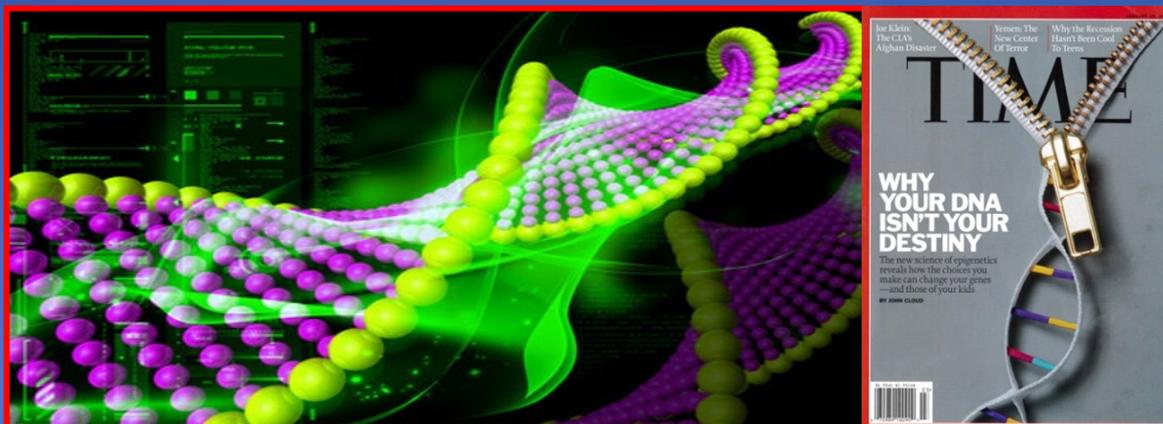




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

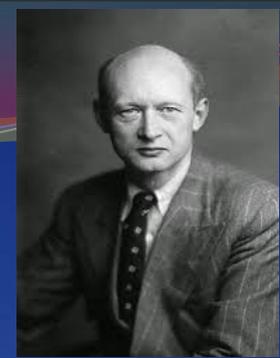
Επίδραση της Διατροφής στους Επιγενετικούς Μηχανισμούς

Ο ρόλος τους στην ανάπτυξη και θεραπευτική στόχευση διαφόρων
τύπου καρκίνου

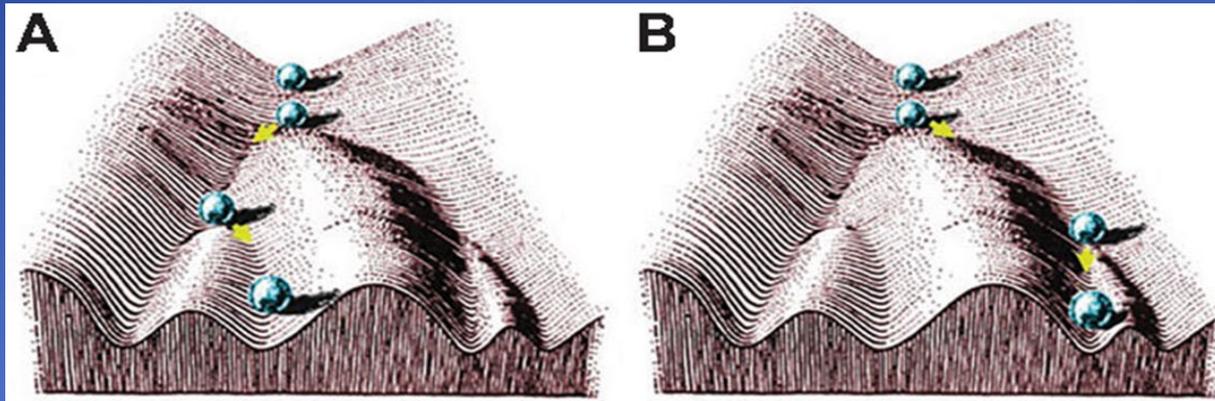


Χριστίνα Πιπέρη
Καθηγήτρια Βιοχημείας
cpiperi@med.uoa.gr

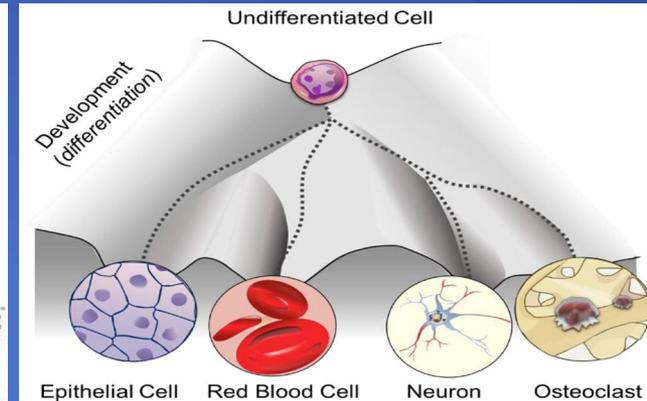
Επιγενετική



- Η εξέλιξη της γενετικής, 'επί' της 'γενετικής'
- Κλάδος της Βιολογίας που μελετά τις αιτιώδεις **αλληλεπιδράσεις** μεταξύ των γονιδίων και των προϊόντων τους, χάρη στις οποίες διαμορφώνεται ο φαινότυπος
- 1942 Conrad H. Waddington: η διαμόρφωση του **φαινοτύπου**, δηλαδή οι μορφολογικές και λειτουργικές ιδιότητες ενός οργανισμού, καθορίζονται από το γονιδίωμα υπό την **επήρεια του περιβάλλοντος**



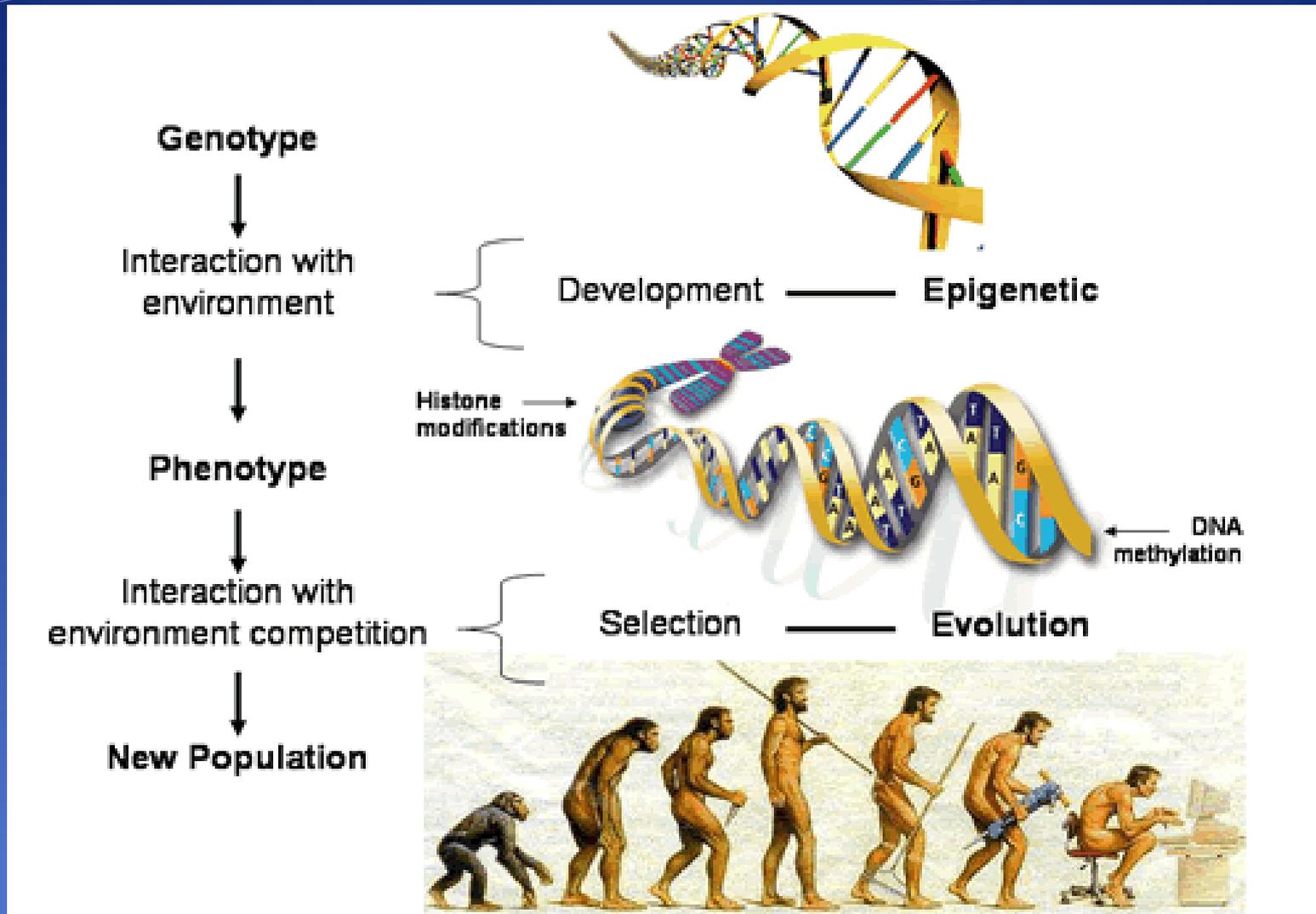
Conrad Waddington's epigenetic landscape



Μοντέλο κυτταρικής διαφοροποίησης

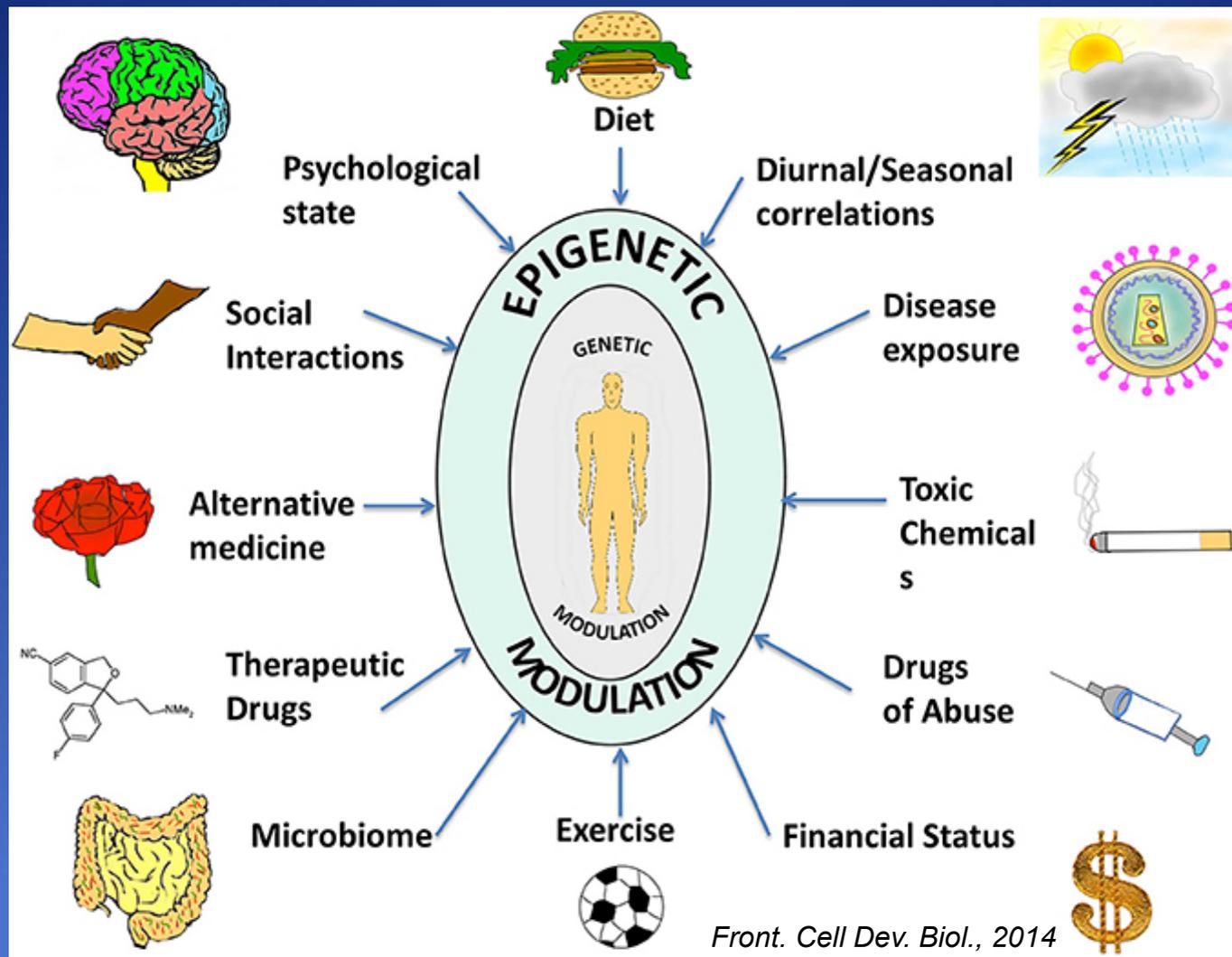
Waddington, C. H. *The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology.* London: George Allen & Unwin, Ltd., (1957).

Επιγενετική: η γέφυρα μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου



- Το **επιγονιδίωμα** αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα του οργανισμού να εξελιχθεί σε συνάρτηση με το **περιβάλλον**

Περιβαλλοντικοί παράγοντες με επιγενετική δράση



- Η **επιγενετική**, όπως και η γενετική πληροφορία, **κληρονομείται**, αλλά σε αντίθεση με τη γενετική πληροφορία, **είναι αναστρέψιμη** (επιγενετική πλαστικότητα) και δύναται να επηρεαστεί από διάφορα ερεθίσματα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες

Επιγονιδίωμα (Epigenome)

Το σύνολο των χημικών τροποποιήσεων στο DNA και στη χρωματίνη που αλλάζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να επηρεάζουν την πρωτογενή αλληλουχία του DNA

-Τροποποιούν το τελικό προϊόν του γονιδίου, παρέχοντας ένα είδος μεταγραφικού ελέγχου (γονιδιακή ρύθμιση)

-Προκαλούν μια ημιμόνιμη αποσιώπηση περιοχών του γονιδιώματος ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων, κληροδοτούνται στον απόγονο που προκύπτει από κυτταρική διαίρεση

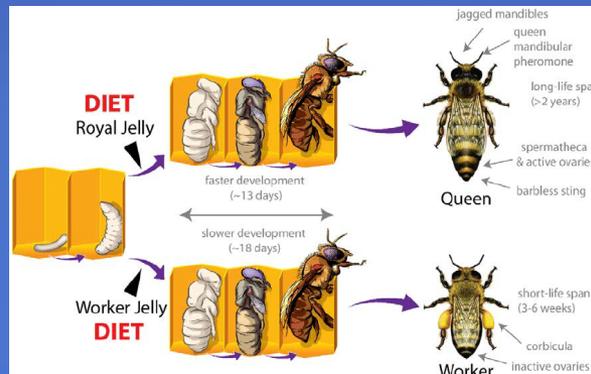
-Απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (κυτ. διαφοροποίηση, φαινοτυπικές διαφορές, αποσιώπηση χρωμοσώματος X, γονιδιωματικό εντύπωμα)



Ίδιο DNA αλλά διαφορετικό επιγονιδίωμα



Μονοζυγωτικά δίδυμα



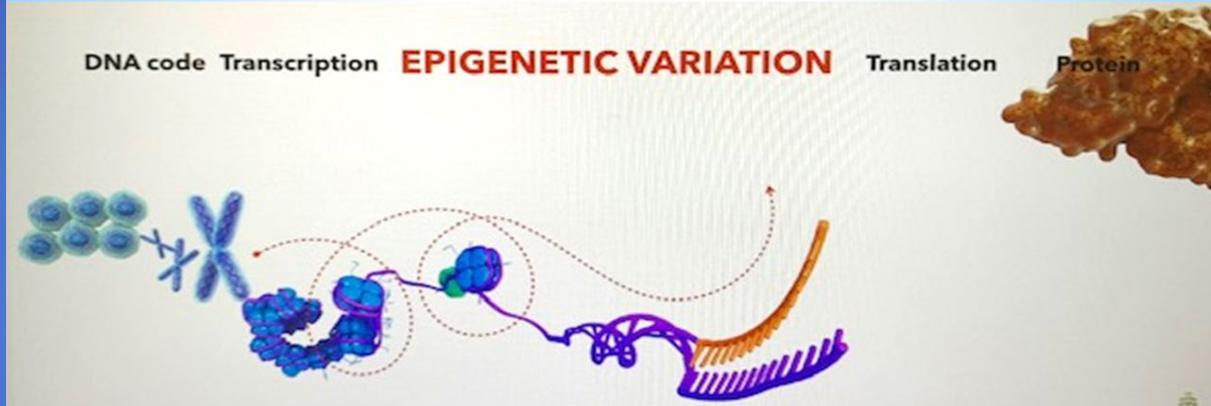
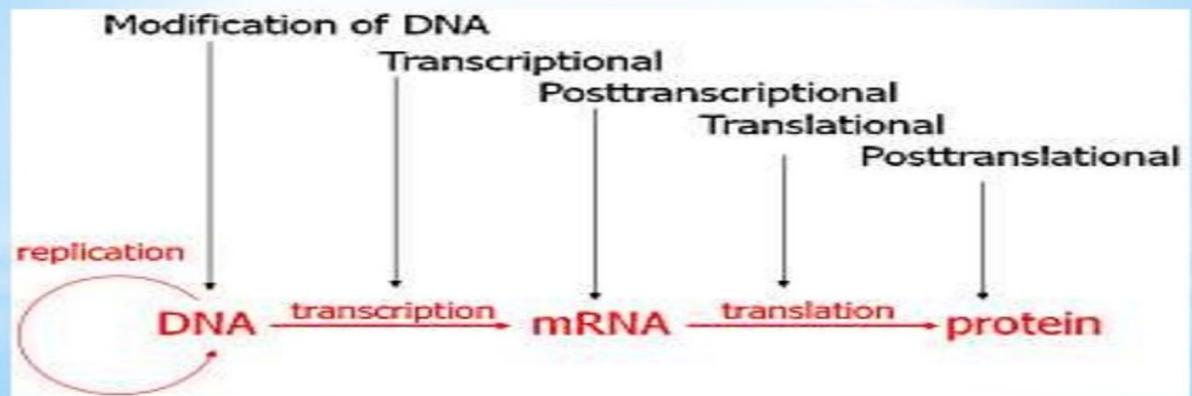
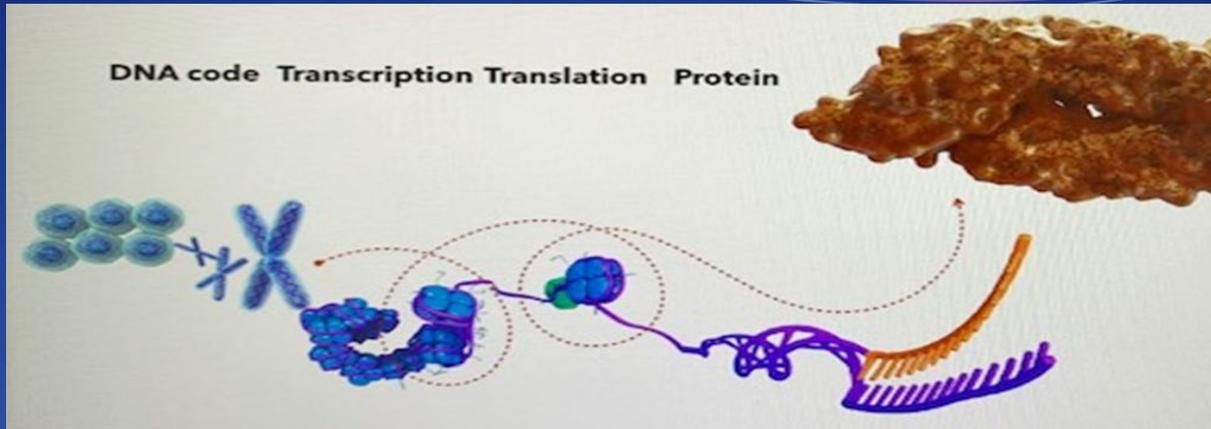
Βασίλισσες-εργάτες μέλισσες



