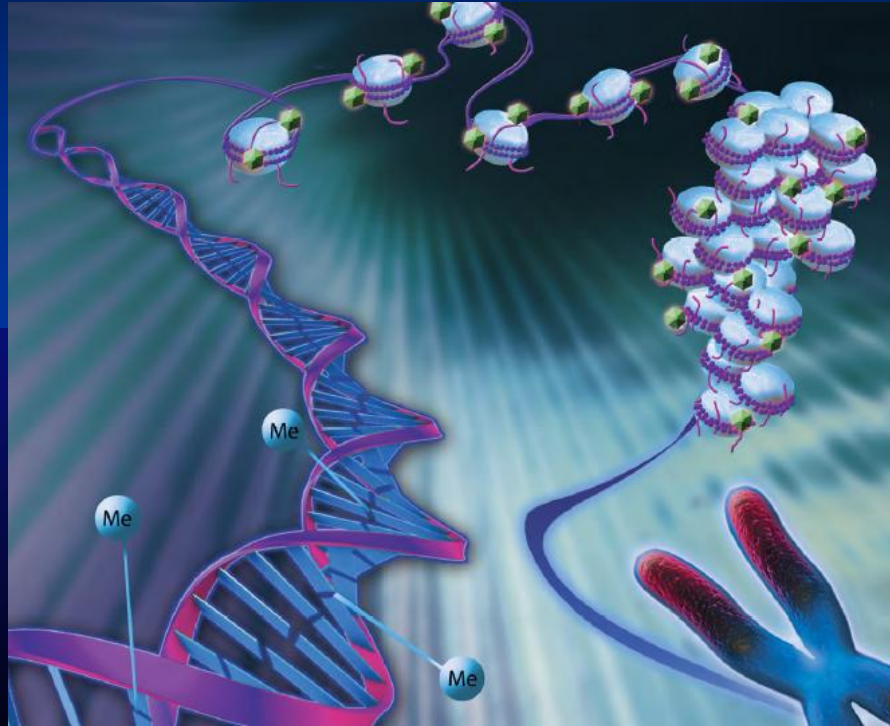


Επιγενετική-Μεθυλίωση του DNA



Σοφία Μαστοράκη, MSc Clinical Chemistry

PhD student

Analysis of Circulating Tumor Cells lab

Department of Chemistry,

University of Athens, Greece

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ



❖ **Conrad Weddington, 1939:** εισήγαγε τον όρο "ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ".

"ο κλάδος της βιολογίας, που μελετά την αιτιώδη αλληλεπίδραση ανάμεσα στα γονίδια και τα προϊόντα τους και φέρνει το φαινότυπο σε λειτουργία"



❖ **Andrian Bird, 2002:** "Φαινόμενο που περιλαμβάνει κληρονομούμενες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση όπου δεν μεταβάλλεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλά επιδρά στην διαμόρφωση του DNA".

ή

honeybee
(*Apis mellifera*)



The illustration shows three honeybees from a dorsal perspective. The worker bee on the left is the smallest, with a yellow and black striped abdomen. The queen bee in the center is the largest, with a long, black, segmented abdomen. The drone bee on the right is larger than the worker but smaller than the queen, with a yellow and black striped abdomen. Each bee is labeled below it: 'worker', 'queen', and 'drone'.

worker

queen

drone

© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

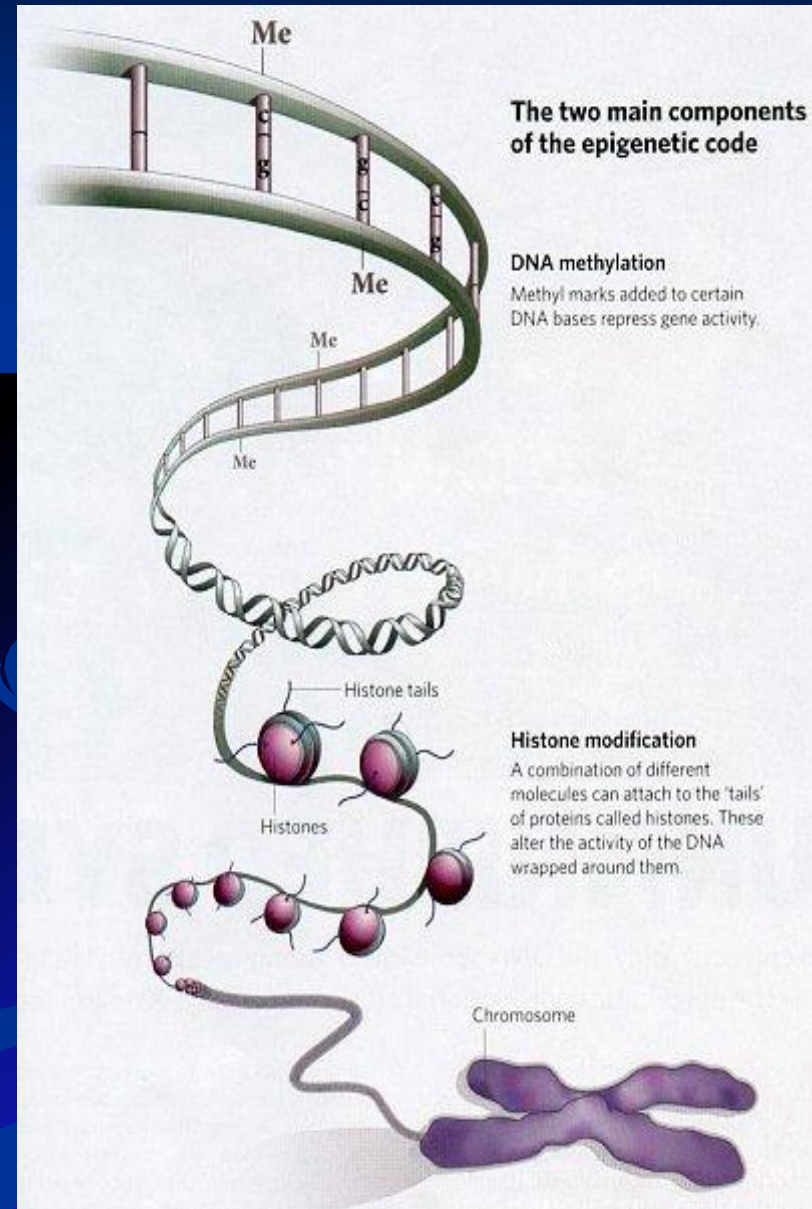
❖ Τα **δύο** κύρια στοιχεία του επιγενετικού κώδικα:

- 1) Μεθυλίωση του DNA
- 2) Τροποποιήσεις ιστονών (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικιτινιλίωση)



Επίδραση στη δομή της χρωματίνης!!

Qiu J. Nature 2010 Vol 441, 143-145



Επιγενετικοί μηχανισμοί

Οι **τρεις** κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι:

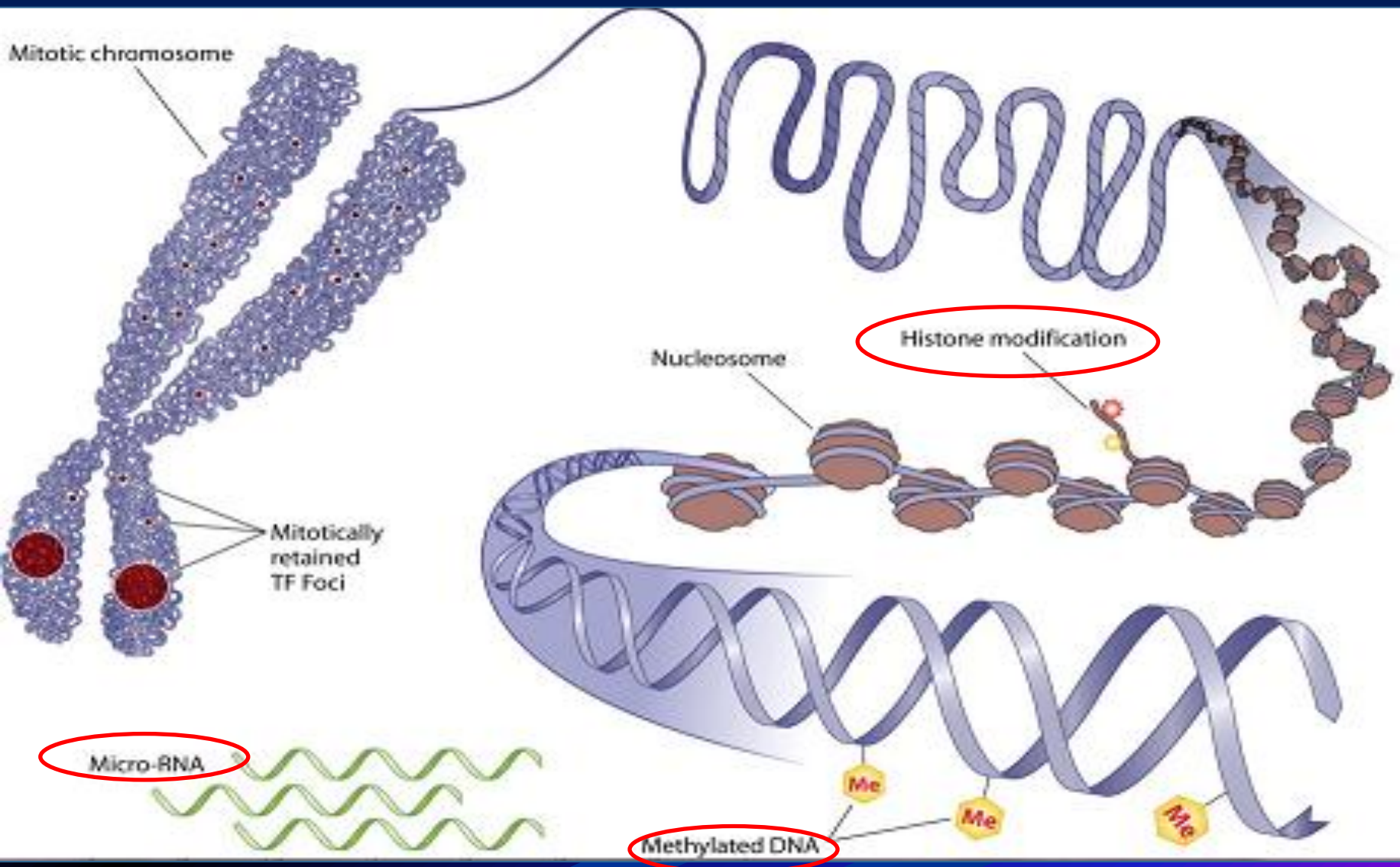
- i) Μεθυλίωση του DNA,
- ii) Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και
- iii) Έκφραση *micro-RNAs (miRNAs)* και *non-coding RNAs (ncRNAs)*

Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να **ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων** τροποποιώντας την πρόσβαση στους υποκινητές γονιδίων (**gene promoters**) και στις ρυθμιστικές περιοχές.



Οποιαδήποτε απορρύθμιση στους τρεις μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε ακατάλληλη έκφραση γονιδίων και να αναπτυχθεί καρκίνος ή κάποια άλλη επιγενετική ασθένεια

Κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί



Επιγενετικοί μηχανισμοί

Χρωμόσωμα

Τροποποιήσεις
Ιστονών

Νουκλεόσωμα

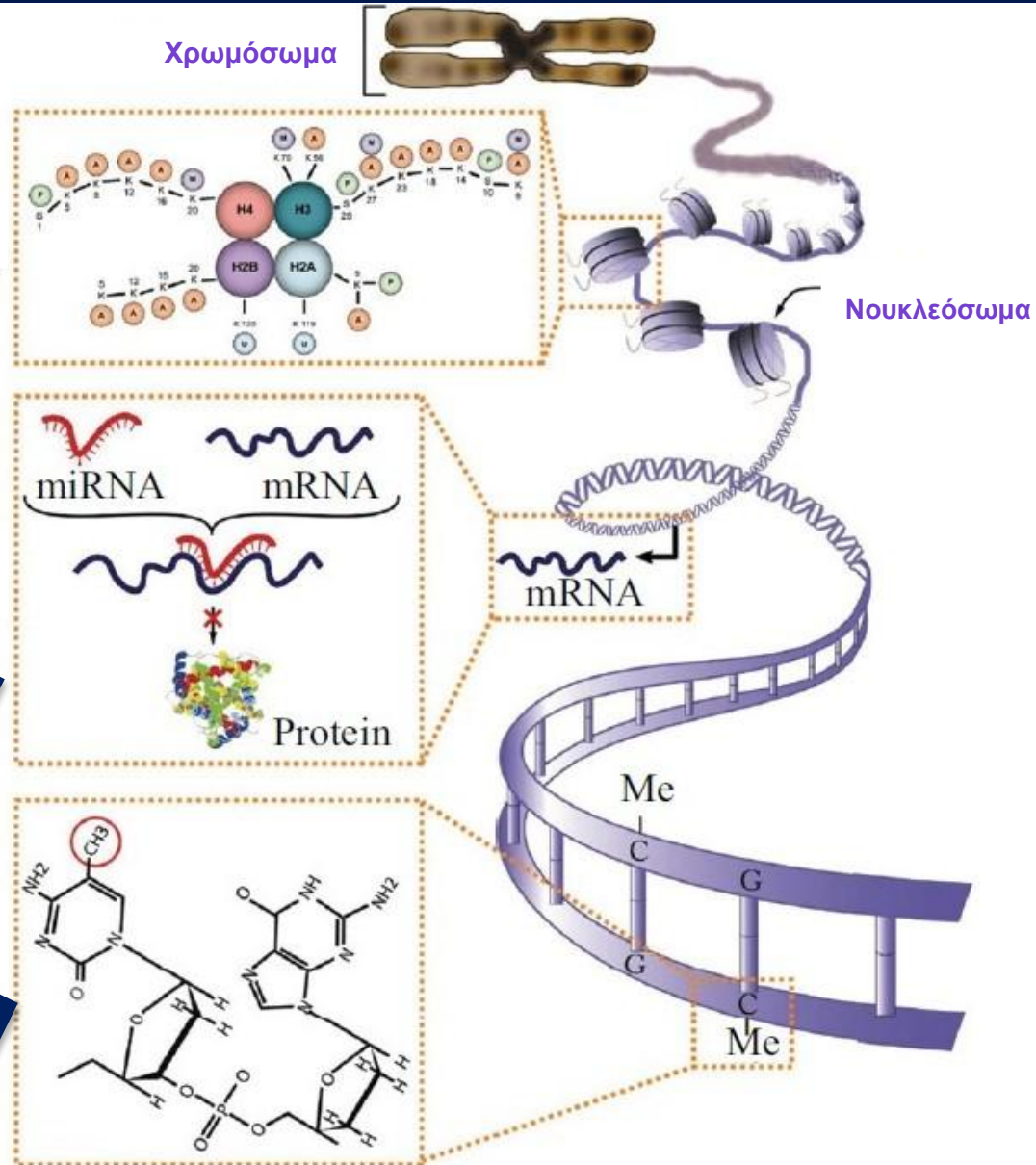
Λάθη στην
επιδιόρθωση του
DNA

Επίδραση
miRNA

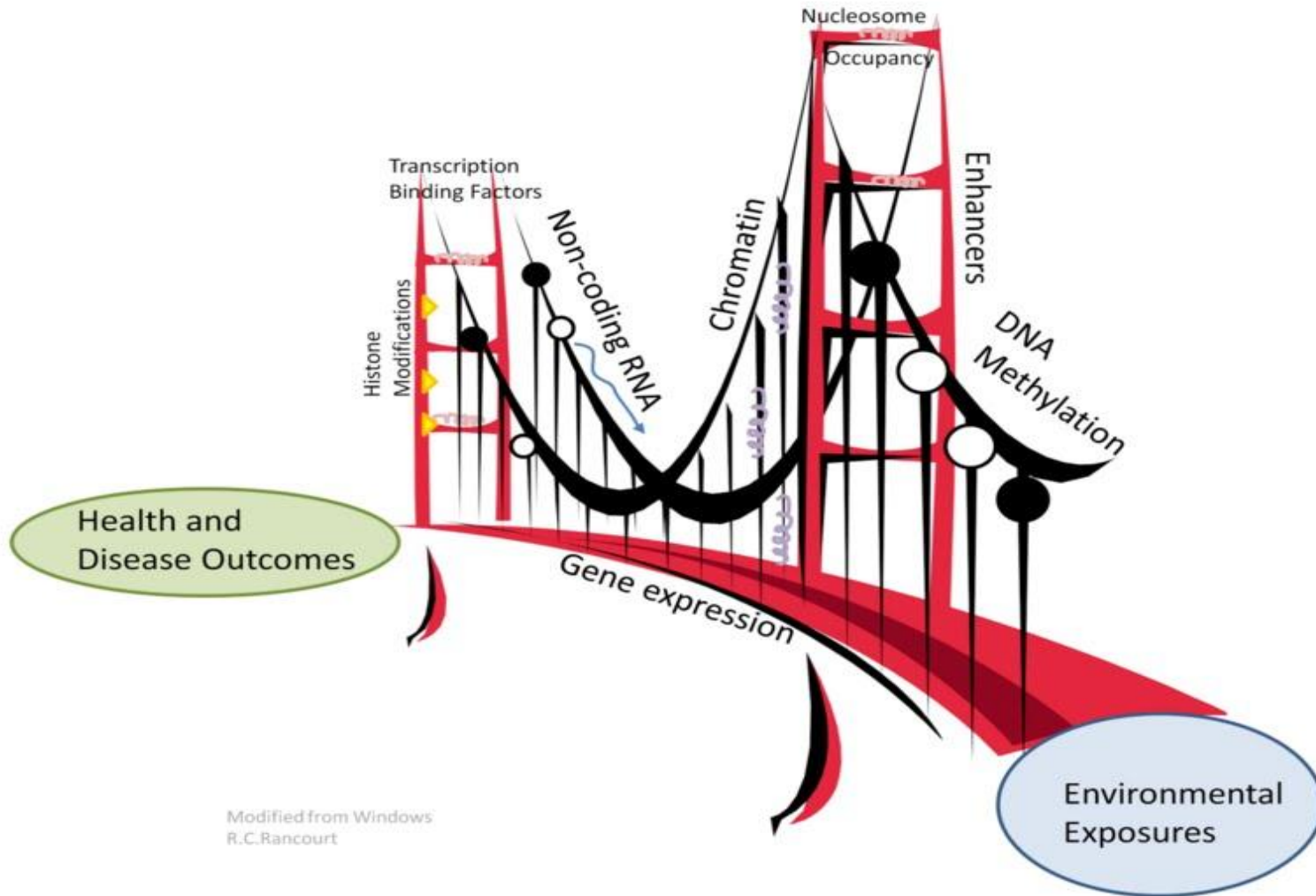
Αναστολή
μετάφρασης

Μεθυλίωση
DNA

Αναστολή
μεταγραφής

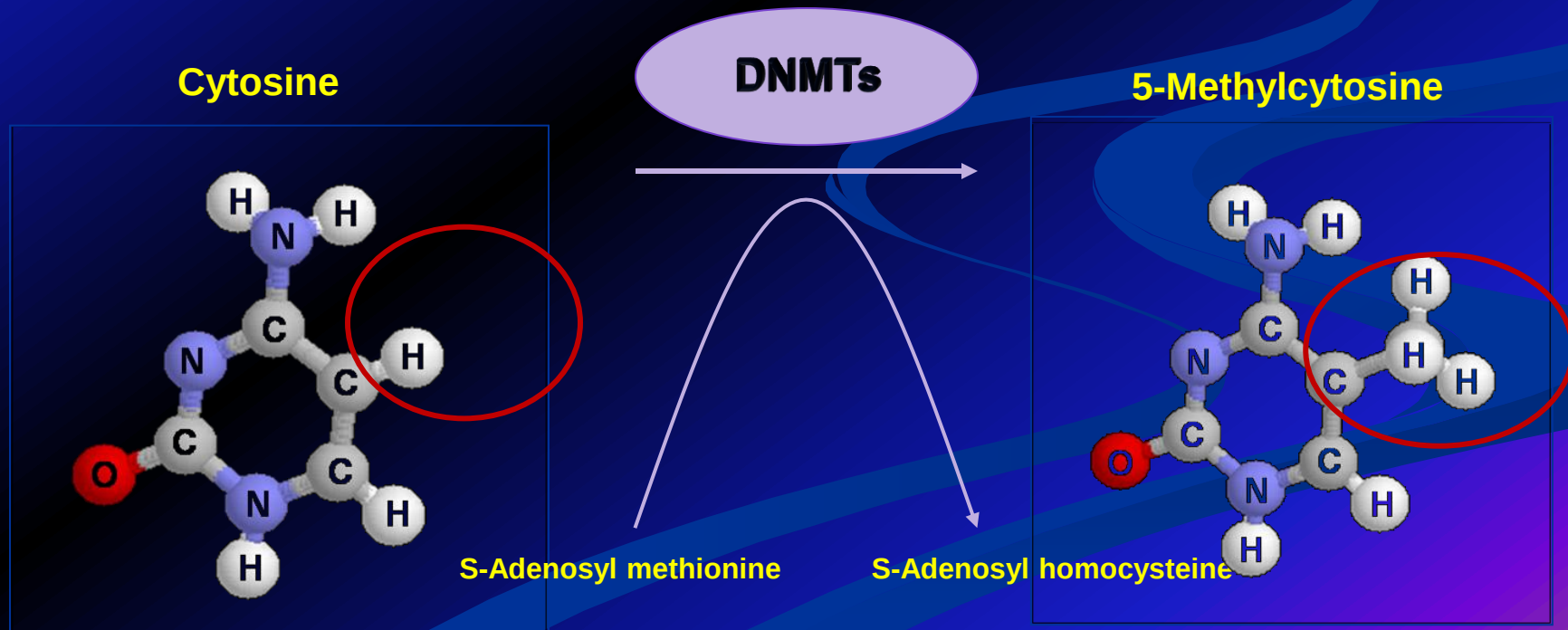


Επιγενετικοί μηχανισμοί-ανακεφαλαίωση

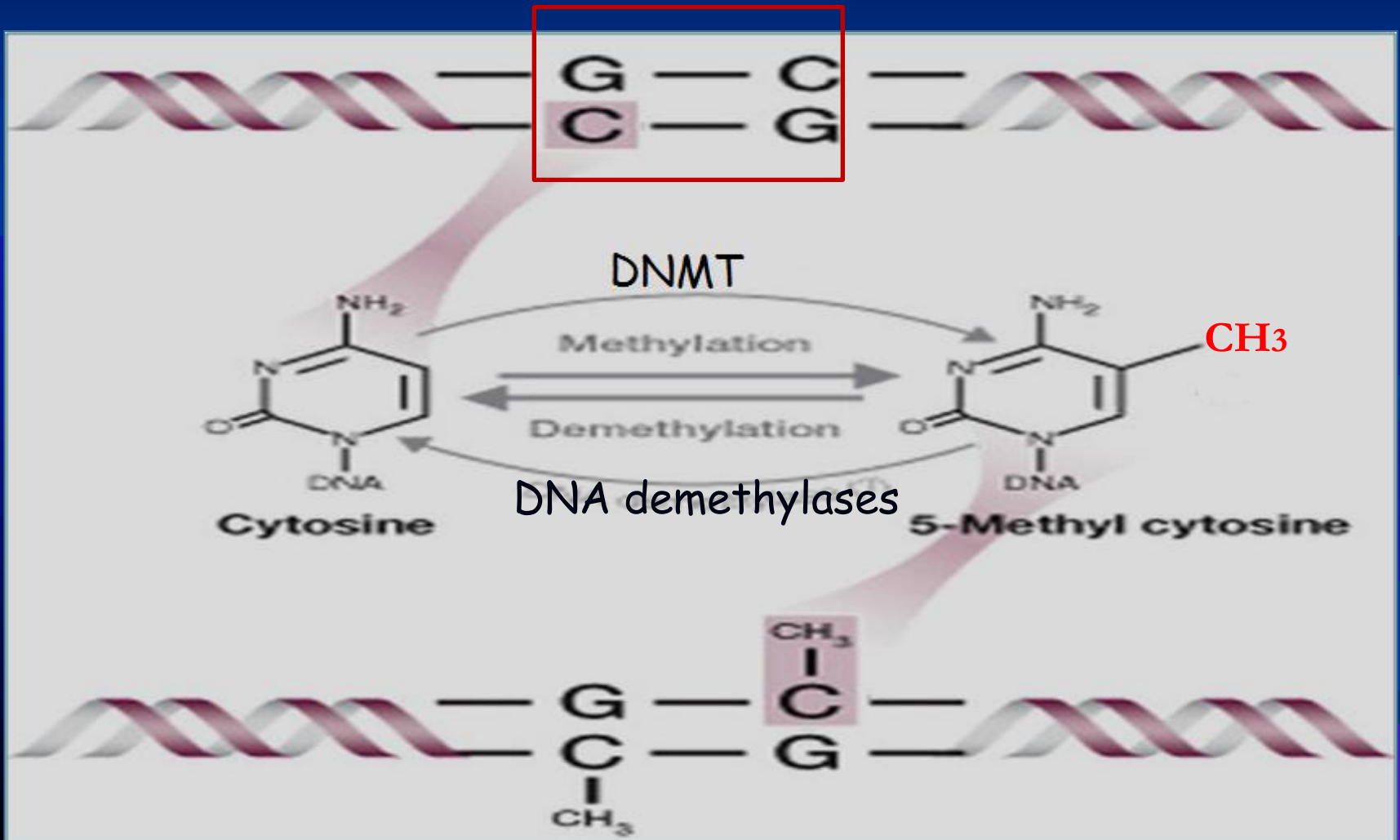


Μεθυλίωση του DNA

- Ομοιοπολική τροποποίηση του DNA
- Προσθήκη μεθυλομάδας (-CH₃) στο 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης
- Σχηματισμός 5-mC → η “5^η βάση”

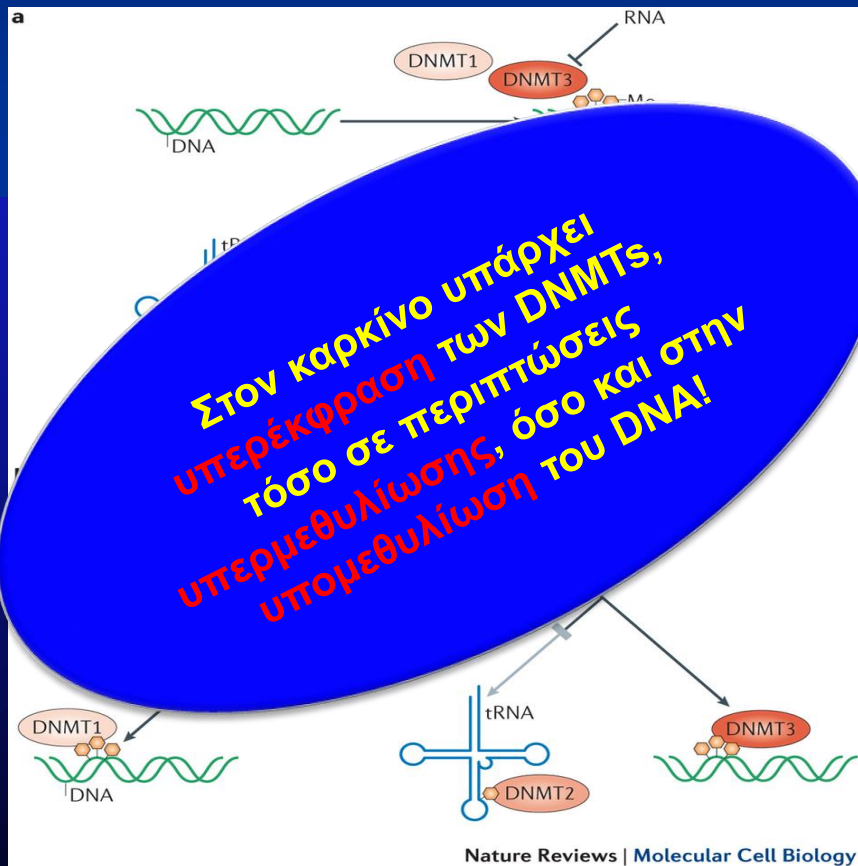


Η μεθυλίωση του DNA



DNA μεθυλοτρανσφεράσες - DNMTs

- ✓ Μεταφέρουν μια $-CH_3$ από το ενεργό τους κέντρο σε ένα κατάλοιπο κυτοσίνης (C).



