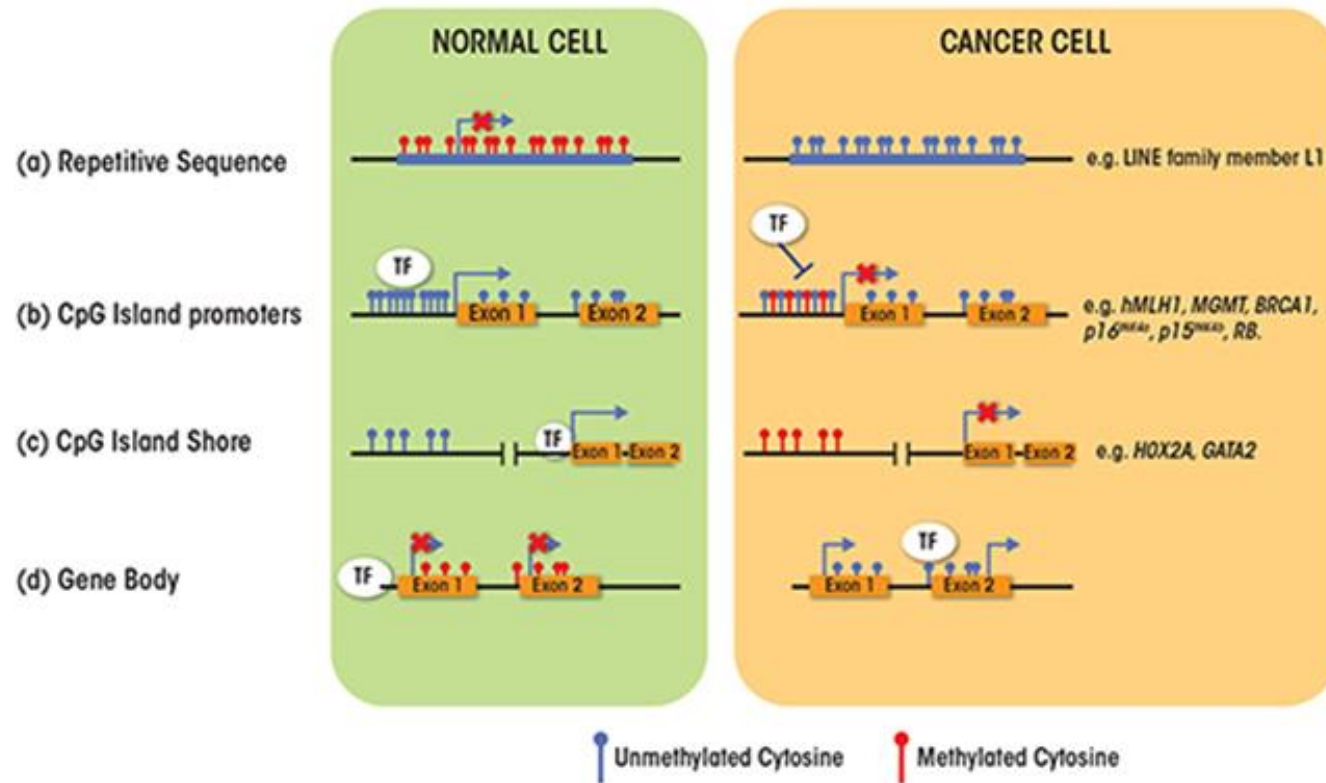
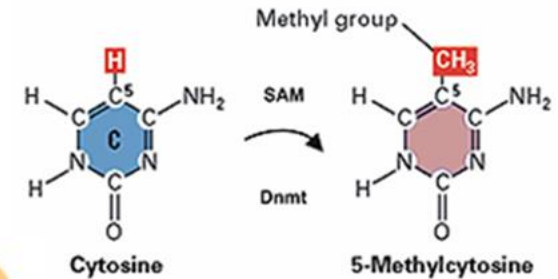
Mack SC, et al. **Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy.** Nature. 2014; 506:445–450. Odsutnost rekurentnih mutacija u subtipu pedijatrijskih ependimoma *fossae posterioris* što sugerira **nemutacijski mehanizam za inicijaciju raka.** Metilatorski fenotip CpG otoka koji vodi transkripcijskom utišavanju Polycomb repressive complex 2 (PRC2) ciljeva, suprimira ekspresiju diferencijacijskih gena putem trimetilacije H3K27.