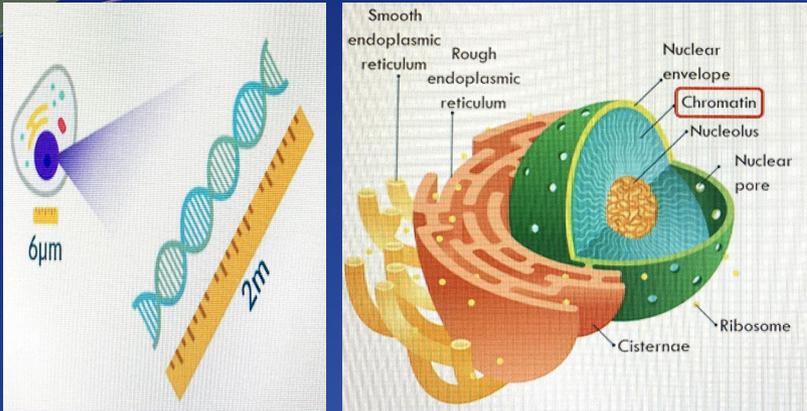
Κάμπιες - πεταλούδες

Κεντρικό δόγμα

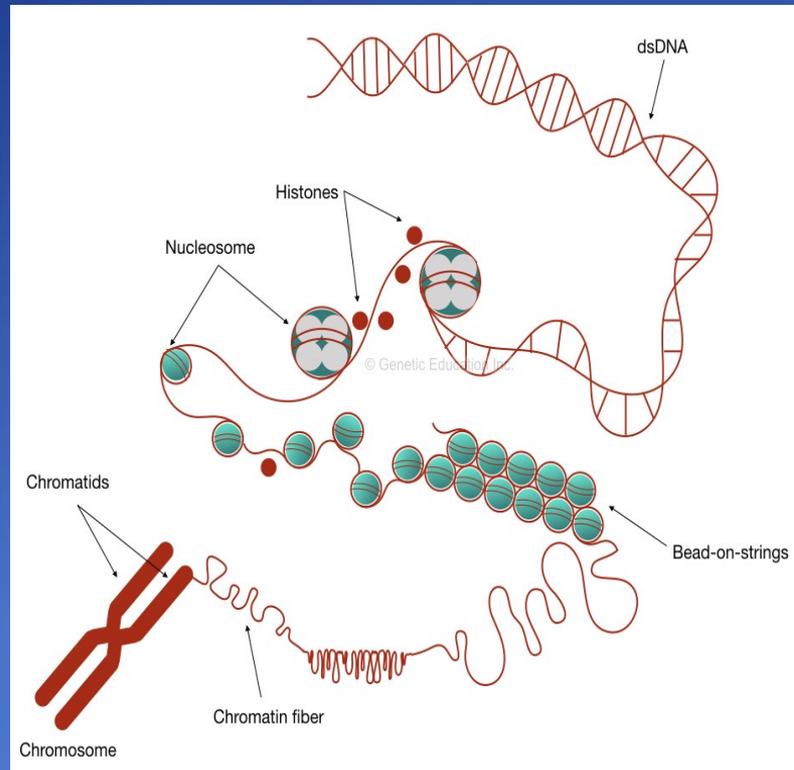
Η ροή της γενετικής πληροφορίας από τα νουκλεϊκά οξέα στην πρωτεΐνη



Συσκευασία DNA στον πυρήνα – ο ρόλος της χρωματίνης

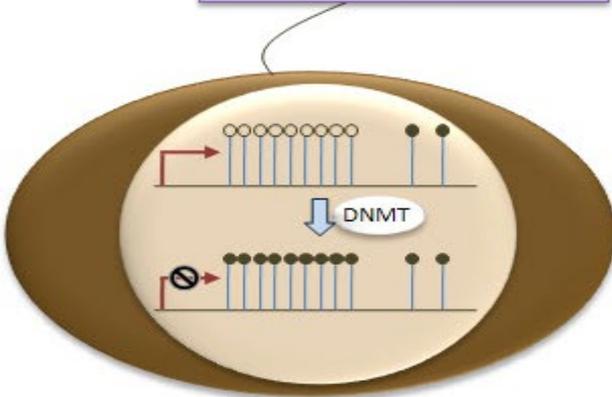


- Η συμπύκνωση της χρωματίνης οργανώνει δομικά το DNA μέσα στον πυρήνα
- Το DNA περιέλλεται γύρω από τα **νουκλεοσώματα**
- Τα νουκλεοσώματα αποτελούνται από πρωτεΐνες, τις **ιστόνες**
- Το αρνητικά φορτισμένο DNA αλληλοεπιδρά με τις θετικά φορτισμένες ιστούνες
- Η δομή της χρωματίνης είναι ιεραρχική ξεκινά από την **ίνα χρωματίνης των 30 nm** και καταλήγει στα **μεταφασικά χρωμοσώματα** (τη πιο συμπαγή μορφή χρωματίνης)

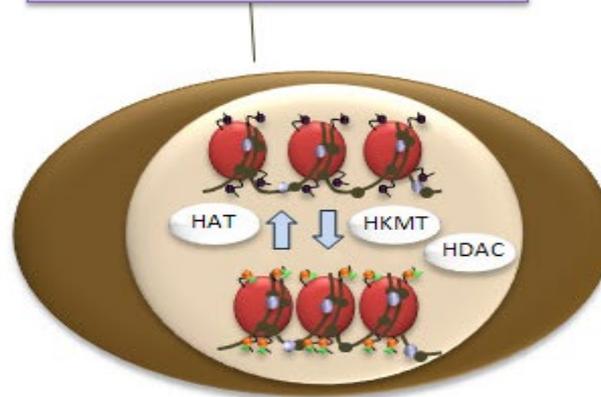


Επιγενετικοί μηχανισμοί

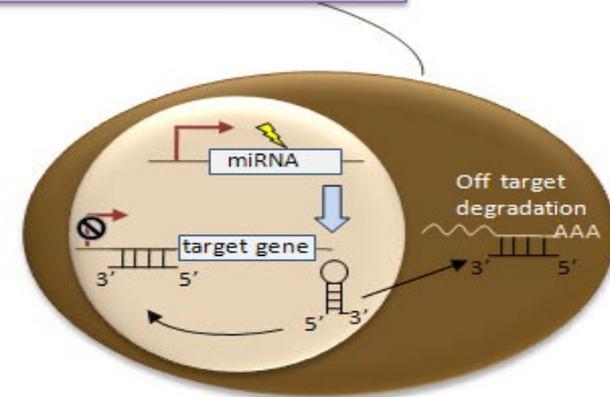
DNA methylation



Histone modifications



miRNAs



Μεθυλίωση του DNA

- Υπερμεθυλίωση (προσθήκη μεθυλομάδων)
- Υπομεθυλίωση (αφαίρεση μεθυλομάδων από φυσ. μεθυλ-κυτοσίνες στο DNA)

Τροποποιήσεις ιστονών

Μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουτίνωση, γλυκοζυλίωση, ADP-ριβοσυλίωση, σουμυιλίωση αμινοξέων (K, S, T, R)

Μη-κωδικοποιημένα RNA (Non-coding RNA (ncRNAs))

Ρύθμιση της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής έκφρασης μέσω πρόσδεσης

I. Μεθυλίωση του DNA

- Προσθήκη μεθυλομάδων σε βάσεις κυτοσίνης C

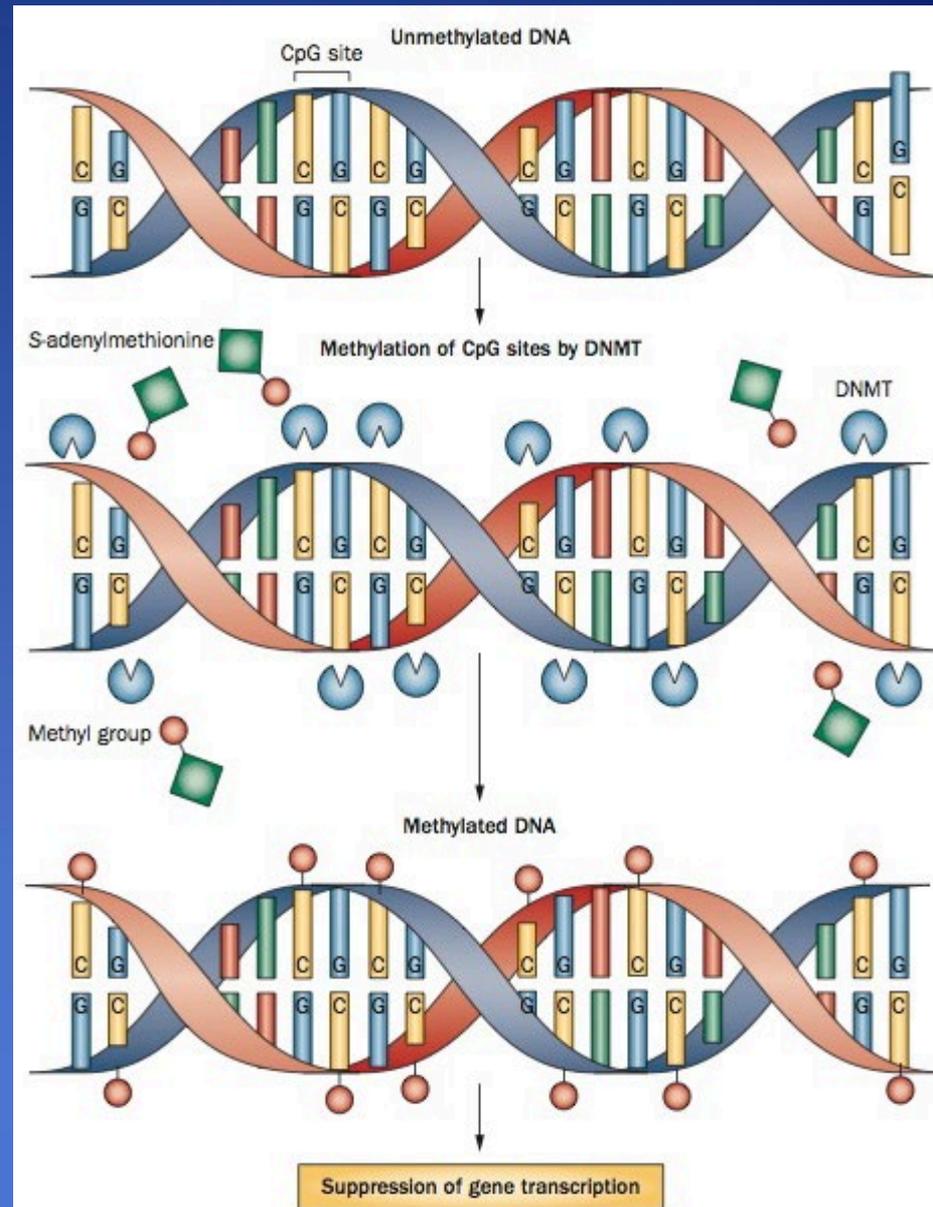
- Πρότυπο μεθυλίωσης: δεν είναι τυχαίο, αλληλουχίες 5'-CG-3' (νησίδια CpG)

- DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs)

Dnmt1: μεθυλίωση διατήρησης

Dnmt3a: *de novo* μεθυλίωση

Dnmt3b: *de novo* μεθυλίωση



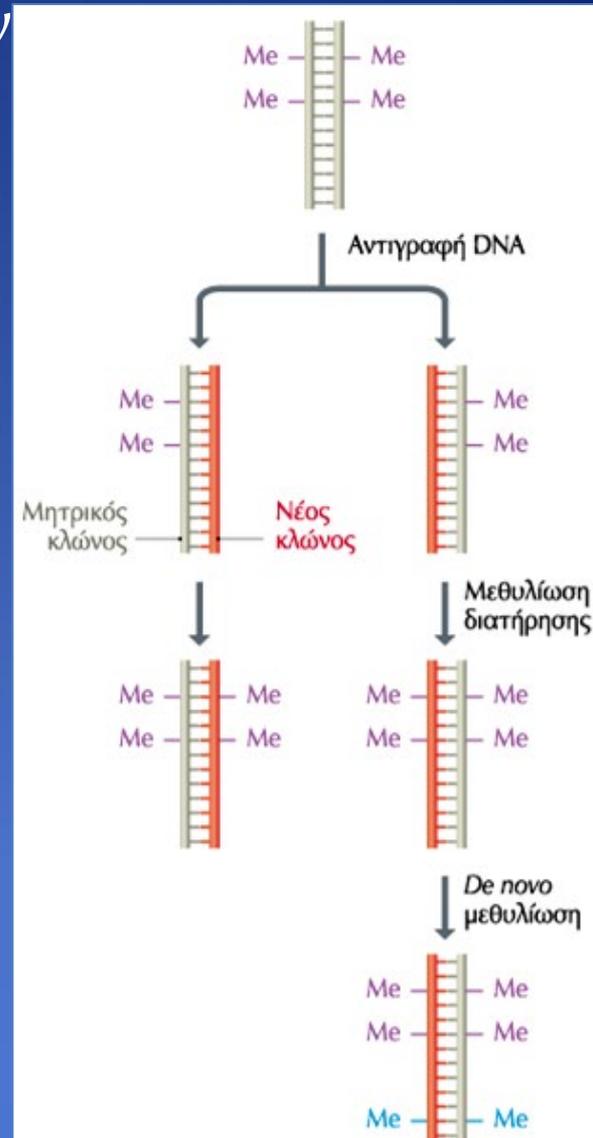
Τύποι Μεθυλίωσης του DNA

Μεθυλίωση διατήρησης: προσθήκη μεθυλομάδων στο νεοσυντεθημένο κλώνο DNA απέναντι από τις μεθυλιωμένες θέσεις στο μητρικό κλώνο

- διαδραματίζεται μετά την αντιγραφή του γονιδιώματος
- τα 2 θυγατρικά μόρια DNA διατηρούν το πρότυπο μεθυλίωσης του μητρικού μορίου
- κληρονομείται μετά τη κυτταρική διαίρεση

De novo μεθυλίωση: προσθήκη μεθυλομάδων σε εντελώς νέες θέσεις

- αλλαγή προτύπου μεθυλίωσης σε μια εντοπισμένη περιοχή του γονιδιώματος

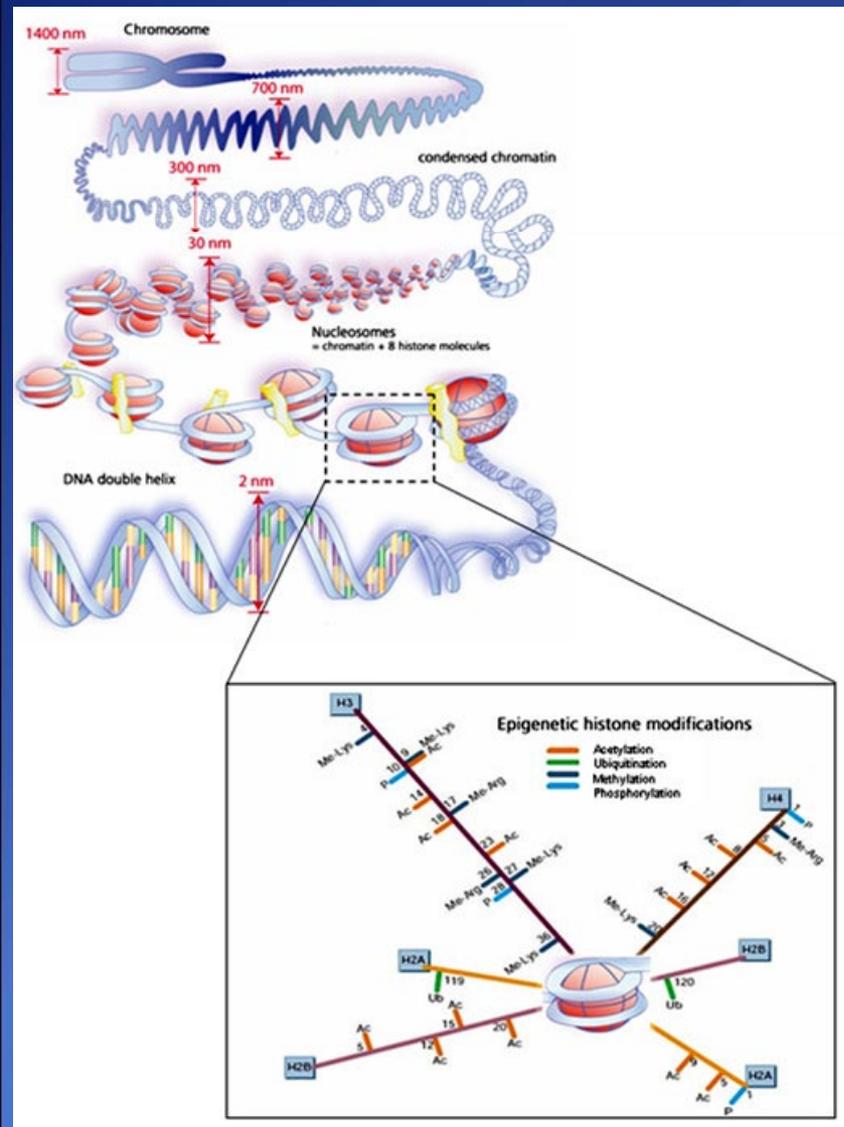


II. Χημικές τροποποιήσεις ιστονών – Επίδραση στη συσκευασία της χρωματίνης

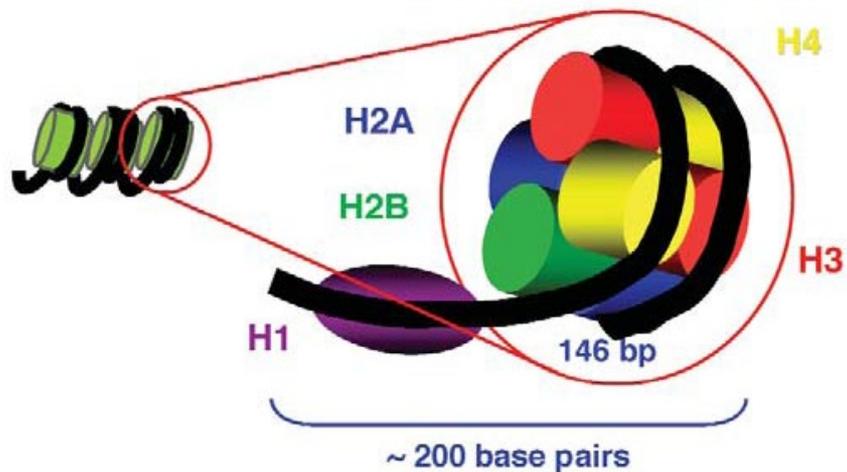
• Δυο τρόποι επιρροής της δομής της χρωματίνης στην έκφραση του γονιδιώματος:

1. Ο βαθμός συσκευασίας της χρωματίνης ενός χρωμοσωμικού τμήματος καθορίζει αν θα εκφραστούν τα γονίδια που περιέχει, και επηρεάζεται από χημικές τροποποιήσεις ιστονών

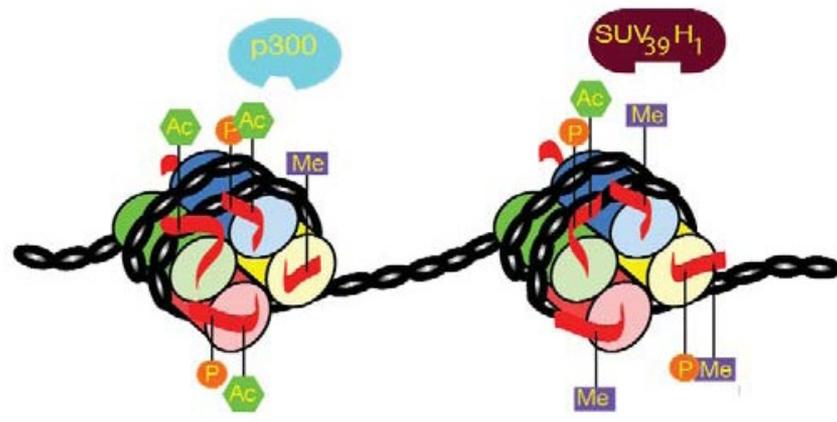
2. Αν ένα γονίδιο είναι προσπελάσιμο, η μεταγραφή του επηρεάζεται από την ακριβή φύση και τοποθέτηση των νουκλεοσωματίων στη περιοχή όπου θα συναρμολογηθεί το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής



Ρύθμιση νουκλεοσωματίου μέσω χημικών τροποποιήσεων των ιστονών

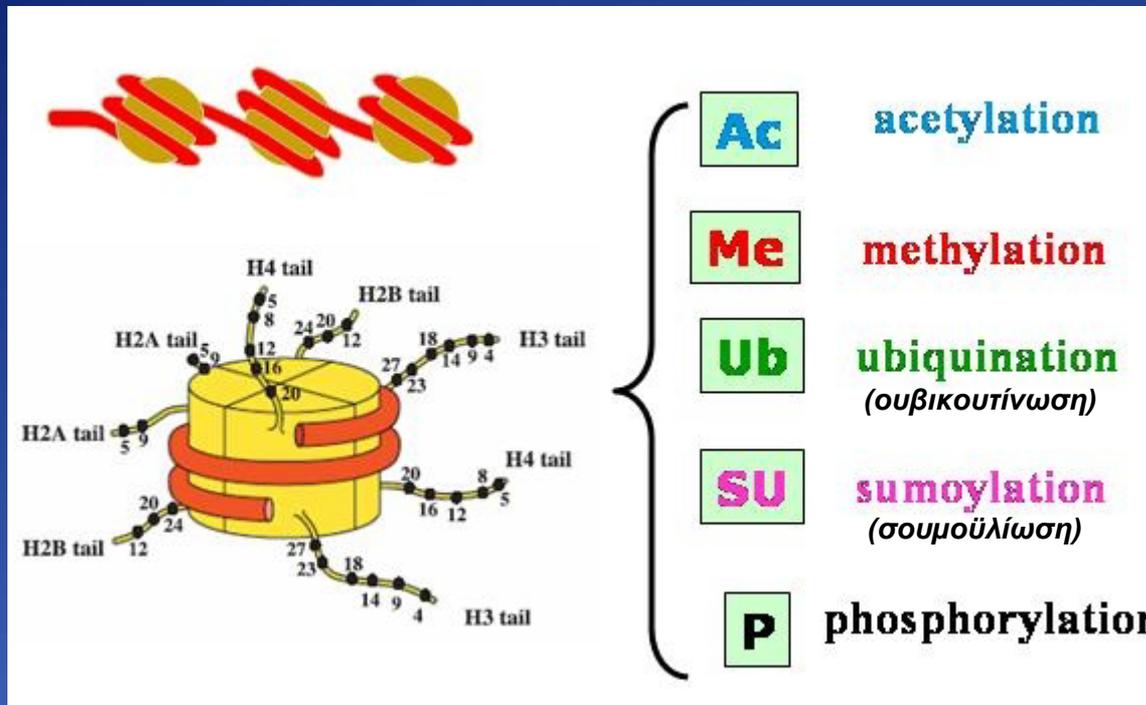


Τα νουκλεοσωμάτια αποτελούνται από **8 πυρηνικές ιστόνες** (2x H2A, H2B, H3, H4) **H1: συνδετική ιστόνη**, βοηθά στην περιέλιξη



Τα **N-άκρα** των ιστονών **H3 και H4** αποτελούν στόχο μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων (Ακ., Μεθ., Φωσφ.) επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση DNA και ιστονών

Χημικές τροποποιήσεις των ιστονών



Function regulated

Transcription, Repair, Replication, Condensation

Transcription, Repair

Transcription, Repair

Transcription

Transcription, Repair, Condensation

- Απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (κυτ. διαφοροποίηση, ανάπτυξη εμβρύου, απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, γονιδιακή αποτύπωση)
- Δυνητικά αναστρέψιμες

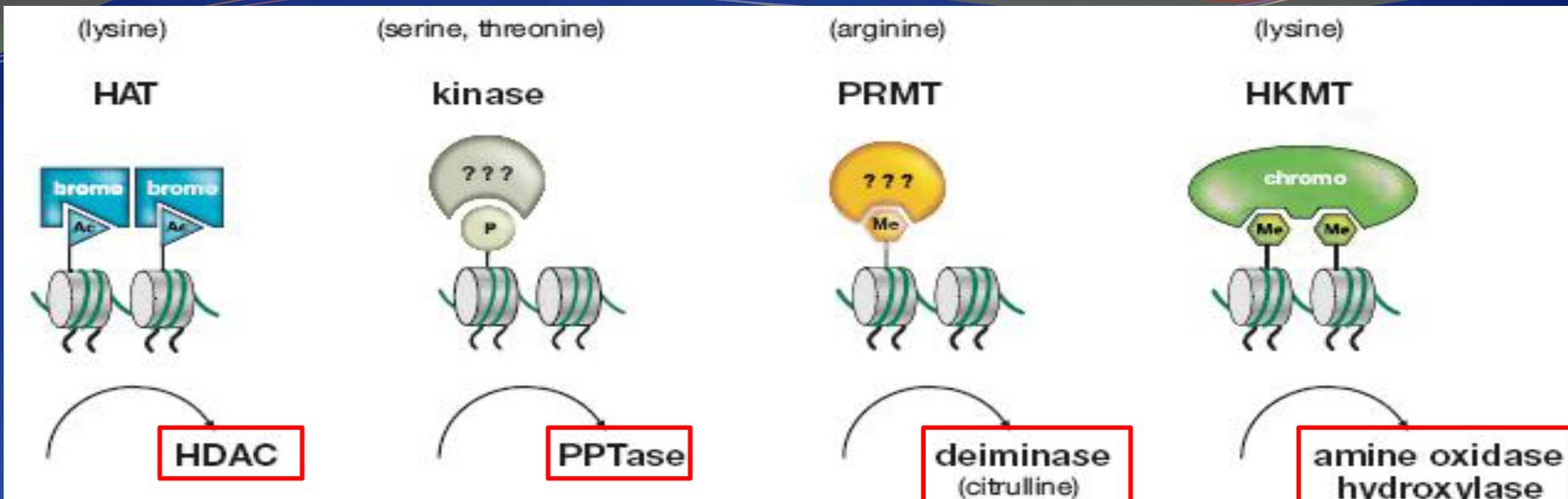
Θέσεις χημικής τροποποίησης των ιστονών – γονιδιακή ρύθμιση



Ενεργοποίηση μεταγραφής: ακετυλίωση, μεθυλίωση αργινίνης, μερική μεθυλίωση λυσινών (H₃K₄ and H₃K₃₆)

Αποσιώπηση/Καταστολή μεταγραφής: μεθυλίωση λυσινών (H₃K₉, H₃K₂₇, H₄K₂₀)

Ένζυμα χημικής τροποποίησης ιστονών



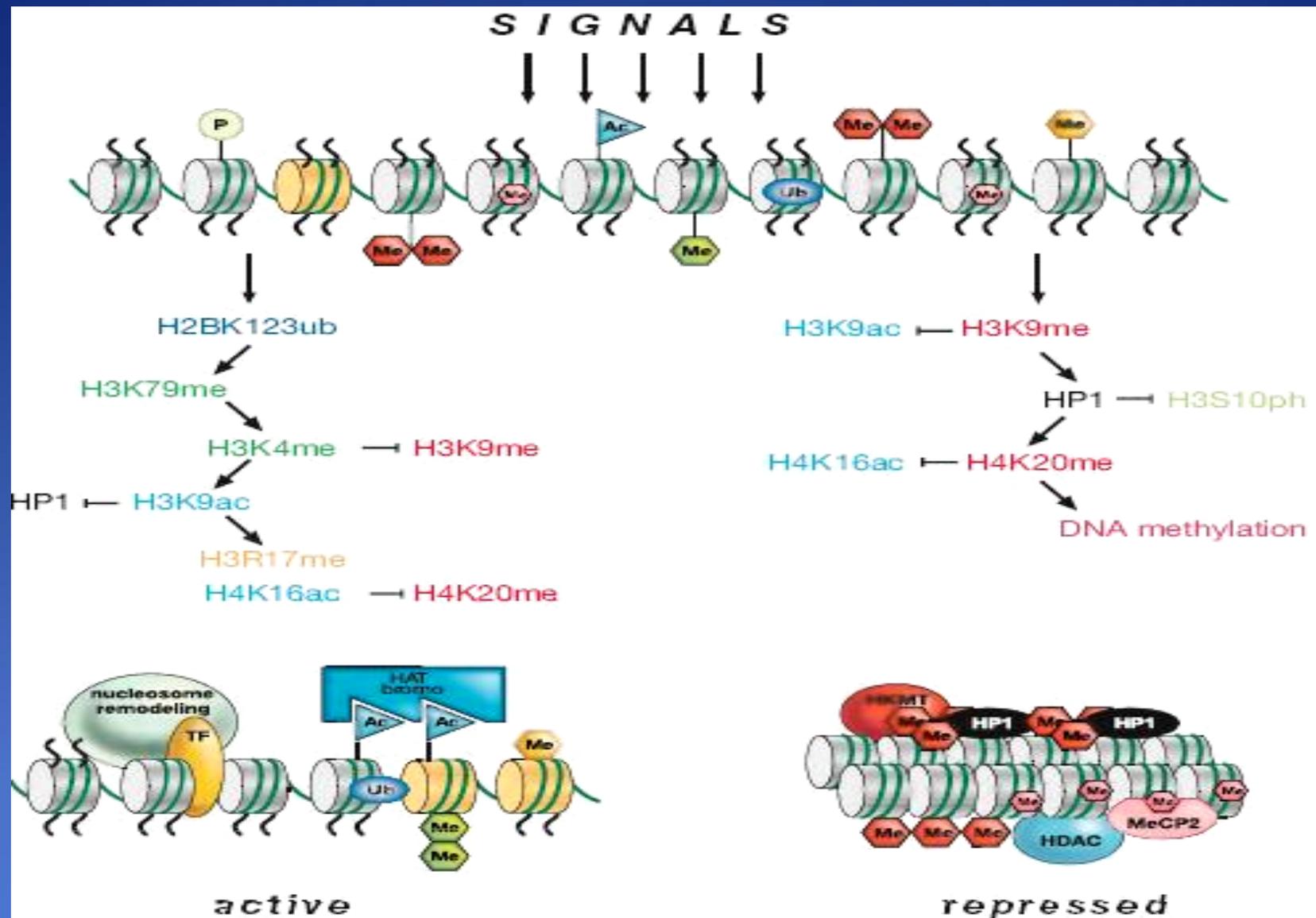
Ενζυμα τροποποίησης ιστονών

HAT: Histone acetyltransferase
Protein kinases
PRMT: protein arginine methyltransferase
HKMT: histone lysine methyltransferase

Ανταγωνιστικά ένζυμα τροποποίησης ιστονών

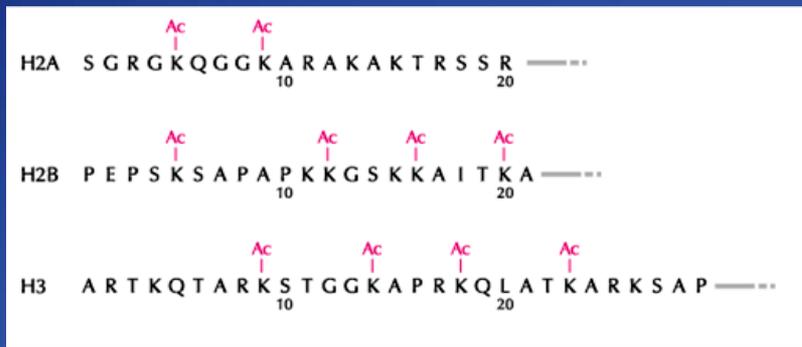
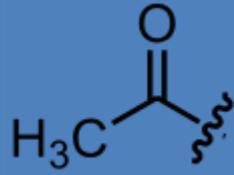
HDAC: histone deacetylase
PPTase: protein phosphatases
Deiminase
Amine oxidase hydroxylase

Συνδυασμός τροποποιήσεων στη χρωματίνη ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων

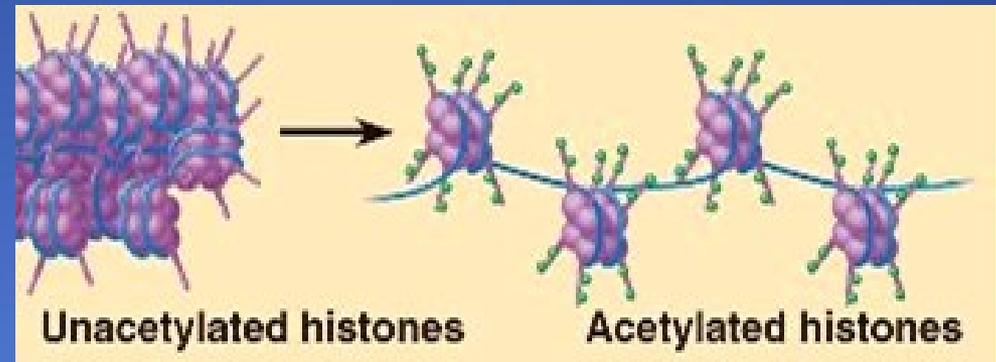


Λειτουργικές επιπτώσεις της ακετυλίωσης των Ιστονών

Ακετυλίωση: προσθήκη **ακετυλομάδων** σε κατάλοιπα λυσίνης στα **N-τελικά άκρα** -σχηματισμός **ουρών που προεξέχουν** από το πυρήνα του νουκλεοσωματίου



- Η ακετυλίωση μειώνει τη συγγένεια των ιστονών για το DNA, προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή



- Το 1996 ανακαλύφθηκαν οι **ακετυλοτρανσφεράσες** των ιστονών (HAT, histone acetyltransferases): τα ένζυμα που προσθέτουν ακετυλομάδες στις ιστονές



Δυο όψεις του οκταμερούς του νουκλεοσωματίου

Οι οικογένειες των ακετυλοτρανσφερασών (HAT)

- 3 διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών
- GNAT ή GCN5-σχετιζόμενες ακετυλοτρανσφεράσες (Gcn5-related N-acetyltransferases): συστατικά των SAGA, ADA, TFTC
 - ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων
 - επιδιόρθωση ορισμένων τύπων βλαβών του DNA, πχ. βλάβες που επάγονται από υπερϊώδη ακτινοβολία
- CBP/p300 (CREB-binding protein) ρυθμίζουν:
 - κυτταρική διαφοροποίηση
 - κυτταρικό πολλαπλασιασμό
 - απόπτωση
- MYST (MOZ/YBF2/SAS2/TIP60)
 - ενεργοποίηση μεταγραφής
 - επιδιόρθωση DNA
 - ενεργοποίηση κυτταρικού κύκλου

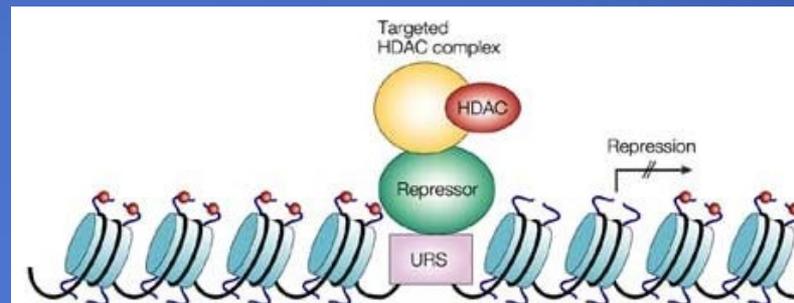
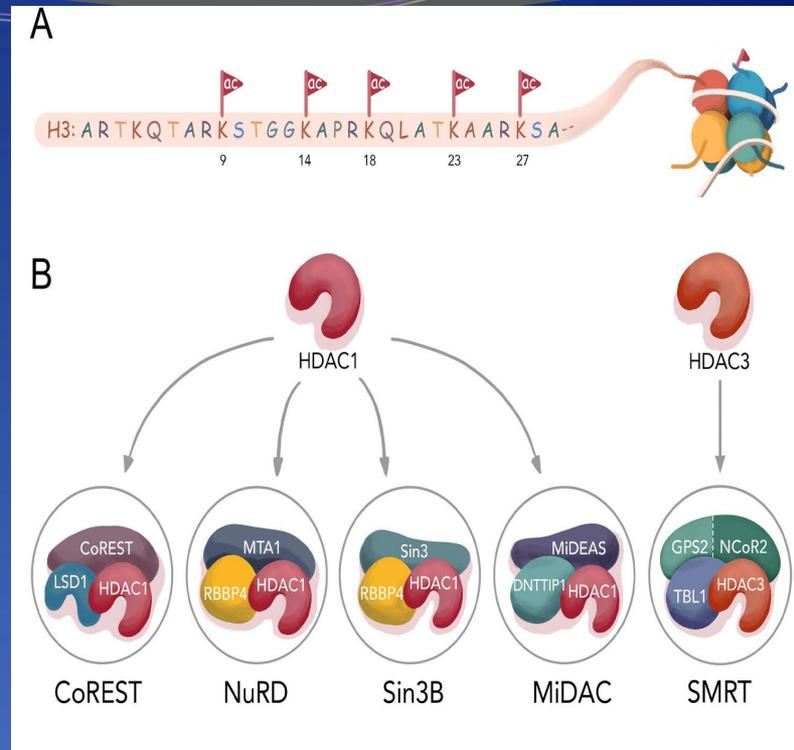
Η απακετυλίωση των ιστονών καταστέλλει ενεργές περιοχές του γονιδιώματος

- Η ακετυλίωση είναι αντιστρεπτή
- Δράση **απακετυλασών των ιστονών** (HDAC, histone deacetylases): αφαίρεση ακετυλομάδων από τις ουρές των ιστονών
- **Ενεργότητα απακετυλασών συνδέεται με αποσιώπηση γονιδίων**
- 1996: πρώτη HDAC₁ των θηλαστικών, σχετίζεται με την πρωτεΐνη της ζύμης Rpd3, αναστολέας της μεταγραφής
- 4 κατηγορίες **HDACs**:
 - Class I: HDAC_{1, 2,3,8} εντοπίζονται στον πυρήνα
 - Class II: HDAC_{4,5,6,7,9,10} (πυρήνας, κυτταρόπλασμα)
 - Class III: sirtuins (SIRT 1-7)
 - Class IV: HDAC₁₁ (χαρακτηριστικά των class I, II)Χρειάζονται Zn⁺ για καταλυτική ικανότητα (οι SIRTs χρειάζονται NAD)

Οι HDAC περιέχονται σε πολύπρωτεϊνικά σύμπλοκα:

- το σύμπλοκο **Sin3** των θηλαστικών αποτελείται από 7 πρωτεΐνες, μεταξύ άλλων την HDAC1, HDAC2 και άλλες επικουρικές που συνεισφέρουν στη ικανότητα πρόσδεσης των ιστονών. Προσδένει σε μεθυλιωμένο DNA. Εμπλέκεται στη καρκινογένεση

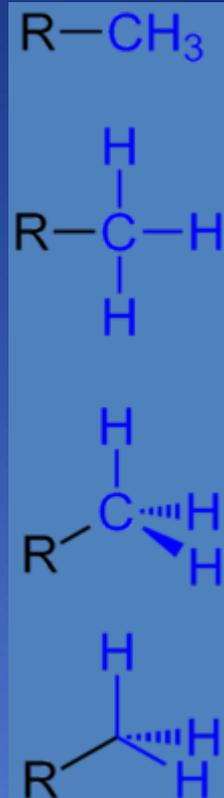
- το σύμπλοκο **NuRD** των θηλαστικών, συνδυάζει τη HDAC1, HDAC2 με διαφορετική ομάδα επικουρικών πρωτεϊνών. Προσδένει σε μεθυλιωμένο DNA. Δρα ως τυπική μηχανή αναδιοργάνωσης νουκλεοσωματίων



Μεθυλίωση ιστονών

Μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης στα N-τελικά άκρα των ιστονών H₃ και H₄.