Τύπος μεθυλοτρανσφεράσης	Λειτουργία
DNMT1	Διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA.
DNMT2	Μικρή ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης στα tRNA.
DNMT3a	De novo μεθυλίωση
DNMT3b	De novo μεθυλίωση
DNMT3L	Συμπαράγοντας για de novo μεθυλίωση

Μεθυλίωση-απομεθυλίωση του DNA

Μεθυλίωση DNA:

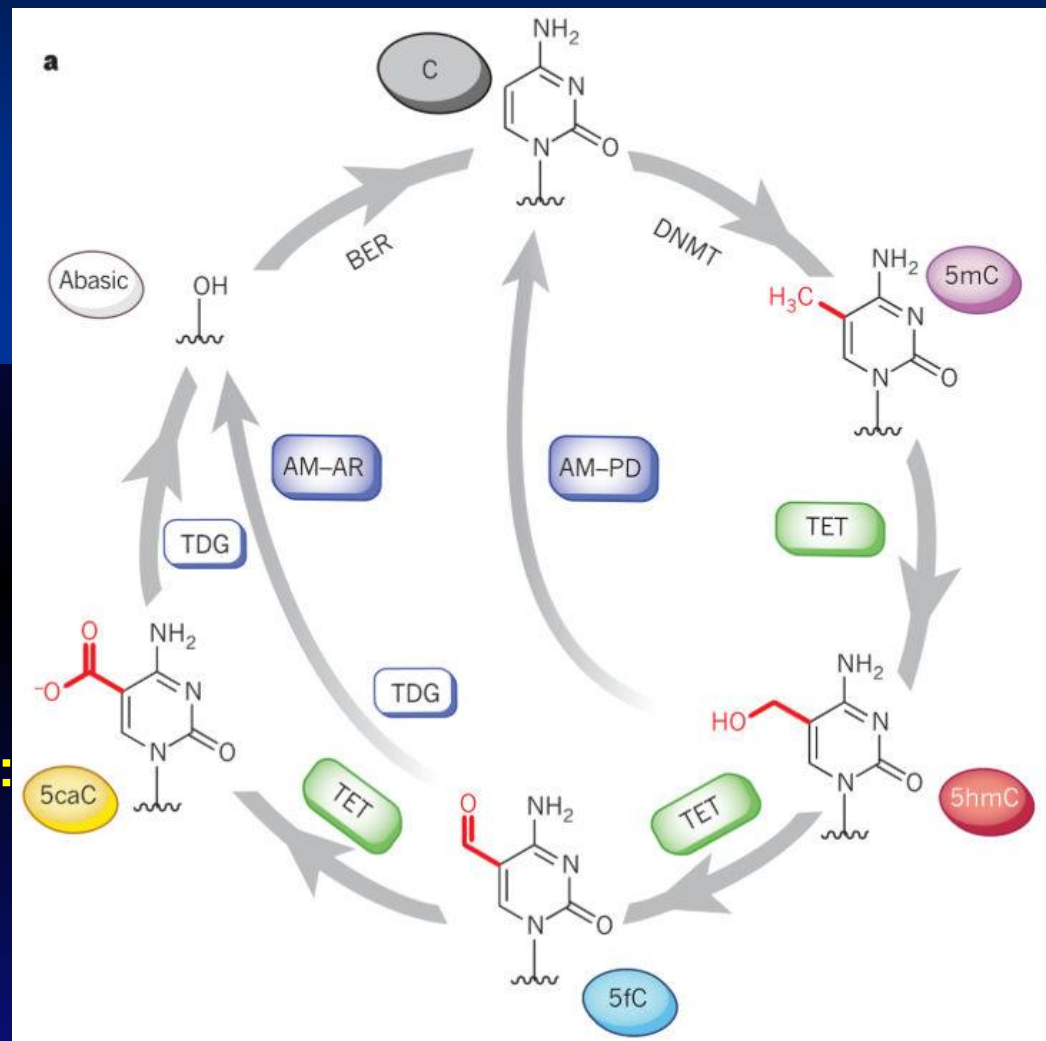
- DNMT1 διατήρηση της μεθυλίωσης
- DNMT3A,B καθιέρωση της μεθυλίωσης

Απομεθυλίωση του DNA:

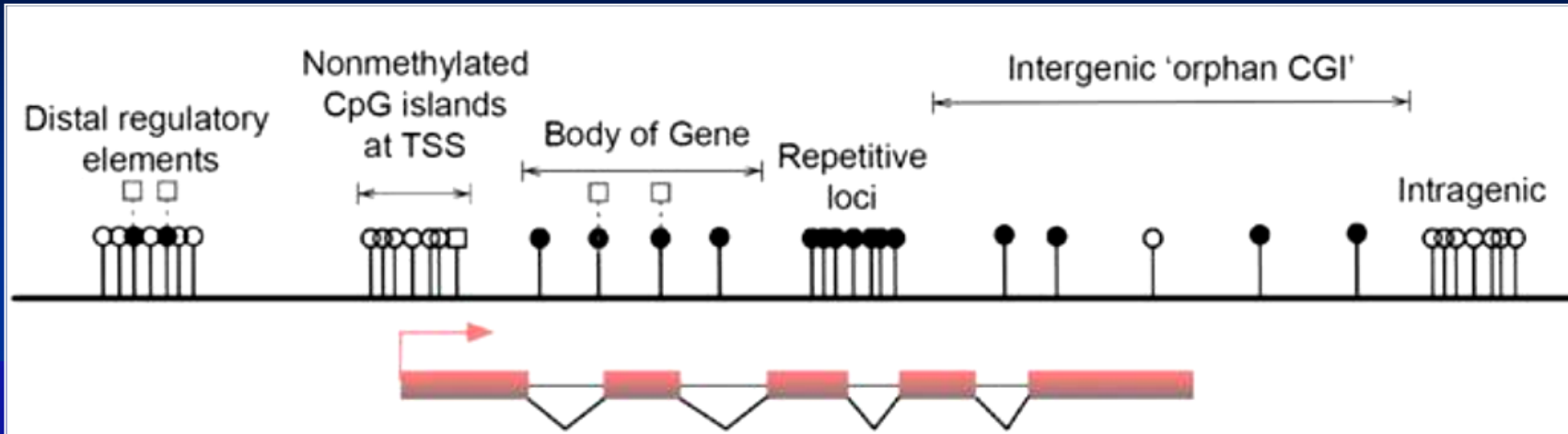
- TET ένζυμο

Αποκατάσταση μεθυλίωσης DNA:

- TDG, BER pathway



Κατανομή μεθυλίωσης στα γονίδια

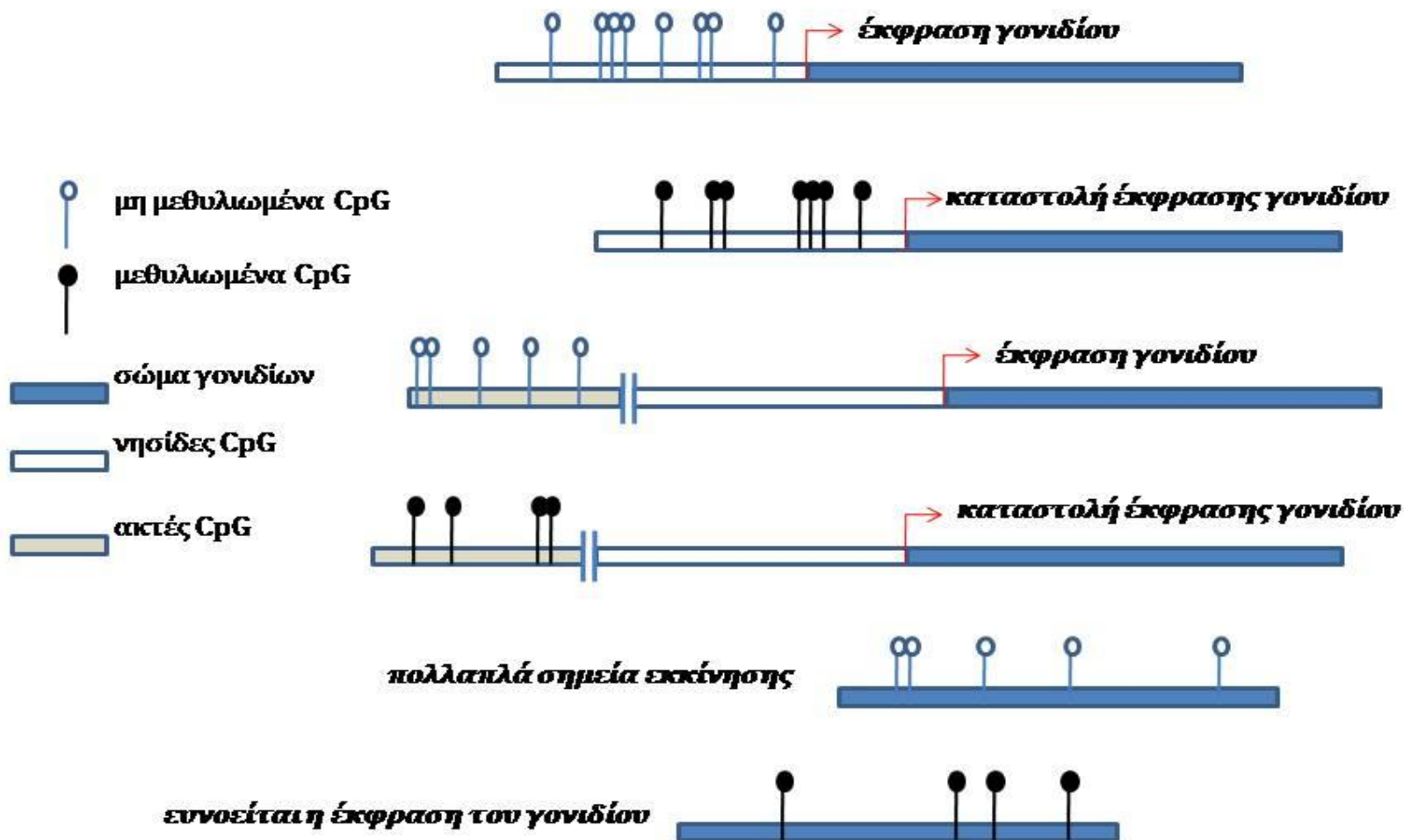


Cao et al, Int. J. Biol. Sci. 2015; 11:604-617

- 70-80% των CG δινουκλεοτιδίων στα γονίδια **μεθυλιωμένα**
- Όμως, CpG νησίδες στον υποκινητή των γονιδίων **μη μεθυλιωμένες** ➡ πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις έναρξης μεταγραφής (TSS) ➡ γονιδιακή έκφραση

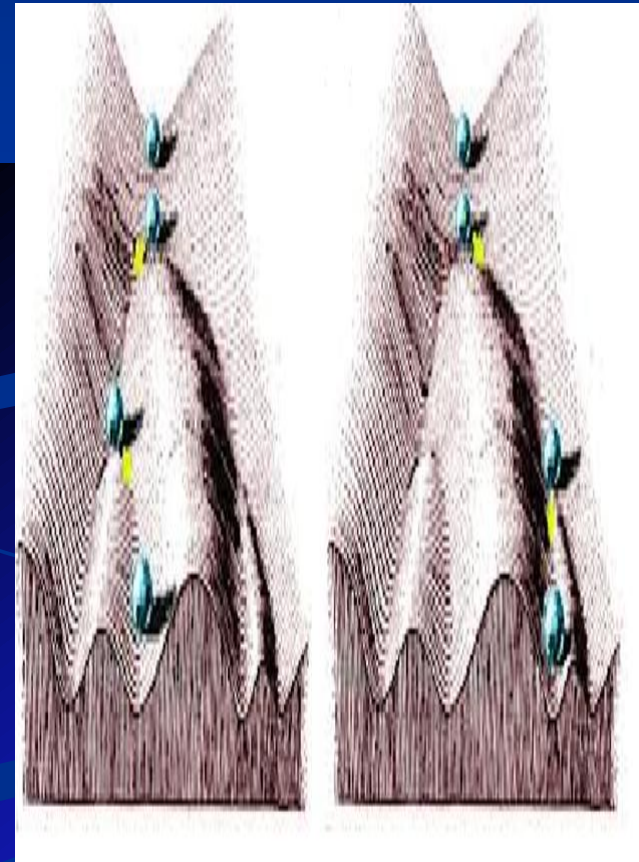
*CpG islands = περιοχές πλούσιες σε CpG (συνήθως στους υποκινητές και σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων)

DNA methylation



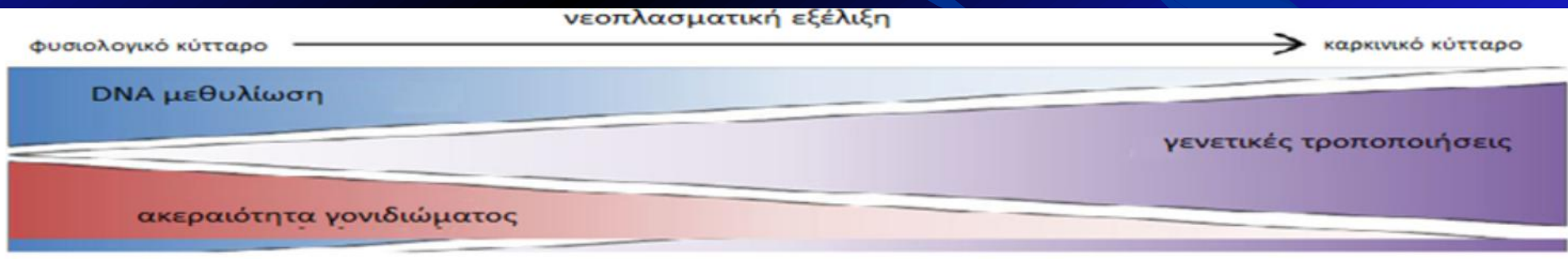
Η μεθυλίωση του DNA στα φυσιολογικά κύτταρα

- ❖ 3-6% όλων των καταλοίπων κυτοσίνης είναι μεθυλιωμένα σε φυσιολογικούς ιστούς
 - ✓ Γονιδιακή σίγαση
 - ✓ Προστασία από μετάθετα στοιχεία
 - ✓ Γονιδιακό εντύπωμα
 - ✓ Αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος
 - ✓ Ιστοειδική έκφραση γονιδίων

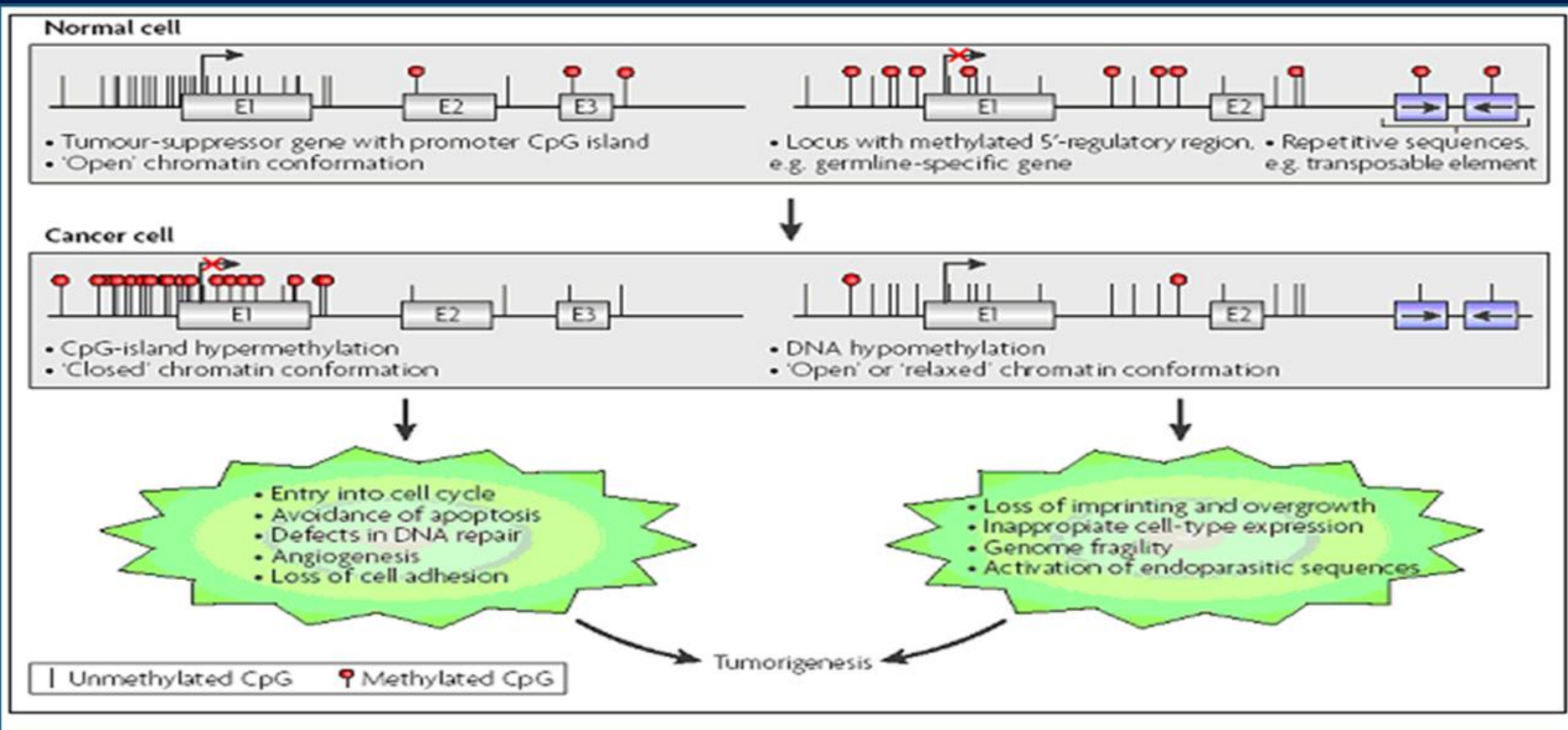


Μεθυλίωση DNA και καρκίνος

- ❖ Αποδείχτηκε για πρώτη φορά το 1983, από τους Feinberg και Vogelstein.
- ❖ Αλλαγή στο προφίλ μεθυλίωσης του κυττάρου:
 - ✓ Ολική υπομεθυλίωση
 - ✓ Υπερμεθυλίωση CpG νησίδων υποκινητών γονιδίων



Η μεθυλίωση του DNA στα καρκινικά κύτταρα.

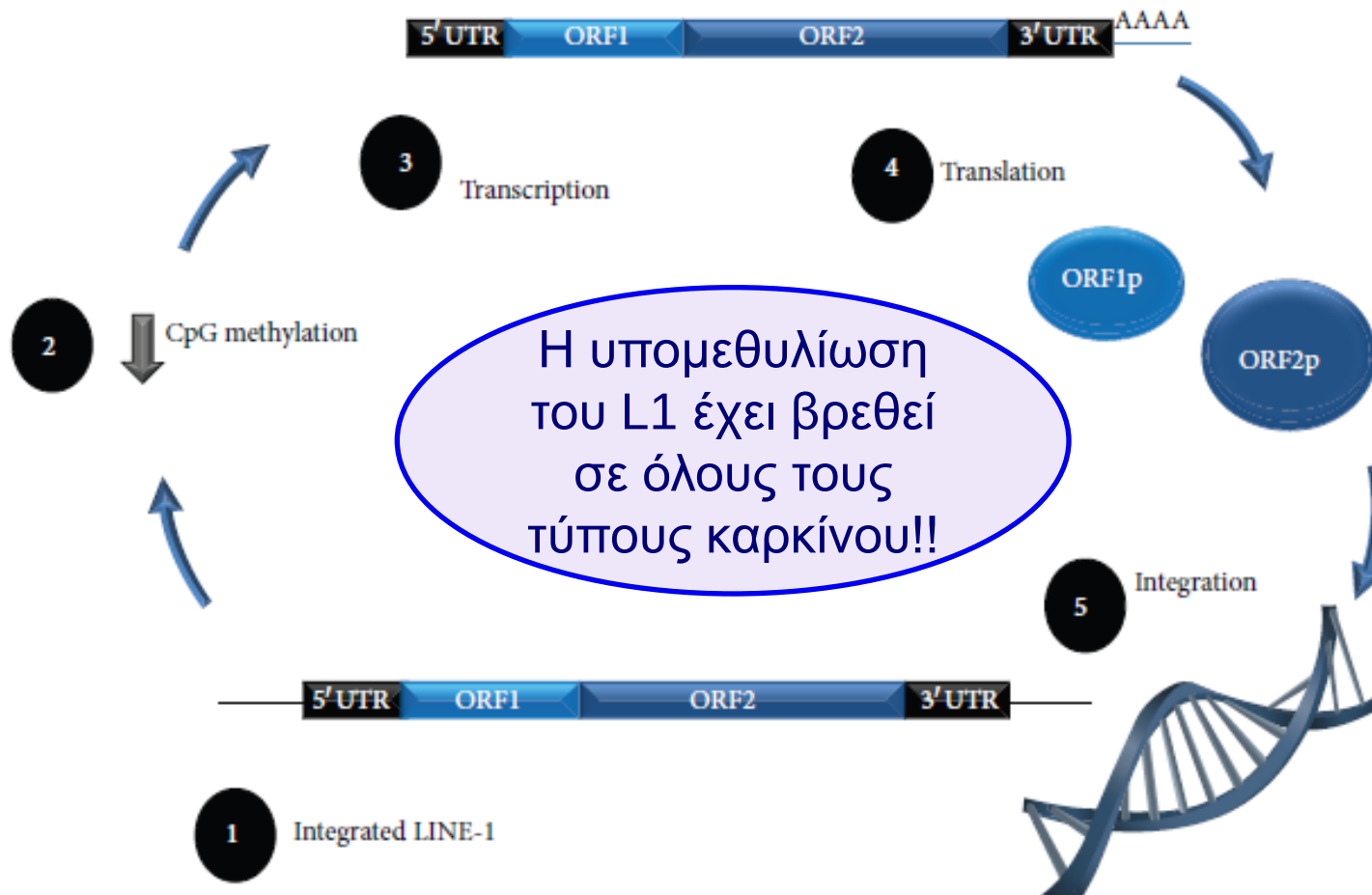


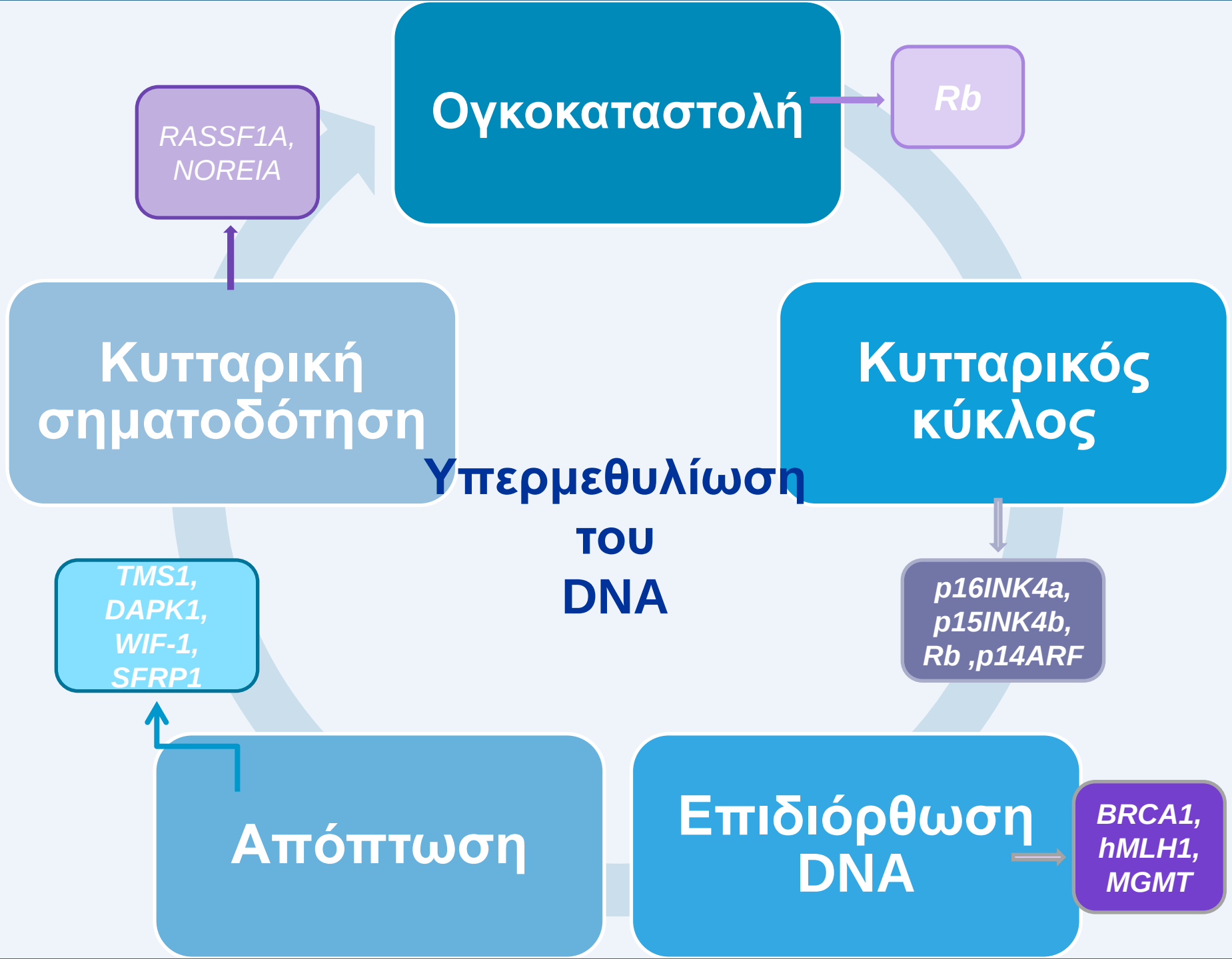
Esteller M. Nat Rev Genet 2007 Vol 8, 286-298

- ❑ **Συνολική υπομεθυλίωση DNA:** ενεργοποίηση ογκογονιδίων και χρωσωμική αστάθεια
- ❑ **Υπερμεθυλίωση στα CpG islands του υποκινητή:** αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο.