## Mehanizmi regulacije genske ekspresije



## 1. Metilacija DNA

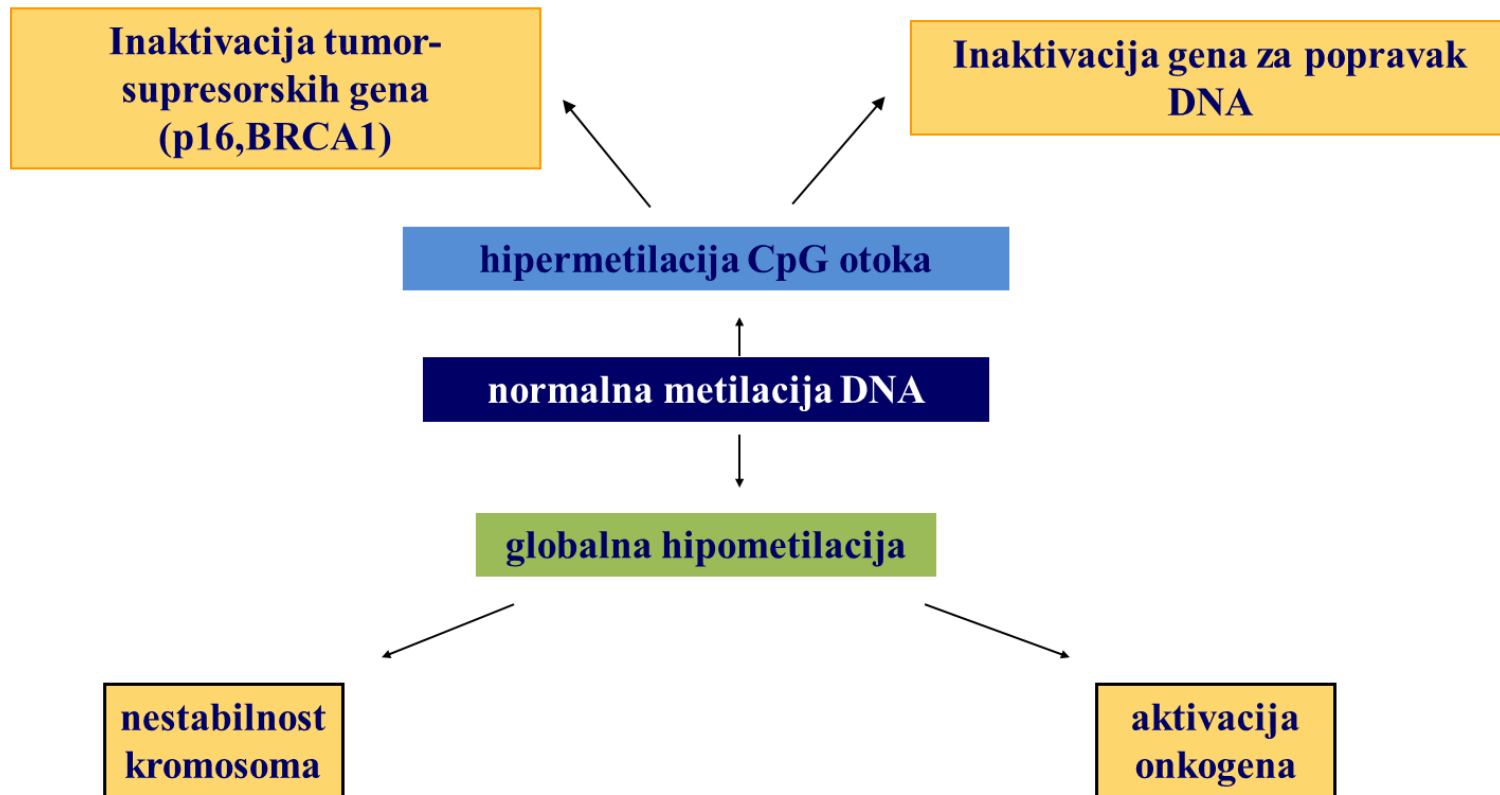
Reverzibilna promjena (epimutacija) za razliku od mutacija