- Μακροπρόθεσμη διαδικασία, δυνητικά αναστρέψιμη, διαμεσολαβείται από τις **μεθυλοτρανσφεράσες**
- Μεθυλίωση στις H₃K₄, H₃K₃₆, H₃K₇₉ → **ενεργοποίηση μεταγραφής**
- Μεθυλίωση στις H₃K₉, H₃K₂₇, H₃K₂₀ → **αναστολή μεταγραφής**
- Συνήθως οι **μονές μεθυλιώσεις** στις H₃K₄, H₃K₃₆, H₄K₂₀, H₃K₇₉, H₂BK₅ συνδέονται με γονιδιακή ενεργοποίηση
- Οι **τρι-μεθυλιώσεις** στις H₃K₂₇, H₃K₉, H₃K₇₉ οδηγούν σε **αναστολή της μεταγραφής**



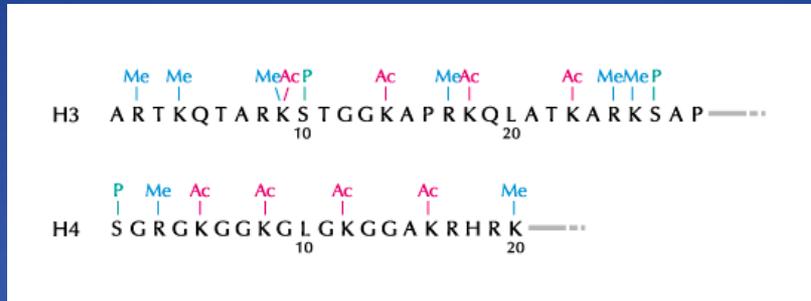
Άλλα είδη τροποποίησης των ιστονών

- **Φωσφορυλίωση** καταλοίπων σερίνης στα N-τελικά άκρα των ιστονών H₂A, H₂B, H₃ και H₄
 - Η φωσφορυλίωση της H₃ και της συνδεδετικής ιστόνης: συνδέεται με το σχηματισμό μεταφασικών χρωμοσωμάτων
- **Ουμπικουτίνωση** καταλοίπων λυσίνης στα C-τελικά άκρα των ιστονών H₂A και H₂B. Προσθήκη της μικρής πρωτεΐνης ουμπικουτίνης
 - Η ουμπικουτίνωση της H₂B: επιδρά στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου
- **Σουμοϋλίωση**, προσθήκη της πρωτεΐνης SUMO
 - παρόμοια δράση με την ουμπικουτίνωση, παίζει ανασταλτικό ρόλο στη μεταγραφή καθώς ανταγωνίζεται την ακετυλίωση

Οι εναλλακτικοί αυτοί τύποι τροποποίησης επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και τη δραστηριότητα του κυττάρου

Κώδικας Ιστονών

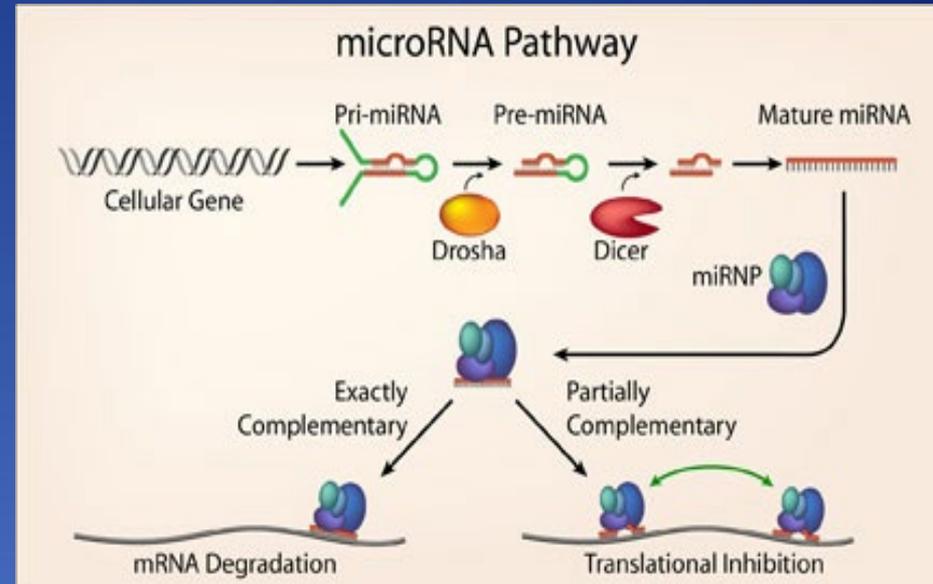
- 29 θέσεις στα N- και C-τελικά άκρα των 4 κεντρικών ιστονών υπόκεινται σε ομοιοπολική τροποποίηση



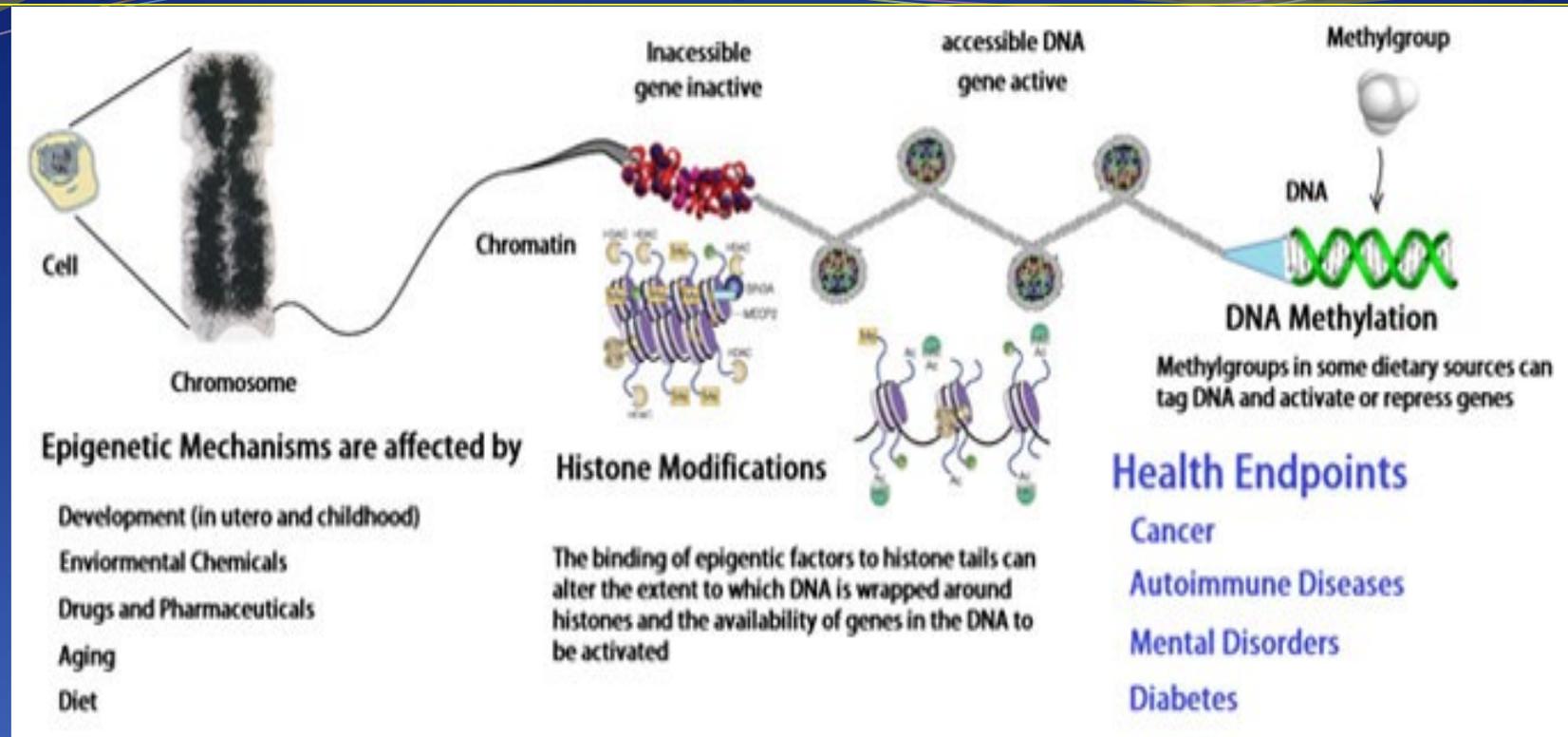
- Κώδικας ιστονών μέσω του οποίου το πρότυπο των χημικών τροποποιήσεων καθορίζει τις περιοχές του γονιδιώματος που θα εκφραστούν σε δεδομένη χρονική στιγμή
- Ο κώδικας ιστονών υπαγορεύει:
 - την **επιδιόρθωση θέσεων** που έχουν υποστεί βλάβη
 - τον **συντονισμό αντιγραφής** του γονιδιώματος με τον **κυτταρικό κύκλο**

III. Μη-κωδικοποιημένα RNA (miRNA, Non-coding RNA (ncRNAs))

- **miRNA (micro-RNA):** μικρά μη κωδικοποιημένα RNA
- **20-25 νουκλεοτίδια**, προέρχονται από μεταγραφή του DNA, αλλά δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη
- **Ρυθμίζουν την έκφραση** άλλων γονιδίων
- Επάγουν **καταστολή της μεταγραφής** ή αποδόμηση των mRNA στόχων
- Παίζουν **σημαντικό ρόλο** στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία
- **Απορρύθμιση** (υπερέκφραση ή μειωμένη ρύθμιση) μέσω χρωμοσωμικών ανωμαλιών οδηγεί σε **παθολογικές καταστάσεις**
- Δράση ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτική



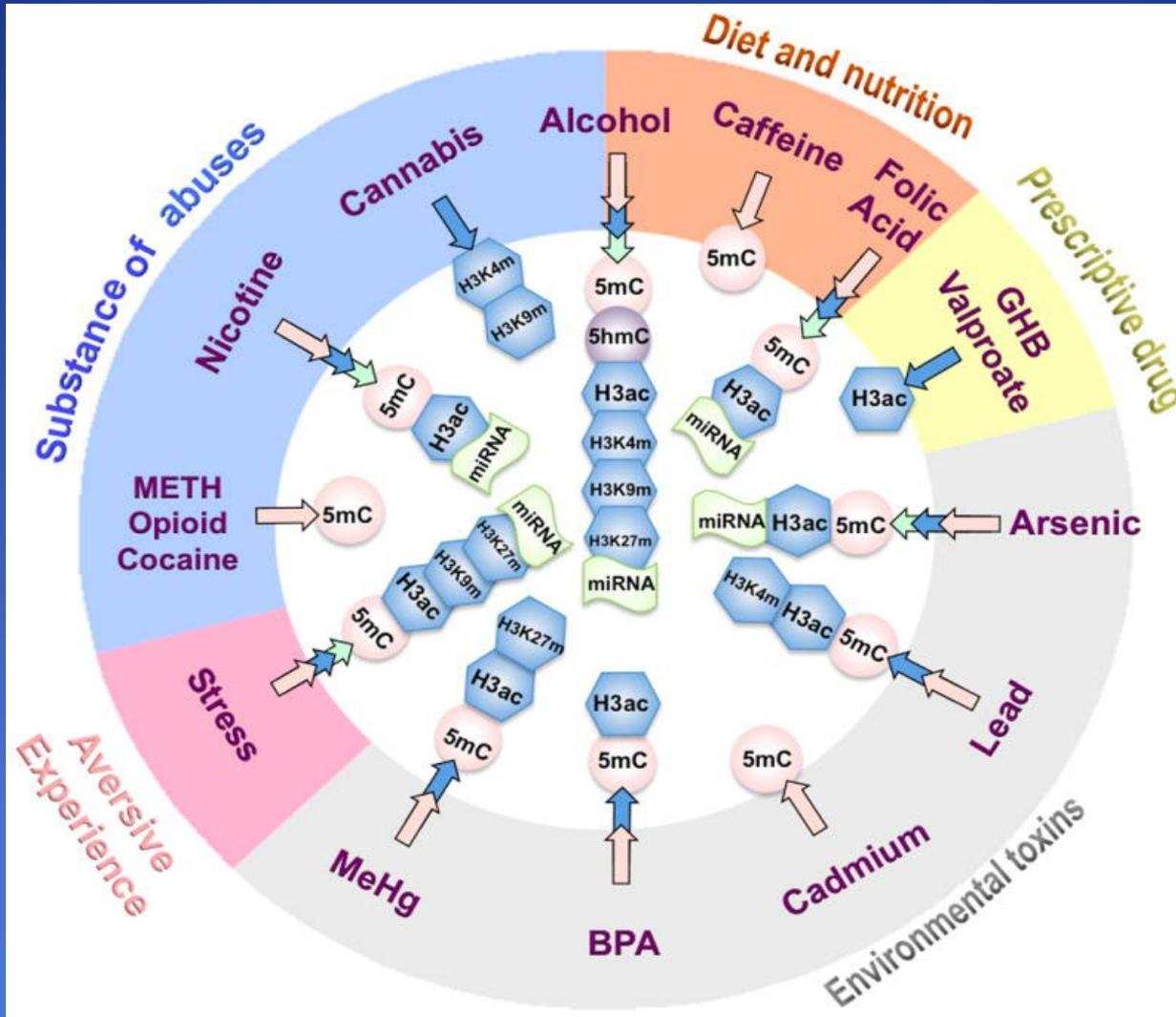
Η σημασία των επιγενετικών μηχανισμών



Διαταραχές των επιγενετικών μηχανισμών σχετίζονται με

- καρκινογένεση,
- νευροαναπτυξιακές και ψυχιατρικές διαταραχές,
- νοσήματα του ανοσοποιητικού συστήματος,
- διάφορα παιδιατρικά σύνδρομα (σύνδρομο Rett, ευθραύστου X, Prader-Willi, Angelman)

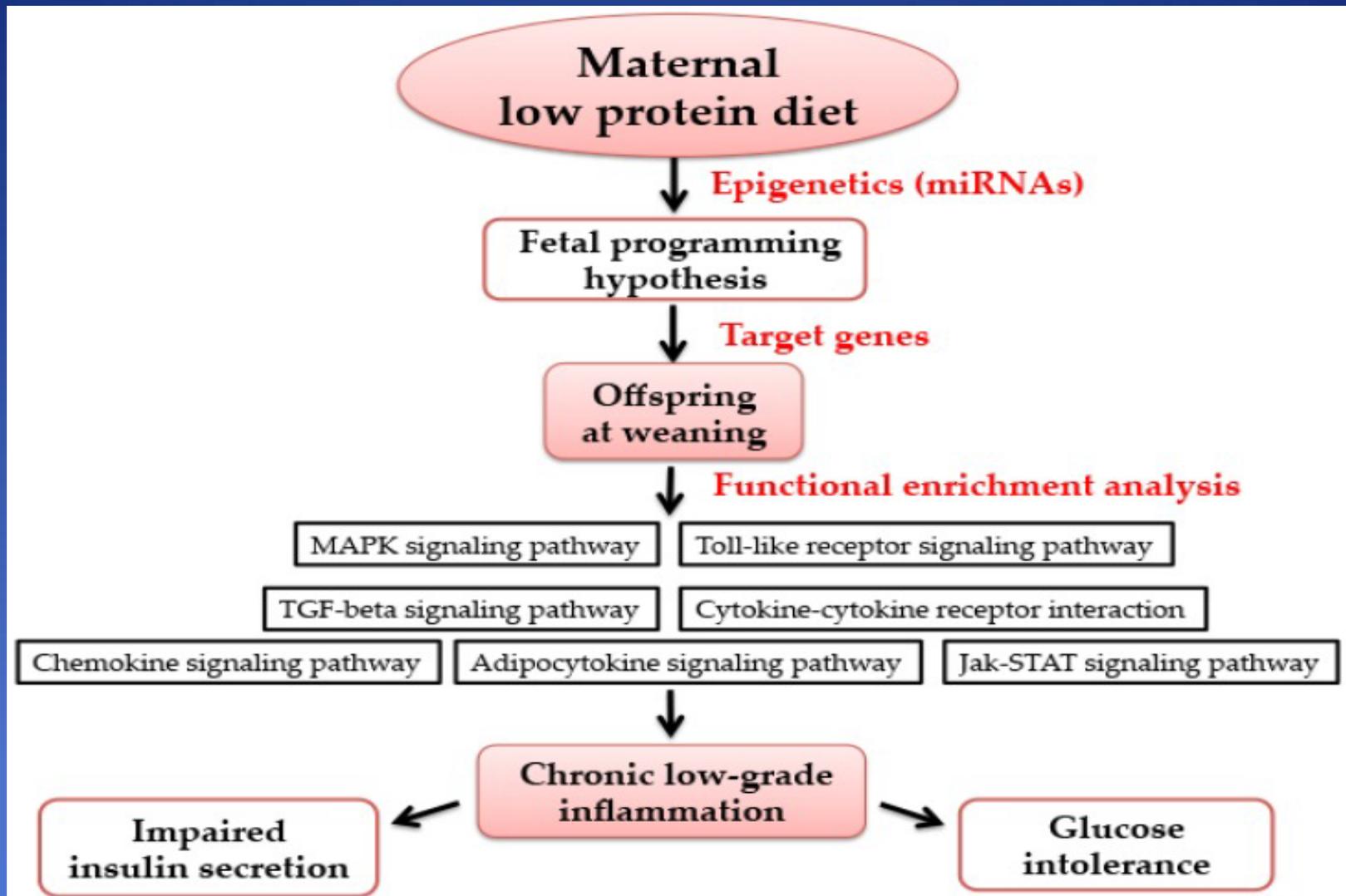
Επίδραση επιγενετικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της κύησης



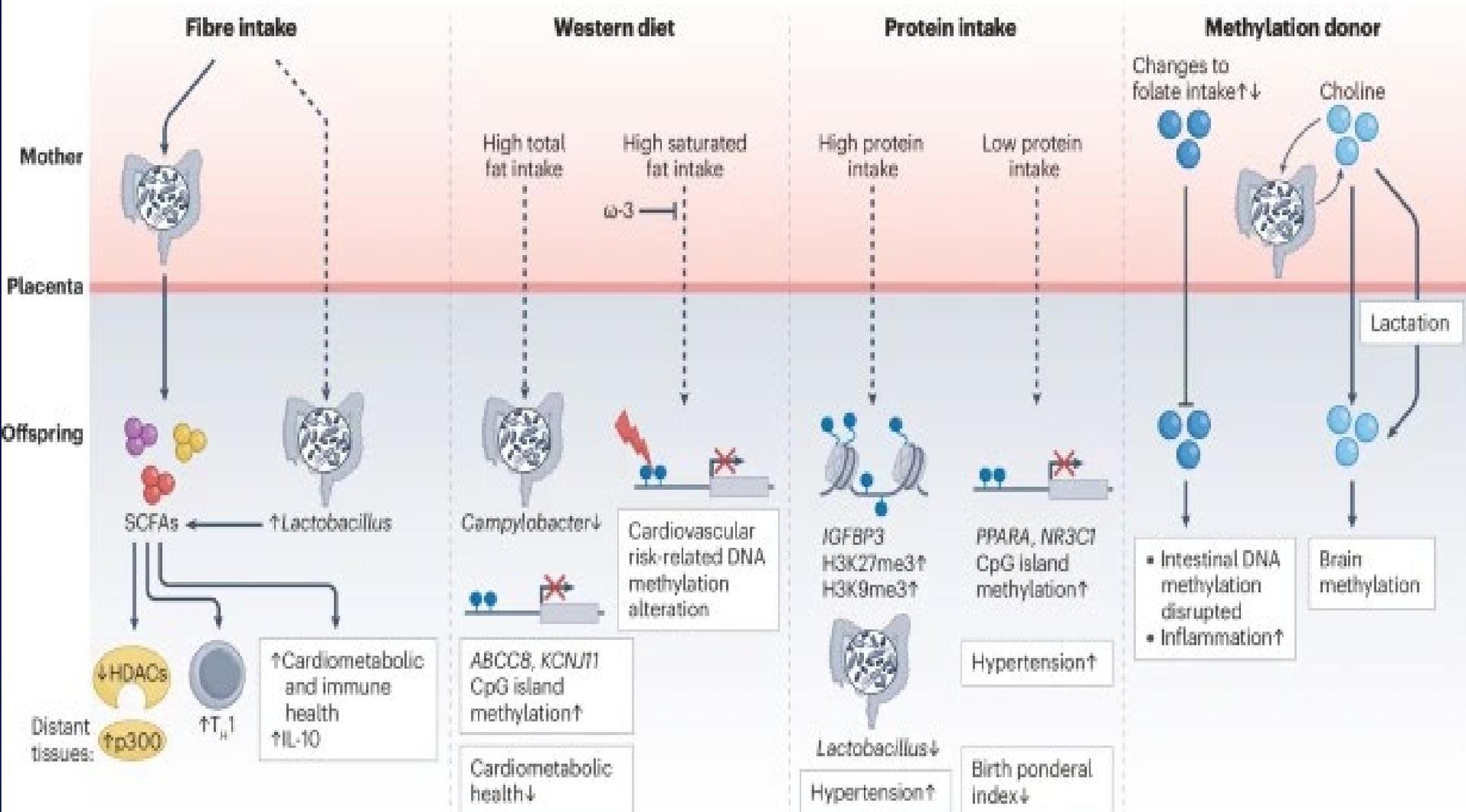
Η επίδραση της διατροφής στην ανάπτυξη επιγενετικών αλλοιώσεων

- Η **ποσότητα** και η **ποιότητα** της διατροφής επιδρούν στο επιγονιδίωμα προκαλώντας επιγενετικές αλλαγές
- **διατροφή με υψηλά επίπεδα λιπαρών (high-fat diet)** : αλλάζει την λειτουργικότητα των HDACs και HATs, και επιδρά αρνητικά στη λειτουργία του ήπατος, αυξάνει την έκφραση των HDACs και οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη
- **διατροφή με υψηλά επίπεδα σακχάρων (high sugar diet)** :
 - η γλυκόζη είναι τοξική για τα β παγκρεατικά κύτταρα, απορρυθμίζει την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης, αποσταθεροποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα HIF
 - Οι **γλυκοτοξίνες** (advanced glycation end products, AGEs) επιδρούν στην έκφραση miRNAs, αυξάνουν τη μεθυλίωση γονιδίων