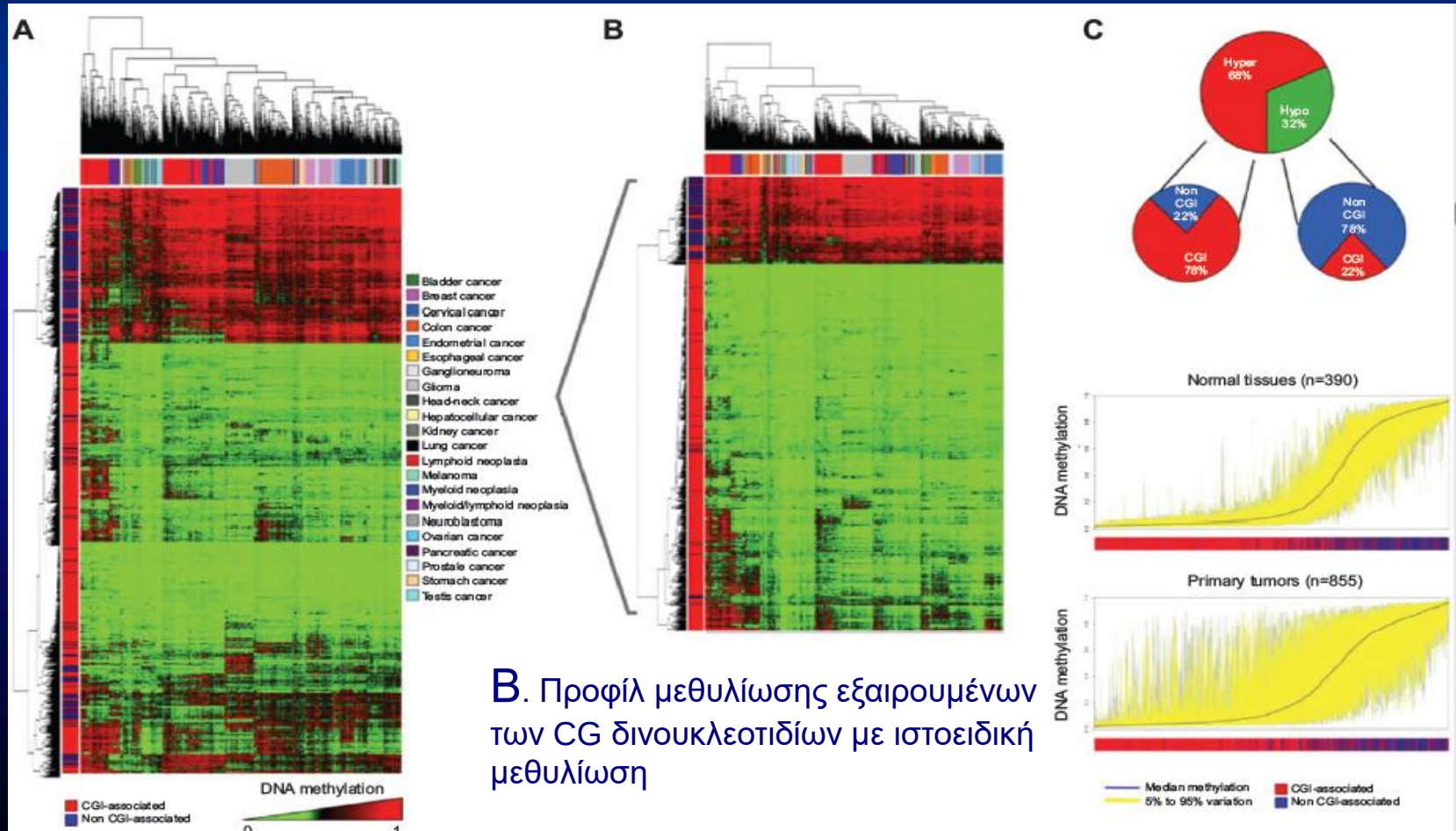
Γενικευμένη υπομεθυλίωση

Υπομεθυλίωση ρετροτρανσποζονίων της οικογένειας LINE





Προφίλ μεθυλίωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου



A. Ιστοειδικό προφίλ μεθυλίωσης πρωτοπαθών όγκων.

Fernandez, Esteller, Genom Res. 2012; 22:407-19

C. Ποσοστά υπερμεθυλωμένων και υπομεθυλωμένων CpG islands στον καρκίνο-ετερογένεια μεθυλίωσης πρωτοπαθών σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς

Table 7.2 Examples of hypermethylated genes found in human tumor cell genomes

Name of gene	Nature of protein function	Type of tumor
<i>RARβ2</i>	nuclear receptor for differentiation	breast, lung
<i>p57^{Kip2}</i>	CDK inhibitor	gastric, pancreatic, hepatic; AML
<i>TIMP3</i>	inhibitor of metalloproteinases	diverse tumors
<i>IGFBP</i>	sequesters IGF-1 factor	diverse tumors
<i>CDKN2A/p16^{INK4A}</i>	inhibitor of CDK4/6	diverse tumors
<i>CDKN2B/p15^{INK4B}</i>	inhibitor of CDK4/6	diverse tumors
<i>p14^{ARF}</i>	inhibitor of HDM2/MDM2	colon, lymphoma
<i>APC</i>	inducer of β -catenin degradation	colon carcinomas
<i>p73</i>	aids p53 to trigger apoptosis	diverse tumors
<i>GSTP1</i>	mutagen inactivator	breast, liver, prostate
<i>MGMT</i>	DNA repair enzyme	colorectal
<i>CDH1</i>	cell-cell adhesion receptor	bladder, breast, colon, gastric
<i>DAPK</i>	kinase involved in cell death	bladder
<i>MLH1</i>	DNA mismatch repair enzyme	colon, endometrial, gastric
<i>TGFBR2</i>	TGF- β receptor	colon, gastric, small-cell lung
<i>THBS1</i>	angiogenesis inhibitor	colon, glioblastoma
<i>RB</i>	cell-cycle regulator	retinoblastoma
<i>CASP8</i>	apoptotic caspase	neuroblastoma, SCLC
<i>APAF1</i>	pro-apoptotic cascade	melanoma
<i>CTMP</i>	inhibitor of Akt/PKB	glioblastoma multiforme

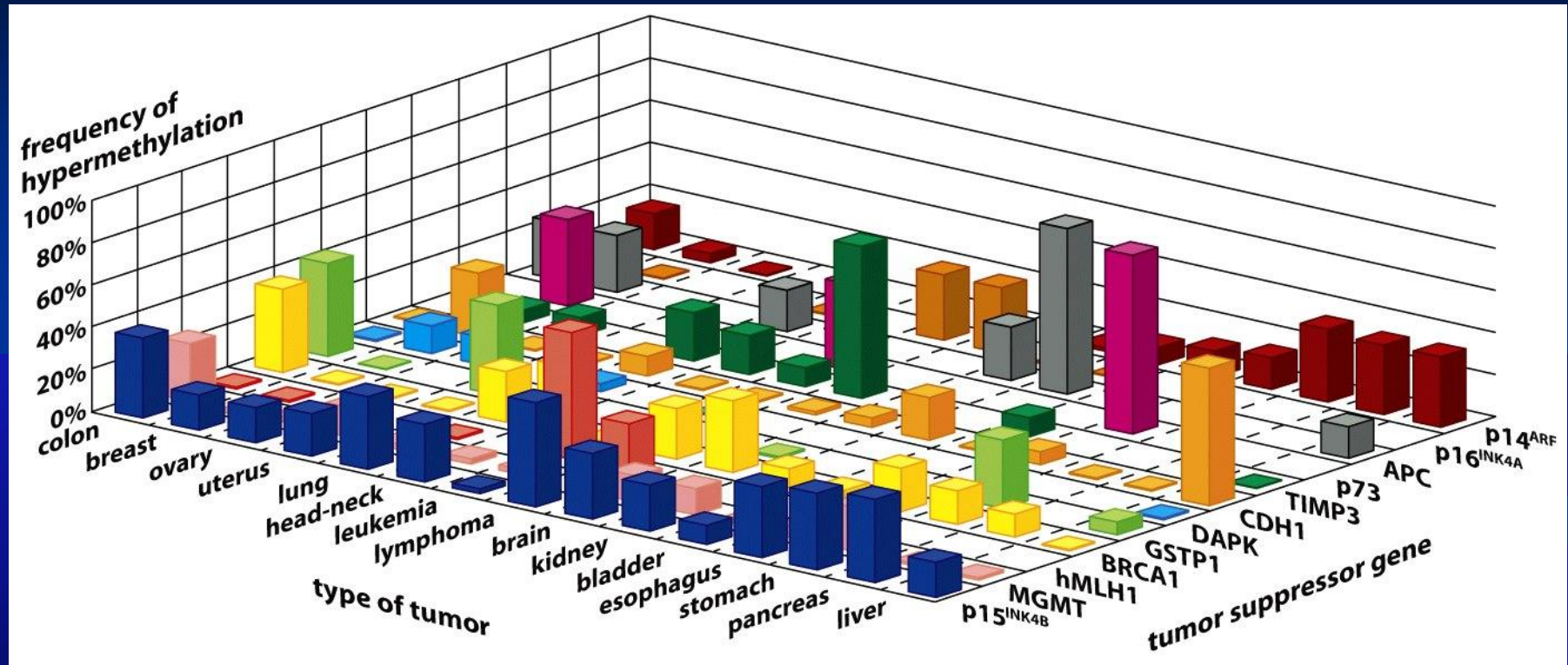
Adapted in part from C.A. Eads et al., *Cancer Res.* 61:3410–3418, 2001.

Table 1. Epigenetic Aberrations among Different Tumor Types.*

Type of Cancer	Epigenetic Disruption
Colon cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> , <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p14^{ARF}</i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> , and <i>WRN</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-124a</i>), global genomic hypomethylation, loss of imprinting of <i>IGF2</i> , mutations of histone modifiers (<i>EP300</i> and <i>HDAC2</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Breast cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i> , E-cadherin, <i>TMS1</i> , and estrogen receptor), global genomic hypomethylation
Lung cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>DAPK</i> , and <i>RASSF1A</i>), global genomic hypomethylation, genomic deletions of <i>CBP</i> and the chromatin-remodeling factor <i>BRG1</i>
Glioma	CpG-island hypermethylation (DNA-repair enzyme <i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> , and <i>THBS1</i>)
Leukemia	CpG-island hypermethylation (<i>p15^{INK4b}</i> , <i>EXT1</i> , and <i>ID4</i>), translocations of histone modifiers (<i>CBP</i> , <i>MOZ</i> , <i>MORF</i> , <i>MLL1</i> , <i>MLL3</i> , and <i>NSD1</i>)
Lymphoma	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>p73</i> , and DNA-repair enzyme <i>MGMT</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Bladder cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> and <i>TPEF/HPPI</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-127</i>), global genomic hypomethylation
Kidney cancer	CpG-island hypermethylation (<i>VHL</i>), loss of imprinting of <i>IGF2</i> , global genomic hypomethylation
Prostate cancer	CpG-island hypermethylation (<i>GSTP1</i>), gene amplification of polycomb histone methyltransferase <i>EZH2</i> , aberrant modification pattern of histones H3 and H4
Esophageal cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p15^{INK4b}</i> and <i>p14^{ARF}</i>), gene amplification of histone demethylase <i>JMJD2C/GASCI</i>
Stomach cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> and <i>p14^{ARF}</i>)
Liver cancer	CpG-island hypermethylation (<i>SOCS1</i> and <i>GSTP1</i>), global genomic hypomethylation
Ovarian cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i>)

* *BRCA1* denotes breast-cancer susceptibility gene 1, *BRG1* BRM/SWI2-related gene 1, *CBP* cyclic AMP response-element-binding protein (CREB)-binding protein, *DAPK* death-associated protein kinase, *EMP3* epithelial membrane protein 3, *EP300* E1A binding protein p300, *EXT1* exostosin 1, *EZH2* enhancer of zeste drosophila homologue 2, *GSTP1* glutathione S-transferase 1, *HDAC2* histone deacetylase 2, *hMLH1* homologue of MutL *Escherichia coli*, *ID4* inhibitor of DNA binding 4, *IGF2* insulin-like growth factor 2, *JMJD2C/GASCI* jumonji domain-containing protein 2C, *MGMT* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, *MLL1* mixed-lineage leukemia 1, *MLL3* mixed-lineage leukemia 3, *MORF* monocytic leukemia zinc finger protein-related factor, *MOZ* monocytic leukemia zinc finger, *NSD1* nuclear receptor binding SET-domain protein 1, *RARB2* retinoic acid receptor β 2, *RASSF1A* ras association domain family protein 1, *SFRP1* secreted frizzled-related protein 1, *SOCS1* suppressor of cytokine signaling 1, *THBS1* thrombospondin 1, *TMS1* target of methylation-induced silencing 1, *TPEF/HPPI* hyperplastic polyposis gene 1, *VHL* von Hippel-Lindau disease, and *WRN* Werner's syndrome.

Methylated state of the promoters of 12 genes in a variety of human tumor types



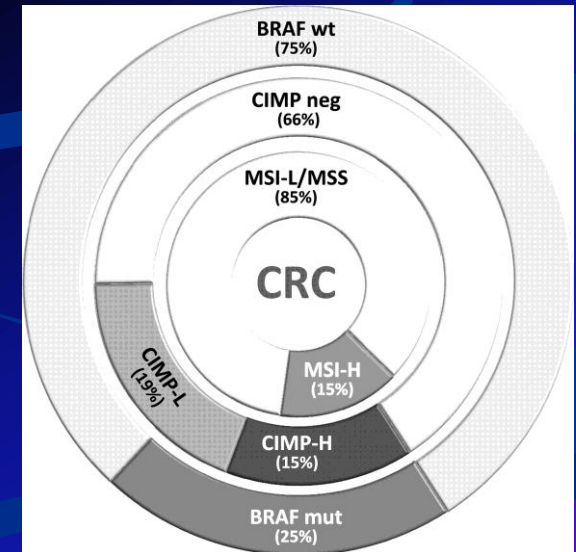
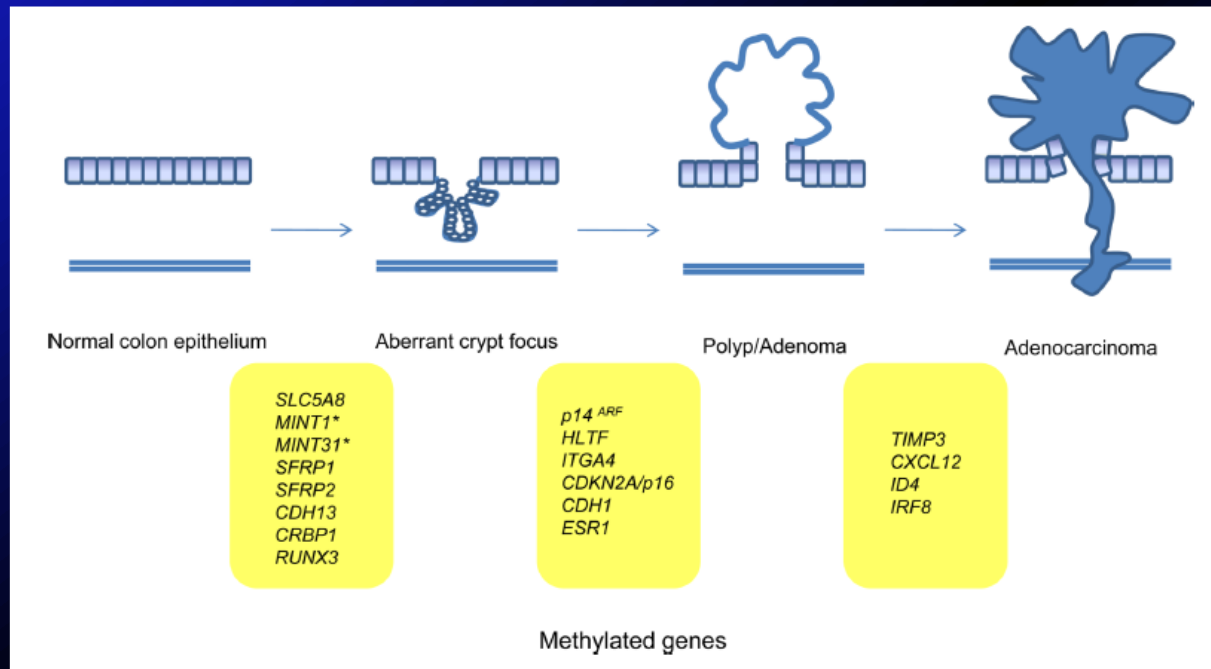
- ✓ The frequency of methylation of a specific gene varies dramatically from one tumor to another
- ✓ Tumor suppressors as well as caretakers undergo hypermethylation

CpG island methylator phenotype (CIMP)

- Το προφίλ μεθυλίωσης συγκεκριμένων πάνελ γονιδίων ορίζει μοναδικές μοριακές υποομάδες σε κάθε τύπο καρκίνου → χαρακτηρισμός και ταξινόμηση τύπων καρκίνου
- Όγκοι που παρουσιάζουν CIMP φαινοτύπους χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη επιδημιολογία, κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία
- Μελέτες σε καρκίνο παχέος εντέρου, γαστρικό καρκίνο, καρκίνο πνεύμονα, ήπατος, ωοθηκών, γλοίωμα, λευχαιμία

CpG island methylator phenotype (CIMP)

- Παρατηρήθηκε και μελετήθηκε για πρώτη φορά στον καρκίνο παχέος εντέρου
- Συνδυασμός με γενετικές αλλοιώσεις: CIMP-H συσχέτιση με μεταλλάξεις στο *BRAF* ενώ CIMP-L συσχέτιση με μεταλλάξεις του *KRAS*



Πρόγραμμα αλληλούχησης επιγονιδιώματος (Human Epigenome Project- HEP) <http://www.epigenome.org/>

- Ξεκίνησε το 1999, με σκοπό την αποκρυπτογράφηση όλων των μεθυλιωμένων προφίλ στο ανθρώπινο γονιδίωμα.
- Χρησιμοποιήθηκαν τεχνολογίες ταυτόχρονης αλληλούχησης, σε μεγάλη κλίμακα, του επιγονιδιώματος
 - i. η αλληλούχηση του DNA, μετά από επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο,
 - ii. η υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων και
 - iii. η φασματομετρία μάζας

Στόχος: Να βρεθεί το επιγενετικό προφίλ (επιγενότυπος) κάθε οργανισμού!

Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης

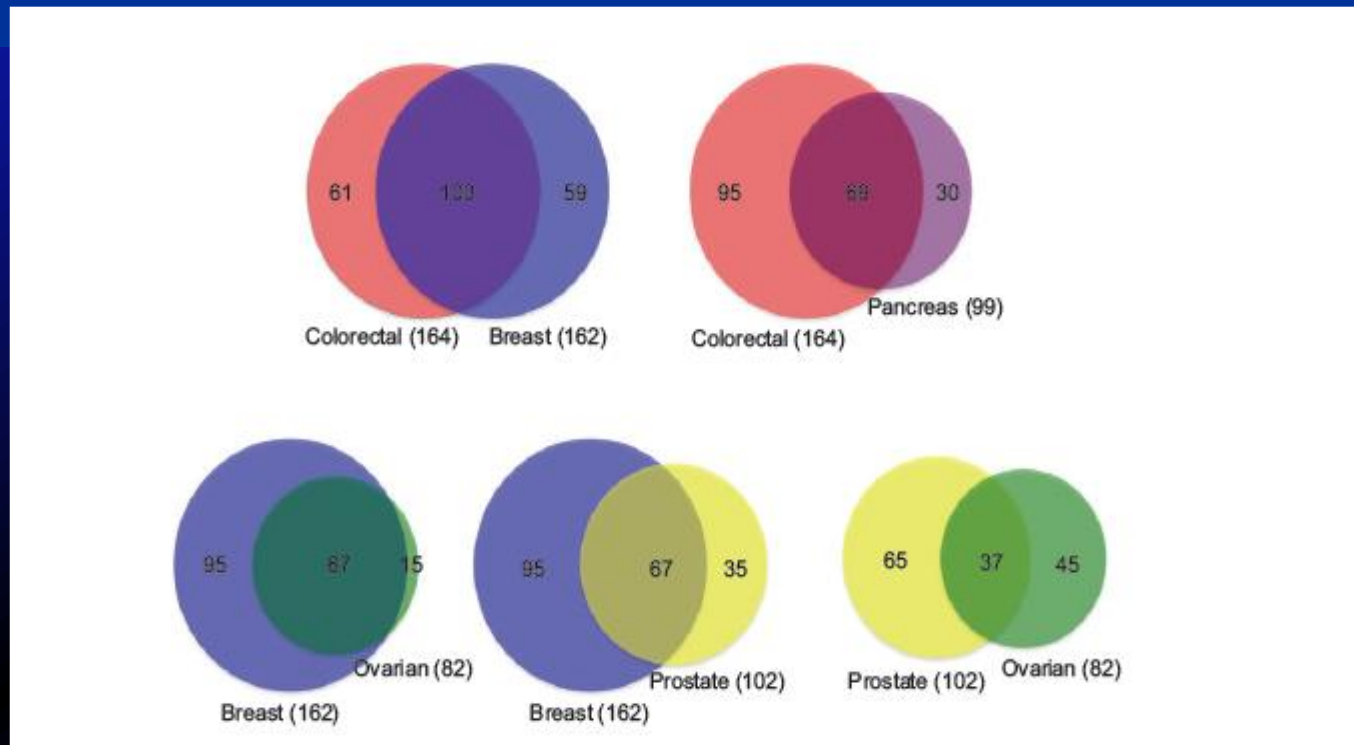
■ Πλεονεκτήματα:

- ✓ Χημικά και βιολογικά σταθερή τροποποίηση του DNA
- ✓ Δυνατότητα ανίχνευσης σε ιστούς και ποικίλα βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα, κόπρανα, BAL...)
- ✓ Τεχνικά, λιγότερο πολύπλοκη ανίχνευση σε σχέση με εκείνη των μεταλλάξεων
- ✓ Μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα
- ✓ Πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση → πρώιμος διαγνωστικός δείκτης
- ✓ Πληροφορίες για την έναρξη και εξέλιξη της νόσου
- ✓ Πληροφορίες για την μετάσταση

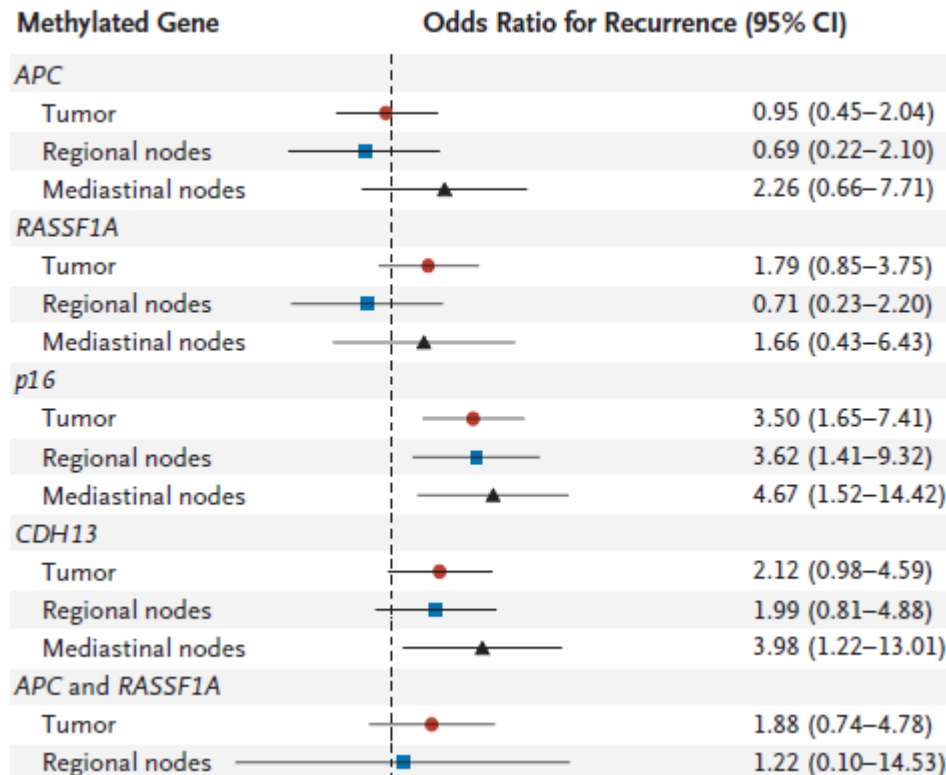


Μεθυλίωση ως βιοδείκτης

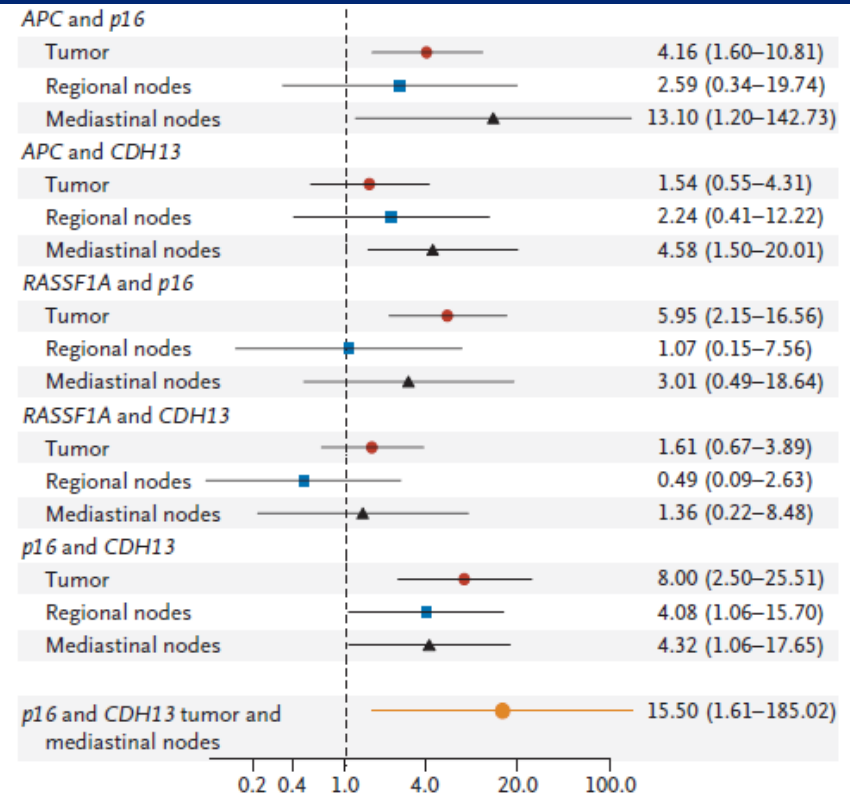
- Κοινά μεθυλιωμένα γονίδια σε διάφορους τύπους καρκίνου



DNA methylation as a tumor biomarker in primary tumors and regional nodes



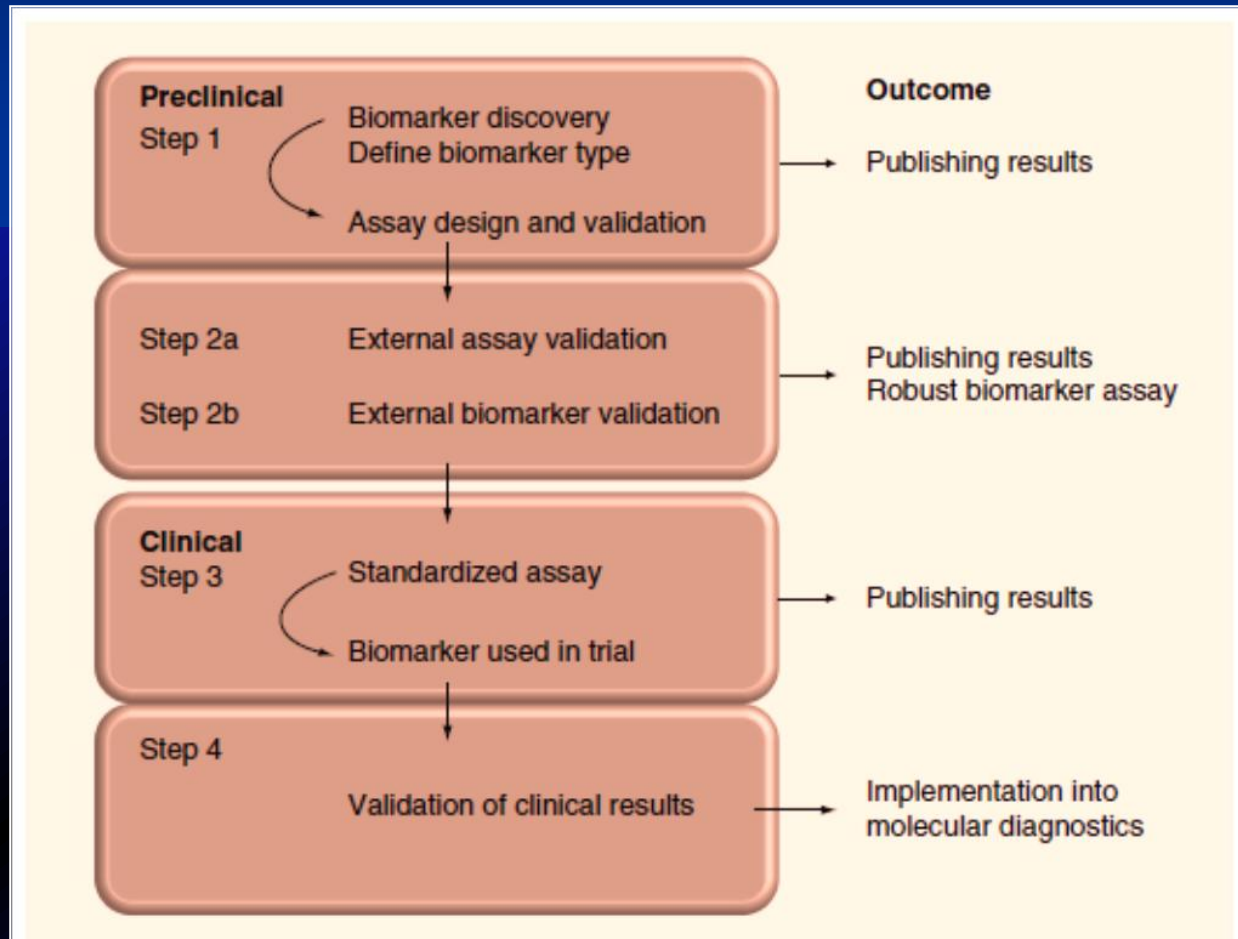
One marker



Combination of markers

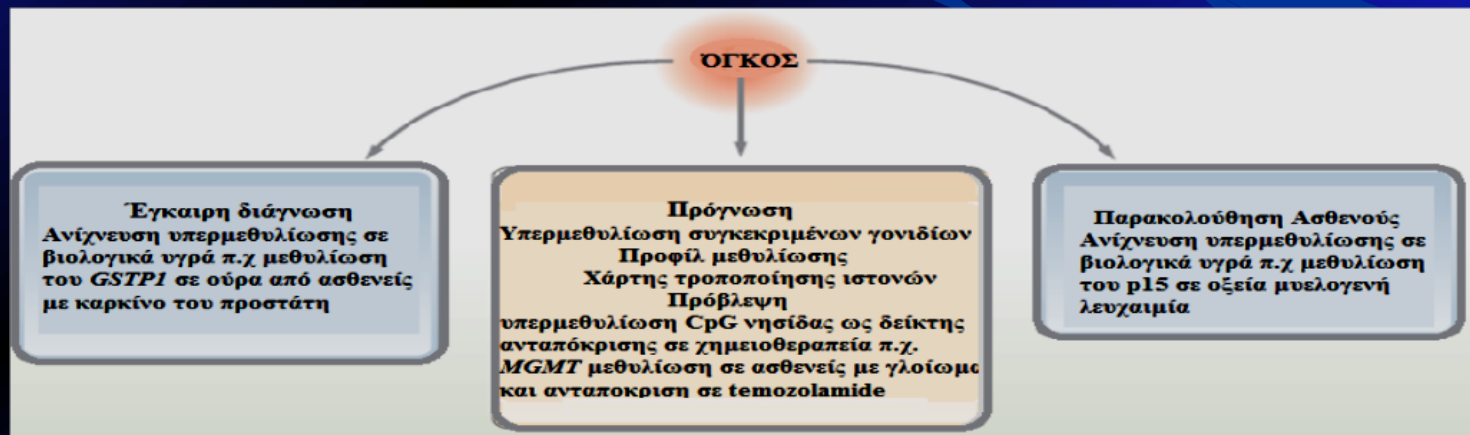
Brock, et al, N Engl J Med 2008;358:1118-28.