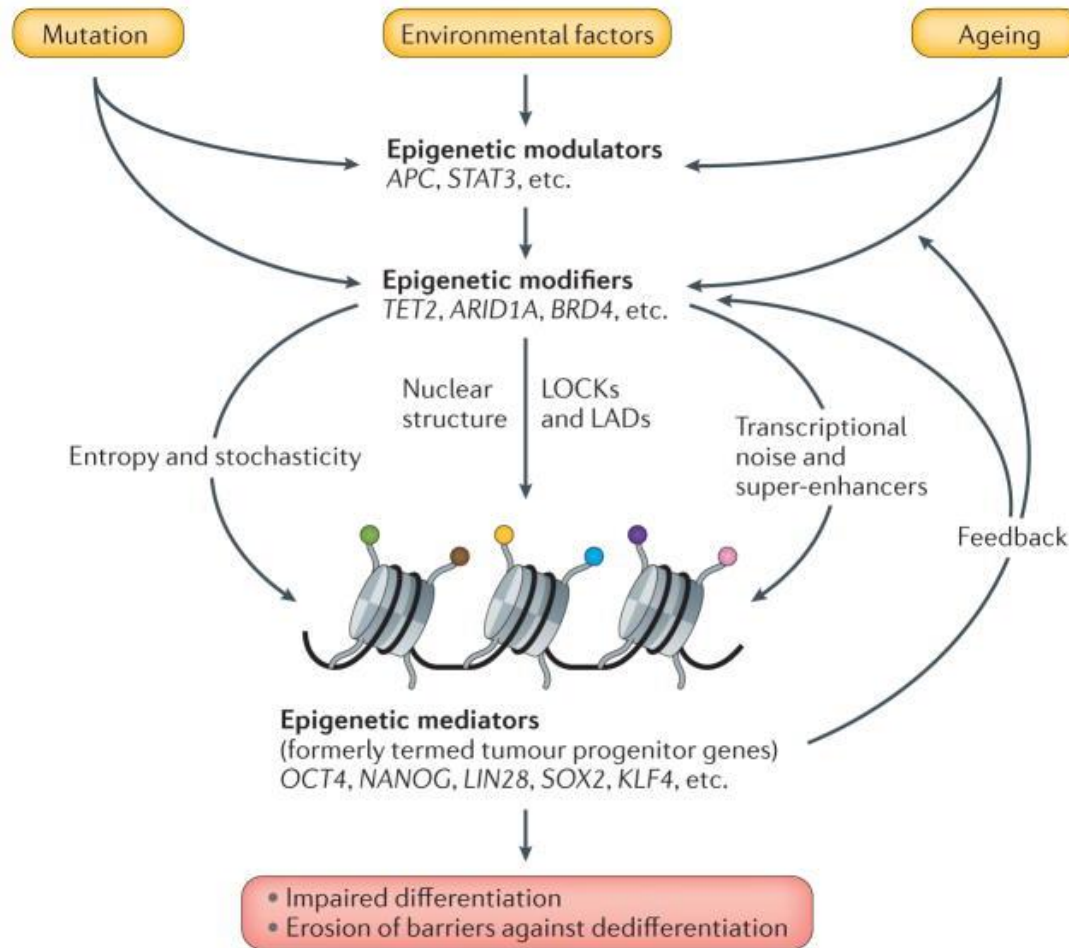


Manja gustoća CpG sekvenci locirana blizu CpG otoka (unutar 2 kb)

## Stanice raka u usporedbi sa normalnim stanicama:

- smanjen ukupan stupanj metilacije - povećana metilacija CpG otoka- svaki tumor sadrži nekoliko stotina aberantno metiliranih CpG otoka od kojih su mnogi dijelovi promotora (smanjena genska ekspresija)- povećana aktivnost DNMT (DNA metil-transferaza)





Epigenetička nestabilnost: erozija barijera protiv dediferencijacije kao što su velike organizirane K9 modifikacije kromatina (LOCKs) koje se preklapaju s domenama povezanim s laminom (LADs) i pojava hipometiliranih blokova koji sadrže najvarijabilnije eksprimirane domene tumorskog genoma i interferiraju s normalnom diferencijacijom

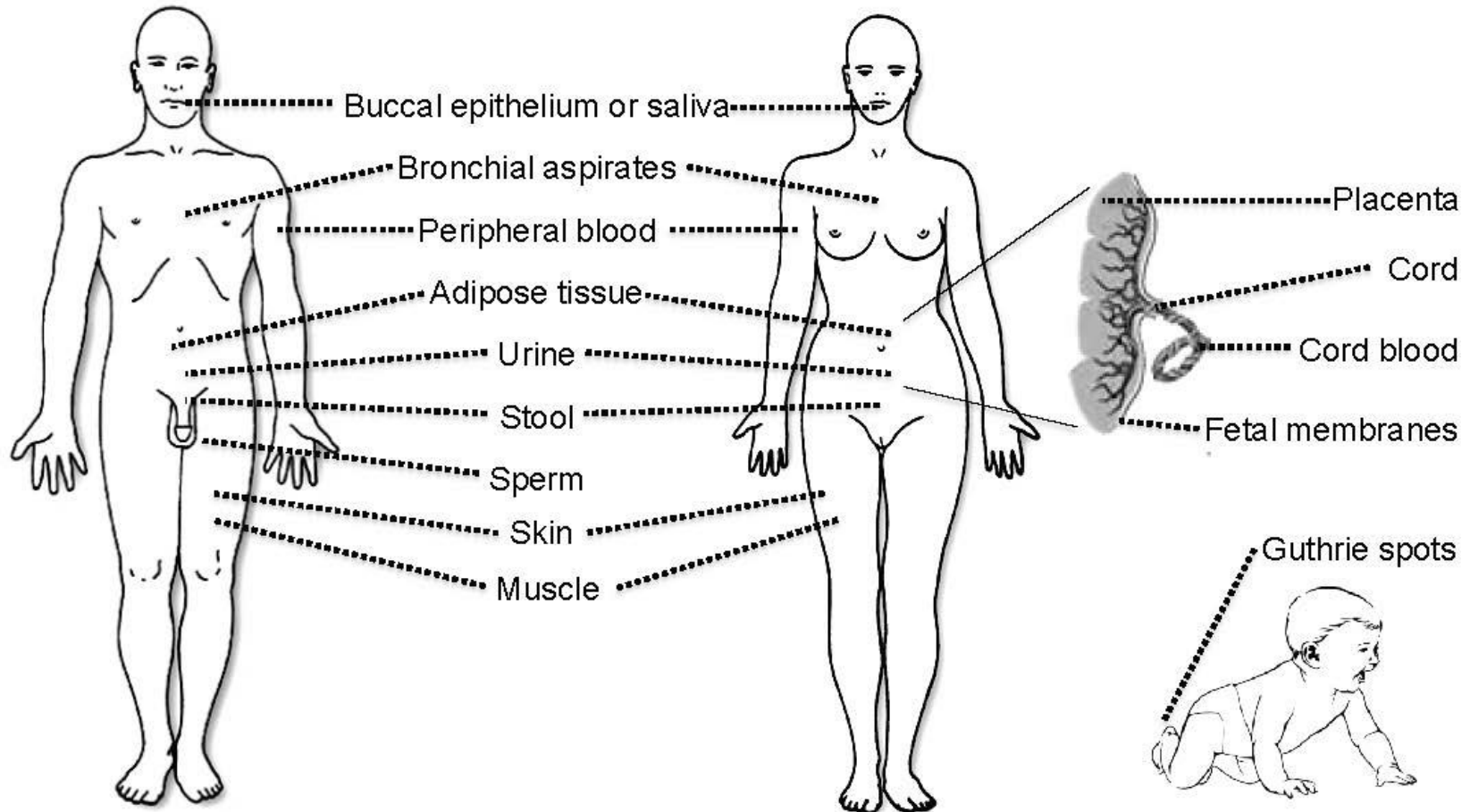
Feinberg AP et al. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. Functional classification of cancer genes and their contribution to malignancy. Nat Rev Genet. 17:284-99, 2016.