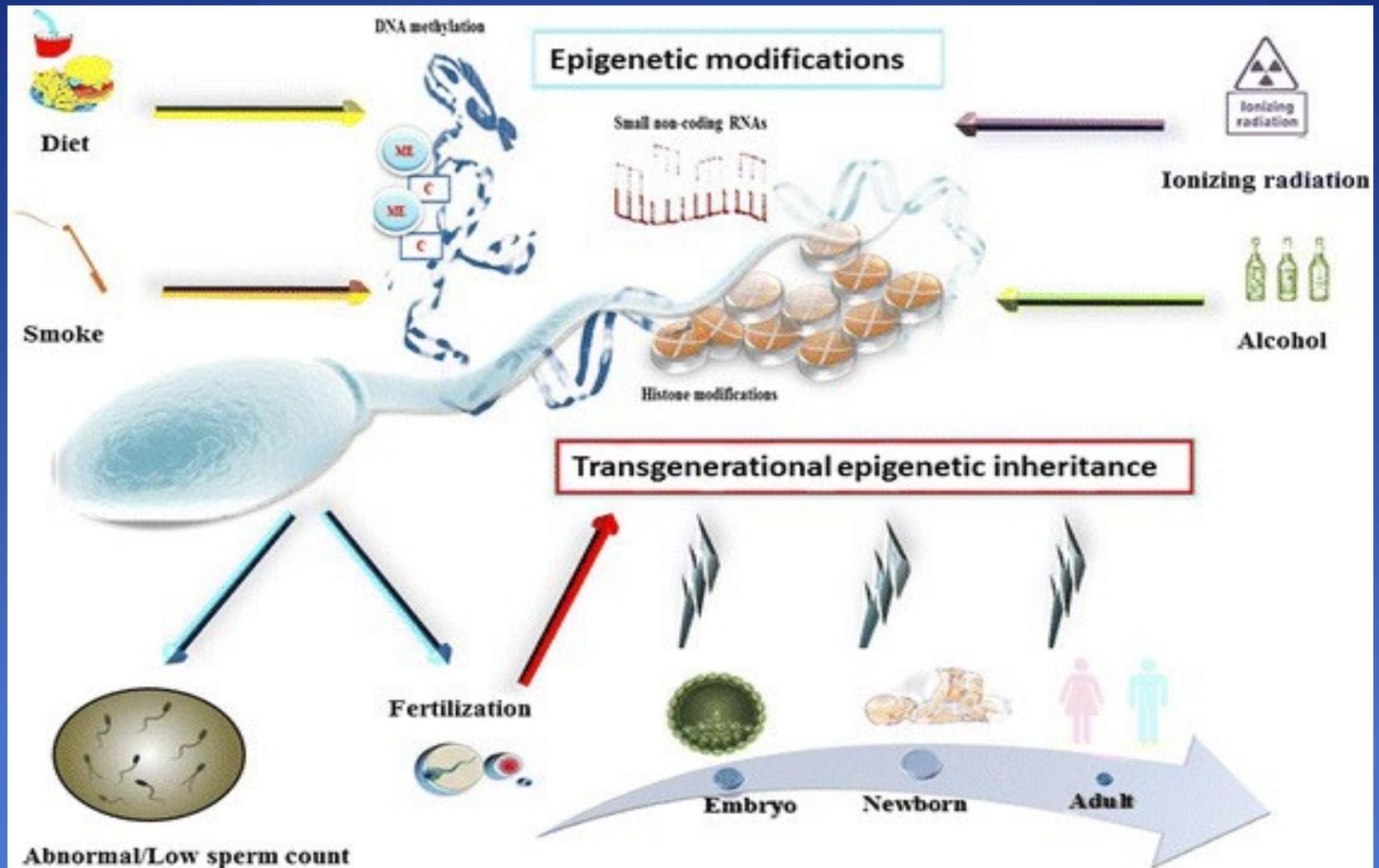
Maternal Low-Protein Diet Modulates Glucose Metabolism and Hepatic MicroRNAs Expression in the Early Life of Offspring



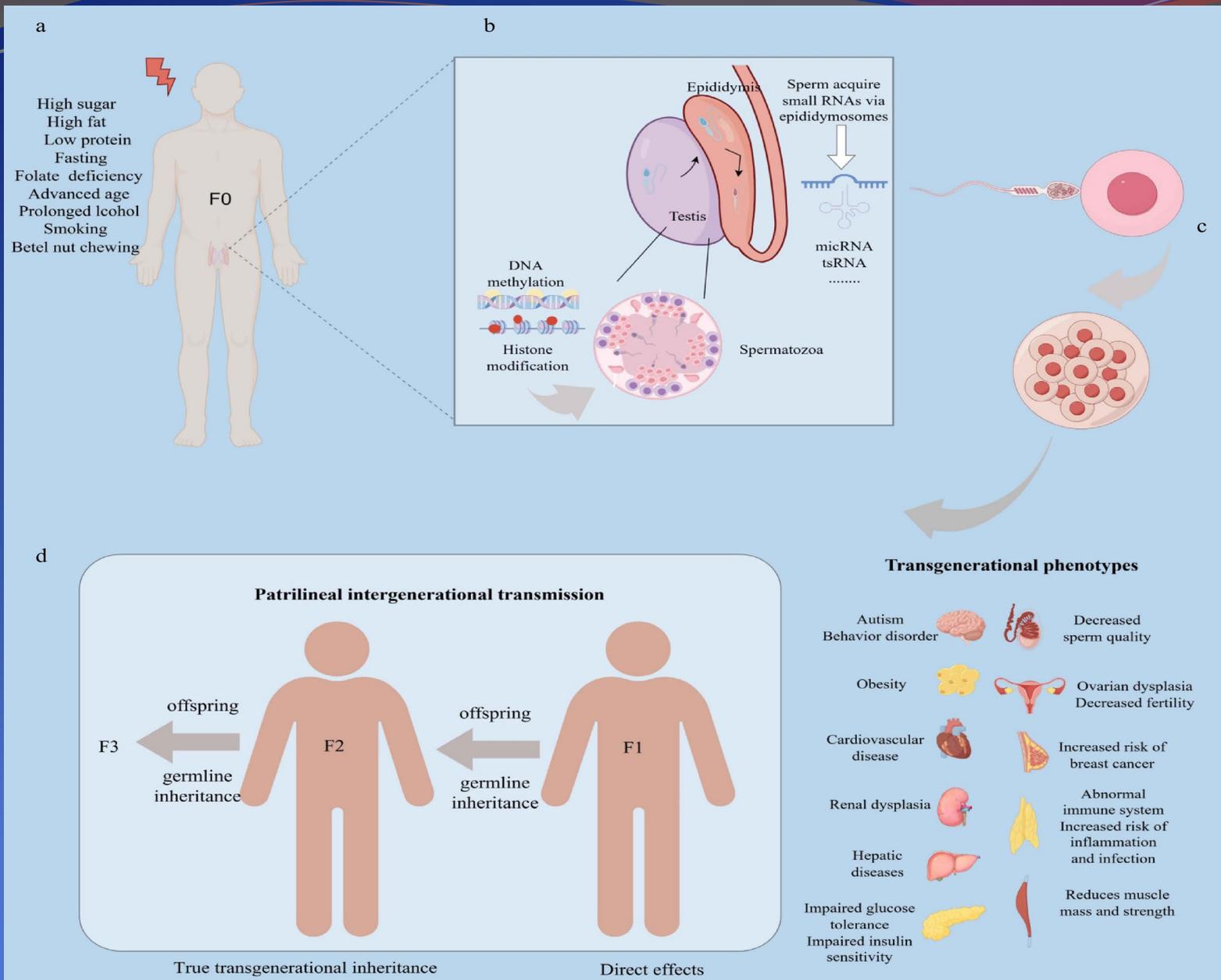
Different maternal dietary patterns affect the gut microbiota and the epigenetic landscape of the offspring, contributing to long-term health outcomes in the offspring



Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health

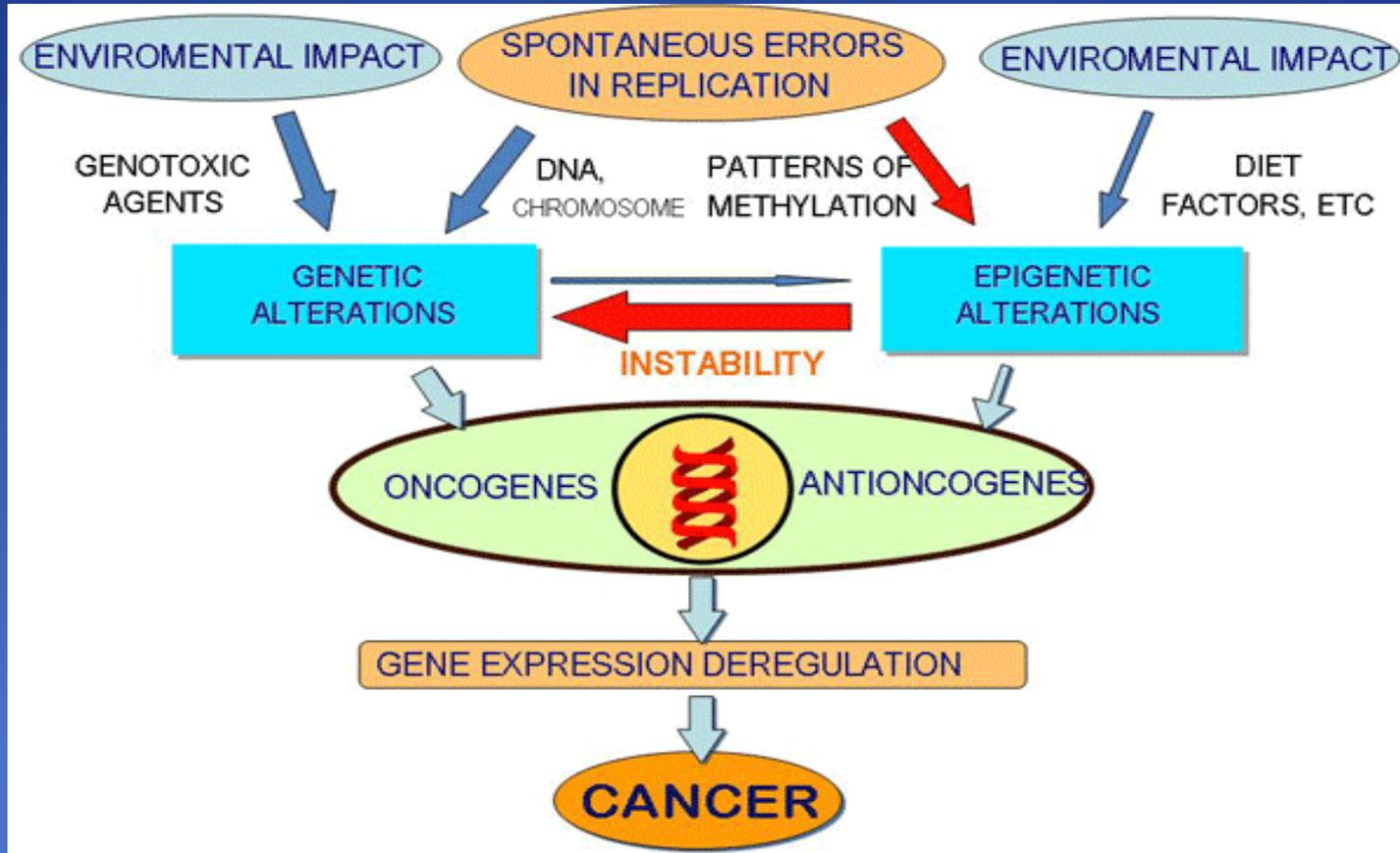


Mechanism of epigenetic influence on offspring health by paternal exposure



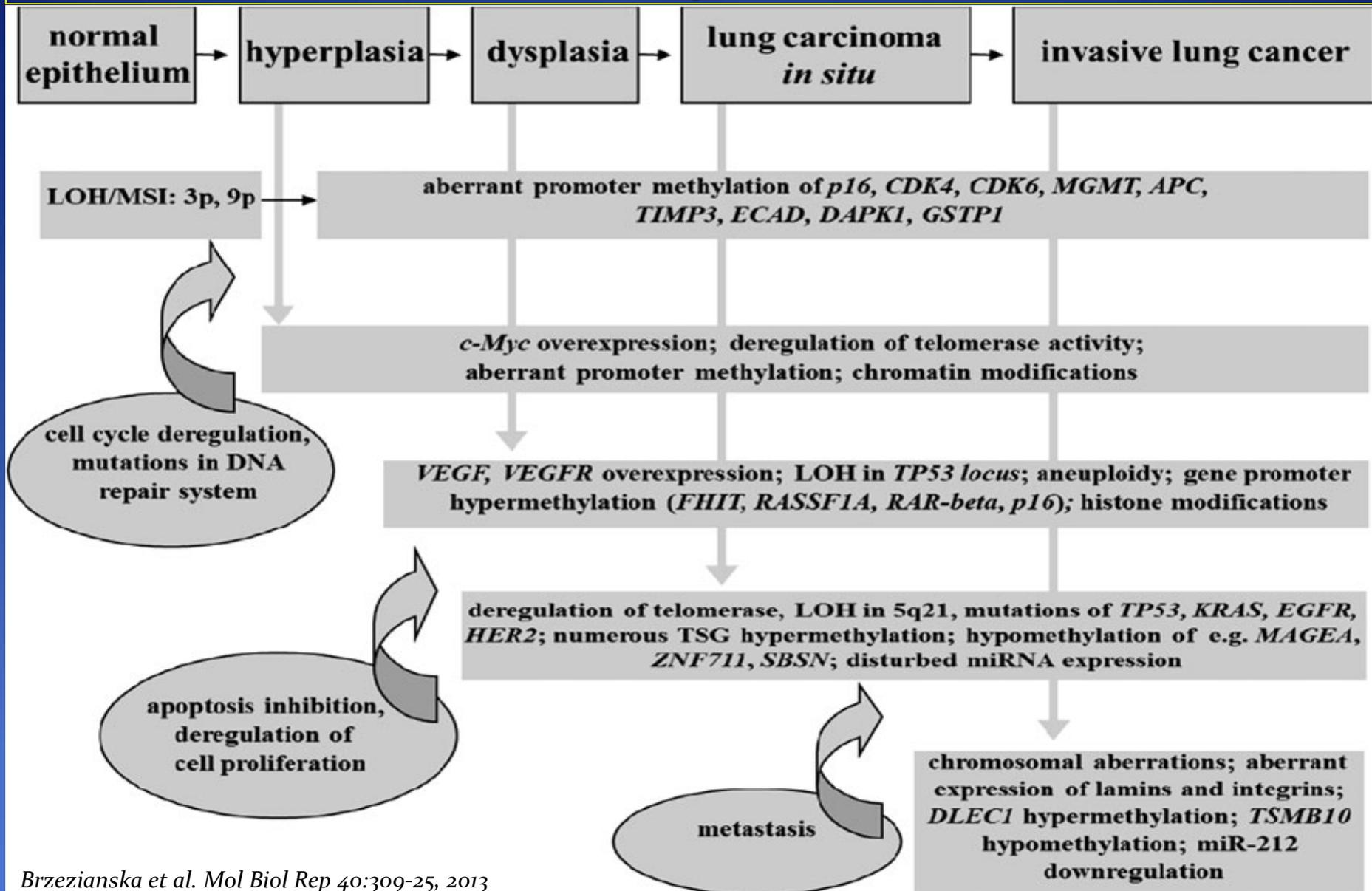
Επιγενετική και καρκινογένεση

- Αλληλεπίδραση γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών οδηγούν σε καρκινογένεση



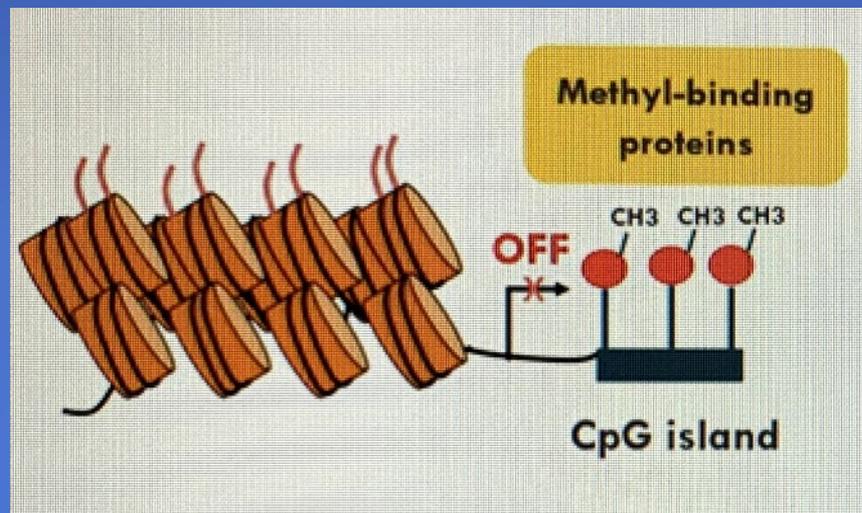
- Συνδυασμός επιγενετικών και γενετικών αλλαγών οδηγούν σε **γενωμική αστάθεια**, διαταραχή στη γονιδιακή έκφραση και ανάπτυξη του όγκου

Γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στο καρκίνο του πνεύμονα



Μεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση

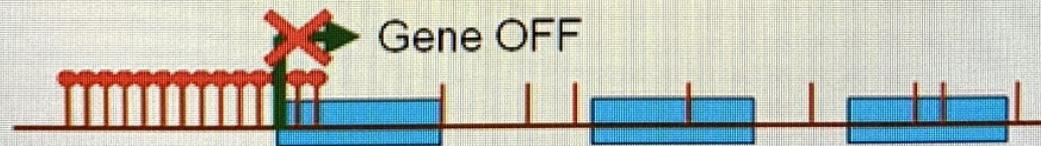
- Μεθυλίωση στους υποκινητές γονιδίων οδηγεί σε **αποσιώπηση** λόγω καταστολής της πρόσδεσης των μεταγραφικών συμπλόκων στο ρυθμιστικό DNA
- Η μεθυλίωση επίσης **προσελκύει** πρωτεϊνικά **σύμπλοκα** αποτελούμενα από πρωτεΐνες που προσδένουν σε μεθυλιωμένες αλληλουχίες CpG (**MBD proteins**), **HDACs** και **HMTs** προκαλώντας συντονισμένες επιγενετικές τροποποιήσεις στη χρωματίνη



Ανώμαλα μοτίβα μεθυλίωσης κάποιων γονιδίων σχετίζονται με καρκινογένεση

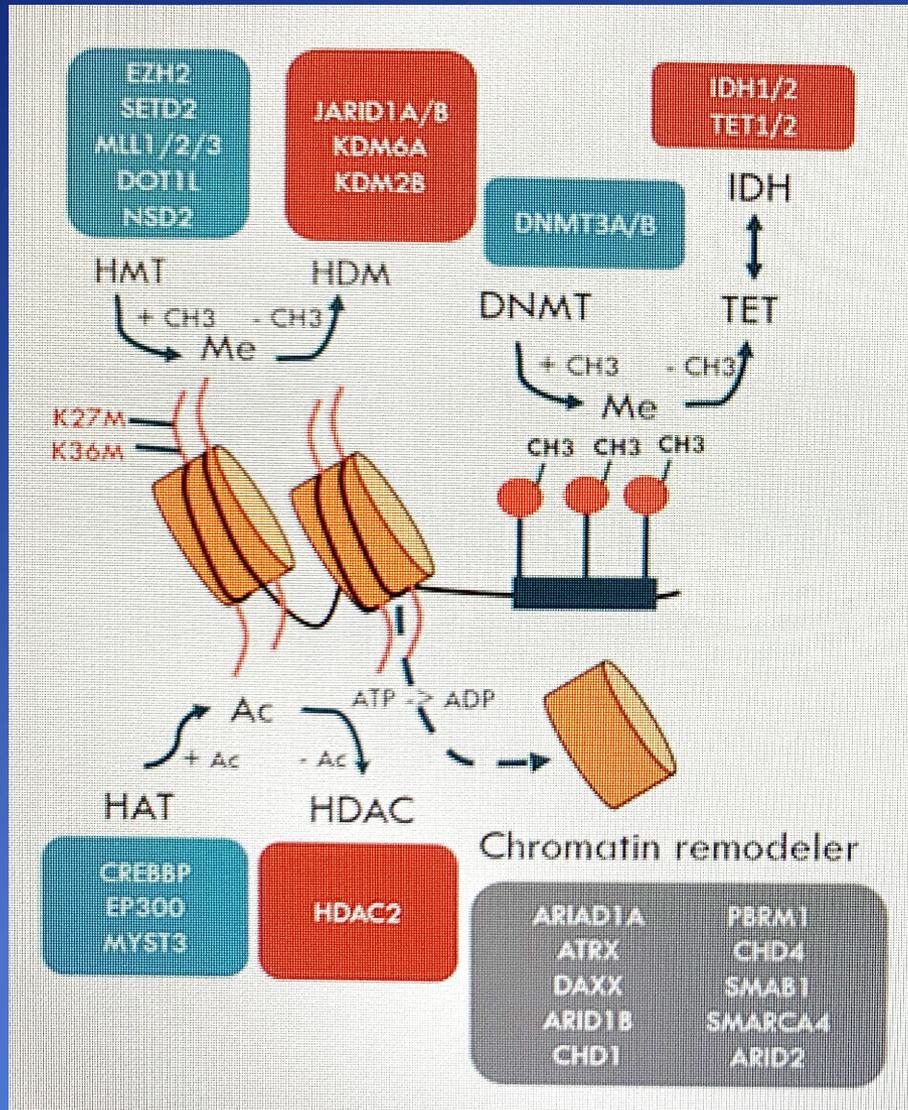
-υπερμεθυλίωση υποκινητών γονιδίων ρύθμισης κυτ. κύκλου, απόπτωση, επιδιόρθωσης του DNA, διαφοροποίησης, προσκόλλησης οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση

- **Cell cycle:**
 - *Rb, p16^{INK4a}, p15^{INK4a}, p14^{ARF}*
- **Signal transduction:**
 - *RASSF1, APC*
- **Apoptosis:**
 - *DAPK, Caspase 8*
- **DNA repair:**
 - *MLH1, MGMT, BRCA1*
- **Senescence:**
 - *TERT, TERC*
- **Invasion/metastasis:**
 - *TIMP-3, E-cadherin*



-υπομεθυλίωση επαναλαμβανομένων αλληλουχιών οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και ογκογένεση

Μεταλλάξεις σε ένζυμα τροποποίησης των ιστονών αλλάζουν τη δομή/λειτουργία της χρωματίνης



- Το 50% των όγκων παρουσιάζει μεταλλάξεις σε ένζυμα τροποποίησης των ιστονών ή/και του DNA
- Πιο συχνά σε ένζυμα που ρυθμίζουν :
- Ακετυλίωση ιστονών
- Μεθυλίωση ιστονών
- Μεθυλίωση DNA
- Ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης

Ακετυλίωση ιστονών και καρκινογένεση

- Αλλαγή της λειτουργικότητας των HAT λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων ή ικών ογκοπρωτεϊνών σχετίζεται με την ανάπτυξη αιματολογικών και συμπαγών όγκων

HAT	Defect	Tumour
P300	Mutations, translocations, deletions	Multiple
CBP	Mutations, translocations, deletions	Multiple
pCAF	Mutations	colon
MOZ	Translocations	Haematologic (AML, ALL)
Tip60	Under expression	Multiple
MORF	Translocations	Uterine leiomyomata

Απακετυλίωση ιστονών και ογκογένεση

HDAC	Defect	Tumour
HDAC ₁	Overexpression/underexpression	Multiple/Colon
HDAC ₂	Overexpression/Mutations	Multiple/Colon, gastric, endometrial
HDAC ₃	Overexpression	colon
HDAC ₄	Overexpression/Mutations	Prostate, breast/colon
HDAC ₅	Under expression	Colon, AML
HDAC ₆	Overexpression	Breast, AML
HDAC ₇	Overexpression	Colon
HDAC ₈	Overexpression	Colon
SIRT ₁	Overexpression/underexpression	Multiple/Colon
SIRT ₂	Underexpression/deletion	Glioma
SIRT ₃	Overexpression	Breast
SIRT ₄	Underexpression	AML
SIRT ₇	Overexpression	Breast, thyroid carcinoma

Μεθυλίωση/Απομεθυλίωση ιστονών και καρκινογένεση

HMT (histone methyltransferase)	Defect	Tumour
MLL ₁	Translocation, amplification	Hematologic
MLL ₂	Amplification	Gliomas, pancreas
MLL ₃	Mutation/deletion	Hematologic/colon
MLL ₄	Amplification	Solid tumours
NSD ₁	Translocation	AML
NSD ₂	Translocation	Multiple myeloma
NSD ₃	Translocation/amplification	AML/breast
BL ₁ MP ₁	Mutations	B cell lymphomas
EVI ₁	Chromosomal rearrangements	Myeloid leukemia
MEL ₁	Translocation	Hematologic
LBP ₁	Overexpression	Gastric
SUV ₃₉ H ₁	Mutation/overexpression	Ovarian/colon
HCP ₁	Underexpression	Breast
GASC ₁ –demethylase	Amplification	Squamous cell carcinoma
PUT ₁ –demethylase	Overexpression	Breast

Επιγενετικές αλλοιώσεις ως καρκινικοί βιοδείκτες

Η παρουσία συγκεκριμένων επιγενετικών αλλοιώσεων σχετίζεται με:

- το τύπο του όγκου
- το στάδιο
- το βαθμό κακοήθειας, τη διαφοροποίηση
- τη πρόγνωση
- την ευαισθησία στη φαρμακευτική αγωγή (drug resistance, drug sensitivity)

Μεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση

Cancer type	Genes Analyzed	Clinical significance	Biological samples analyzed
Lung	<i>p16INK4, DAPK11, APC, RASSF1A, CDH1, MGMT, RAR-β, FHIT, p14ARF, BLU, CDH13,</i>	Differentiation, poor prognosis	Tumor and Plasma, serum, sputum
Breast	<i>HIC1, RASSF1A, RAR-β, CDH1, CDH13, ESR1, CDH1, p16INK4A, APC, DAPK11</i>	Early detection, poor prognosis	Tumor and Plasma Plasma
Prostate	<i>GSTP1, CD44</i>	Early detection of high risk	Tumor and Plasma
Ovarian	<i>CDH1, CDH13, APC, TIMP3, GSTP1, PPP1R13B, HSPA2, HSD17B4, ESR1, RASSF1A, BCRA1, p14ARF, p16INK4A</i>	Early detection, cancer specific	Tumor and Plasma, peritoneal fluid
Hepatocellular	<i>p16 INK4A, CDKN2B, RASSF1A</i>	Poor outcome	Tumor and Plasma
Gastric	<i>p16 INK4A, CDKN2B, DAPK1, GSTP1, CDH1, RAR-β</i>	Poor prognosis, tumor recurrence	Tumor and Plasma
Colorectal	<i>DAPK1, p16 INK4A, MLH1, SFRP2, SFRP5, PGR, HIC1, vimentin</i>	Tumor progression	Tumor and Plasma, stool
Bladder	<i>CDH1, APC, MGMT, RASSF1A, GSTP1, p16INK4A, RAR-β, ARF, p14ARF, DAPK1, BCL2, TERT, EDNRB, TNFRSF25</i>	Initial diagnosis and follow-up	Tumor and plasma, Urine

Τροποποιήσεις ιστονών και καρκινογένεση

Τύπος όγκου	Τροποποίηση	Κλινική σημασία
Lung	H3K9Ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H3K18ac, H4K16ac, H3K4me2, H3K9me, H4K20me3	Ακετυλιώσεις-καλή πρόγνωση Μεθυλιώσεις -δυσμενής
Prostate	H3K4me2, H3K18ac, H3K4me1, H3K9me2, H3K9me3, H3Ac, H4Ac, H4K20me1, H4K20me2, H3K27me3	Μετάσταση, επανεμφάνιση όγκου, κακή πρόγνωση
Breast	H3K9me3, H4K20me3, H3K18ac, H4K12ac, H3K4me2, H4K20me3, H4R3me2, H4K16ac	Κακή πρόγνωση, επιθετικότητα, H4K16ac↓: πρώιμος δείκτης
Leukemia	H3K9me3↓	Καλή πρόγνωση
Esophagus	H3K18ac, H4R3me2, H3K27me3↓	Καλή πρόγνωση
Kidney	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3↓	Κακή επιβίωση
Liver	H3K4me3, H3K27me3↑	Κακή πρόγνωση, επιβίωση
Pancreas	H3K4me2, H3K9me2, H3K18ac↓	Κακή επιβίωση

miRNAs και καρκινογένεση

<i>Cancer type</i>	<i>Upregulated miRNA</i>	<i>Clinical significance</i>
Lung cancer (Non-squamous non-small-cell lung cancer (stages II, III, and IV) and lymph-node metastasis)	miR-205 miR-96 miR-182 miR-183	Poor prognosis
Breast cancer Stages I and II; oestrogen-receptor-positive disease Stage III; oestrogen-receptor-negative disease; basal-like HER2+	miR-126, miR-136, miR-100, miR-99a, miR-145, miR-10a miR-150, miR-142-3p miR-142-5p, miR-148a	Good Poor Poor
Colorectal cancer Microsatellite instability vs microsatellite stable KRAS mutated	miR-938, miR-615-5p miR-1184, miR-551a miR-127-3p, miR-92a miR-486-3p, miR-378 miR-15a, miR-16-1 miR-16-2, miR-195	Good Poor Poor
Chronic lymphocytic leukaemia High ZAP70; immunoglobulin variable region not mutated 17p deletion Trisomy 12	miR-130b, miR-129-3p miR-632, miR-768-5p miR-181	Aggressive Disease progression

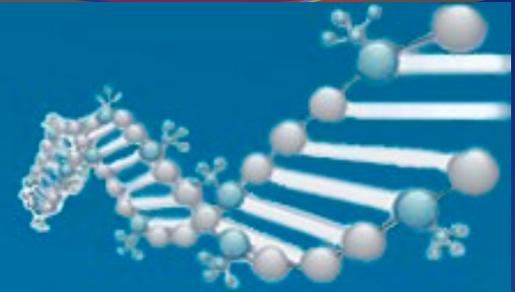
Επιγενετικοί βιοδείκτες ως παράγοντες που επηρεάζουν τη θεραπεία

Γονίδιο-Βιοδείκτης	Επιγενετικός Μηχανισμός	Μηχανισμός Δράσης	Τύπος όγκου	Είδος θεραπείας
MGMT (<i>O</i> -6-methylguanine DNA methyltransferase)	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Επιδιόρθωση του DNA- αφαιρεί αλκυλομάδες από γουανίνες	Γλοίωμα, λευχαιμία	Καλός προγνωστικός δείκτης θεραπείας με αλκυλιωτικούς παράγοντες carmustine, temozolomide
BRCA1, MLH1 (<i>Breast cancer 1, mutL-homolog1</i>)	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Επιδιόρθωση του DNA	Καρκίνος μαστού, ωοθηκών	Αντίσταση σε cisplatin , ευαισθησία σε αναστολείς PARP
ERCC1, ERCC5, WRN (<i>excision repair cross-complementary, Warner syndrome</i>)	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Επιδιόρθωση του DNA	Γλοίωμα Καρκίνος ωοθηκών	Ευαισθησία σε cisplatin, αναστολείς τοποϊσομεράσης, nemo-rubicin
GSTP1 (<i>glutathione S-transferase pi 1</i>)	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Αποτοξίνωση από ξενοβιοτικά	Καρκίνος προστάτη, μαστού	Ευαισθησία σε doxorubicin
TP53	Μεταλλάξεις. Υπερμεθυλίωση υποκινητή TP73, APOB1	Απόπτωση	Μελάνωμα (APOB1)	Ευαισθησία σε adriamycin
CDK10 (<i>cyclin-dependent kinase 10</i>)	Υπερμεθυλίωση υποκινητή	Κυτταρική σηματοδότηση	Καρκίνος μαστού	Αντίσταση σε αντι-οιστρογονική θεραπεία

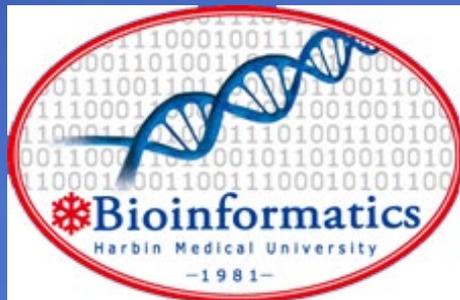


MethyCancer

Database of Human DNA Methylation and Cancer

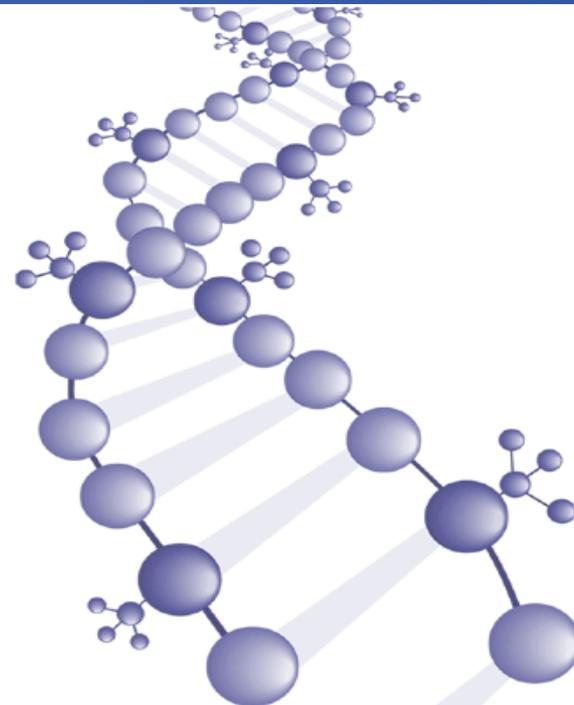


 **pG_MPs:** identification of CpG methylation patterns of genomic regions



HEP

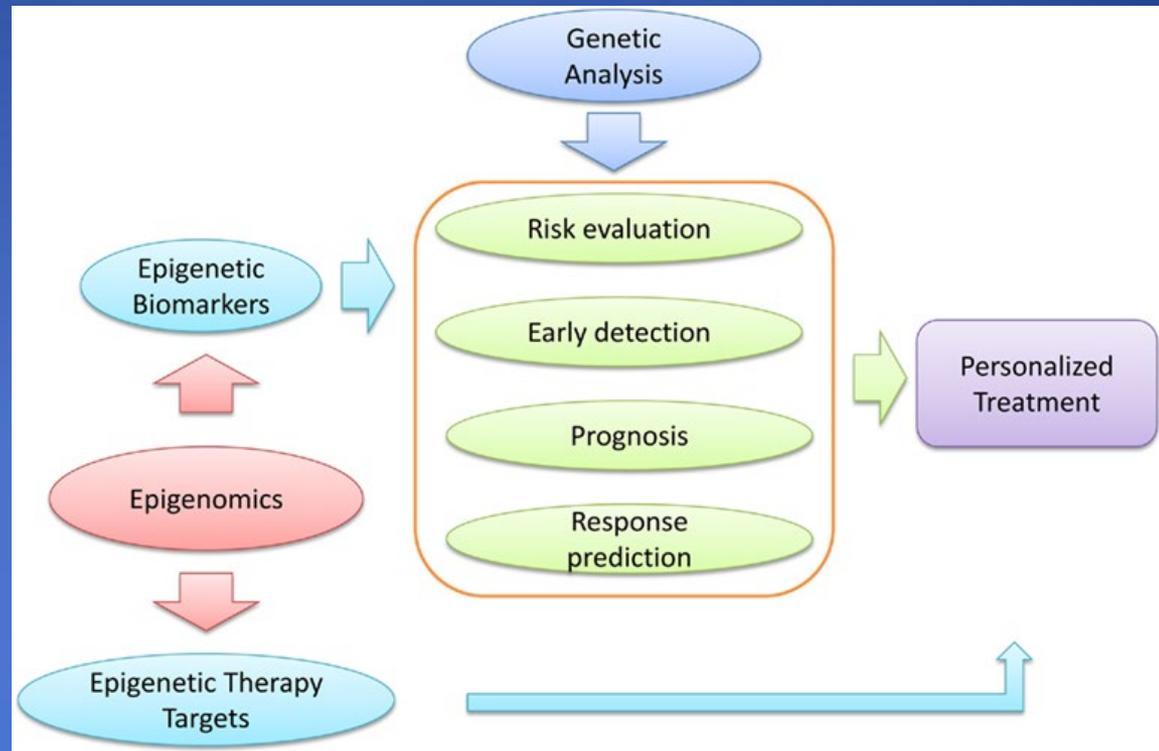
Human
Epigenome
Project



Μελέτη επιγενετικών αλλαγών

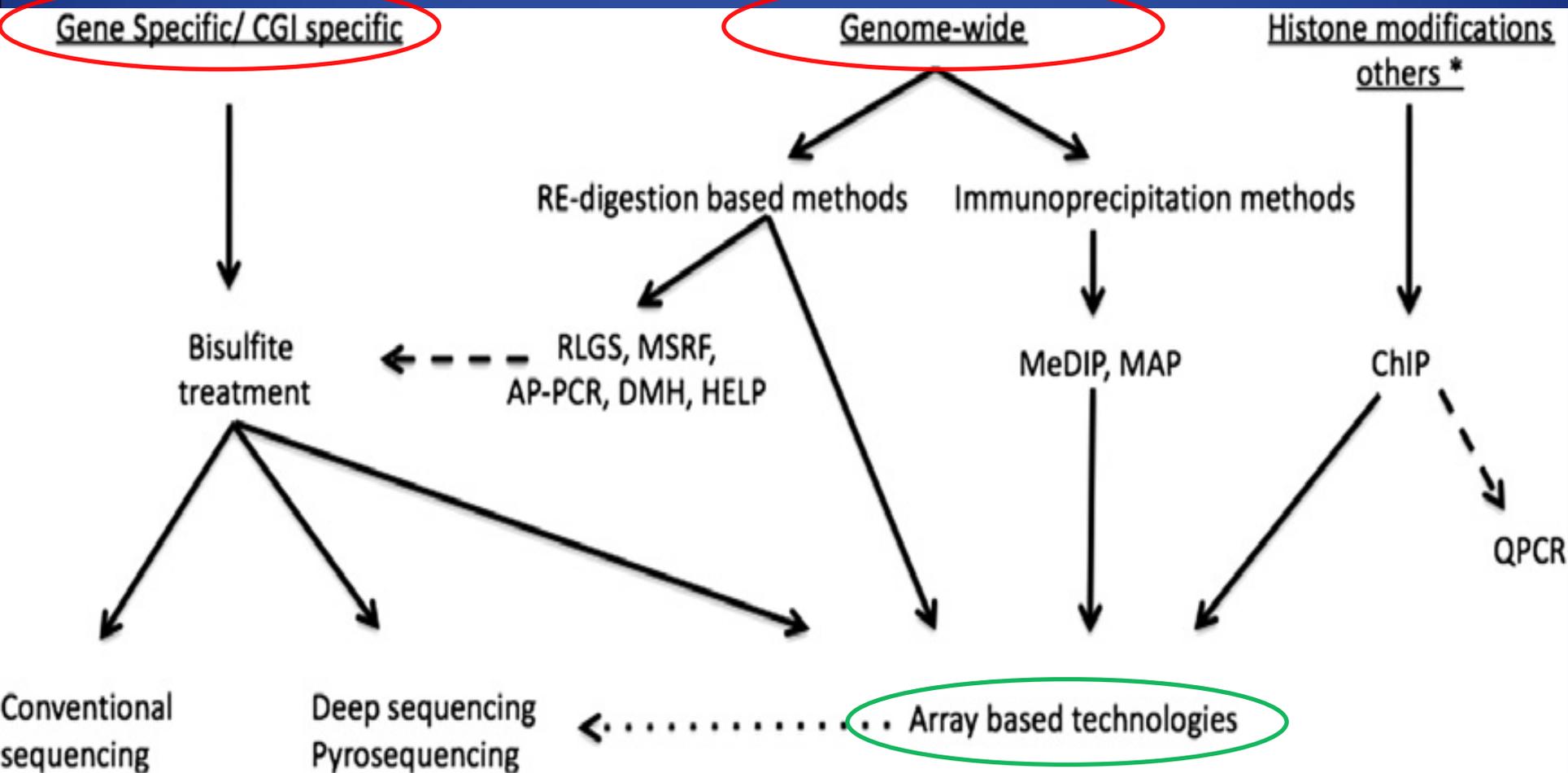
- Απομόνωση DNA, χρωματίνης, RNA από ποικιλία δειγμάτων:

- Ιστό (φρέσκο και μονιμοποιημένο σε παραφίνη)
- Περιφερικό αίμα
- Ούρα
- Πτύελα
- Παγκρεατικό υγρό
- Περιτοναϊκό υγρό
- Κολπικές εκκρίσεις
- Κόπρανα