Προτεινόμενη πορεία για επικύρωση βιοδεικτών μεθυλίωσης DNA



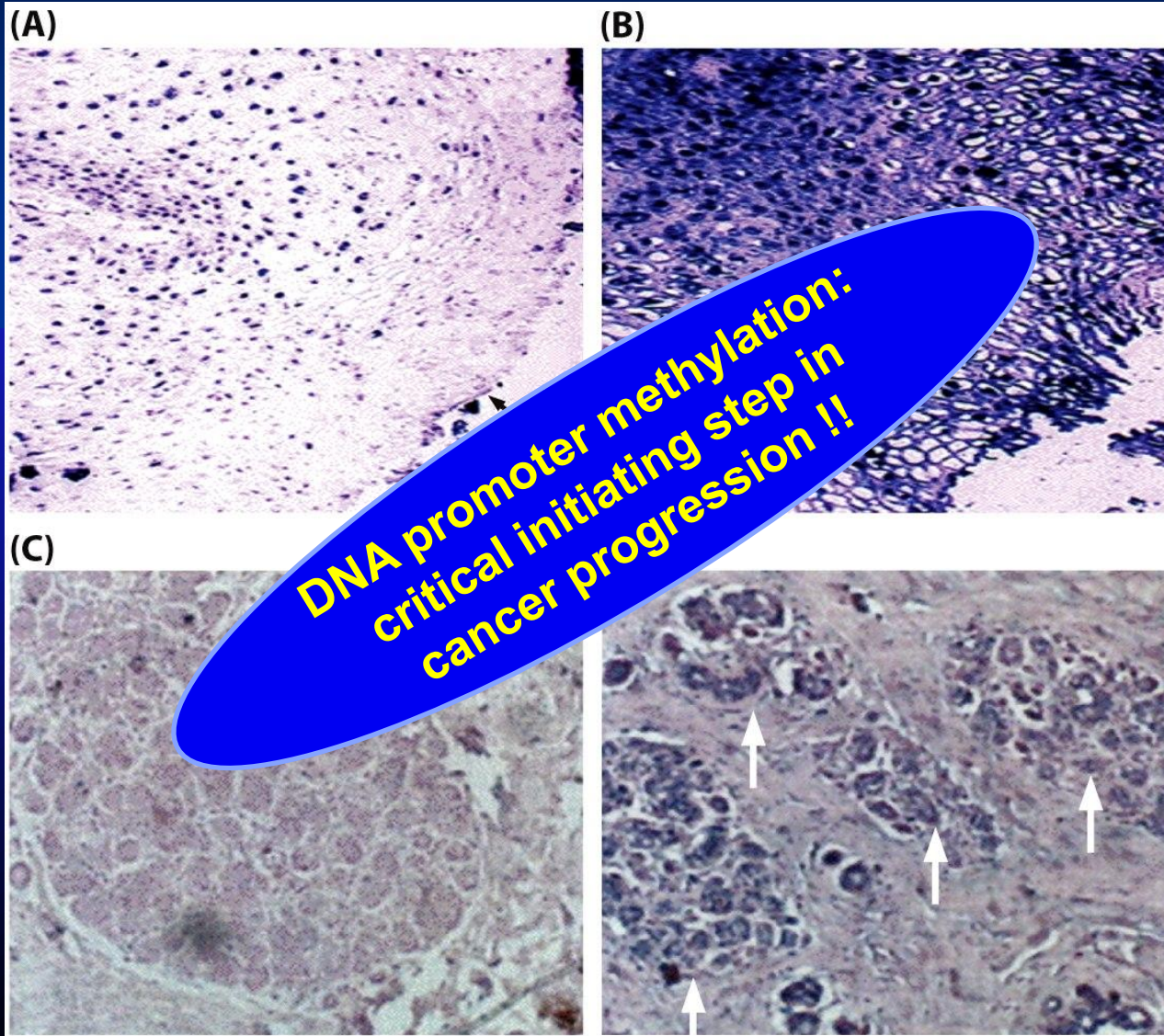
Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης καρκίνου

- **Δείκτης καρκίνου:** οποιοδήποτε βιολογικό μόριο ανιχνεύεται στο αίμα, σε βιολογικά υγρά και σε ιστούς και αποτελεί ένδειξη κάποιας φυσιολογικής ή μη φυσιολογικής διαδικασίας ή της κατάστασης μιας νόσου (National Cancer Institute)
- Οι **επιγενετικοί βιοδείκτες** είναι χρήσιμοι για:
 - Πρώιμη διάγνωση (diagnostic biomarkers-screening)
 - Πρόγνωση (prognostic biomarkers)
 - Ανταπόκριση στη θεραπεία (predictive biomarkers)

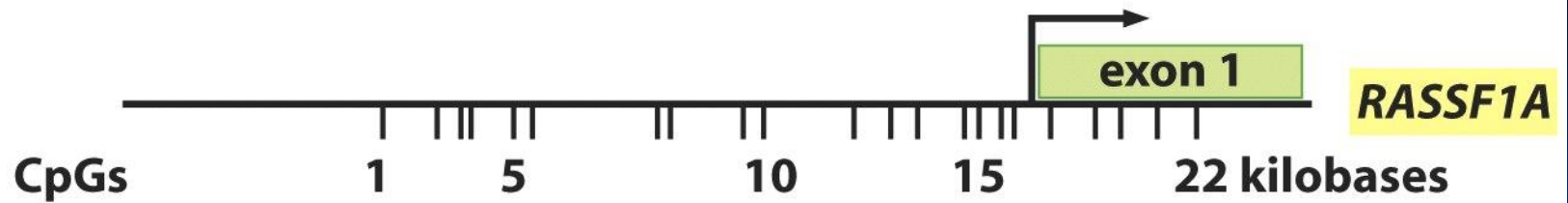


DNA methylation is an early event in carcinogenesis

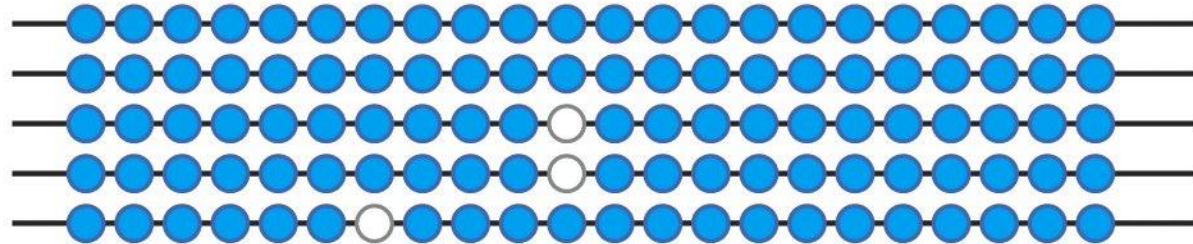
- ✓ In situ hybridization
Promoter of p16 *INK4A*
Tumor suppressor gene
- ✓ Methylation specific probe



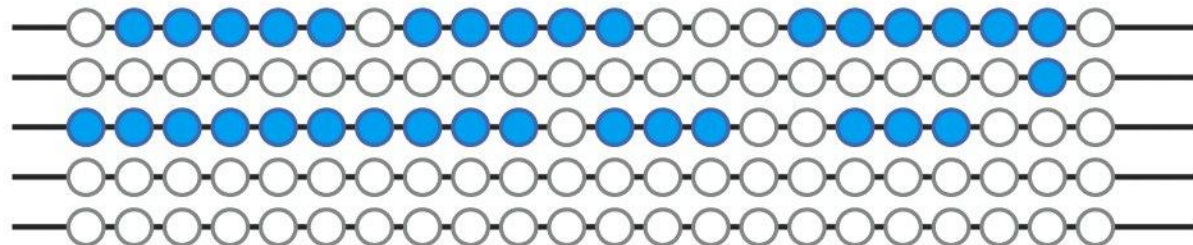
- A)** Low grade squamous intraepithelial lesion of the cervix
- B)** Adjacent high grade lesion (progression to a cervical carcinoma)
- C)** Normal breast tissue, no promoter methylation
- D)** Normal breast tissue, promoter methylation



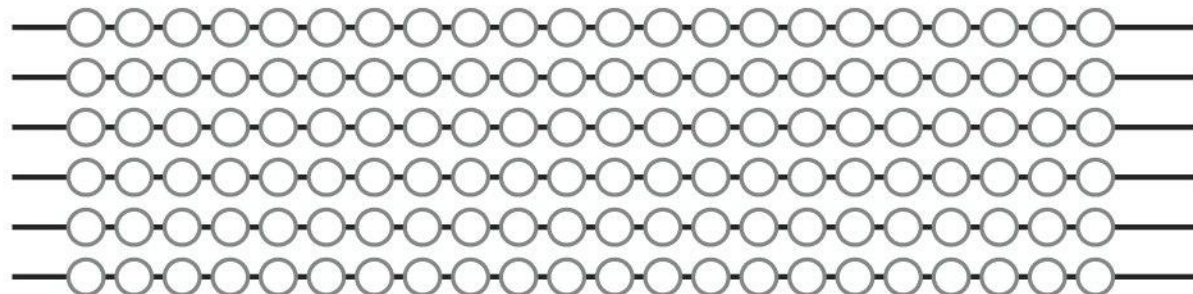
**DNA from
tumor 232**

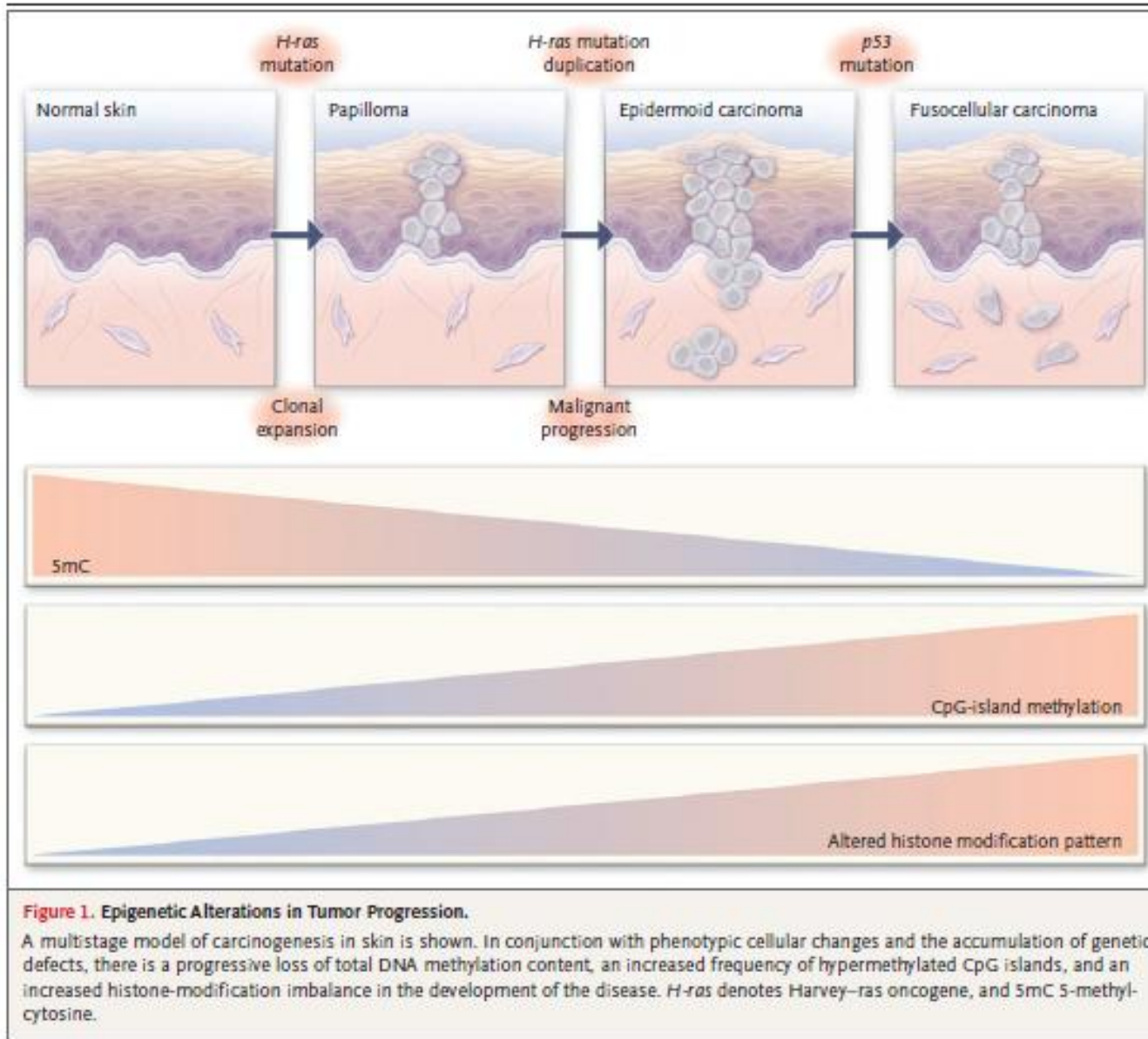


**DNA from
adjacent
normal
tissue**



**DNA from
normal
control
individual**





Μεθυλίωση DNA ως διαγνωστικός δείκτης

Γονίδιο	Καρκίνος	Είδος δείγματος	Διαγνωστική αξία
<i>CDKN2A</i>	Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα	Ιστός	Πρώιμη διάγνωση
<i>JAM3, EPB41L3, TERT, C13ORF18</i>	Τραχήλου της μήτρας	Επίχρισμα	Πρώιμη διάγνωση, screening test
<i>GSTP1</i>	Καρκίνος προστάτη	Ούρα	Πρώιμη διάγνωση
<i>APC, GSTP1</i>	Καρκίνος προστάτη	Ιστός	Διαφορική διάγνωση σε συνδυασμό με ιστοπαθολογική ανάλυση
<i>MLH1</i>	HNPCC	Ιστός	Βοηθητική διάγνωση

Μεθυλίωση DNA ως διαγνωστικός δείκτης

- Εμπορικά διαθέσιμα κιτ για διάγνωση βασισμένη στην μεθυλίωση

Biomarker	Application	Cancer	Tissue	Commercial test (company)
<i>SEPT9</i>	Early detection	Colorectal	Blood	Epi proColon® 1.0 (Epigenomics) ColoVantage™ (Quest Diagnostics) RealTime mS9 (Abbott)
<i>VIM</i>	Early detection	Colorectal	Stool	Cologuard™ (Exact Sciences)
<i>SHOX2</i>	Early detection	Lung	Bronchial fluid	Epi proLung® BL 1.0 (Epigenomics)

Βιοδείκτες μεθυλίωσης του DNA για διάγνωση



THE SEPTIN9 TEST: EARLY DETECTION OF COLORECTAL CANCER MADE EASY WITH A BLOOD TEST

Too few people participate in programs for early detection of colorectal cancer. The Septin9 test could change this: Our test helps to detect colorectal cancer early – in a simple blood sample.



EPI PROLUNG BL REFLEX ASSAY

The Epi proLung BL Reflex Assay offers pathologists an additional tool for a quick and reliable diagnosis of lung cancer by analysing the new biomarker for lung cancer: *m*SHOX2.

Μεθυλίωση DNA ως προγνωστικός δείκτης

Καρκίνος	Γονίδιο/α	Είδος δείγματος	Προγνωστική αξία
Πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου	<i>CDKN2A</i>	ιστός	Μετάσταση σε λεμφαδένες και μυϊκή διήθηση
	<i>PGP9.5</i>	ιστός	Επιβίωση
Αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου	<i>APC</i>	πλάσμα	Σταδιοποίηση, επιβίωση
	<i>APC, DAPK, E-cadherin, ESR1, MGMT, CDKN2A, TIMP3</i>	ιστός	Υποτροπή, επιβίωση
NSCLC	<i>CDKN2A, MGMT, DAPK, RASSF1A, CDH13, ASC, APC</i>	ιστός	Υποτροπή
Προστάτη	<i>RASSF1A, CDH13, RARb, RASSF1A, GSTP1, APC</i>	ιστός	Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, επιβίωση
Ουροδόχου κύστης	<i>CDKN2A, ARAF1, IGFBP3</i>	πλάσμα	Υποτροπή
Παχέος εντέρου	<i>CDKN2A</i>	Ορός, πλάσμα	Κακή πρόγνωση
Μαστού	<i>BRCA1, RASSF1A</i>	Ιστός, ορός	Κακή πρόγνωση
Τραχήλου της μήτρας	<i>CDH1, CDH13</i>	ορός	DFI, διήθηση
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	Ιστός, περιφερικό αίμα	Υποτροπή, μεταστάσεις

Μεθυλίωση DNA ως προγνωστικός δείκτης

□ Καρκίνος μαστού:

Γονίδιο	Προβλεπτική αξία
<i>ESR1</i>	Επιβίωση με tamoxifen
<i>ARH1</i>	Επιβίωση όχι με tamoxifen
<i>CYP1B</i>	Ανταπόκριση σε tamoxifen
<i>ESR6</i>	Καλή πρόγνωση σε tamoxifen
<i>PITX2</i>	Ανταπόκριση σε tamoxifen-ανθρακυκλίνες
<i>ACBCB1</i>	Θετικός προβλεπτικός δείκτης doxorubicin
<i>GSTP1</i>	Θετικός προβλεπτικός δείκτης doxorubicin
<i>BRCA1</i>	Ευαισθησία σε PARP inhibitors

Μεθυλίωση DNA ως προβλεπτικός δείκτης

■ Άλλοι τύποι καρκίνου:

Γονίδιο	Καρκίνος	Προβλεπτική αξία
<i>APAF1</i>	μελάνωμα	Αντίσταση στη χημειοθεραπεία
<i>RASSF1A</i>	μελάνωμα	Ανταπόκριση στην βιοχημειοθεραπεία
<i>BRCA1</i>	ωοθηκών	Ευαισθησία στην χημειοθεραπεία με πλατίνα
<i>MGMT</i>	γλοιοβλάστωμα	Ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία

Διάγνωση

- **SEPT9**
- **SHOX2**

Δεν υπάρχουν για όλους τους τύπους καρκίνου εξειδικευμένοι βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωσή τους



χρησιμοποιούνται πάνελ

Πρόγνωση

- **DAPK** → κακή πρόγνωση στον καρκίνο του πνευμονα
- **p16^{INK4A}** → κακή πρόγνωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου
- **EPK3** → κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού

Πρόβλεψη

- **hMLH1, GSTP1, BRCA1**, για τον καρκίνο μαστού και ωοθηκών
- **WRN** για τον καρκίνο παχέος έντερου



Epigenetic Therapy of cancer

- Unlike mutations, DNA methylation and histone modifications are reversible.
- Epigenetic alterations allow the cancer cell to adapt to changes in its microenvironment, but dormant, hypermethylated tumor-suppressor genes can be awakened with drugs.
- It is possible to re-express DNA methylated genes in cancer cell lines by using demethylating agents and to rescue their functionality.
- DNA demethylating drugs in low doses have clinical activity against some tumors.
- Two such agents, 5-azacytidine (Vidaza) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), have been approved as treatments for the myelodysplastic syndrome and leukemia.
- However, these demethylating agents have not yet been shown to have clinical activity against solid tumors.

Επιγενετικά φάρμακα ως αντικαρκινικά

Στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων



Επανενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης



Στόχευση άμεσα των DNMTs

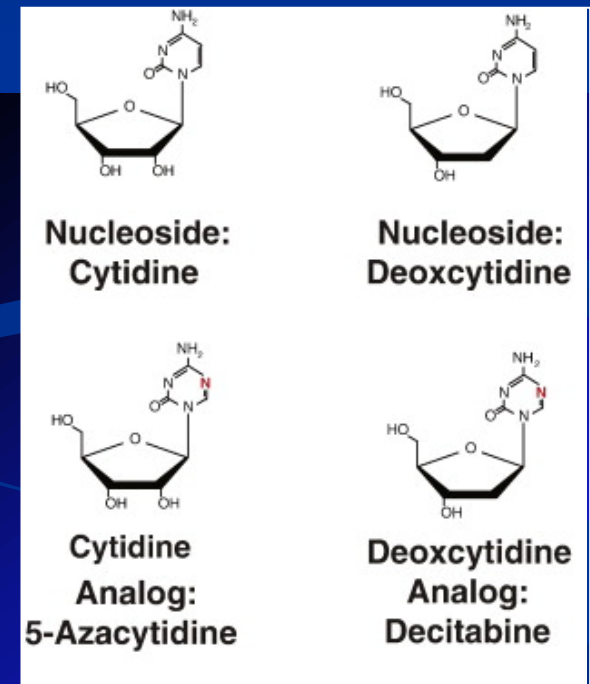
Στοχεύση των πρωτεϊνών, που συνδέονται ειδικά με το μεθυλιωμένο DNA και μεταδίδουν τα κατασταλτικά σήματα

- 5-αζακιτιδίνη (vidaza)
- 5-αζα-2-δεοξυκιτιδίνη (decitabine)

(+) πολύ καλά αποτελέσματα σε μικρές δόσεις
(+) μικρή τοξικότητα
(-) μικρός t_{1/2}

Μεθυλίωση του DNA ως θεραπευτικός στόχος

- 1^ης γενιάς DNMT αναστολείς
(αποκατάσταση φυσιολογικού προφίλ μεθυλίωσης-επαναφορά έκφρασης)
- Στηρίζονται στην **αντιστρεπτή φύση** της μεθυλίωσης
- **FDA approved** επιγενετικές θεραπείες για μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία: **5-azacytidine** (Vidaza, Celgene), **decitabine** (Dacogen, Eisai)

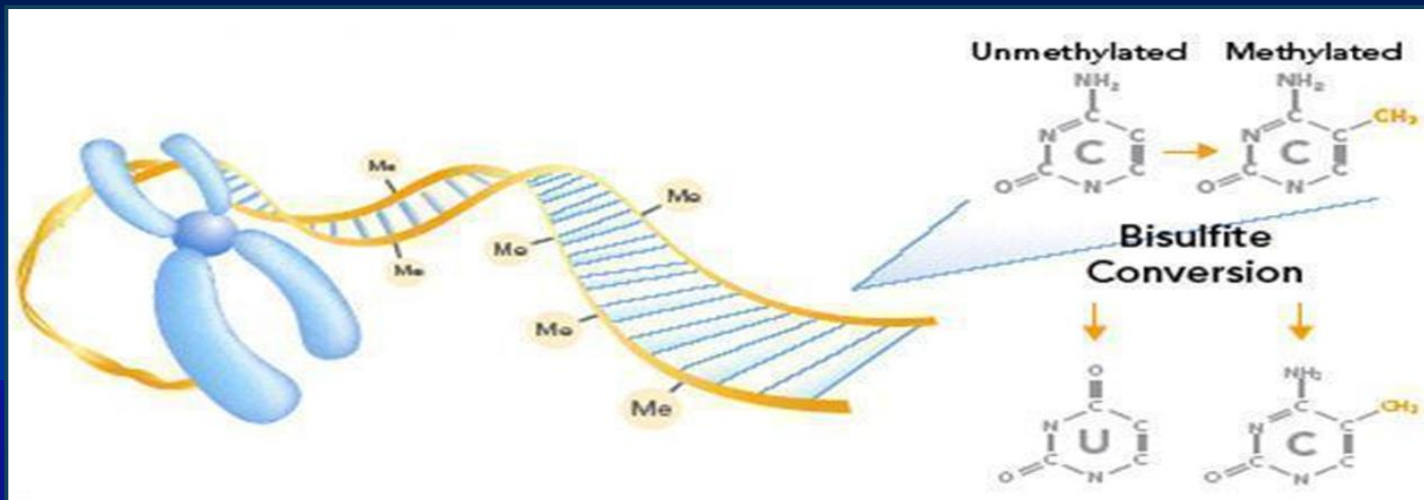


Μέθοδοι ανάλυσης της μεθυλίωσης του DNA

1. Ενζυμική μέθοδος με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική στη μεθυλίωση (Methylation specific PCR - MSP)
3. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)
4. MethyLight
5. DNA methylation-specific oligonucleotide microarrays
6. NGS

ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΜΕ ΟΞΙΝΟ ΘΕΙΩΔΕΣ ΝΑΤΡΙΟ

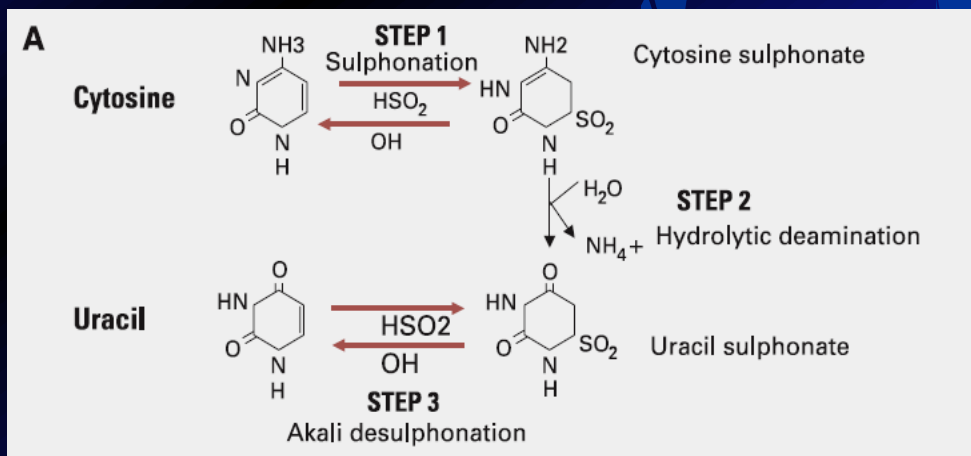
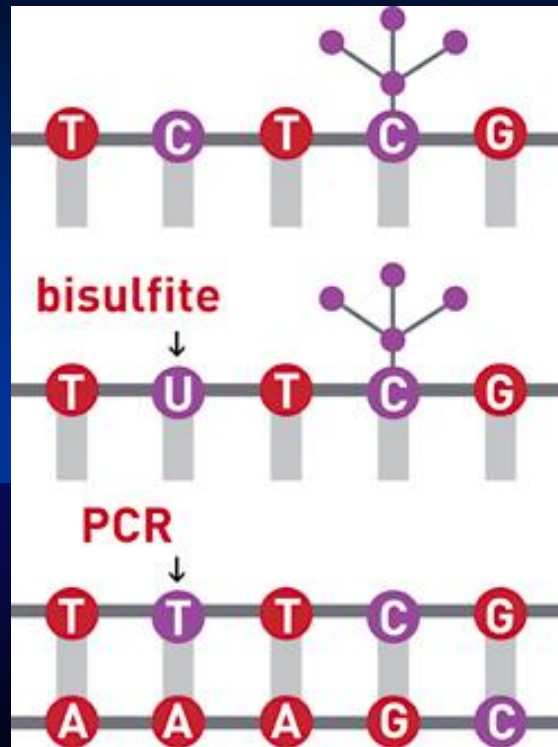


<http://ncifrederick.cancer.gov>

- Οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες (C) μετατρέπονται σε ουρακίλες (U)
- Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες
- Τελικό προϊόν μονόκλωνο

	Original sequence	Sequence after bisulfite treatment
Unmethylated DNA	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-U-G-G-T-U-A-T-U-G-U-A-T
Methylated DNA	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-C-G-G-T-U-A-T-C-G-U-A-T

DNA sodium bisulfite treatment



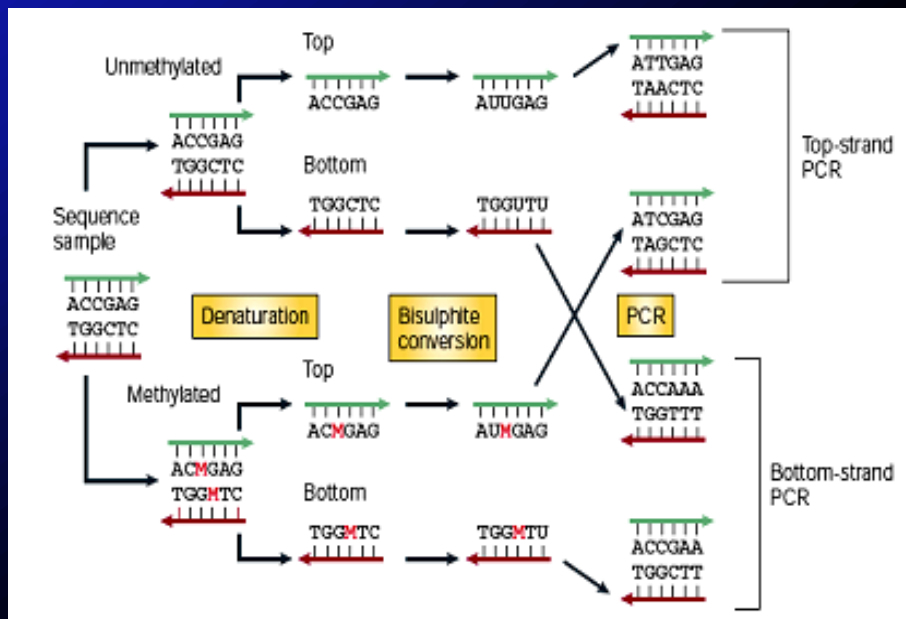
Detection of DNA methylation

a Problem	PCR or cloning
	C → C
	M → C
b Solution	Bisulphite PCR
	C → U → T
	M → M → C

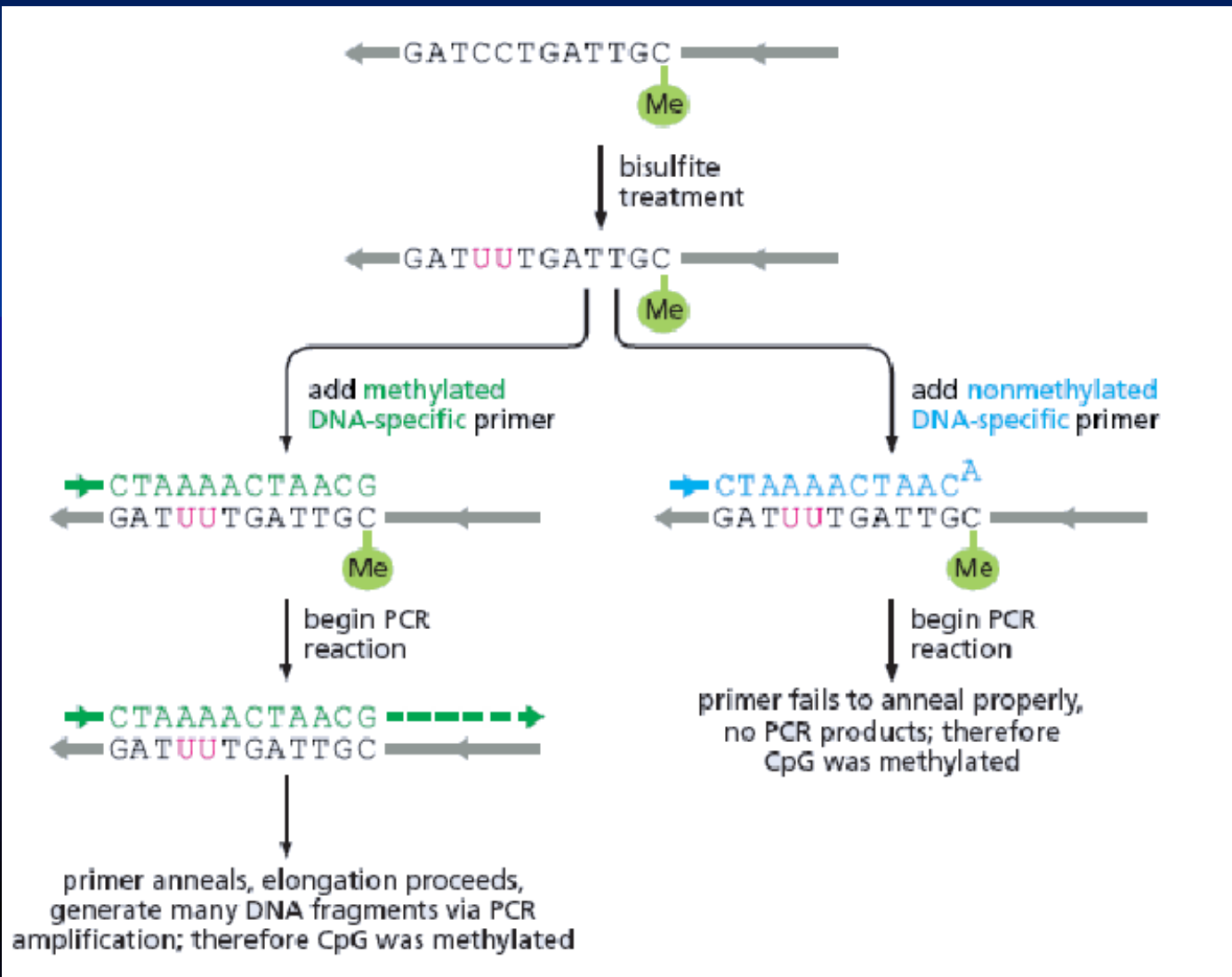
✓ Standard molecular biology techniques, such as PCR and cloning, erase DNA methylation information

✓ Sodium bisulfite converts all unmethylated, but not methylated, cytosine to uracil

✓ As a consequence, the converted DNA is no longer self-complementary and amplification of either the top or bottom DNA strand requires different primers



Methylation specific PCR (MSP)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική στη μεθυλίωση Methylation specific PCR - MSP

Μέθοδος αναφοράς

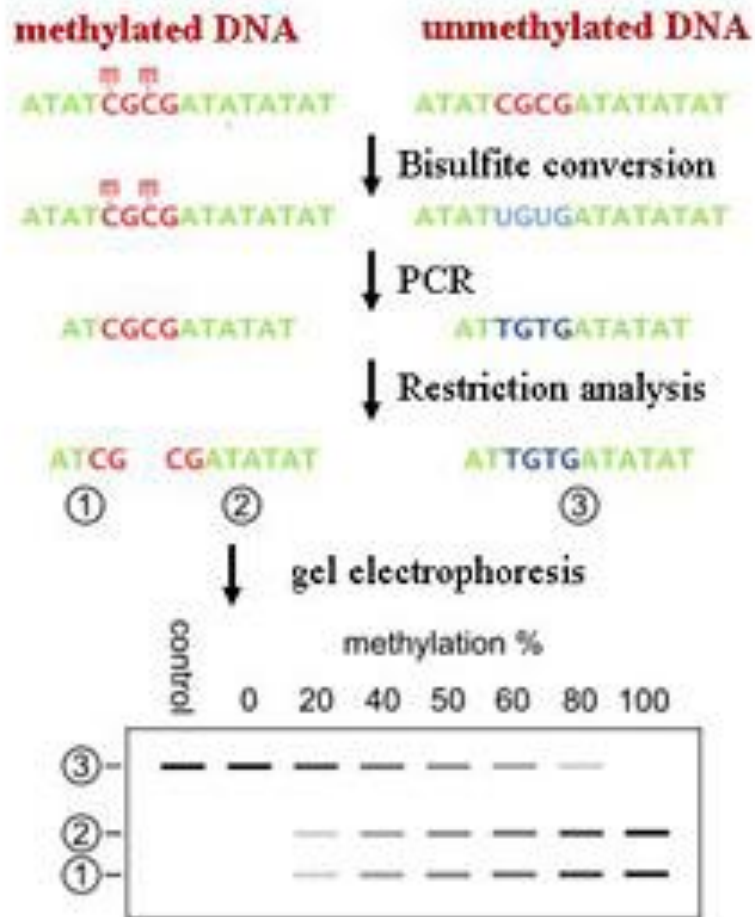
(+) ευαίσθητη και ειδική για οποιαδήποτε αλληλουχία CpG, που βρίσκεται εντός των CpG islands

(+) απλή και γρήγορη διαδικασία, με δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων

(+) φθηνή

Combined Bisulfite Restriction Analysis COBRA

Ημιποσοτική μέθοδος που βασίζεται στην MSP



- Οι εκκινητές σχεδιάζονται να μην έχουν αλληλουχίες που περιλαμβάνουν CpG δινουκλεοτίδια.

- Η σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται μετά από πέψη των προϊόντων της PCR με Π.Ε. και ηλεκτοφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

- Δεν είναι κατάλληλη για κλινικά δείγματα,

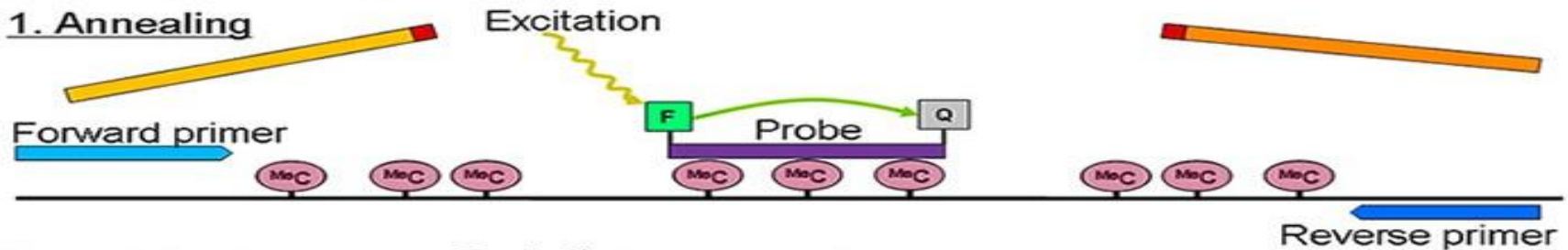
- Κίνδυνος από επιμολύνσεις στην PCR

Methylight

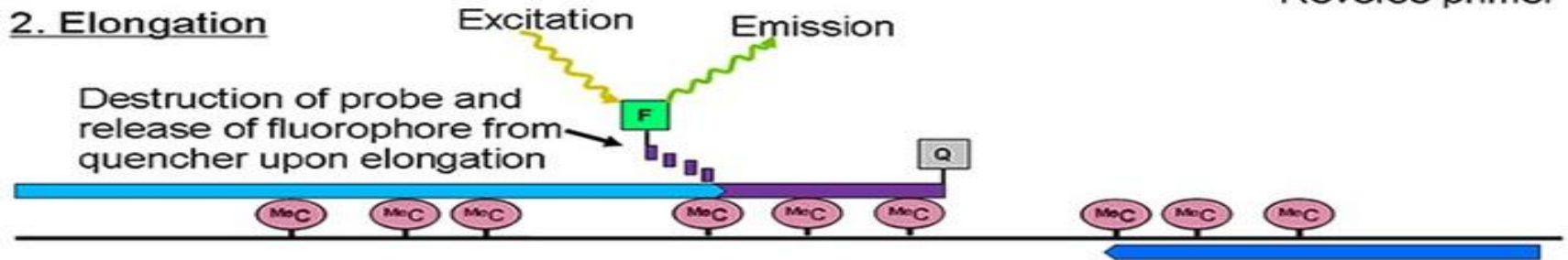
Real time PCR → επιτρέπει ποσοτικοποίηση

A: Methylated sequence

1. Annealing

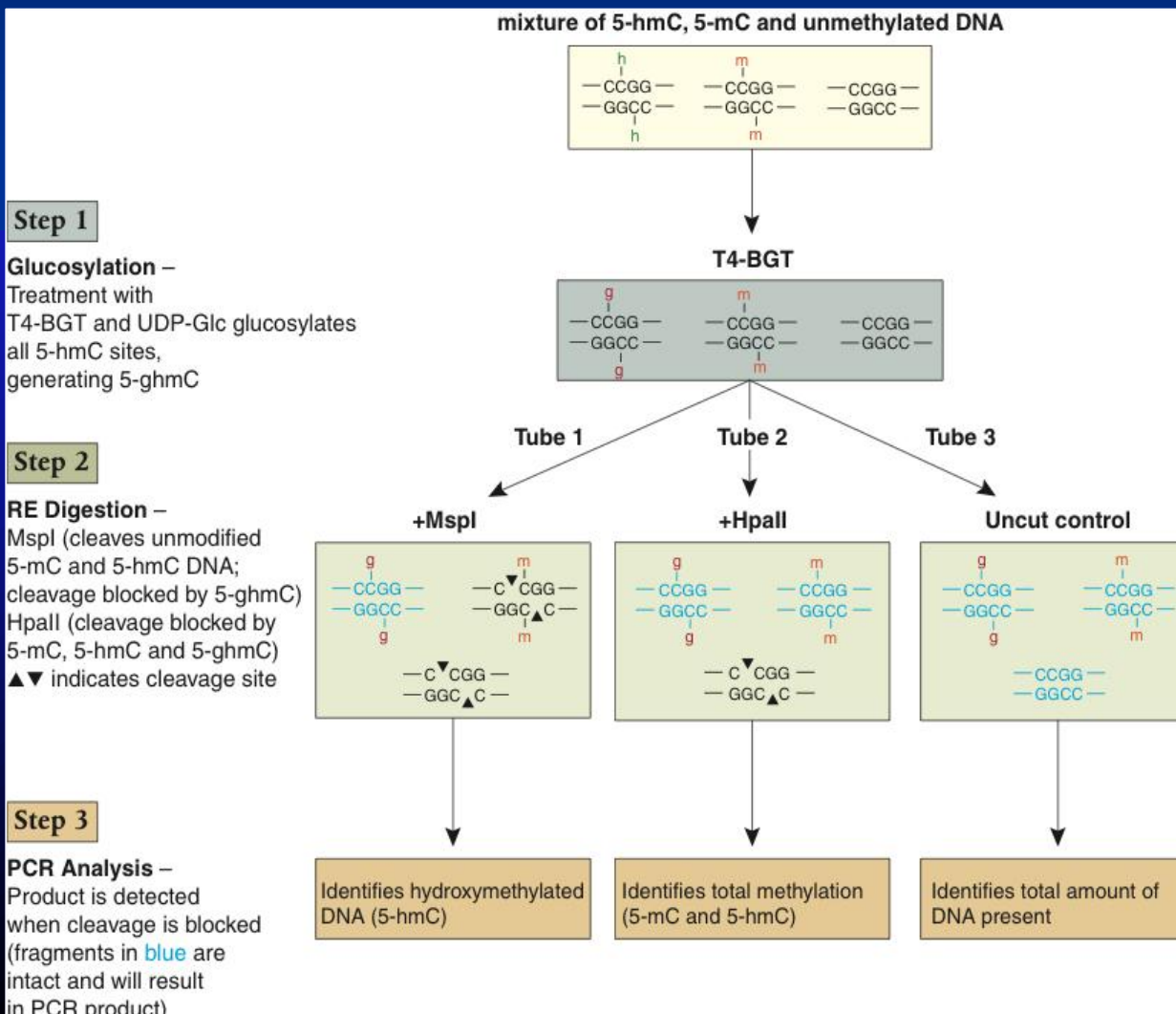


2. Elongation



- ✓ Σήμα ανάλογο της προσδιοριζόμενης αλληλουχίας
- ✓ Υψηλή ευαισθησία
- ✓ Ειδικότητα
- ✓ Δυνατότητα αυτοματοποίησης
- ✓ Μικρός όγκος δειγμάτων
- ✓ Ταχεία επεξεργασία

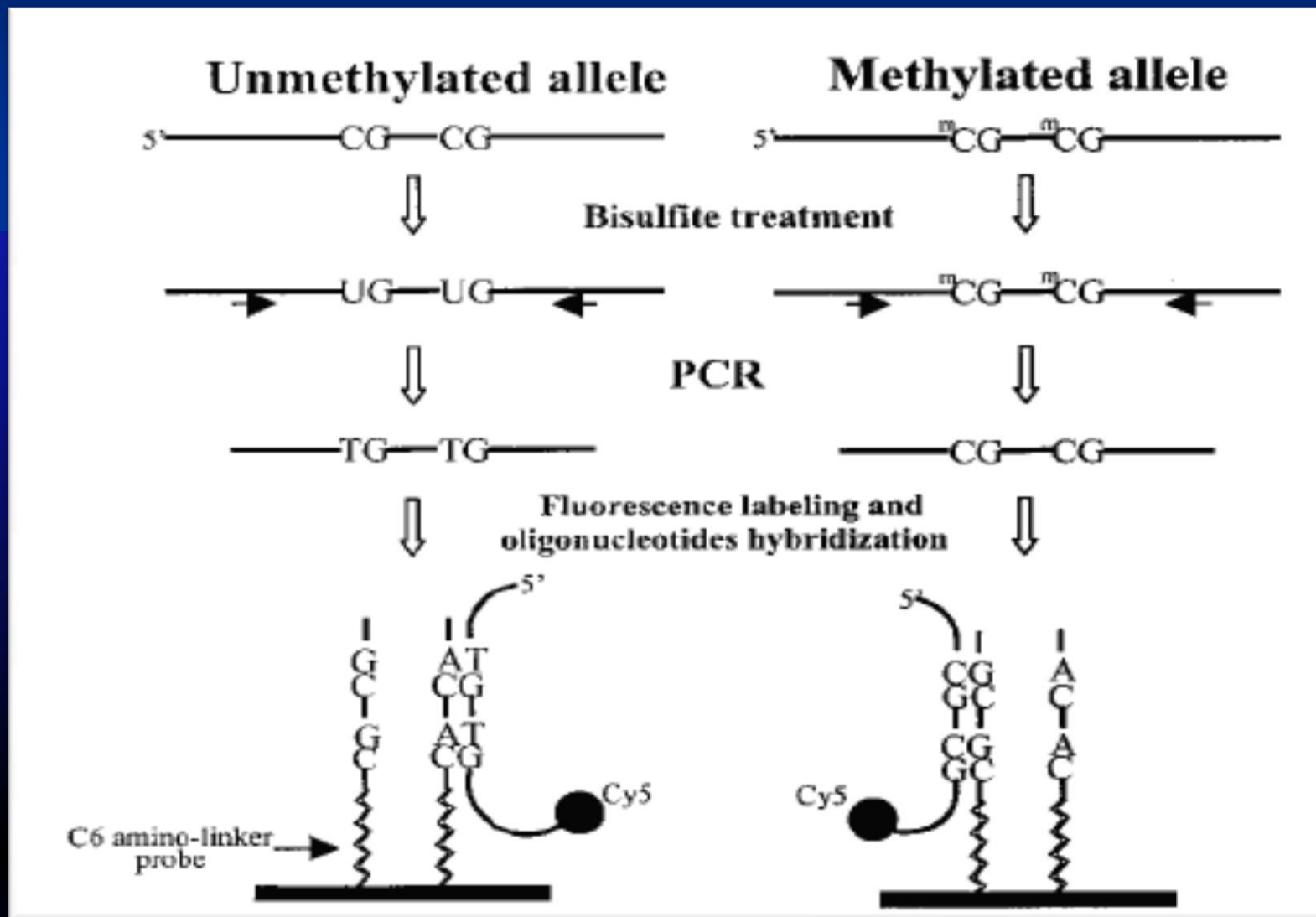
Ενζυμική μέθοδος με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών



(+) μεγάλη ακρίβεια
(-) απαιτεί μεγάλες ποσότητες γενωμικού DNA
(-) ανιχνεύει μεθυλιώσεις μόνο εντός των περιοχών που κόβουν οι Π.Ε

DNA methylation-specific oligonucleotide microarrays

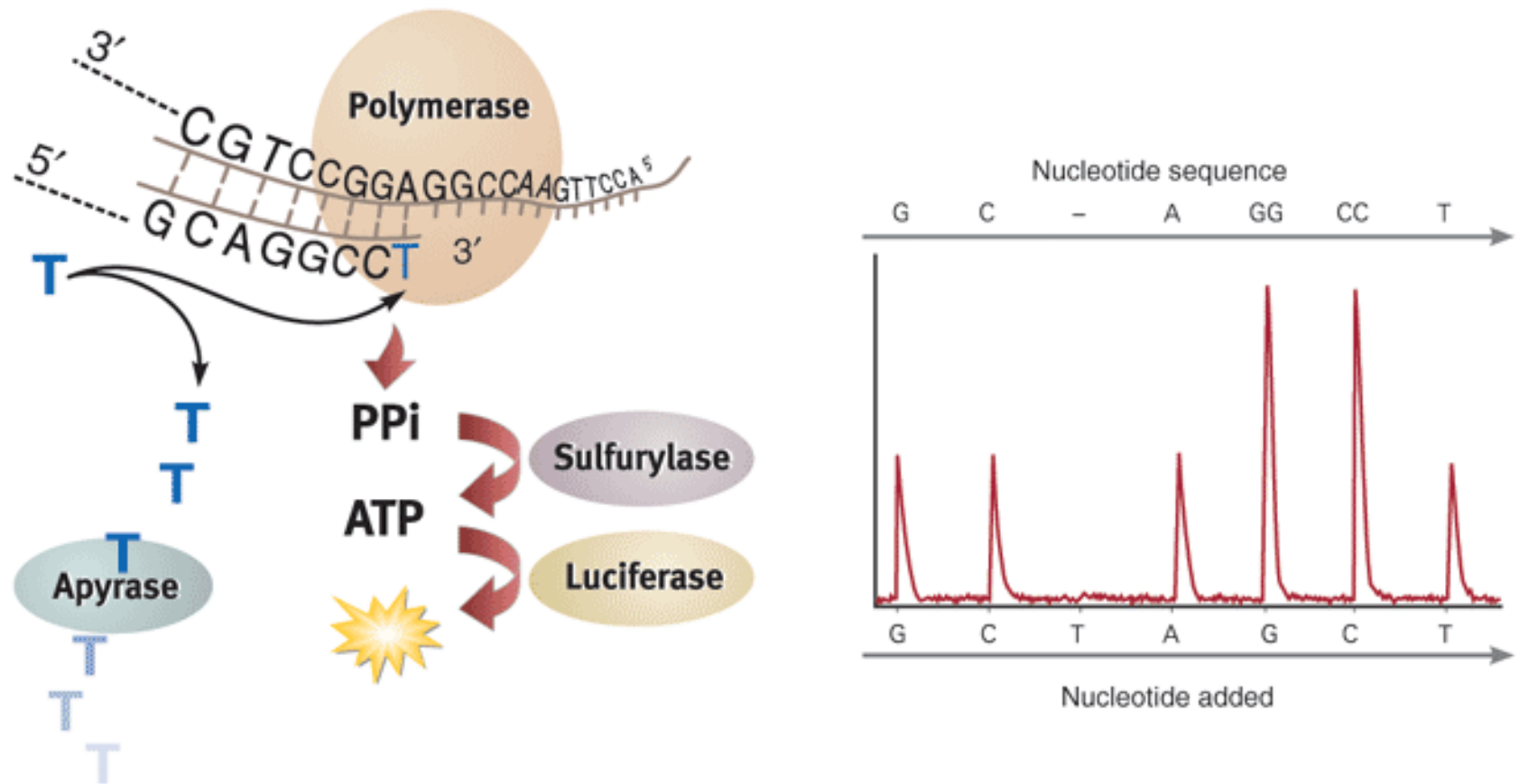
Ανάλυση μεθυλιώσεων του DNA σε όλο το γονιδίωμα



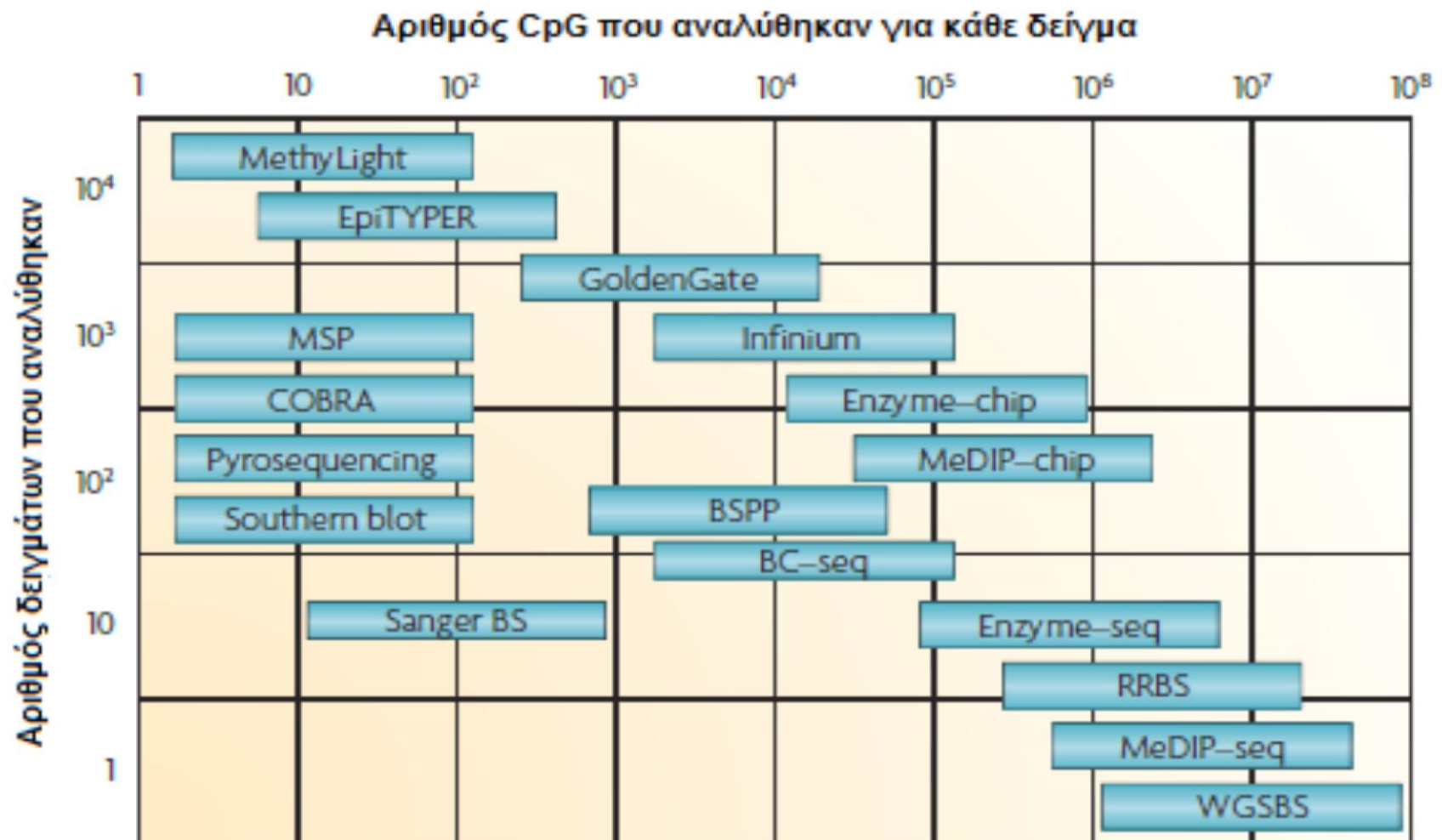
DNA methylation analysis by pyrosequencing

- Pyrosequencing is a sequencing-by-synthesis method that quantitatively monitors the real-time incorporation of nucleotides through the enzymatic conversion of released pyrophosphate into a proportional light signal.
- Quantitative measures are of special importance for DNA methylation analysis in various developmental and pathological situations.
- Analysis of DNA methylation patterns by pyrosequencing combines a simple reaction protocol with reproducible and accurate measures of the degree of methylation at several CpGs in close proximity with high quantitative resolution.
- After bisulfite treatment and PCR, the degree of each methylation at each CpG position in a sequence is determined from the ratio of T and C. The process of purification and sequencing can be repeated for the same template to analyze other CpGs in the same amplification product.