Klasa	Definicija	Primjer
<b>Genetička klasifikacija</b>		
Onkogen	Gen čija je aktivacija putem mutacije povoljna za stanicu raka. Djeluje kao dominantan gen.	<i>MYC, KRAS, PIK3CA, ABL1, BRAF</i>
Gen supresor tumora	Gen čija je inaktivacija putem mutacije povoljna za stanicu raka. Općenito djeluje kao recesivan gen.	<i>RB1, TP53, WT1, NF1, NF2, VHL, APC, CDKN2A</i>
<b>Selekcijska klasifikacija</b>		
„Vozač” ( <i>Driver gene</i> )	Gen, čija mutacija ili aberantna ekspresija uzrokuje klonalnu ekspanziju tumorskih stanica tj. daje selektivnu prednost stanicama raka.	<i>MYC, KRAS, PIK3CA, ABL1, RB1, TP53, WT1</i>
„Putnik” ( <i>Passenger gene</i> )	Usputne mutacije koje ne utječu na tumorski fenotip.	Prema procjenama čine 99.9% svih mutacija u raku
<b>Epigenetička funkcionalna klasifikacija</b>		
Epigenetički modulator	Mutirani ili gen divljeg tipa koji aktivira ili reprimira epigenetičku mašineriju u raku.	<i>IDH1/2, KRAS, APC, TP53, STAT1/3, YAP1, CTCF</i>
Epigenetički modifikator	Mutirani ili gen divljeg tipa koji modificira metilaciju DNA ili strukturu kromatina ili njegovu interpretaciju u raku.	<i>SMARCA4, PBRM1, ARID1A, ARID2, ARID1B, DNMT3A, TET2, MLL1/2/3, NSD1/2, SETD2, EZH2, BRD4</i>
Epigenetički medijator (tumor progenitor gene)	Gen reguliran putem epigenetičkog modifikatora u raku (mutacije rijetke ili odsutne) koji povećava pluripotentnost ili preživljenje.	<i>OCT4, NANOG, LIN28, SOX2, KLF4</i>

## BIOMARKERI

- Epigenetičke promjene su od jednake važnosti ili čak od veće važnosti od mutacija za razvoj raka
- **Aberantna metilacija DNA:** prisutna skoro uvijek ili uvijek u raku, javlja se rano na specifičnim regijama
- Biomarkeri iz tumorskih biopsija važni za odluku o terapiji
- Biomarkeri iz tjelesnih tekućina važni za rano otkrivanje
- Malo ih je u kliničkoj primjeni iako je njihov potencijalni broj puno veći
- Nedostatak standardizacije koči kliničku primjenu biomarkera
- **Kvantitativne metodologije** su osnova određivanja klinički relevantnog praga
- **Potrebna standardizacija** bazirana na multilaboratorijskim programima kontrole kvalitete
- Važna validacija kandidata u kliničkim studijama
- Interpretacija rezultata DNA-metilacije zahtijeva ekspertnu analizu u posebnim centrima



Tkiva u kojima se mogu istraživati **DNA-metilacijski biomarkeri**. Nisu posebno prikazana tumorska tkiva budući da rak može pogoditi bilo koji dio tijela.

## Prednosti DNA metilacijskih biomarkera za *in vitro* dijagnostiku:

1. DNA metilacija omogućava pouzdana mjerenja na **heterogenim i degradiranim uzorcima (npr. formalinom fiksirani te u parafin uklopljeni)**.
2. Specifična je za tip stanice ali **robustna** u odnosu na prolazne perturbacije pa komplementira statične biomarkere (DNA sekvence) i nestabilne biomarkere bazirane na RNA-ekspresiji.
3. DNA metilacija je binarna oznaka (tj. za jednu stanicu i alel svaki CpG je metiliran ili nemetiliran)

2005. Hegi i sur,: bolesnici s glioblastomom tretirani Temozolomidom (alkilirajući agens) bolje preživljavali ako je promotorski CpG otok MGMT gena za popravak DNA bio metiliran

Wick, W et al. MGMT testing-the challenges for biomarker-based glioma treatment. Nat. Rev. Neurol. 10: 372–385, 2014.

C. Bock et al. for the BLUEPRINT consortium

**Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications** . Nature Biotechnology 34:726–737, 2016. DOI:doi:10.1038/nbt.3605

DNA methylation patterns are altered in numerous diseases and often correlate with clinically relevant information such as disease subtypes, prognosis and drug response. With suitable assays and after validation in large cohorts, such associations can be exploited for clinical diagnostics and personalized treatment decisions. Here we describe the results of a community-wide benchmarking study comparing the performance of all widely used methods for DNA methylation analysis that are compatible with routine clinical use. We shipped 32 reference samples to 18 laboratories in seven different countries. Researchers in those laboratories collectively contributed 21 locus-specific assays for an average of 27 predefined genomic regions, as well as six global assays. We evaluated assay sensitivity on low- input samples and assessed the assays' ability to discriminate between cell types. Good agreement was observed across all tested methods, with **amplicon bisulfite sequencing and bisulfite pyrosequencing showing the best all-round performance**.

Our technology comparison can inform the selection, optimization and use of DNA methylation assays in large-scale validation studies, biomarker development and clinical diagnostics.