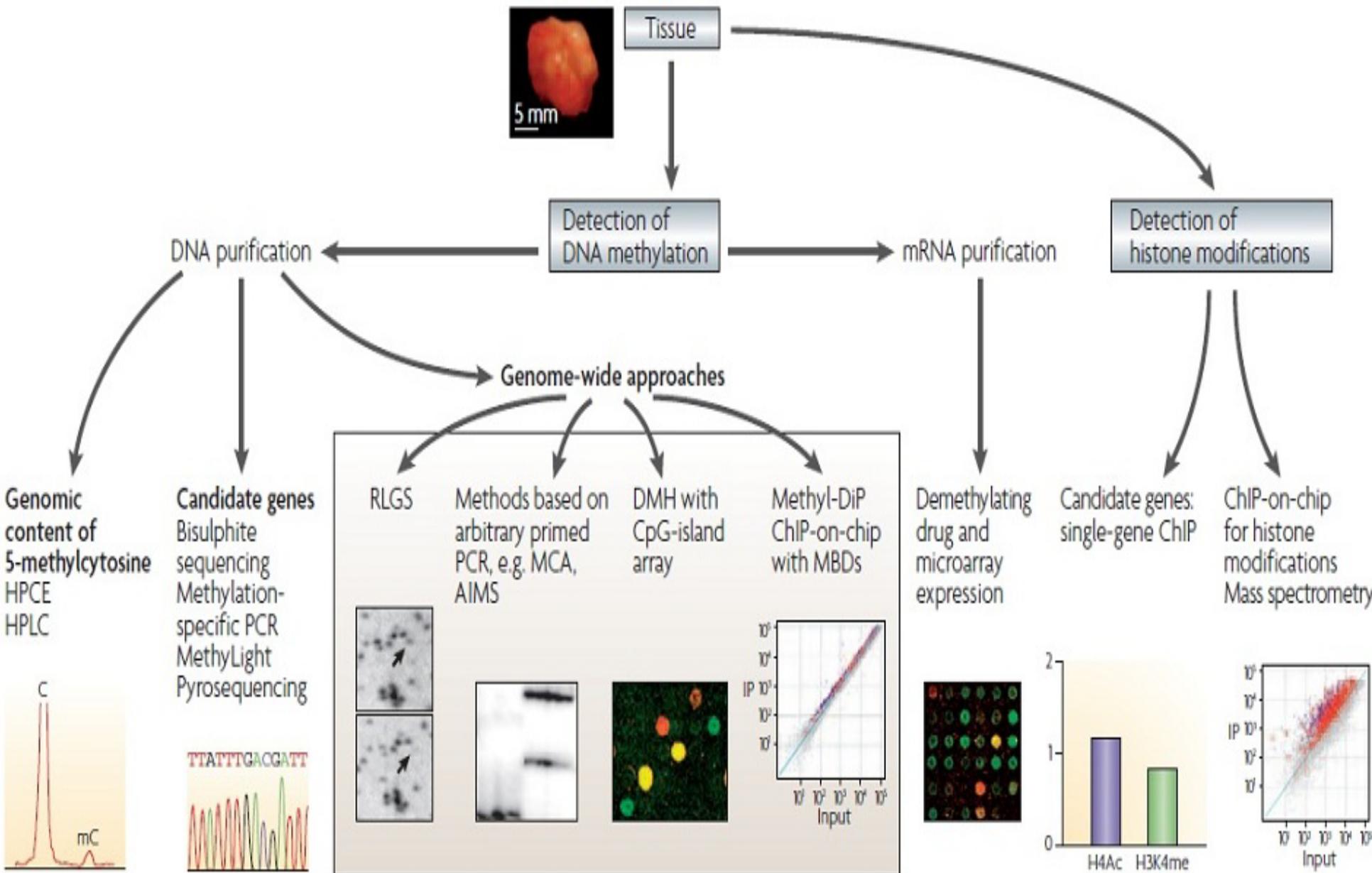


Μεθοδολογία επιγενετικής ανάλυσης

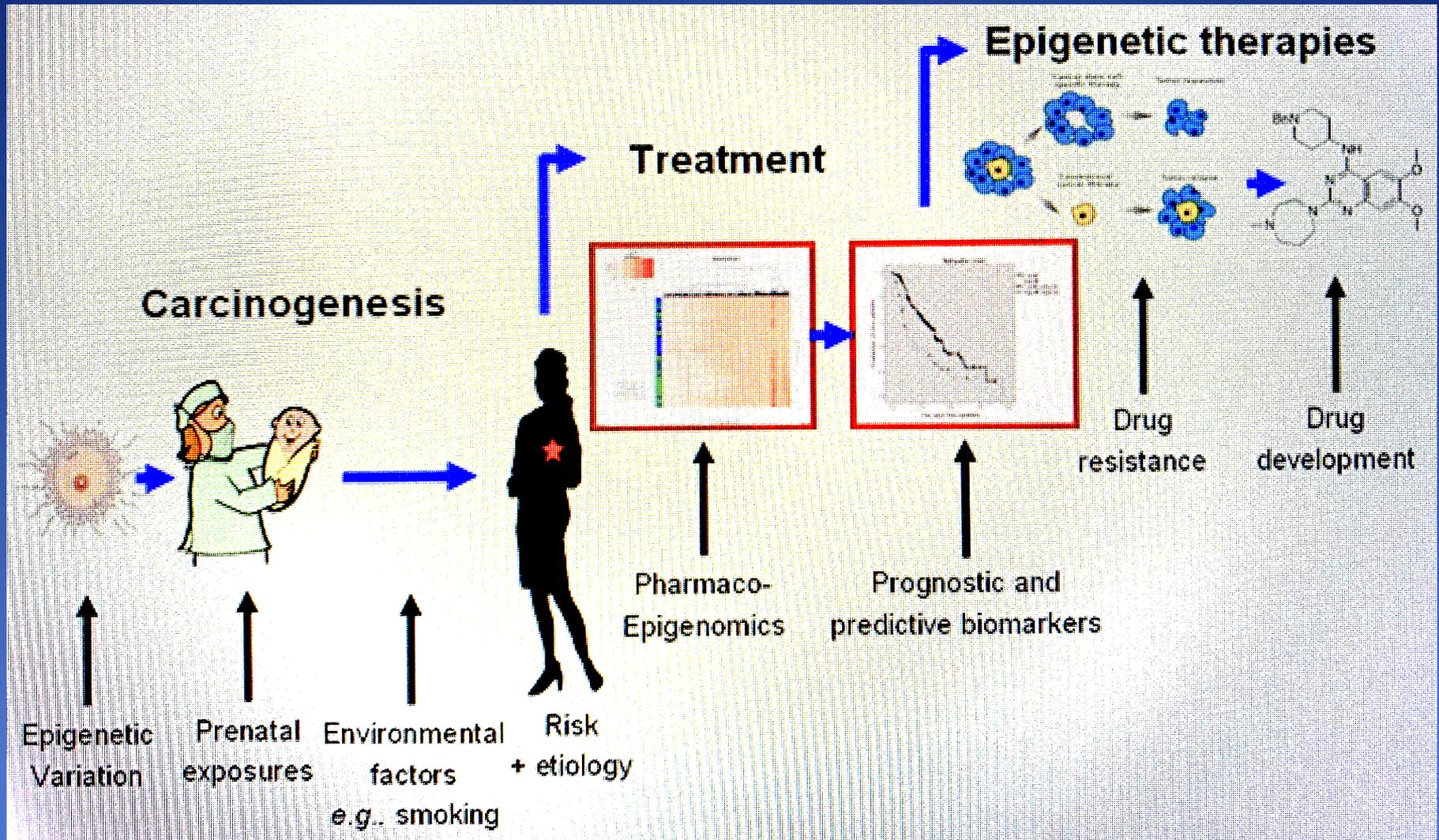
- Ανάλυση μεμονωμένων γονιδίων ή περιορισμένου αριθμού γονιδίων
- Ανάλυση του συνολικού γονιδιώματος



Epigenetic profiling joins personalized cancer medicine



Επιγενετικοί μηχανισμοί επιδρούν σε διάφορα στάδια της διαδρομής ενός ασθενούς με καρκίνο



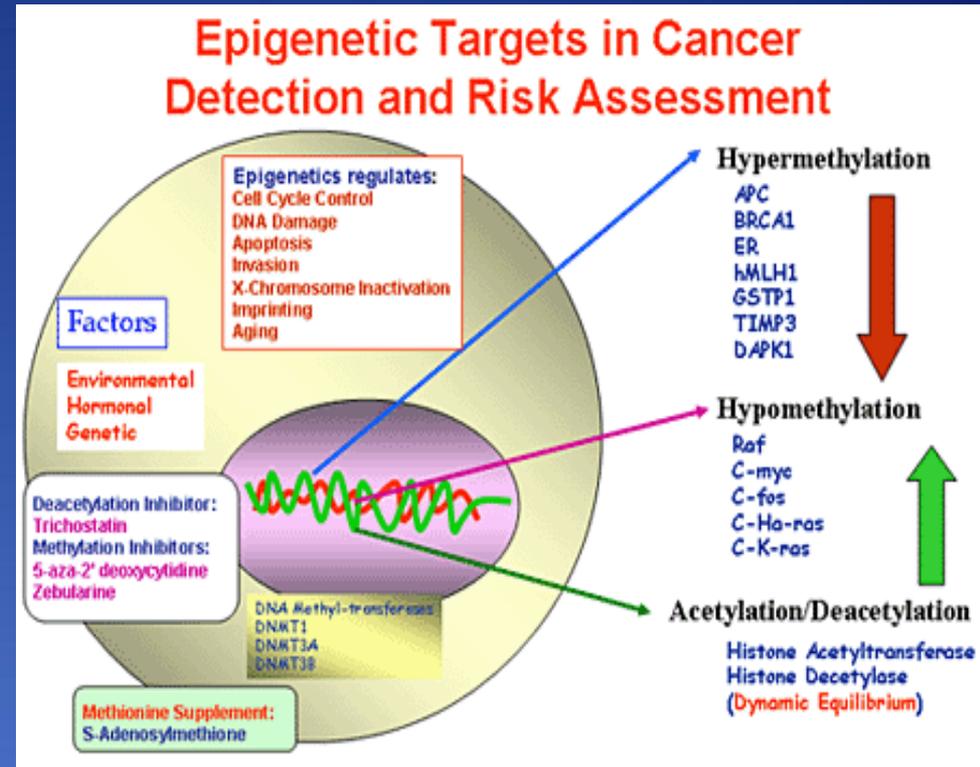
Στοχευμένη επιγενετική θεραπεία

Συνδυασμός αναστολέων της μεθυλίωσης του DNA και της απακετυλίωσης των ιστονών

Azacitidine, decitabine, hydralazine: αναστολείς της μεθυλίωσης, δεσμεύουν και αποδομούν τις DNMTs

επιτρέποντας την επανέκφραση γονιδίων που έχουν αδρανοποιηθεί λόγω υπερμεθυλίωσης

- Χρησιμοποιούνται στη θεραπεία **μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων**, αναιμίας και χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας

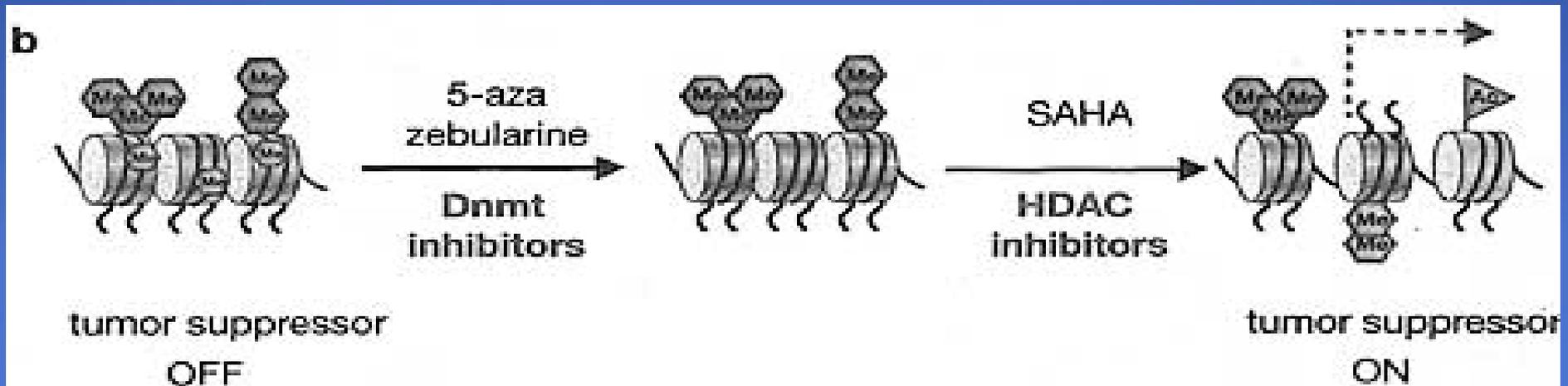


Συνδυαστική δράση αναστολέων της μεθυλίωσης του DNA και της απακετυλίωσης των ιστονών

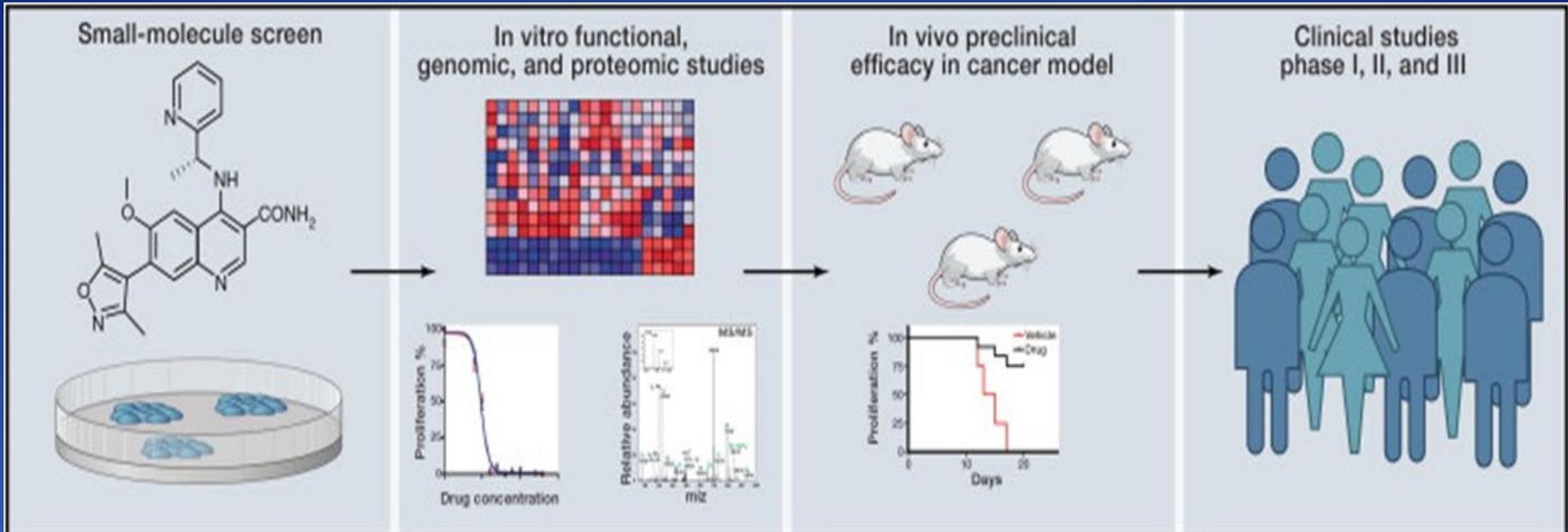
A. **Επιγενετικές τροποποιήσεις** (μεθυλίωση DNA, αποακετυλίωση ιστονών) μετατρέπουν ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό **ενεργοποιώντας ογκογονίδια**



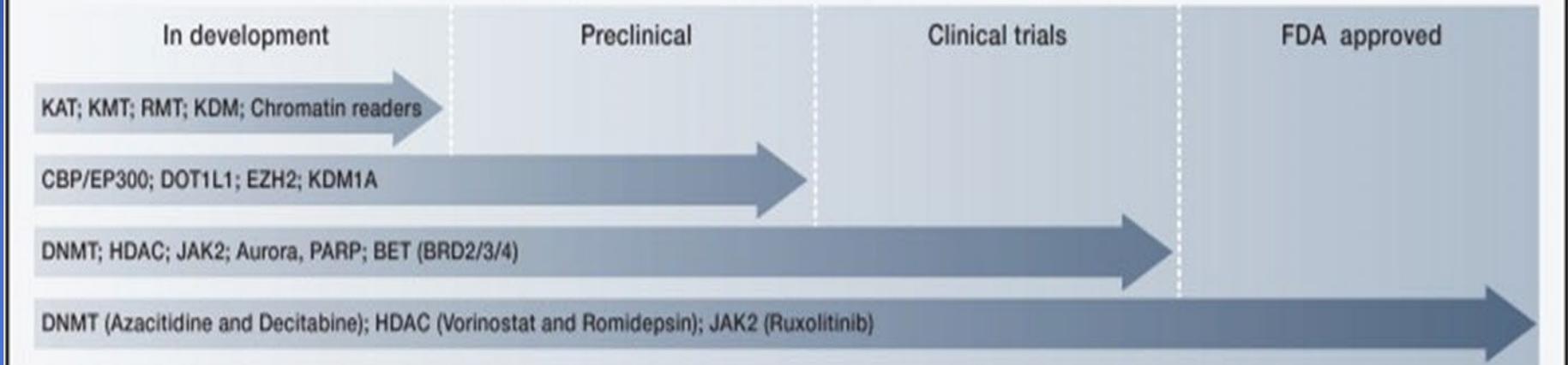
B. **Αναστολείς των DNA μεθυλο τρανσφερασών** απομακρύνουν τη μεθυλίωση και η χορήγηση αναστολέων απακετυλίωσης των ιστονών **επιτρέπει την ακετυλίωση** επιτρέποντας την **ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου**



Current states of epigenetic targets for inhibitors



Current States of Epigenetic Targets for Inhibitors



Combination Epigenetic Therapy Has Efficacy in Patients with Refractory Advanced Non Small Cell Lung Cancer

Rosalyn A. Juergens, John Wrangle, Frank P. Vendetti, Sara C. Murphy, Ming Zhao, Barbara Coleman, Rosa Sebre, Kristen Rodgers, Craig M. Hooker, Noreli Franco, Beverly Lee, Salina Tsai, Igor Espinoza Delgado, Michelle A. Rudek, Steven A. Belinsky, James G. Herman, Stephen B. Baylin, Malcolm V. Brock, Charles M. Rudin

Cancer Discov. 2011 December ; 1(7): 598–607.

Department of Oncology, Surgery, Radiology, Lovelace Respiratory Research Institute, Johns Hopkins University

Abstract

Epigenetic alterations are strongly associated with cancer development. We conducted a phase I/II trial of combined epigenetic therapy with **azacitidine and entinostat**, inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation, respectively, in extensively pretreated patients with recurrent metastatic non-small cell lung cancer. **This therapy is well tolerated**, and objective responses were observed, including **a complete response and a partial response in a patient who remains alive and without disease progression approximately 2 years after completing protocol therapy**. Median survival in the entire cohort was 6.4 months (95% CI: 3.8–9.2), comparing favorably with existing therapeutic options. **Demethylation of a set of four epigenetically silenced genes known to be associated with lung cancer was detectable in serial blood samples** in these patients, and was associated with improved progression-free ($p=0.034$) and overall survival ($p=0.035$). Four of 19 patients had major objective responses to subsequent anti-cancer therapies given immediately following epigenetic therapy.

Patient population

This study enrolled 45 adults with metastatic NSCLC with disease progression after at least one prior anti-cancer regimen for metastatic disease. Any number of prior therapies was allowed, and patients with treated brain metastases were included. Patients were excluded if they had uncontrolled brain metastases or liver metastases replacing > 30% of the liver parenchyma. Patients with HIV on anti-retroviral therapy were also excluded.