DNA methylation analysis by pyrosequencing



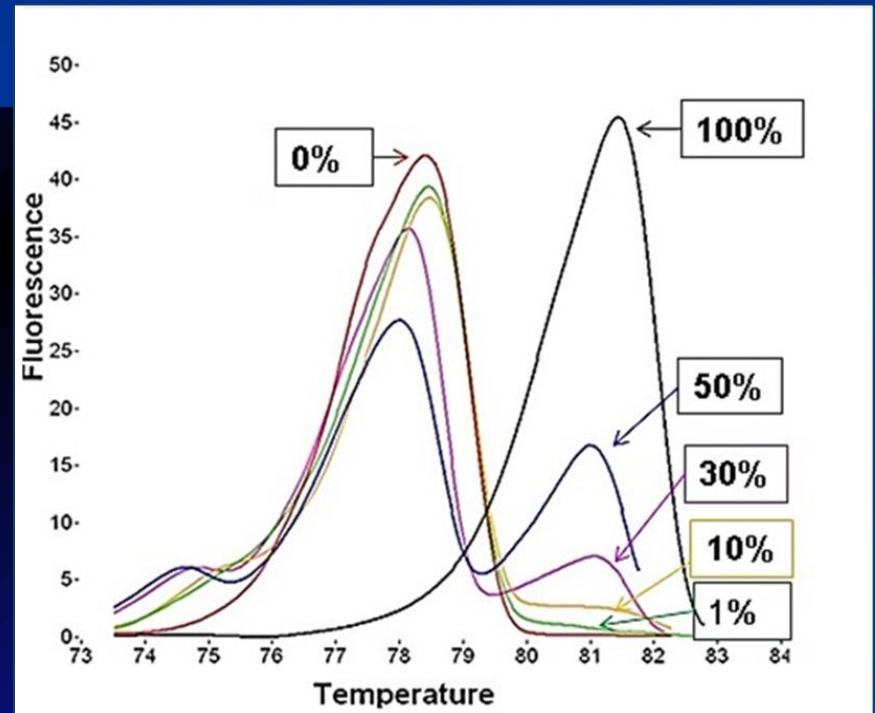
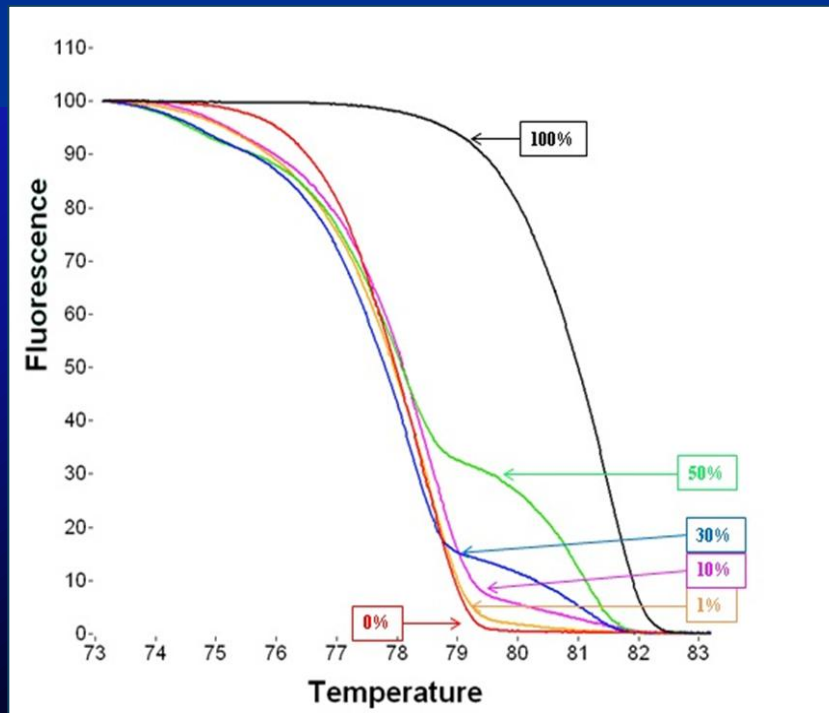
Σύγκριση μεθόδων ανάλυσης της μεθυλίωσης του DNA



A rapid and accurate closed-tube Methylation-Sensitive High Resolution Melting Analysis assay for the semi-quantitative determination of SOX17 promoter methylation in clinical samples.

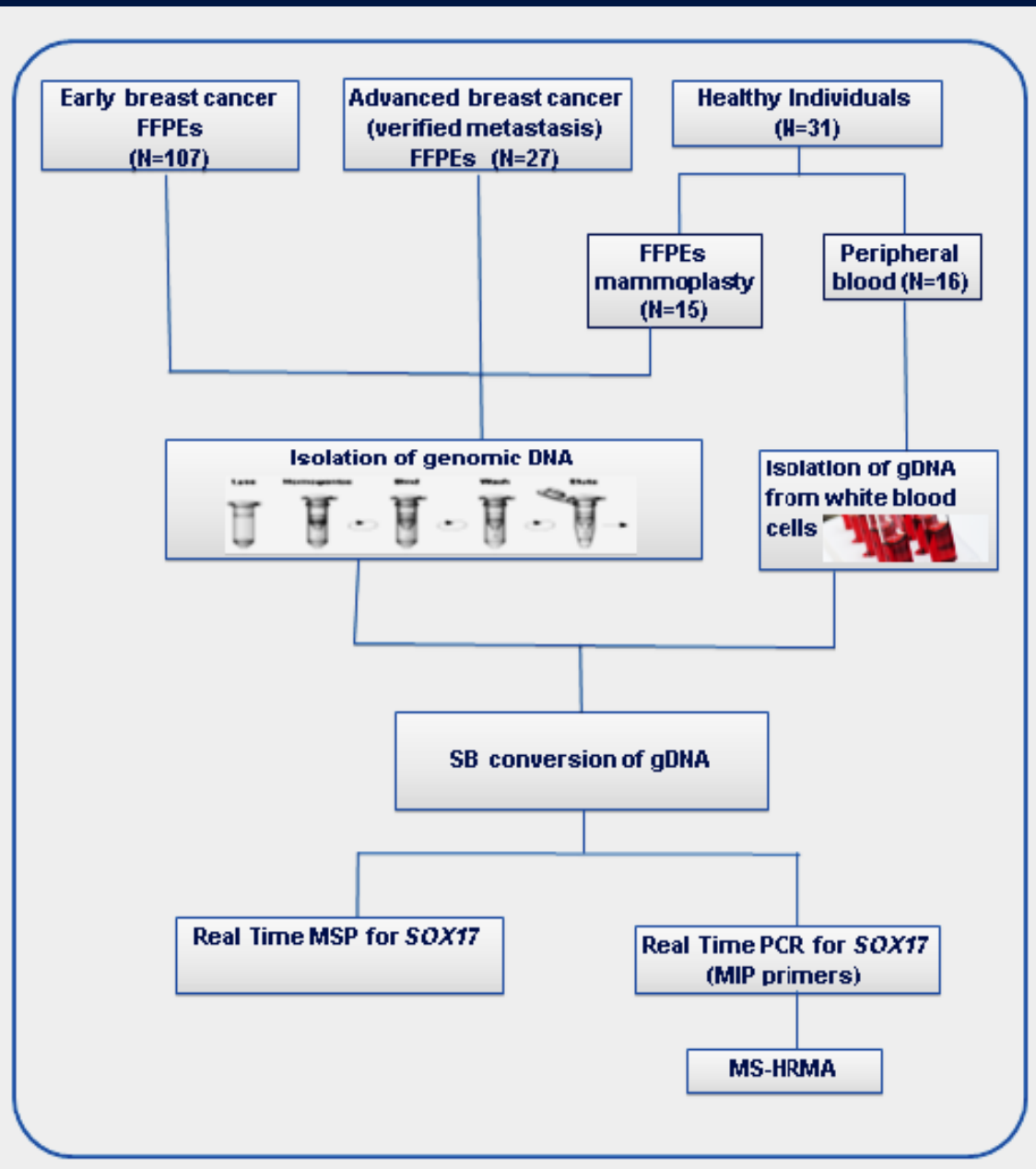
Mastoraki S¹, Chimonidou M¹, Dimitrakopoulos L¹, Kounelis S², Malamos N², Georgoulas V³, Lianidou E⁴.

Μελέτη ευαισθησίας



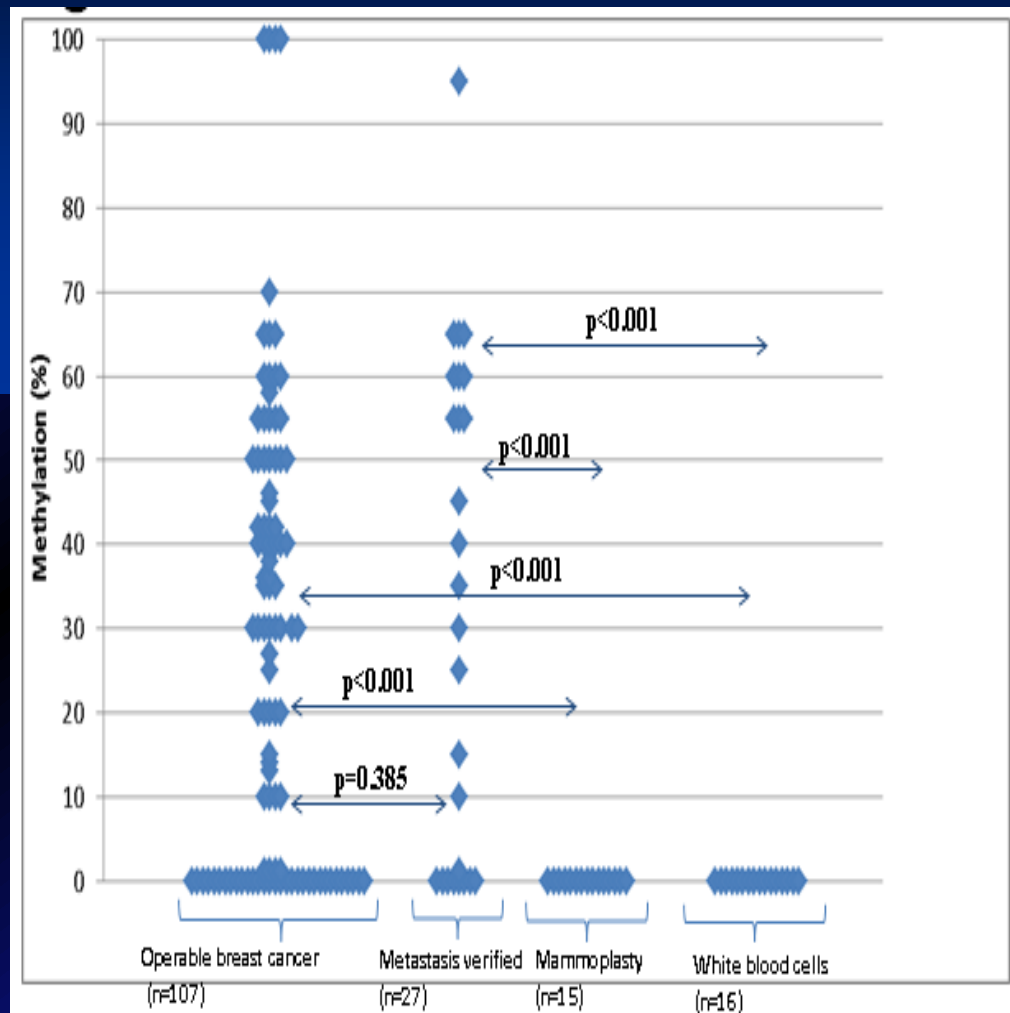
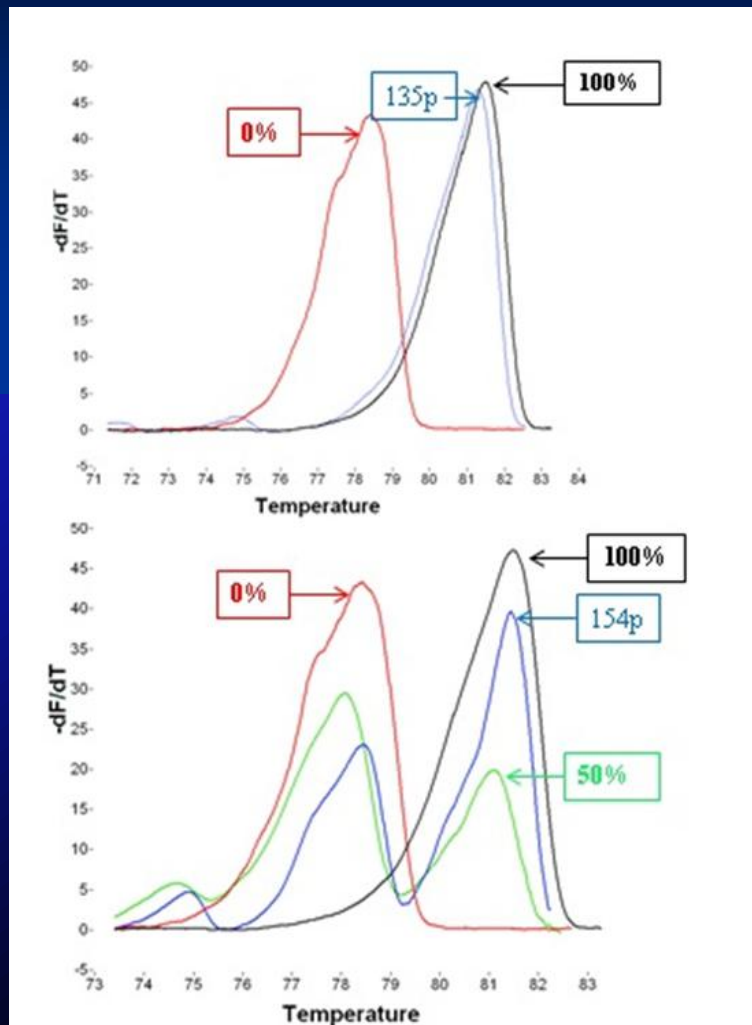
- ✓ Δυνατή η διάκριση 1 μεθυλιωμένης αλληλουχίας DNA έναντι 99 μη μεθυλιωμένων!

Πειραματική πορεία



**Mastoraki S.
et al, 2015,
Clin Chim
Acta**

Αποτελέσματα

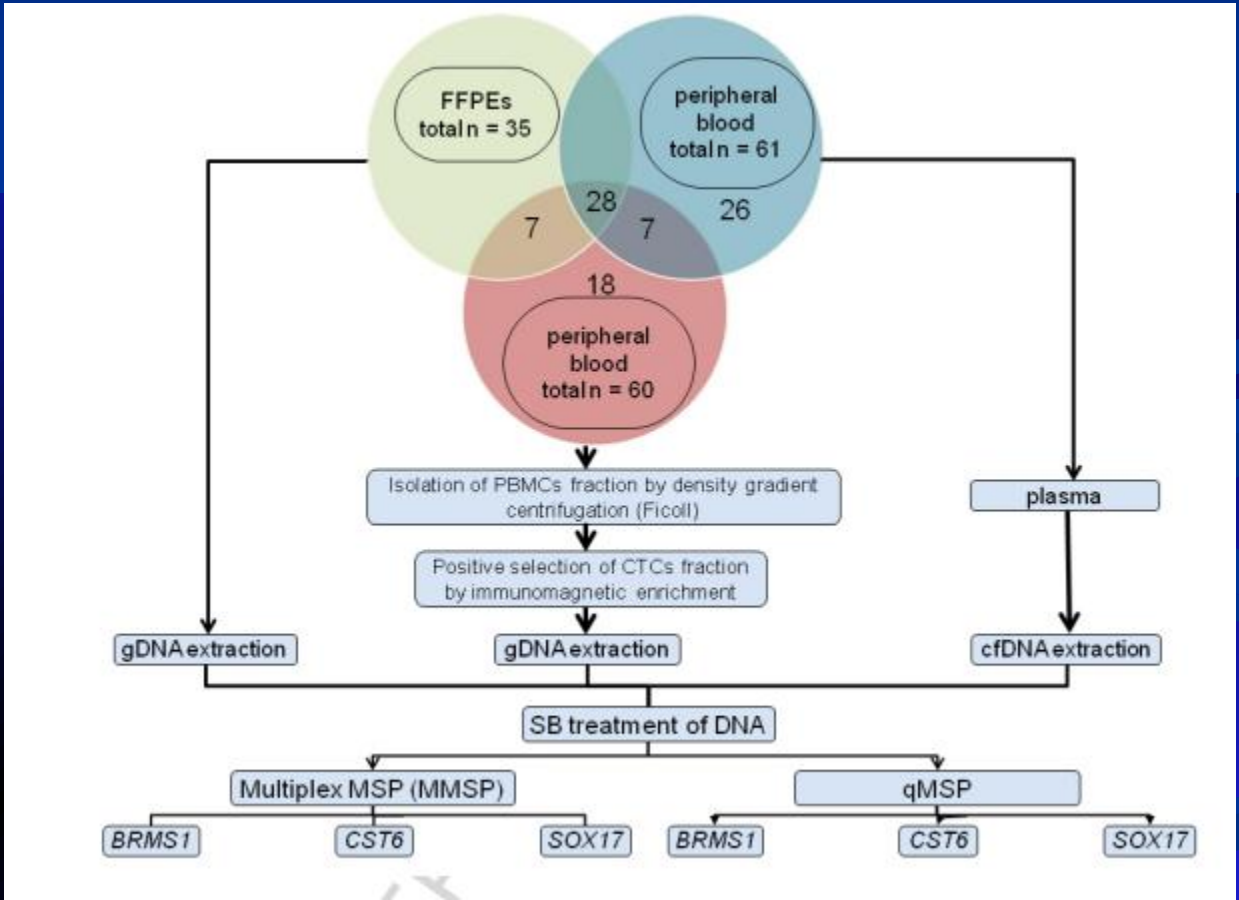


Συμπεράσματα

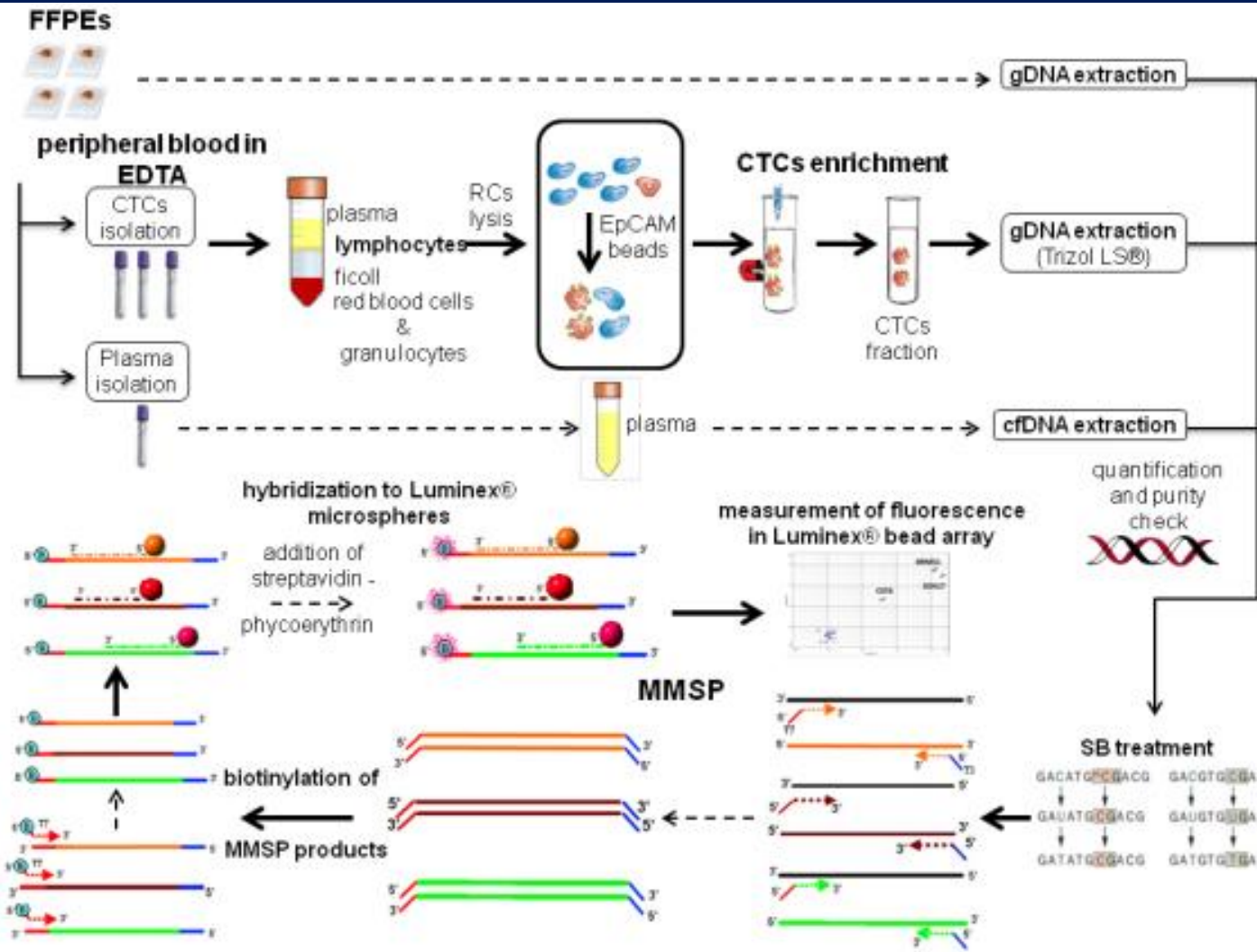
1. Η αναπτυχθείσα τεχνική MS-HRMA για τη διερεύνηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του SOX17 είναι:
 - ✓ Ευαίσθητη
 - ✓ Γρήγορη
 - ✓ Απλή
 - ✓ Χαμηλού κόστους
2. Συγκρίσιμα αποτελέσματα με Real-Time MSP σε λιγότερο χρόνο
3. Δυνατότητα ημιποσοτικής εκτίμησης ποσοστών μεθυλίωσης

Development and validation of a multiplex methylation specific PCR-coupled liquid bead array for liquid biopsy analysis.

Parisi C¹, Mastoraki S¹, Markou A¹, Strati A¹, Chimonidou M¹, Georgoulas V², Lianidou ES³.



MMSP-coupled liquid bead array assay



DNA Methylation biomarkers in early breast cancer

Clin Biochem. 2009 Jul;42(10-11):970-5. Epub 2009 Apr 15.

Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer.

Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES.

Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, 15771, Greece.

Ann Oncol. 2009 Jun;20(6):1020-5. Epub 2009 Jan 15.

Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer.

Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES.

Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, University of Athens, Athens, Greece.

Int J Cancer. 2009 Dec 15;125(12):2887-92.

Methylation of cystatin M promoter is associated with unfavorable prognosis in operable breast cancer.

Kioulafa M, Balkouranidou I, Sotiropoulou G, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES.

Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece.