Testirane metode:

1. amplicon bisulfite sequencing (Amplicon BS) – Next generation sequencing of pooled PCR amplicons derived from bisulfite-converted DNA
2. Enrichment bisulfite sequencing (enrichment BS)- similar-microdroplet based amplification to enrich many genomic regions in parallel
3. Mass spectrometric analysis of DNA methylation (EpiTyper)
4. Bisulfite pyrosequencing sequencing by synthesis to single PCR amplicons obtained from bisulfite-converted DNA

Gen	Tip biomarkera	Tip raka	Dijagnostički test /kit: naziv (proizvođač)
<i>VIM</i>	dijagnostički	kolorektalni	Cologuard (Exact Sciences)
<i>SEPT9</i>	dijagnostički	kolorektalni	Epi proColon (Epigenomics) ColoVantage (Quest Diagnostics) RealTime mS9 (Abbott)
<i>SHOX2</i>	dijagnostički	pluća	Epi prolong (Epigenomics)
<i>GSTP1/APC/RASSF1A</i>	dijagnostički	prostata	ConfirmMDx (MDx Health)
<i>MGMT</i>	prediktivni	glioblastom	PredictMDx Glioblastoma (MDx Health)  SALSA MS-MLPA probemix ME011 Mismatch Repair genes (MRC-Holland)  PyroMark MGMT Kit (Qiagen)

## TERAPIJA

Peter A. Jones, Jean-Pierre J. Issa & Stephen Baylin

Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics* 17, 630–641 (2016)

Next-generation sequencing has revealed that **more than 50% of human cancers harbour mutations in enzymes that are involved in chromatin organization**. Tumour cells not only **are activated by genetic and epigenetic alterations**, but also routinely **use epigenetic processes to ensure their escape from chemotherapy and host immune surveillance**. Hence, a growing emphasis of recent drug discovery efforts has been on targeting the epigenome, including DNA methylation and histone modifications, with several new drugs being tested and some already approved by the US Food and Drug Administration (FDA). The future will see the increasing success of combining epigenetic drugs with other therapies. **As epigenetic drugs target the epigenome as a whole, these true 'genomic medicines' lessen the need for precision approaches to individualized therapies.**

Danas:

Postoji mogućnost **ciljanog metilacijskog editiranja genoma sisavca (CRISPR/Cas9)**

Table 1 | Epigenome-targeting drugs that are approved or in clinical trials

Inhibitor	Mechanism	Rationale	Drug	Target	Cancer type	Approval or trial status	Pharmaceutical company
DNMTi	Inhibition of DNA methylation	Removes hypermethylation of tumour suppressor genes	Azacitidine (Vidaza)	Pan-DNMT	MDS	EMA and FDA	Celgene Corporation (and generic)
			Decitabine (Dacogen)	Pan-DNMT	AML MDS	EMA (for AML) and FDA (for MDS)	Otsuka Pharmaceutical (and generic)
			Guadecitabine	Pan-DNMT	AML	Phase III	Astex Pharmaceuticals
HDACi	Inhibition of histone deacetylation	Reduces oncogene transcription and signalling, and promotes cell cycle arrest and apoptosis	Belinostat (Beleodaq)	HDAC class I and class II	Peripheral T cell lymphoma	FDA	Spectrum Pharmaceuticals
			Panobinostat (Farydak)	HDAC class I, class II and class IV	Multiple myeloma	FDA	Novartis
			Romidepsin (Istodax)	HDAC class I	Cutaneous T cell lymphoma	FDA	Celgene
			Vorinostat (Zolinza)	HDAC class I, class II and class IV	Cutaneous T cell lymphoma	FDA	Merck & Co.
			Abexinostat	HDAC class I, class II and class IV	Lymphoma	Phase I and phase II	Pharmacyclics
			ACY-241	HDAC6	Multiple myeloma	Phase I	Acetylon Pharmaceuticals
			AR-42	HDAC class I, class II and class IV	Haematological malignancies	Phase I	Arno Therapeutics
			CUDC-907	HDAC class I and class IIb	Solid tumours and haematological malignancies	Phase I	Curis
			CXD101	HDAC class I	Solid tumours and haematological malignancies	Phase I	Celleron Therapeutics
			Entinostat	HDAC class I	Breast cancer	Phase III	Syndax Pharmaceuticals
			Givinostat	HDAC class I and class II	Haematological malignancies	Phase II	Italfarmaco
			Mocetinostat	HDAC class I	Solid tumours and haematological malignancies	Phase II	Mirati Therapeutics
			Resminostat	HDAC1, HDAC3 and HDAC6	Hepatocellular carcinoma	Phase II	4SC
Ricolinostat	HDAC6	Solid tumours and haematological malignancies	Phase II	Acetylon			

Peter A. Jones, Jean-Pierre J. Issa & Stephen Baylin. Targeting the cancer epigenome for therapy Nature Reviews Genetics 17, 630–641 (2016)



# Epigenetika u medicini

iBET	Inhibition of BET binding to acetylated histones	Reduces oncogene signalling through super-enhancers	CPI-0610	Pan-BET	Haematological malignancies	Phase I	Constellation Pharmaceuticals
			TEN-010	Pan-BET	AML, MDS and solid tumours	Phase I	Tensha Therapeutics
			BAY1238097	Pan-BET	Solid tumours and lymphomas	Phase I	Bayer Corporation
			OTX015	Pan-BET	Haematological malignancies	Phase I and phase II	Merck & Co.
			INCB054329	Pan-BET	Leukaemias and solid tumours	Phase I and phase II	Incyte Corporation
			BMS-986158	Pan-BET	Solid tumours	Phase I and phase II	Bristol-Myers Squibb (BMS)
			FT-1101	Pan-BET	AML and MDS	Phase I	Forma Therapeutics
			GSK525762	Pan-BET	Solid tumours and haematological malignancies	Phase I	GlaxoSmithKline (GSK)
IDH inhibitors	Inhibition of mutant forms of <i>IDH</i> , a TCA cycle enzyme; also affect erasers of DNA methylation (TET enzymes) and histone methylation	Inhibits activating mutations	AG-881	IDH1 and IDH2	<i>IDH</i> mutant malignancies	Phase I	Agios Pharmaceuticals
			AG-120	IDH1	<i>IDH1</i> mutant malignancies	Phase I and phase II	Agios
			IDH305	IDH1	<i>IDH1</i> <sup>R132</sup> mutant malignancies	Phase I	Novartis
			AG-221	IDH2	<i>IDH2</i> mutant malignancies	Phase I and phase II	Agios
EZH2 inhibitors	Blockage of H3K27 methylation	Inhibits activating mutations; induces apoptosis or differentiation	CPI-1205	EZH2	Lymphomas	Phase I	Constellation
			Tazemetostat	EZH2	Lymphomas and sarcomas	Phase I and phase II	Epizyme
DOT1 inhibitor	Inhibition of H3K79 methylation	Synthetic lethality of cells with <i>MLL</i> rearrangement	EPZ-5676	DOT1L	<i>MLL</i> -rearranged leukaemias	Phase I	Epizyme
LSD1 inhibitor	Inhibition of H3K4 and H3K9 demethylation	Promotes expression of tumour suppressor genes	GSK2879552	LSD1	AML and small-cell lung cancer	Phase I and phase II	GSK

AML, acute myeloid leukaemia; DNMTi, DNA methyltransferase inhibitors; EMA, European Medicines Agency; FDA, US Food and Drug Administration; H3K27, histone 3 lysine 27; HDACi, histone deacetylase inhibitors; iBET, inhibitors of the bromodomain and extra-terminal motif proteins; IDH, isocitrate dehydrogenase; LSD1, lysine-specific histone demethylase 1; MDS, myelodysplastic syndrome; *MLL*, mixed-lineage leukaemia; TCA, tricarboxylic acid; TET, ten-eleven translocation.

Zavod za biologiju, Medicinski fakultet, Zagreb

Akademik Nikola Škreb : osnivač Zagrebačke embriološke škole

Draško Šerman- diferencijalna ekspresija proteina u razvoju- začetak proteomike

## MZOŠ projekti:

Eksperimentalni pristup reproduktivnom zdravlju sisavaca i

Eksperimentalni embrionalni tumori i razvoj sisavaca in vitro i in vivo (2002-2013) (F. Bulić-Jakuš)

## Sveučilište u Zagrebu- potpore:

Epigenetika razvojnih procesa i tumorigeneze u sisavaca (in vitro/in vivo) (2013- do danas) (F. Bulić-Jakuš)  
istraživanje nuspojava epigenetičkih lijekova u razvoju sisavaca i terapiji tumora (DNA-demetilacijski agens, inhibitori histonskih deacetilaza, si RNA)

## HRZZ projekt, 2017

Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa (epiSem) (D. Ježek)

Zavod za biologiju, MEF

Zavod za histologiju i embriologiju, MEF

Škola narodnog zdravlja, MEF

KBC Sestre milosrdnice

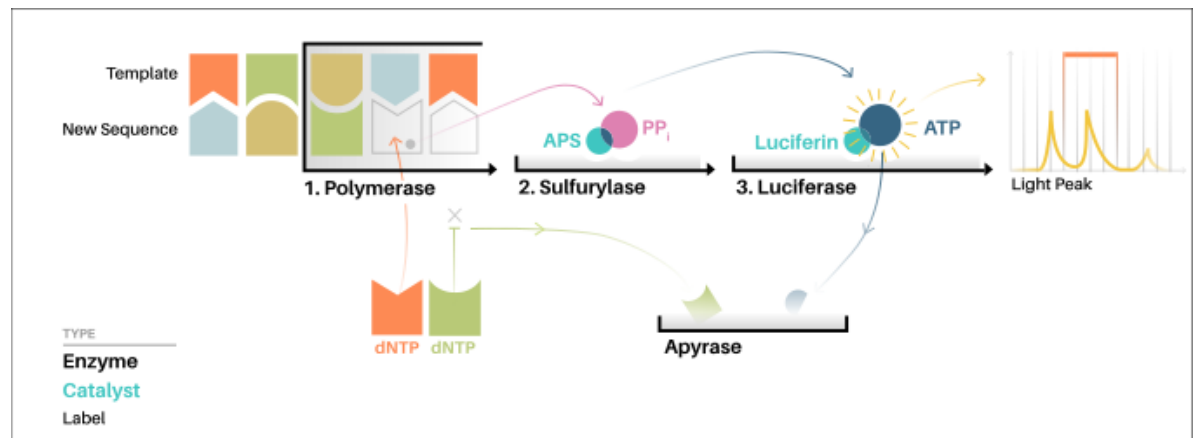
KBC Zagreb

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

- Bisulfitno pirosekvenciranje bazirano je na **metodologiji sekvenciranja pomoću sinteze** koristeći kao početni materijal **DNA tretiranu bisulfitom**. Metoda je relativno jeftina i brza i pogodna za analizu DNA metilacije na **pojedinom genskom lokusu**. Metilacija DNA određuje se na jednom CpG nukleotidu ali se razina metilacije određuje **kvantitativno** za svaki CpG lokus kao srednja vrijednost svih epialela koji su amplificirani tijekom PCR-a. Analitička osjetljivost iznosi oko 5%–10% za pojedine CpG dinukleotide. Odlično se mogu analizirati mali PCR amplikoni poput onih koji se dobiju iz **parafinskih blokova nakon fiksacije u formalinu**. Važno je napomenuti da ovakav pristup omogućava **kontrolu kvalitete bisulfitne konverzije** putem programa koje je proizvođač ugradio u sustav. Pirosekvenciranje očitava do 100 pb.