Methylation of cystatin M promoter is associated with unfavorable prognosis in operable breast cancer

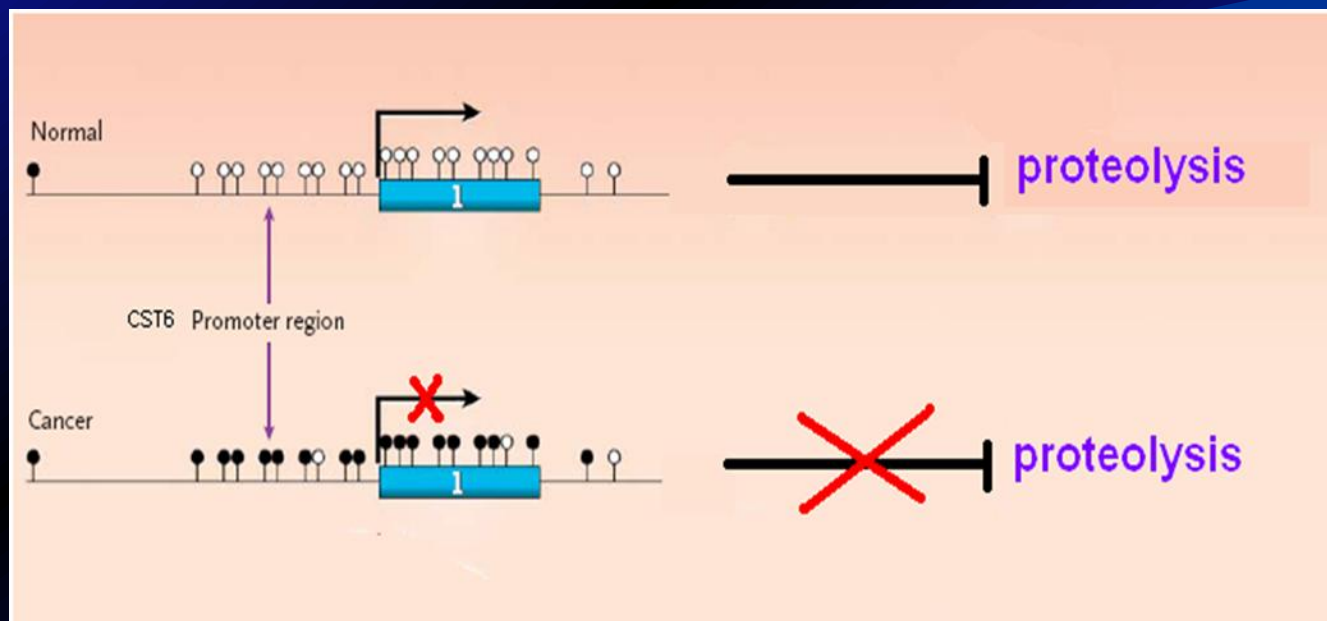
Magdalini Kioulafa¹, Ioanna Balkouranidou¹, Georgia Sotiropoulou², Loukas Kaklamanis³, Dimitris Mavroudis⁴, Vassilis Georgoulas⁴ and Evi S. Lianidou^{1*}

¹Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece

²Department of Pharmacy, University of Patras, Rion-Patras, Greece

³Department of Pathology, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens, Greece

⁴Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece



CST6 methylation in breast cancer: Conclusion

- our data demonstrate for the first time that cystatin M promoter methylation provides important prognostic information in patients with operable breast cancer
- this methylation plays an important role in the clinical behavior of breast tumors.
- The diagnostic sensitivity and specificity of CST6 methylation as a biomarker for prediction of relapses and deaths in operable breast cancer seems to be quite promising.

original article

Annals of Oncology
doi:10.1093/annonc/mdn733

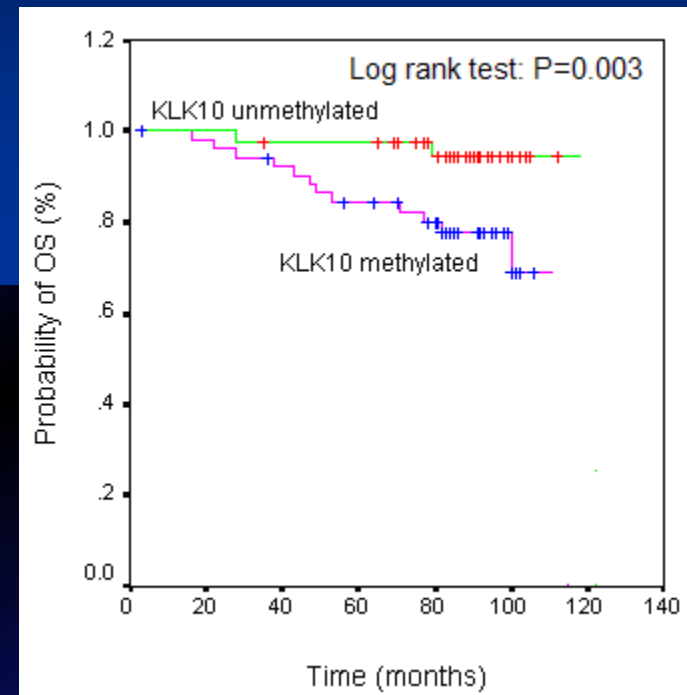
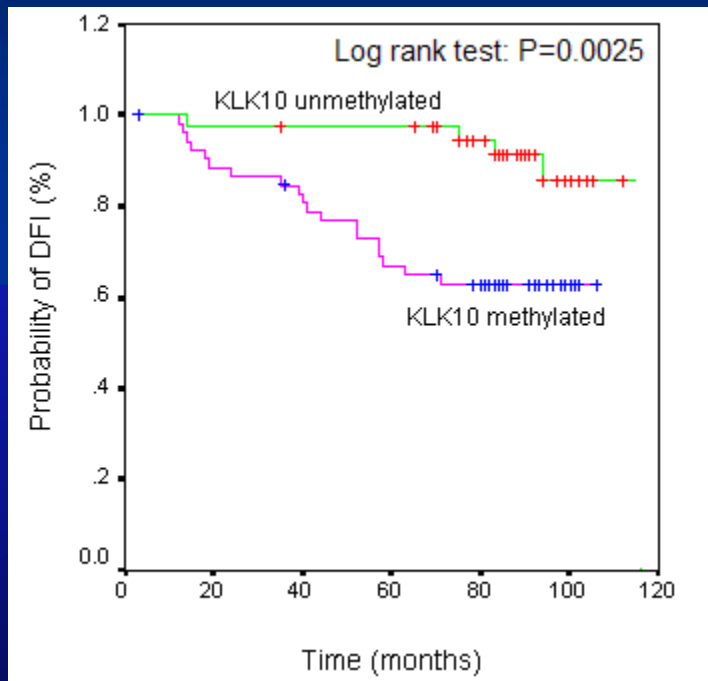
Kallikrein 10 (*KLK10*) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer

M. Kioulafa¹, L. Kaklamanis², E. Stathopoulos³, D. Mavroudis⁴, V. Georgoulas⁴ & E. S. Lianidou^{1*}

¹Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens; ²Department of Pathology, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens; Departments of ³Pathology and Medical Oncology and ⁴Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete Greece

Received 1 October 2008; accepted 4 November 2008

KLK10 methylation



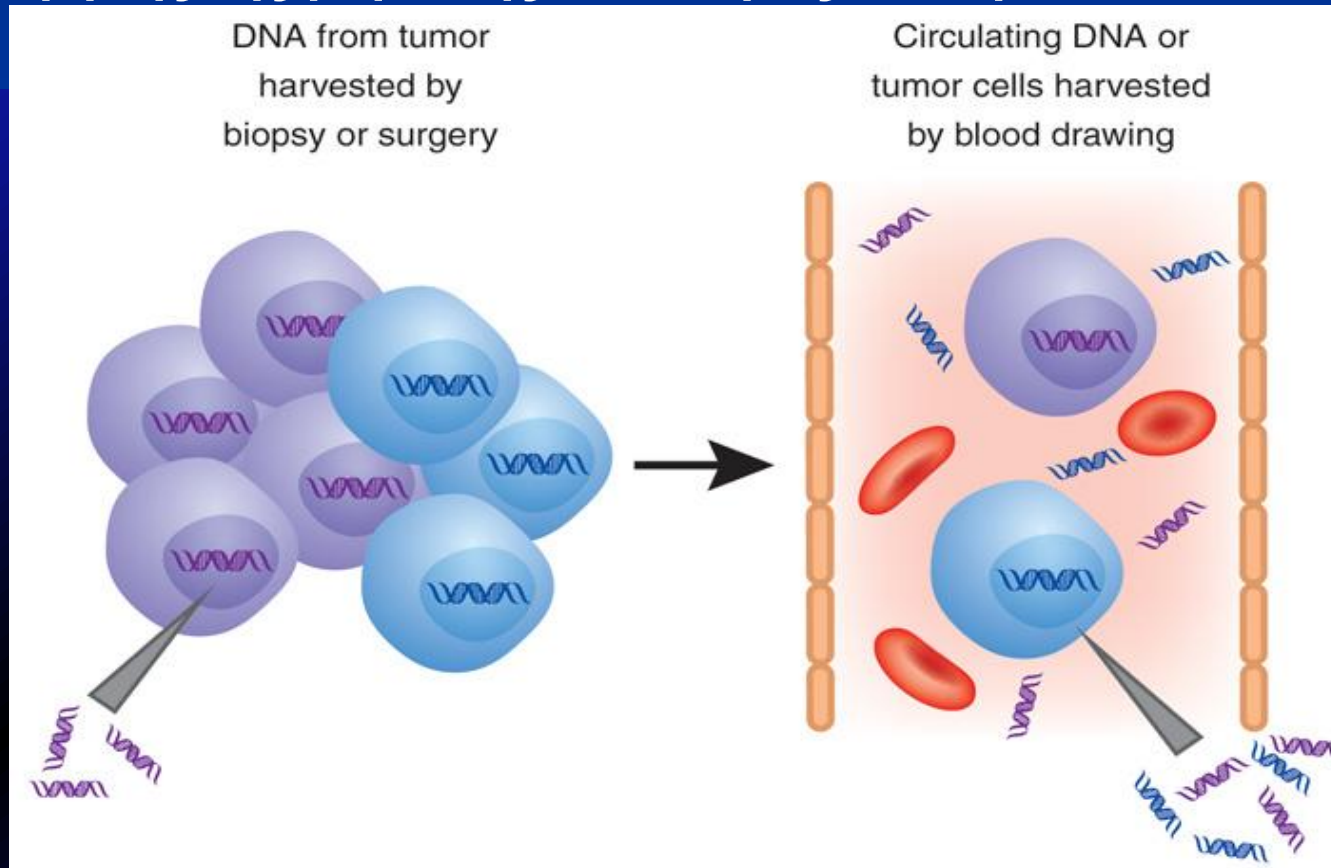
**Disease Free Interval
(DFI) : ($p=0.0025$)**

**Overall Survival
(OS) f ($p=0.003$)**

Kioulafa et al, Ann of Oncology, 2009

Tissue biopsy VS Liquid biopsy

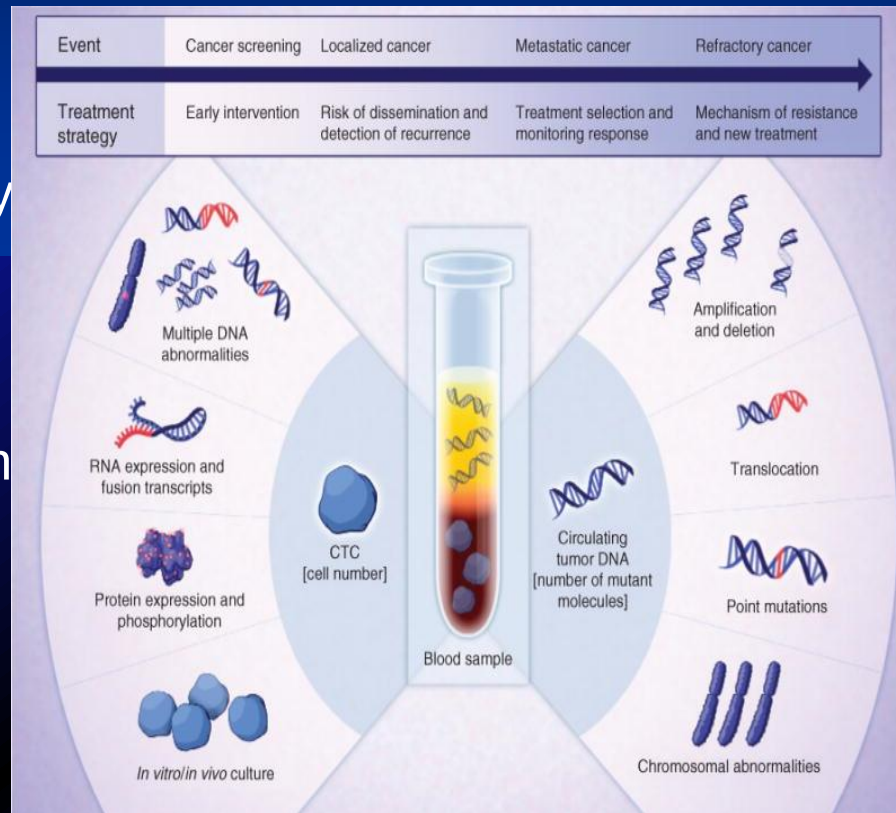
- Εξαιτίας της ετερογένειας του όγκου, τμήμα βιοψίας καρκινικού ιστού μπορεί να περιέχει κύτταρα που δεν είναι αντιπροσωπευτικά του συνόλου του όγκου
- Ανάλυση του cfDNA και των CTCs βοηθά στην ολοκλήρωση της σκιαγράφησης της μοριακής ταυτότητας του όγκου



Liquid biopsy

CTCs

- better understanding of tumor biology and tumor cell dissemination
- molecular characterization info on the biology of metastasis and resistance to established therapies



Daniel A. Haber and Victor E. Velculescu: Cancer Discov. 2014

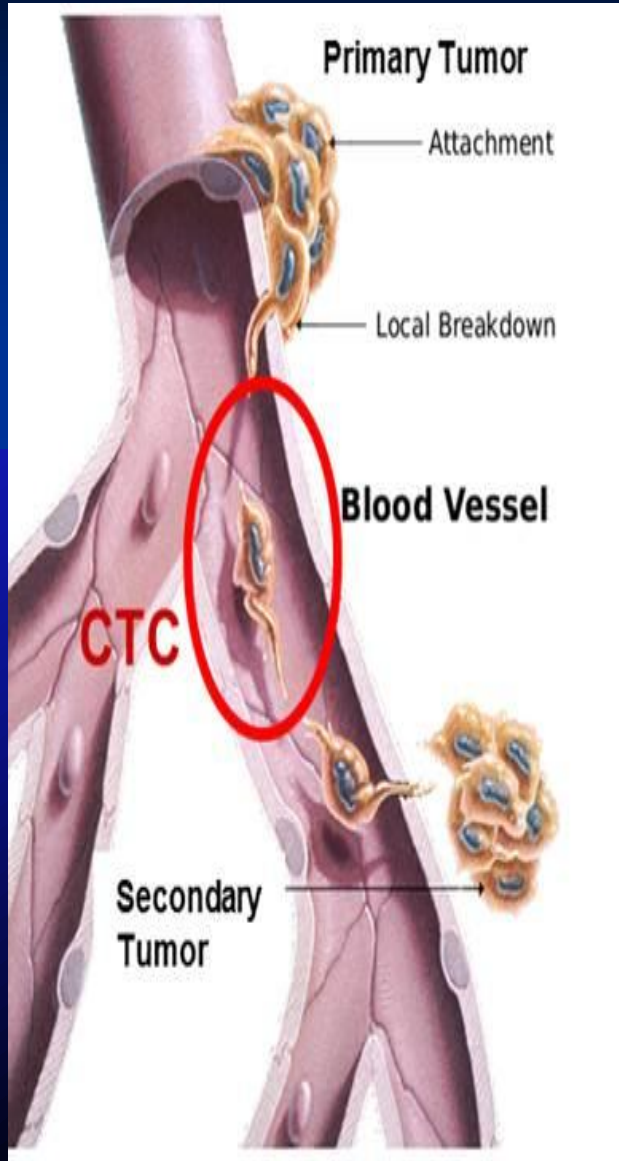
ctDNA

- monitoring treatment responses, unravelling therapeutic resistance, and potentially detecting disease progression before clinical confirmation
- Tumor characterization to adapt better therapeutic management of patients

CTC

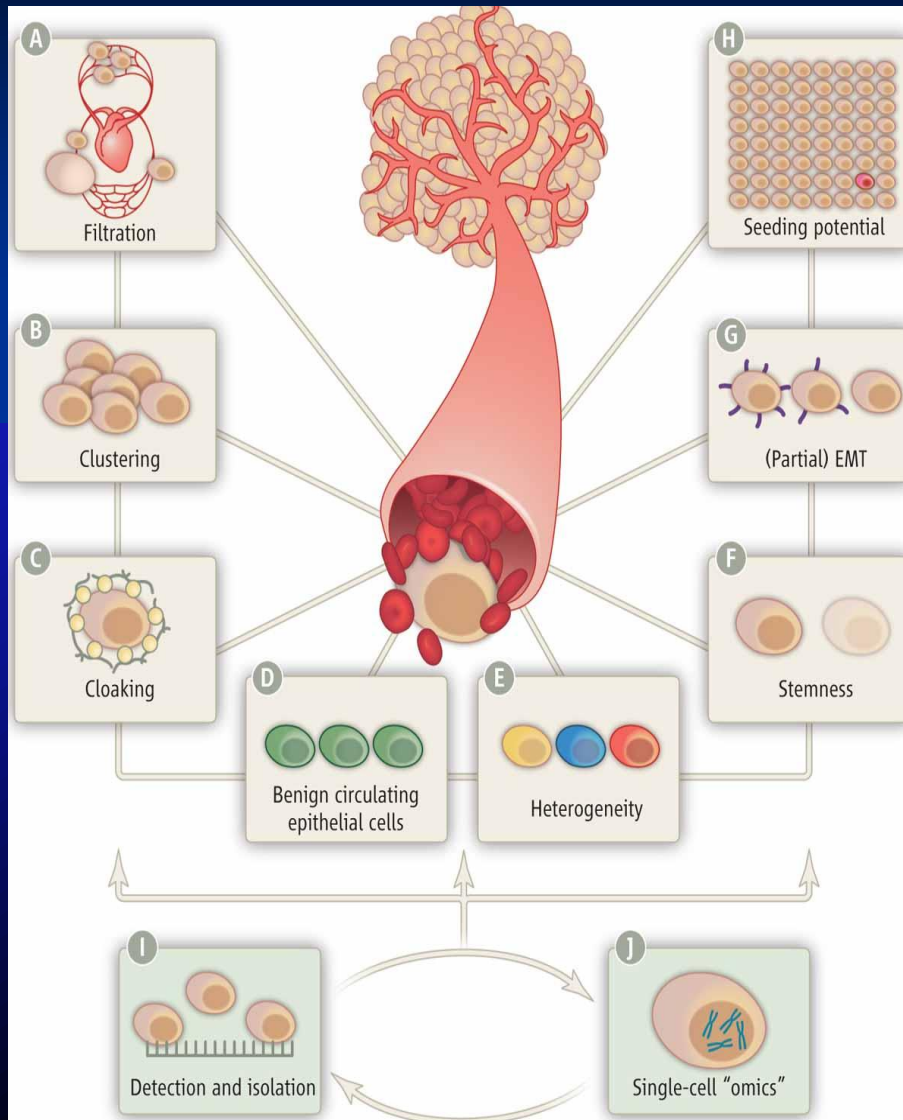
methylation studies

Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)



- Η έννοια εισήχθη πρώτη φορά το 1869 από τον Asworth
- Τα κύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα των ασθενών, τα οποία έχουν διασκορπιστεί από τον πρωτοπαθή όγκο από έναν υπολειμματικό όγκο που δεν αφαιρέθηκε ή από τις μεταστάσεις
- Ανιχνεύονται στο αίμα των ασθενών σε συγκεντρώσεις ένα καρκινικό κύτταρο ανά 10^6 - 10^7 λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος
- Μέτρηση των CTCs ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους μεταστατικού καρκίνου με σκοπό τον έλεγχο ανταπόκρισης στην θεραπεία

Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)



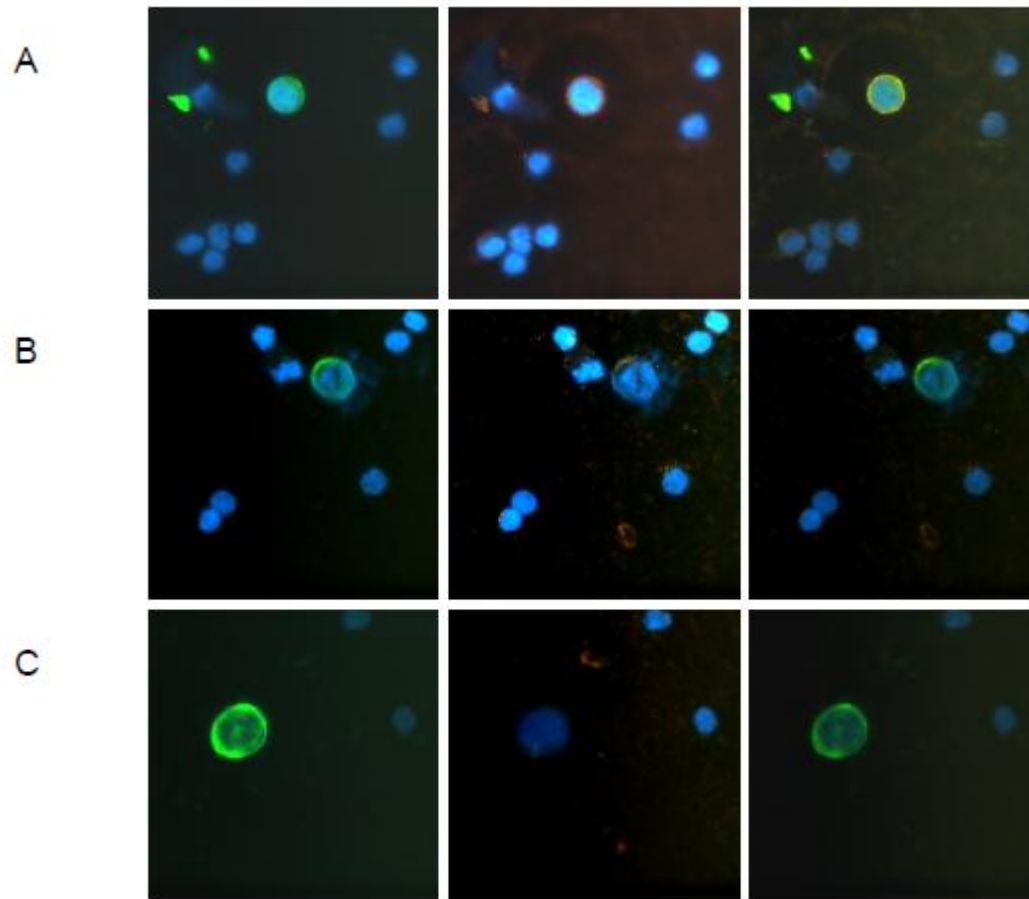
- Αποτελούν ένα νέο πολλά υποσχόμενο δείκτη καρκίνου (υγρή βιοψία)
- Συμβάλλουν στην πρόωρη ανίχνευση της μεταστατικής νόσου σε λιγότερο διηθητικούς όγκους, πιο αξιόπιστα σε σχέση με τις διαθέσιμες συμβατικές μεθόδους, όπως η κλινική εμφάνιση, η ραδιογραφική αξιολόγηση και οι καρκινικοί βιοχημικοί δείκτες
- **Μοριακός χαρακτηρισμός** των CTCs κρίνεται απαραίτητος για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης

Heat map: DNA methylation in CTCs by Methylation Specific PCR (MSP)

[illegible]

Maria Chimonidou et al, Clin. Chem., 2011

BRMS1 expression in cytopsin stained CTC of early breast cancer patients. Cells were stained with A45-B/B3 antibody (green), BRMS1 antibody (red) and Dapi (blue). Quantification of the samples was performed with the ARIOL system



Pancytokeratin
(A45-B/B3 antibody)

BRMS1 antibody

Overlay

A):BRMS1 high expression,

(B): BRMS1 low expression,

C) negative for BRMS1

**BRMS1 expression
in CTCs (cytopsins)**



**BRMS1 methylation
in CTCs (cytopsins)**

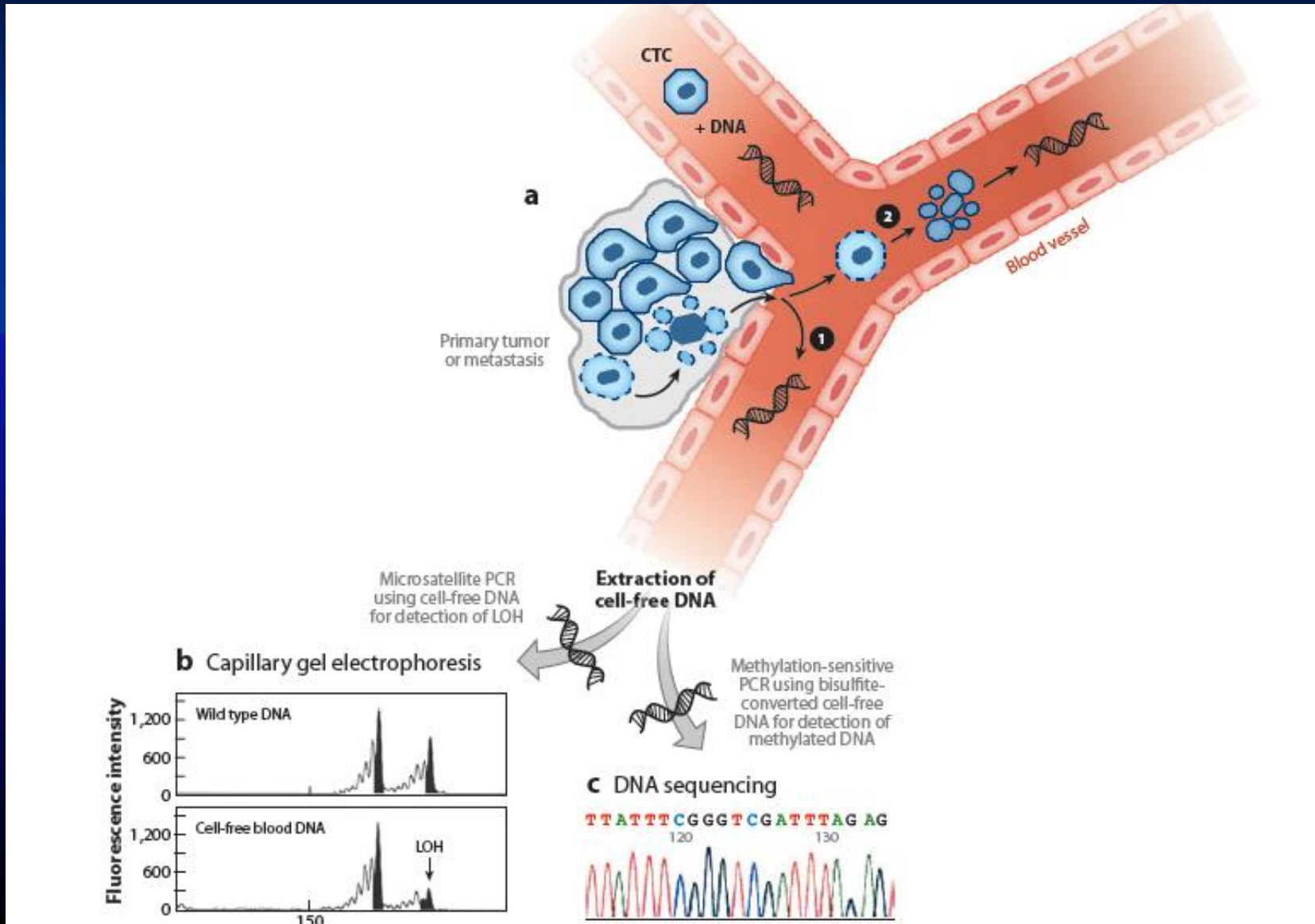


Cell free DNA
methylation studies

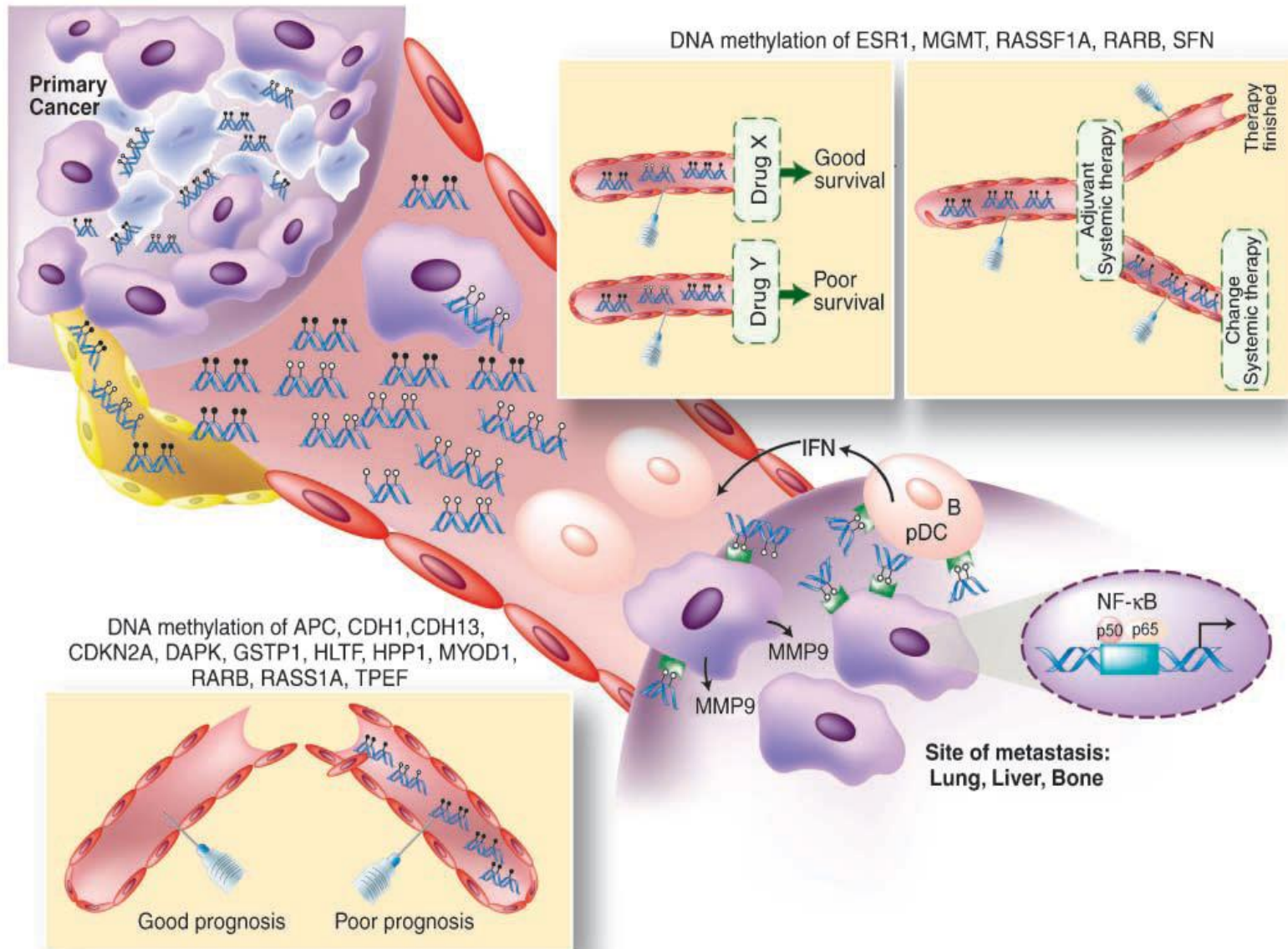
Cell free DNA (cfDNA)

- cfDNA circulates in plasma of patients with cancer at increased concentrations.
- Cell free DNA maintains the **genetic and epigenetic** profile of its primary tumor source
- Many teams have focused on the development of assays that allow the specific detection of small amounts of tumor specific **ctDNA** in the peripheral blood of patients with cancer.
- The detection of tumor specific DNA alterations such as **mutations** and **methylation** in cfDNA provides a less invasive, more easily accessible source of DNA for genetic analysis than tumor biopsies.
- Several studies have described methylation of tumor suppressor genes in serum or plasma samples and in the corresponding primary breast tumors, while DNA methylation was not detected in plasma or serum of healthy donors.