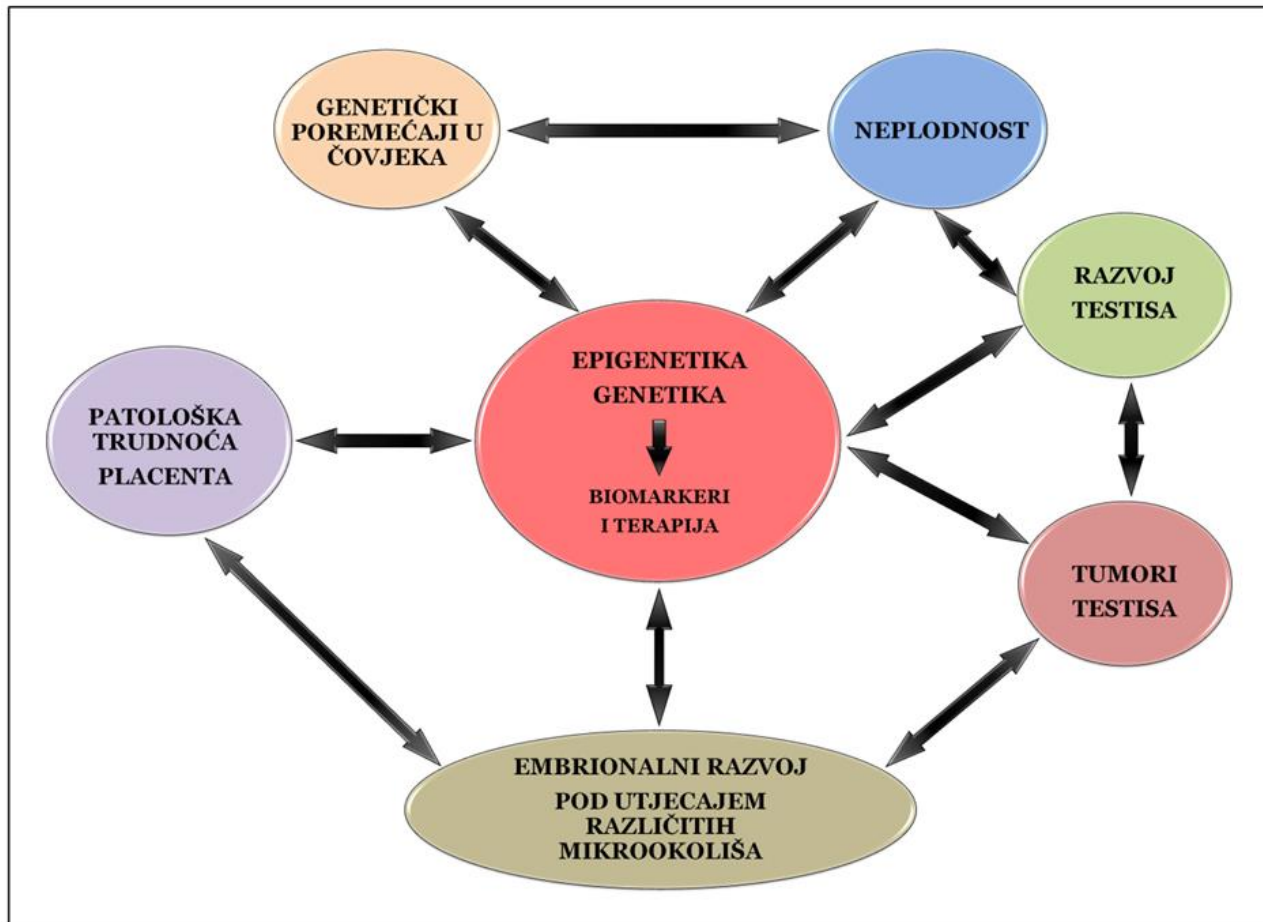
Mikeska T and Jeffrey M. Craig J M. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. Genes 5:821-864, 2014.

PyroMark q24, Qiagen  
Zavod za biologiju, MEF  
Istraživanje metilacije DNA u  
sklopu projekata potpore  
Sveučilišta, HRZZ, ZCI

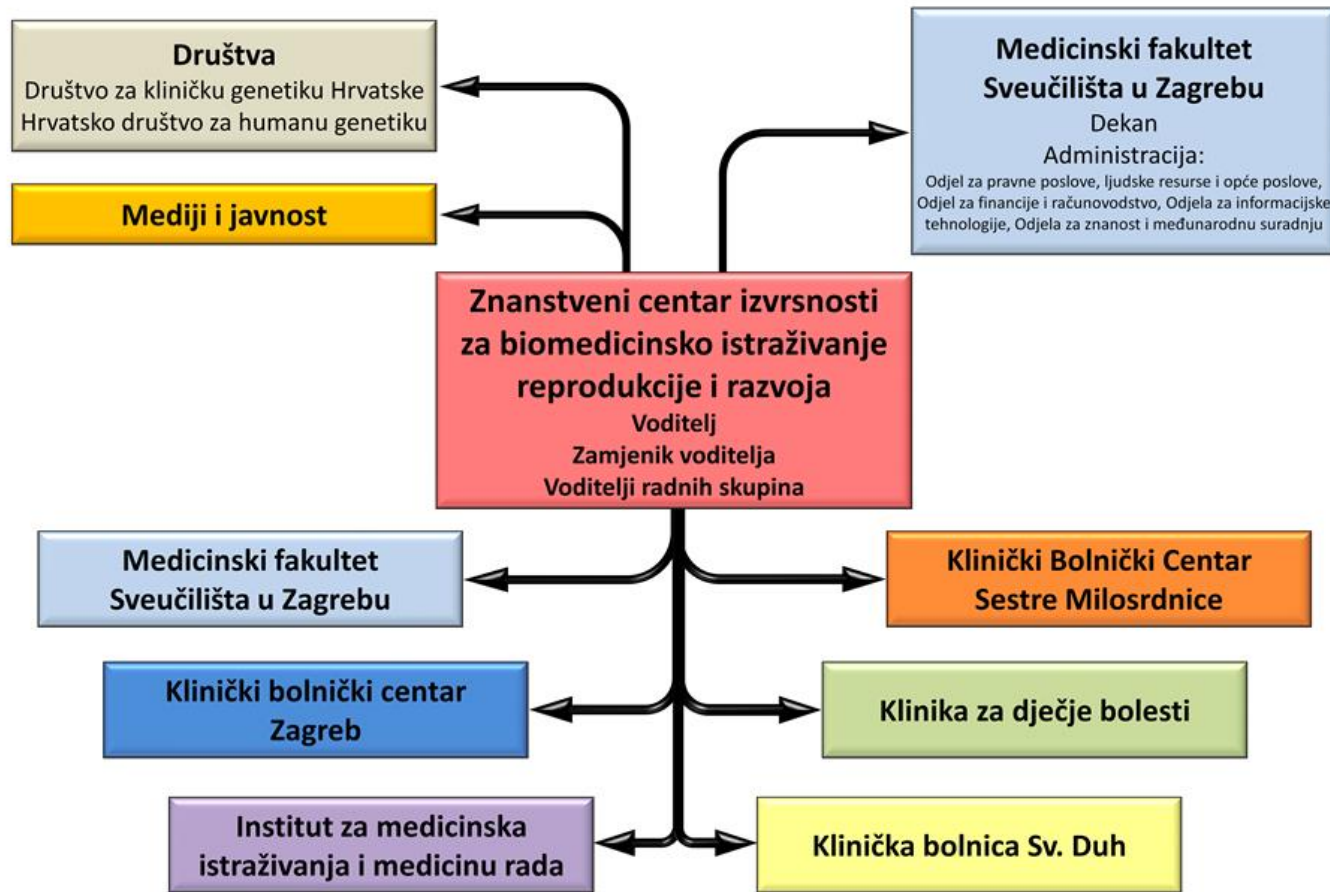


Znanstveni centar izvrsnosti (ZCI) za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, 2014. (D. Ježek, S. Vukičević)

Istraživačka jedinica za biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja (D. Ježek)



Znanstveni interesi i njihovo umrežavanje



Organizacija ZCI – Istraživačka jedinica za biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja



1917–2017  
100 Years of School of  
Medicine, University  
of Zagreb

# Epigenetika u medicini

## Projekt CERRM: Reproktivna i regenerativna medicina – istraživanja novih platformi i potencijala, 2017.

Istraživanje epigenetičkih mehanizama i oznaka u animalnim modelima i bolestima čovjeka-  
Zavod za biologiju, MEF, Zagreb- voditelji elemenata: F. Bulić-Jakuš, N. Sinčić, LJ. Šerman

Element 2. Istraživanje epigenetičkih oznaka u animalnoj reprodukciji i razvoju

Voditelj:

prof.dr.sc. dr.med.Floriana Bulić-Jakuš

Suradnici:

Prof.dr.sc. Maja Vlahović, Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

doc.dr.sc. Ana Katušić Bojanac, Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

doc.dr.sc. dr.med. Nino Sinčić, Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Izv.prof.dr.sc.dr.med. Ljiljana Šerman, Zavod za biologiju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Prof.d.sc. dr.med. Gordana Jurić-Lekić, Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

Prof.dr.sc. dr.med. Nina-Canki Klain, Zavod za biologiju i Laboratorij za Medicinsku genetiku, neurogenetiku i mišićne poremećaje, HIIM, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Prof.dr.sc. dr.med Mirjana Kujundžić Tiljak, ŠNZ Andrija Štampar, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Dr.sc. Gordana Jakovljević, Klinika za dječje bolesti, Zagreb

Znan.savj.dr.sc. Aleksandra Fučić, Institut za medicinsko istraživanje i medicinu rada, Zagreb

Dr.sc. dr. med. Nikola Sobočan, specijalist gastroenterolog, KBC Merkur, Zagreb

Dr.sc. dr. med. Vedrana Mužić, specijalist fizikalne i rehabilitacijske medicine, KBC-Zagreb

Mr.sc. dr.med. Milvija Plazibat, specijalist pedijatar, bolnica Zabok

Dr.med. Robert Buljubašić, specijalist kirurg, Klinička bolnica Dubrava

The project was co-financed by the European Union through the European Regional Development Fund.

The content of the publication/broadcasted material is the sole responsibility of  
Floriana Bulić-Jakuš.