Detection of DNA methylation in Cell-free circulating DNA



DNA methylation in cfDNA



Molecular Analysis of Plasma DNA for the Early Detection of Lung Cancer by Quantitative Methylation-Specific PCR

Kimberly Laskie Ostrow¹, Mohammad O. Hoque¹, Myriam Loyo¹, Marianna Brait¹, Alissa Greenberg², Jill M. Siegfried³, Jennifer R. Grandis⁴, Autumn Gaither Davis³, William L. Bigbee⁵, William Rom², and David Sidransky¹

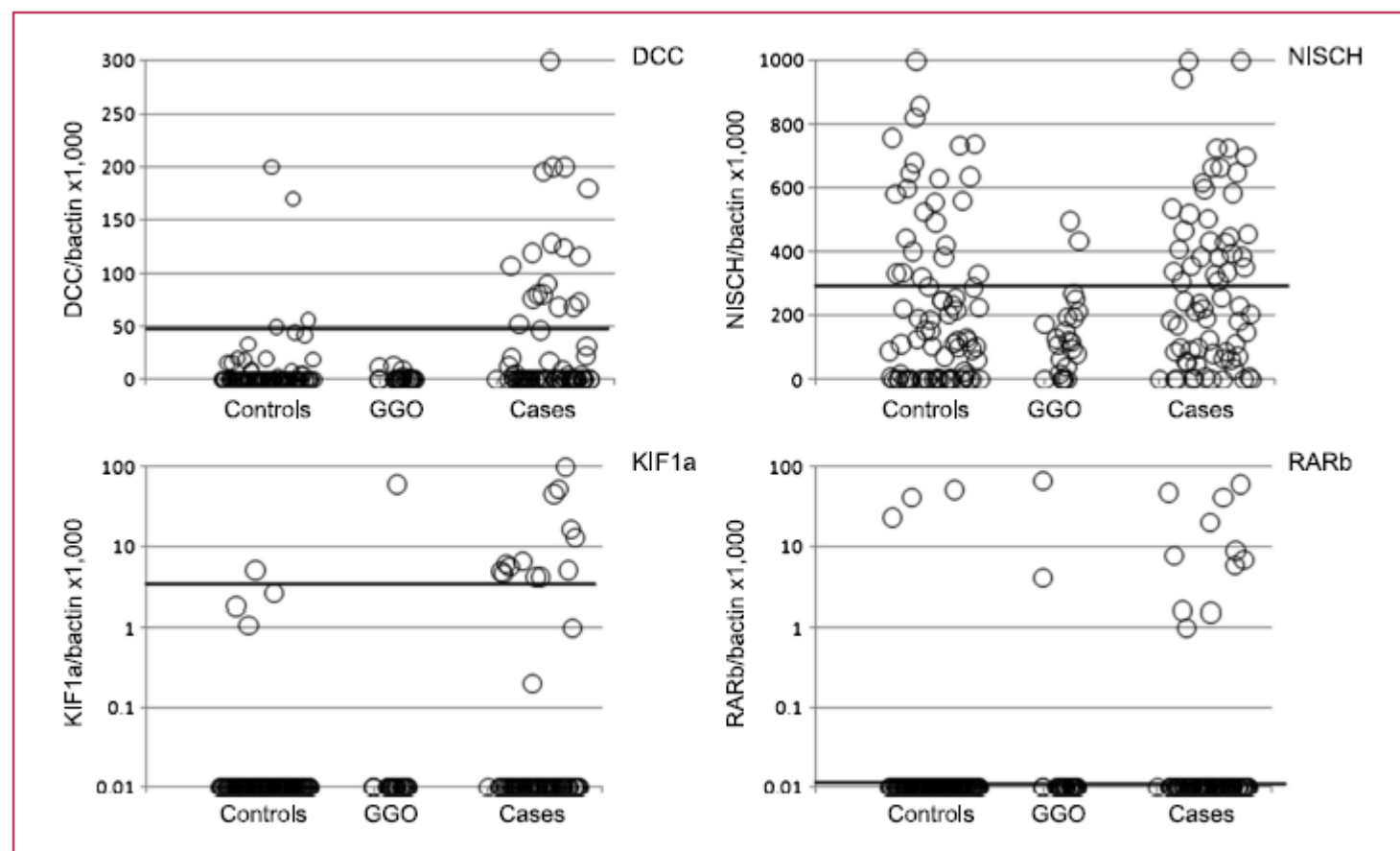


Fig. 1. Scatter plots of quantitative fluorogenic real-time PCR analysis of candidate gene promoters *Kif1a*, *DCC*, *RARb*, and *NISCH*. The samples were categorized as unmethylated or methylated based on detection of methylation above a threshold set for each gene (horizontal bar).

Table 4. Methylation of genes in independent set

Gene	Frequency of positivity			P	Cutoff	AUC (95% confidence interval)	Sensitivity %	Specificity %
	Controls	GGO	Cancers					
KIF1A	1 of 80	1 of 23	13 of 70	$P = 0.0003$	2.6	0.583 (0.5-0.662)	18	98.8
DCC	4 of 80	0 of 23	19 of 70	$P = 0.0002$	44	0.603 (0.521-0.681)	26.4	95
RARB	3 of 80	2 of 23	11 of 70	$P = 0.02$	0	0.556 (0.47-0.636)	16	96.3
NISCH	20 of 80	2 of 23	29 of 70	$P = 0.037$	334	0.596 (0.518-0.670)	41	75
1 of 4 genes	23 of 80	5 of 23	51 of 70	$P = 0.0001$		0.64	73	71

NOTE: The plasma samples from the independent set were tested for the methylation of RarB, NISCH, KIF1a, and DCC. Significant differences in methylation were detected between cancerous tumors and controls. Differences in methylation were also detected between cancerous tumors and noncancerous abnormal CT findings (GGOs).

Table 5. Methylation sensitivity and specificity for multiple markers

Gene	Frequency of positivity		P	AUC	Sensitivity %	Specificity %
	Controls	Cancers				
KIF1A, DCC, RARb, NISCH	23 of 80	51 of 70	0	0.64	73	71
DCC, RARb, NISCH	22 of 80	47 of 70	0	0.57	67	73
Kif1A, NISCH, RARb	24 of 80	43 of 70	0	0.64	62	70
Kif1A, DCC, NISCH	22 of 80	46 of 70	0	0.57	68	73
KIF1A, DCC, RARb	6 of 80	30 of 70	0	0.6	43	93
DCC, NISCH	20 of 80	40 of 70	0	0.61	57	75
KIF1a, NISCH	21 of 80	38 of 70	0	0.61	54	74
RARB, NISCH	23 of 80	37 of 70	0	0.6	28	71
KIF1A, DCC	7 of 80	26 of 70	0	0.62	37	91
DCC, RARB	6 of 80	24 of 70	0	0.59	34	93
KIF1a, RARB	4 of 80	19 of 70	0	0.76	27	95

NOTE: ROCs were established for multiple markers. All four markers used in combination had the greatest sensitivity and specificity.

Μεθυλίωση στο cfDNA ως βιοδείκτης

Cancer type	Diagnostic	Prognostic	Ref.
Breast	Van der Auwera <i>et al.</i> (2009) Sharma <i>et al.</i> (2010) Sharma <i>et al.</i> (2010) Radpour <i>et al.</i> (2011) Yamamoto <i>et al.</i> (2011) Lee <i>et al.</i> (2012) Sturgeon <i>et al.</i> (2012) Kloten <i>et al.</i> (2013) Chimonidou <i>et al.</i> (2013) Chimonidou <i>et al.</i> (2013)	Sharma <i>et al.</i> (2010) Mirza <i>et al.</i> (2010) Matuschek <i>et al.</i> (2010) Gobel <i>et al.</i> (2011) Fujita <i>et al.</i> (2012)	[157,158] [158,167] [159,168] [160,169] [161,170] [162] [163] [164] [165] [166]
Colorectal	Grutzmann <i>et al.</i> (2008) deVos <i>et al.</i> (2009) Li <i>et al.</i> (2009) Lange <i>et al.</i> (2012) Hibi <i>et al.</i> (2012) Church <i>et al.</i> (2013)	deVos <i>et al.</i> (2009) Li <i>et al.</i> (2009) Philipp <i>et al.</i> (2012)	[171,172] [172,173] [173,177] [174] [175] [176]
Cervical	Adebukadeer <i>et al.</i> (2012)		[178]
Gastric	[†] Zhai <i>et al.</i> (2012)		
HCC	Chan <i>et al.</i> (2008)	Balgkouranidou <i>et al.</i> (2013)	[108,179]
Liver	Sun <i>et al.</i> (2013)	Chan <i>et al.</i> (2008)	[60]
Lung	Lee <i>et al.</i> (2012)	Sun <i>et al.</i> (2013)	[180]
Melanoma	Salvianti <i>et al.</i> (2012) Lo Nigro <i>et al.</i> (2013)	Vinayanuwattikun <i>et al.</i> (2013)	[181,182]
Renal	de Martino <i>et al.</i> (2012)	Hoshimoto <i>et al.</i> (2012)	[111,103] [183]
Prostate	Ellinger <i>et al.</i> (2008) Sunami <i>et al.</i> (2009) Schwarzenbach <i>et al.</i> (2011) Dumache <i>et al.</i> (2012)		[184] [185]
Ovary	Bondurant <i>et al.</i> (2011) Zhang <i>et al.</i> (2013)		[110] [186] [187]

[†]Article involving genome-wide or whole-genome analysis.

Μεθυλίωση cfDNA ως προγνωστικός δείκτης

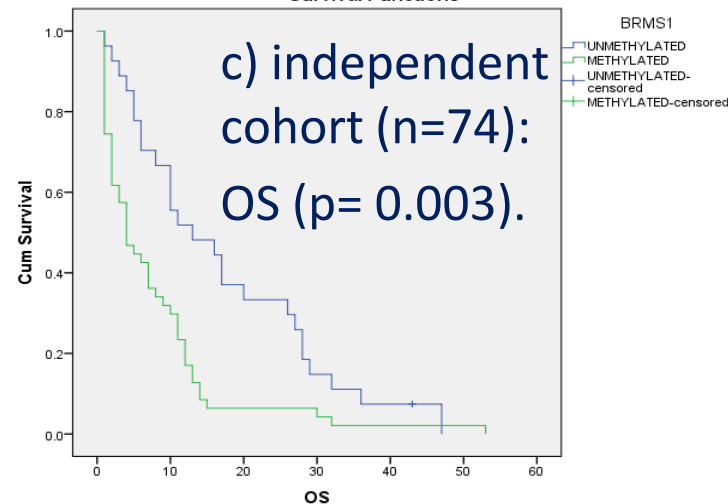
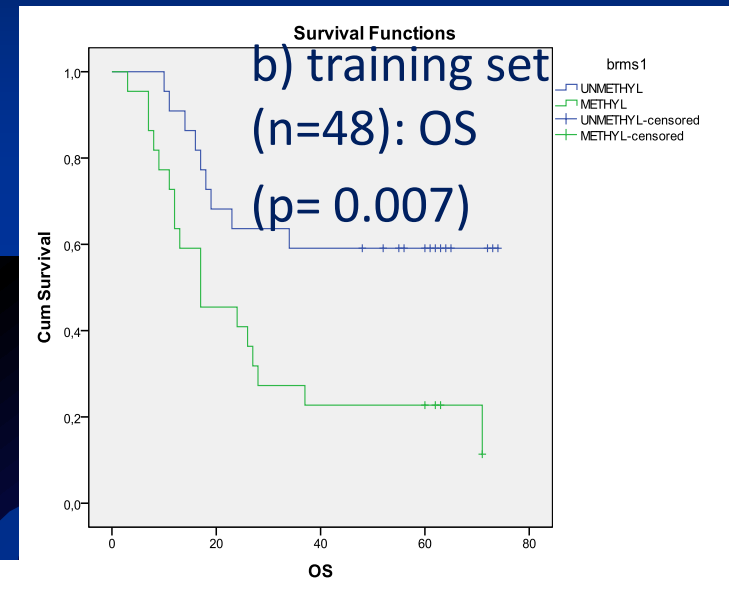
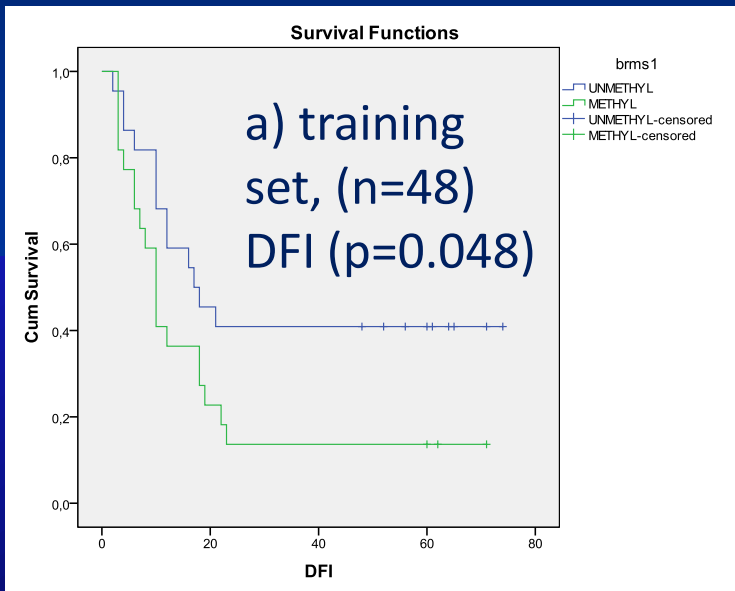
Br J Cancer. 2014 Apr 15;110(8):2054-62. doi: 10.1038/bjc.2014.104. Epub 2014 Mar 18.

Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer.

Balgkouranidou I¹, Chimonidou M², Milaki G³, Tsarouxa EG⁴, Kakolyris S⁵, Welch DR⁶, Georgoulas V³, Lianidou ES².

- ✓ Ο υποκινητής του **BRMS1** ήταν μεθυλιωμένος στους ιστούς ασθενών με NSCLC σε ποσοστό 59,6% και 47,9% στο cfDNA αλλά όχι σε υγιή άτομα (0%)
- ✓ Σύμφωνα με τις καμπύλες Kaplan-Meier, η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου στο cfDNA συνδέεται με μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα (DFI) ($P = 0.048$) και μικρότερη συνολική επιβίωση (OS) ($P = 0.007$)
- ✓ Σε προχωρημένο NSCLC, η OS ήταν σημαντικά διαφορετική υπέρ των ασθενών με μη-μεθυλιωμένο υποκινητή **BRMS1** στο cfDNA ($P = 0.003$)
- ✓ Η μεθυλίωση του υποκινητή **BRMS1** σε cfDNA που απομονώνεται από το πλάσμα ασθενών με NSCLC παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες που πρέπει να αξιολογηθούν περαιτέρω ως κυκλοφορούν νεοπλασματικός βιοδείκτης

Μεθυλίωση cfDNA ως προγνωστικός δείκτης



**Is there any correlation between
CTC and cell free DNA???**

Journal Club

Clinical Chemistry



AACC

SOX17 Promoter Methylation in Circulating Tumor Cells and Matched Cell-Free DNA Isolated from Plasma of Patients with Breast Cancer

M. Chimonidou, A. Strati, N. Malamos, V. Georgoulas, and E.S. Lianidou

January 2013

www.clinchem.org/content/59/1/270.full

© Copyright 2013 by the American Association for Clinical Chemistry

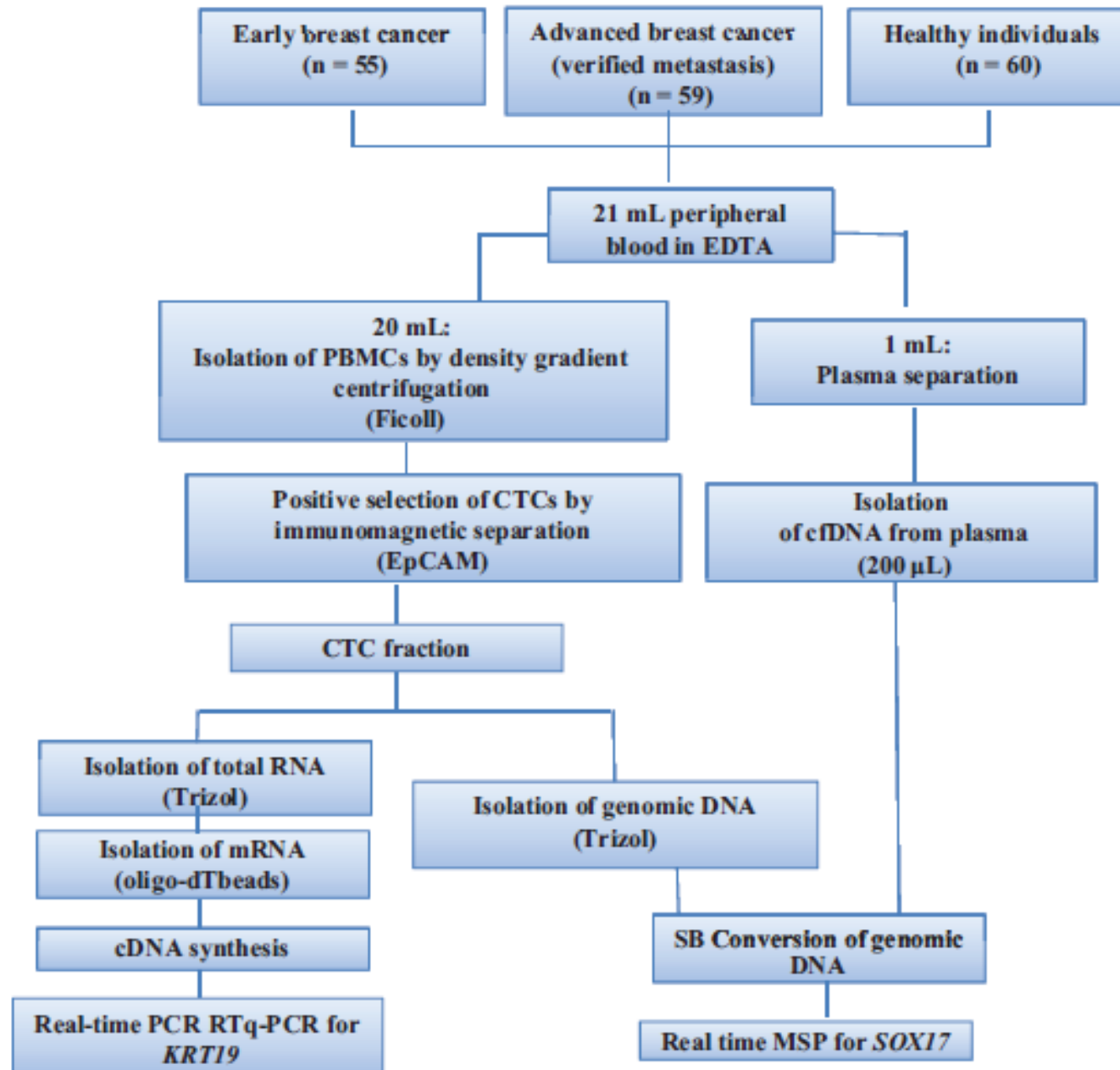
Question:

Is there a direct connection between the presence of CTCs and cell free DNA in patients with operable breast cancer where the primary tumor has already been resected?

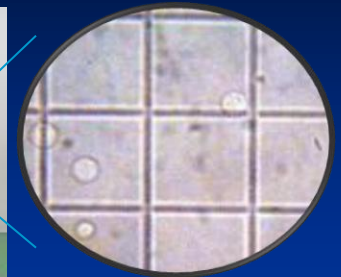
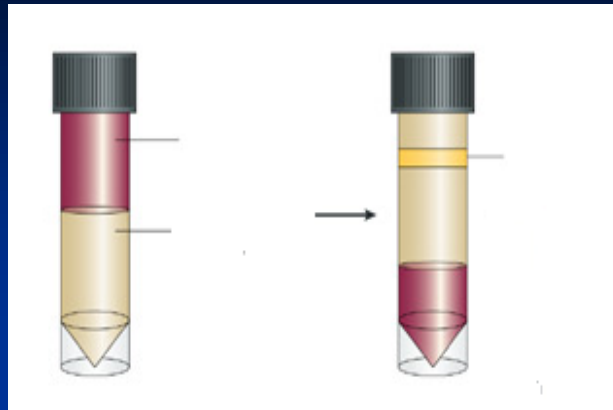
To address this question, we have chosen to use the same marker and the same methodology in matched clinical samples.

We evaluated whether *SOX17* promoter methylation in CTCs was associated with the methylation pattern of this gene in matched cfDNA isolated from plasma of patients with breast cancer.

Workflow of the study



Methodology



Cell count



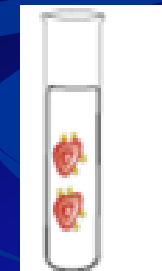
CTCs
isolation

CellFreeDNA
isolation

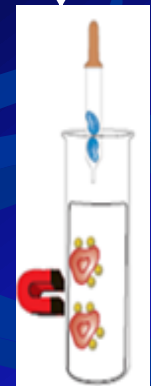
Plasma



DNA
extraction
From CTCs



Positive
selection
(EpCAM)

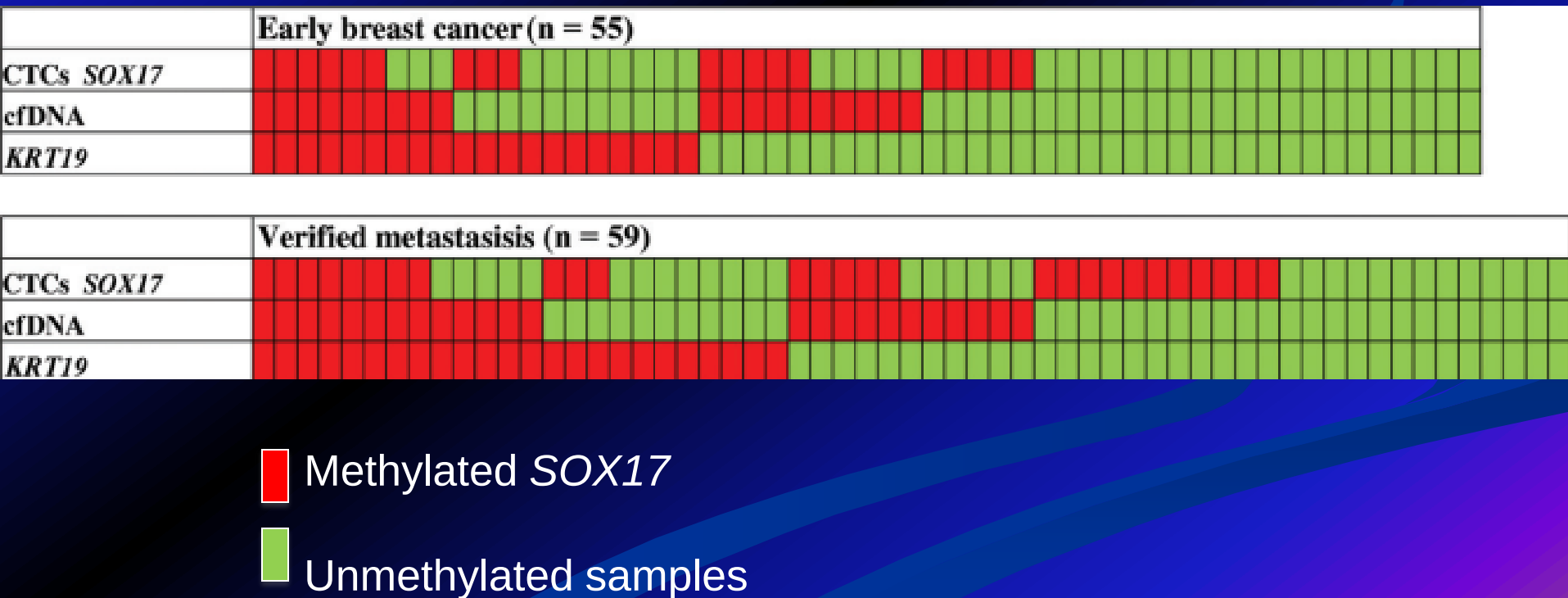


Apply magnet

Outline of the extraction of cell free DNA and CTCs.

RESULTS

Heat map of SOX17 promoter methylation in matched samples:
CTCs Fraction and cfDNA of patients with: (a) operable breast cancer (n=55), (b) verified metastasis (n=59)
In parallel, the expression of the epithelial marker CK-19 is shown in CTCs fraction



DNA methylation and cancer - Conclusions

- DNA methylation has critical roles in the control of gene activity and the architecture of the nucleus of the cell.
- In humans, DNA methylation occurs in cytosines that precede guanines; these are called dinucleotide CpGs.
- CpG sites are not randomly distributed in the genome; instead, there are CpG-rich regions known as CpG islands which span the 5' end of the regulatory region of many genes.
- These islands are usually not methylated in normal cells.
- The methylation of particular subgroups of promoter CpG islands can, however, be detected in normal tissues.

DNA methylation and cancer - Conclusions

- Methylation of tumor suppressor gene promoters plays an important role in the clinical behavior of breast tumors.

DNA hypermethylation markers are under study as complementary diagnostic tools, prognostic factors, and predictors of responses to treatment .

Analysis of hypermethylation of the CpG island has potential diagnostic applicability for carriers of high-penetrance mutations in tumor-suppressor genes.

Hypermethylation of a tumor-suppressor gene and DNA hypermethylation profiles can be indicators of the prognosis in patients with cancer

The hypermethylation of particular genes is potentially a predictor of the response to treatment.

DNA methylation and cancer - Conclusions

- Unlike mutations, DNA methylation and histone modifications are reversible.
- Epigenetic alterations allow the cancer cell to adapt to changes in its microenvironment, but dormant, hypermethylated tumor-suppressor genes can be awakened with drugs.
- It is possible to re-express DNA methylated genes in cancer cell lines by using demethylating agents and to rescue their functionality.
- DNA demethylating drugs in low doses have clinical activity against some tumors.

Ευχαριστώ πολύ!