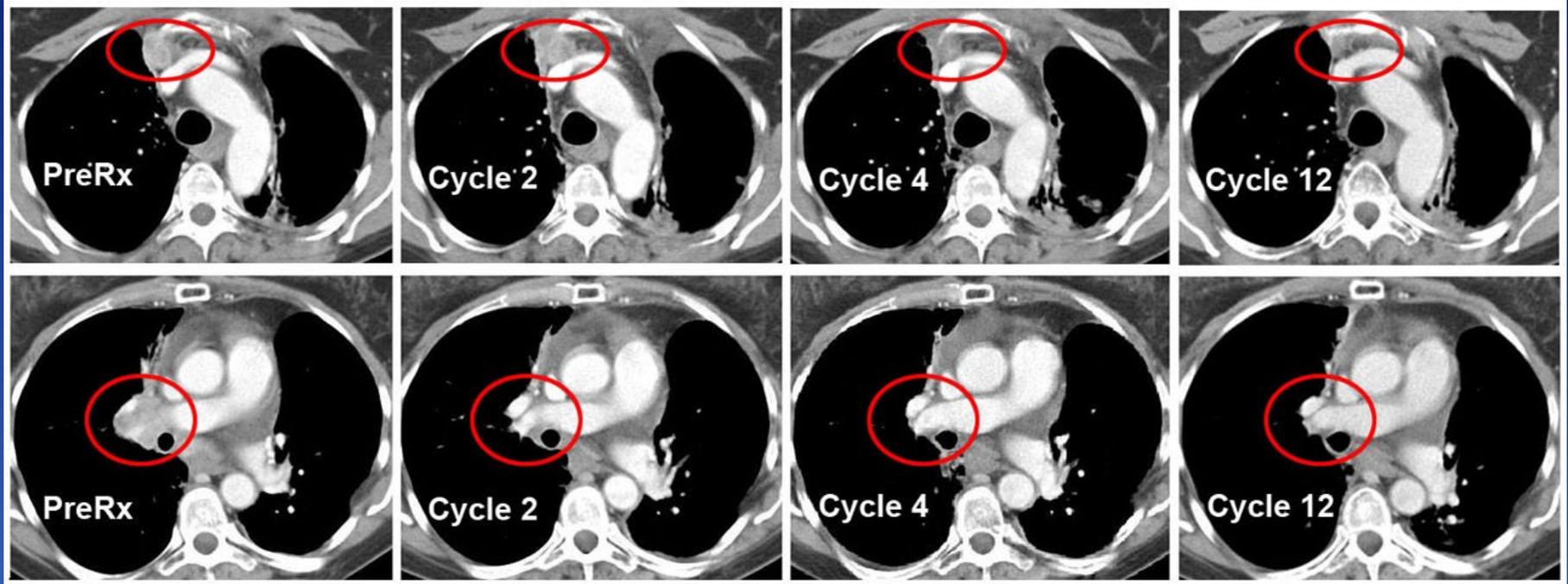
Biomarker analyses

Promoter methylation status of *APC*, *RASSF1A*, *CDH13*, and *CDKN2A* was examined in circulating DNA from patient plasma collected prior to therapy (day 0) and after 1 cycle of therapy (day 29).

Study design

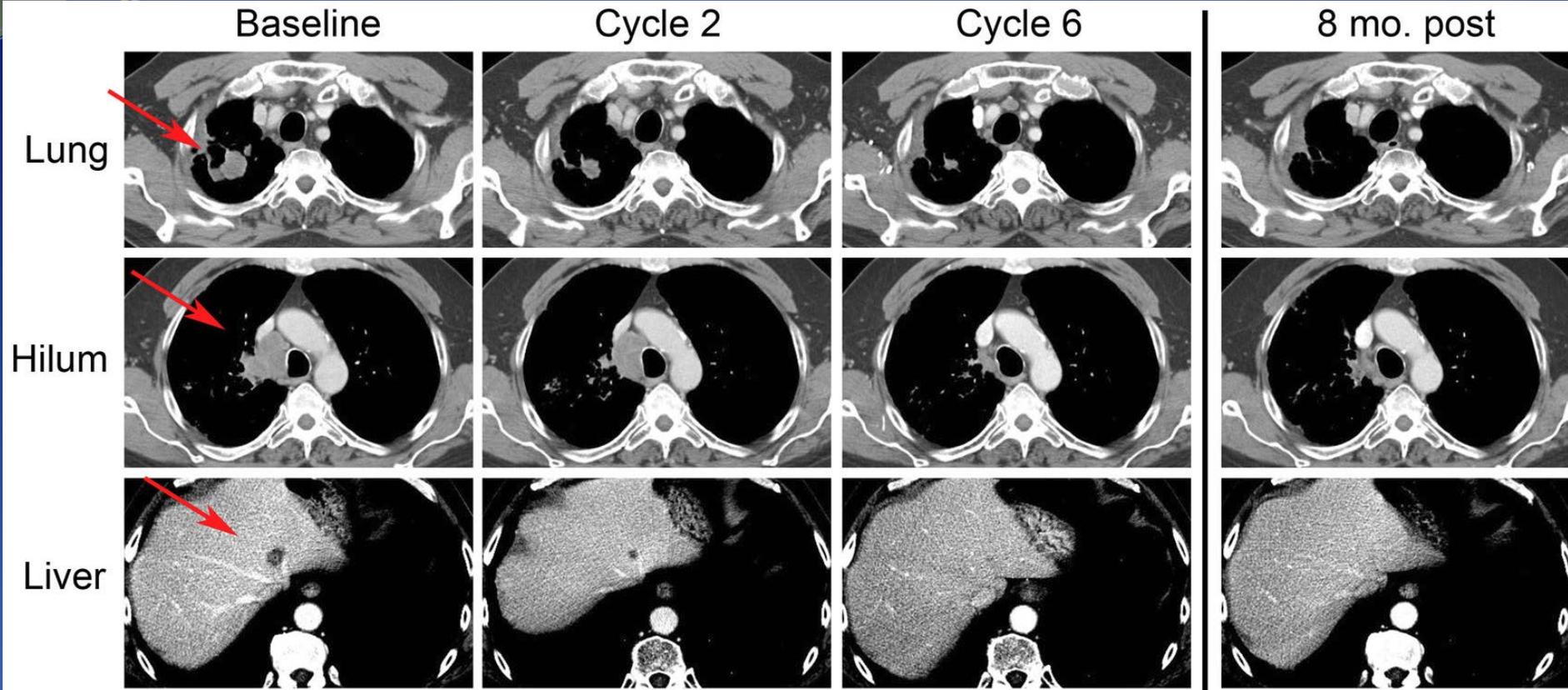
The phase I component used a standard 3 + 3 patient cohort design to assess adverse events of the combination of azacitidine at 30 mg/m² or 40 mg/m² on days 1–6 and 8–10 with entinostat at a 7 mg fixed dose on days 3 and 10 of each 28 day cycle. Based on the strategy of exploring doses of azacitidine well below previously defined maximally tolerated doses, dose levels in phase I were prespecified as limited to no more than 40 mg/m² daily. The phase II component was a single-arm two-stage open label study designed to assess the response rate of the combination at the 40 mg/m²/d dose of azacitidine.

Serial CT scan images from patient with a complete response



Scans show progressive resolution of a prevascular tumor (top) and a right hilar mass (bottom) over the course of one year on therapy. Red circles indicate areas of measurable disease.

Serial CT scan images from patient with a partial response



Scans demonstrate **gradual resolution of sites of disease** including a lung mass, matted hilar lymph nodes, and one of the liver metastases. Although he was taken off study for treatment of an intercurrent small cell lung cancer, he remains alive and was without evidence of disease recurrence nearly 2 years after completion of this therapy. Red arrows indicate areas of measurable disease.

Survival stratified by target gene methylation status

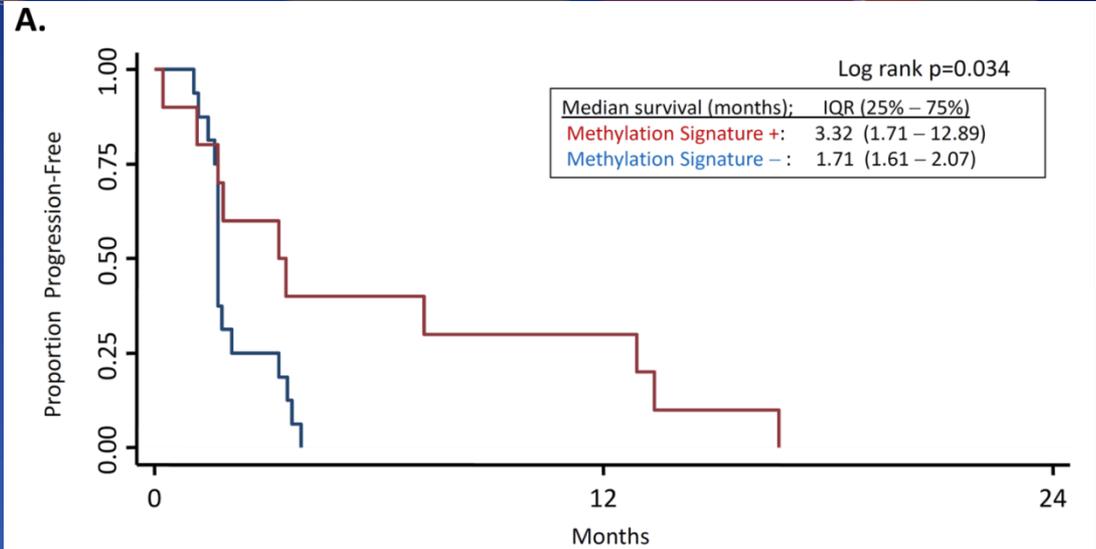
Promoter methylation of *APC*, *CDH13*, *RASSF1a*, and *CDKN2A* were evaluated in circulating plasma DNA from patients at pre-treatment and on day 29.

A. Progression-free survival

B. Overall survival

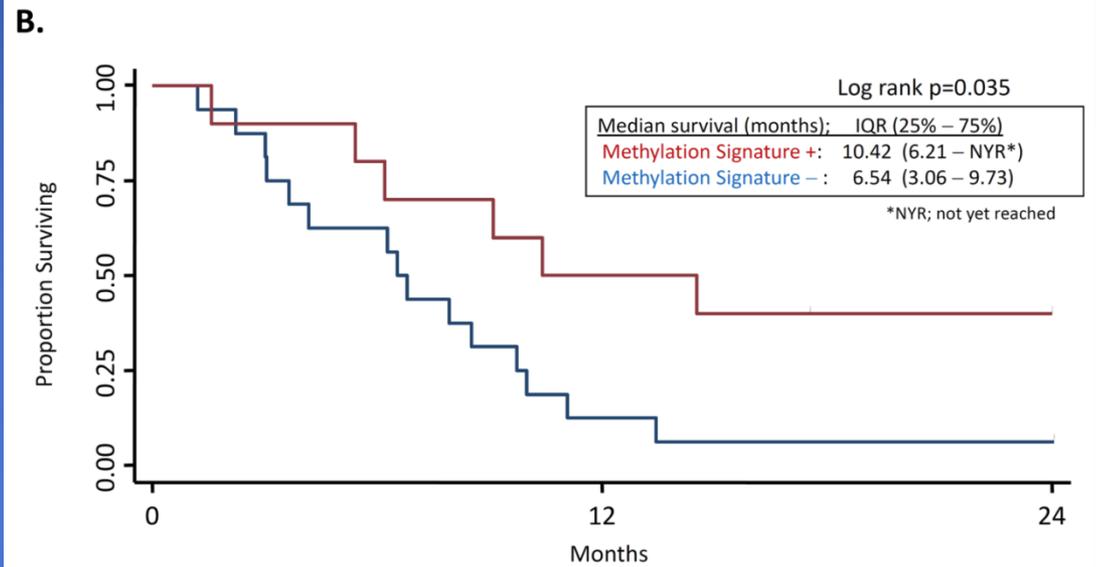
Red: patients with pre-treatment methylation of ≥ 2 of these 4 genes that demonstrate demethylation by day 29.

Blue: all other patients with detectable circulating DNA (total N = 26).



Number at Risk (% progression-free):

Signature +:	10 (100)	3 (30.0)	0 (0.0)
Signature -:	16 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)



Number at Risk (% alive):

Signature +:	10 (100)	5 (50.0)	3 (40.0)
Signature -:	16 (100)	2 (12.5)	1 (6.3)

Εξέλιξη και κλινική εφαρμογή των επιγενετικών φαρμάκων

Epigenetic drug discovery and the road ahead

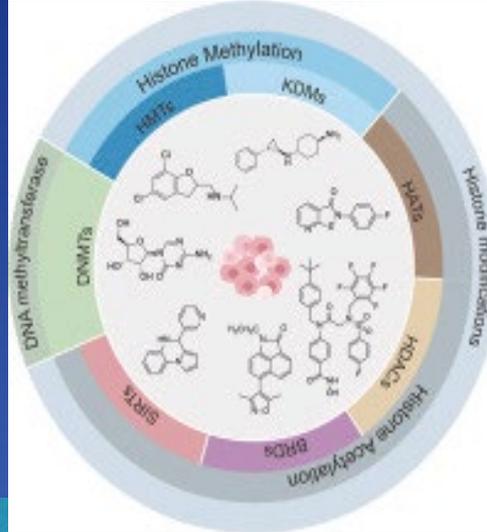
2004

FDA approved drugs
(DNMTi, HDACi)



2020

New drugs on the horizon



Targeting cancer
epigenetic pathways

Drug combination therapies

DNMTi + HDACi

Epigenetic drugs + targeted kinase inhibitors

Epigenetic drugs + chemotherapy

Epigenetic drugs + immunotherapy

Epigenetic drugs + others

Monotherapy

Drive tumor cell growth,
arrest, differentiation,
and cell death

Target cancer-specific
gene expression programs

Synthetic lethality
opportunities with
mutated epigenetic
enzyme complexes

Combinations

Enhance the activity and
durability of clinically
approved drugs

Combination synergies
with chemo and
targeted therapies

Target epigenetically-driven
drug resistant states

Immuno-oncology

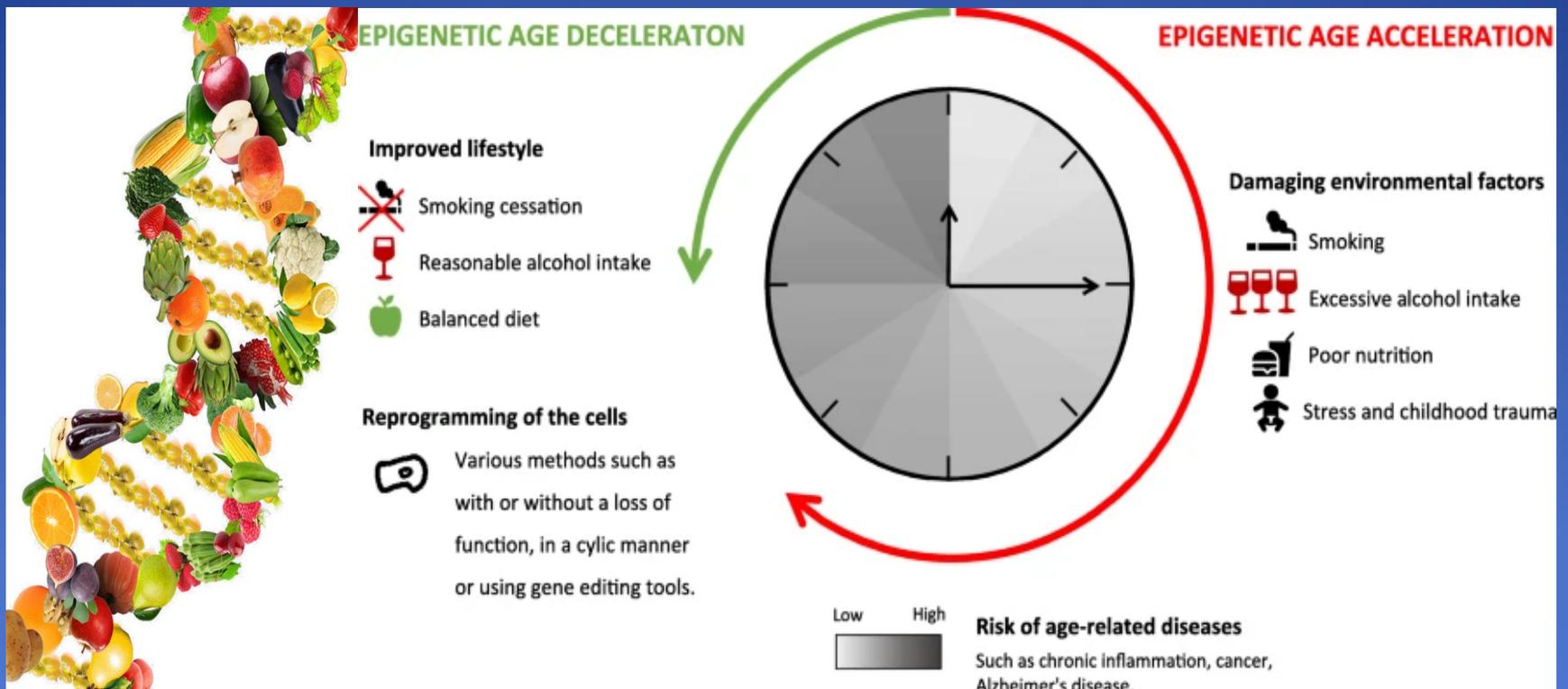
Improve patient responses to
immune checkpoint inhibitors

Prime immune system for
checkpoint therapies

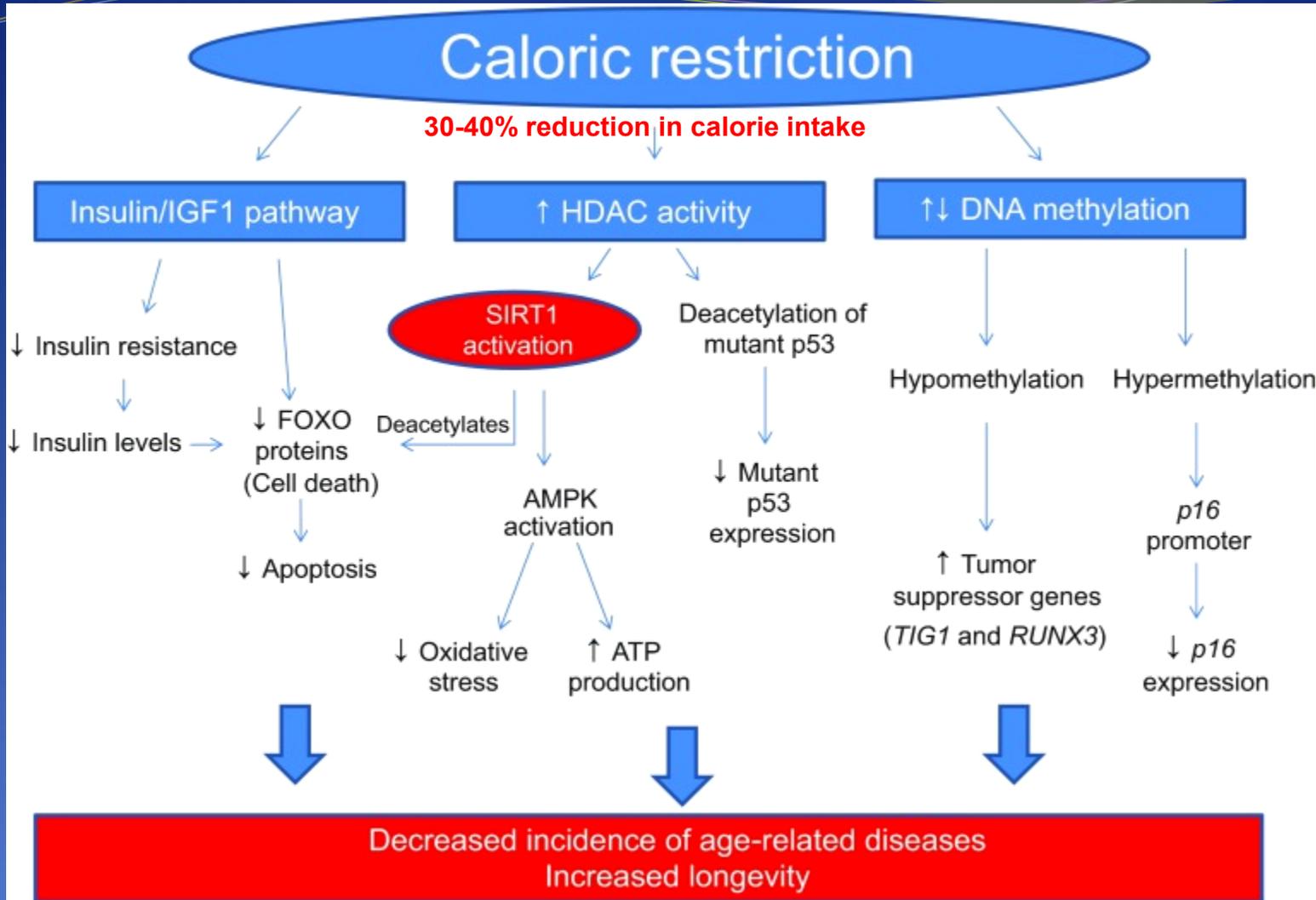
Reactive antigenicity
of "cold tumors"

Sustain anti-tumor
T-cell responses

Επίδραση της διατροφής στους επιγενετικούς μηχανισμούς – Nutriepigenomics

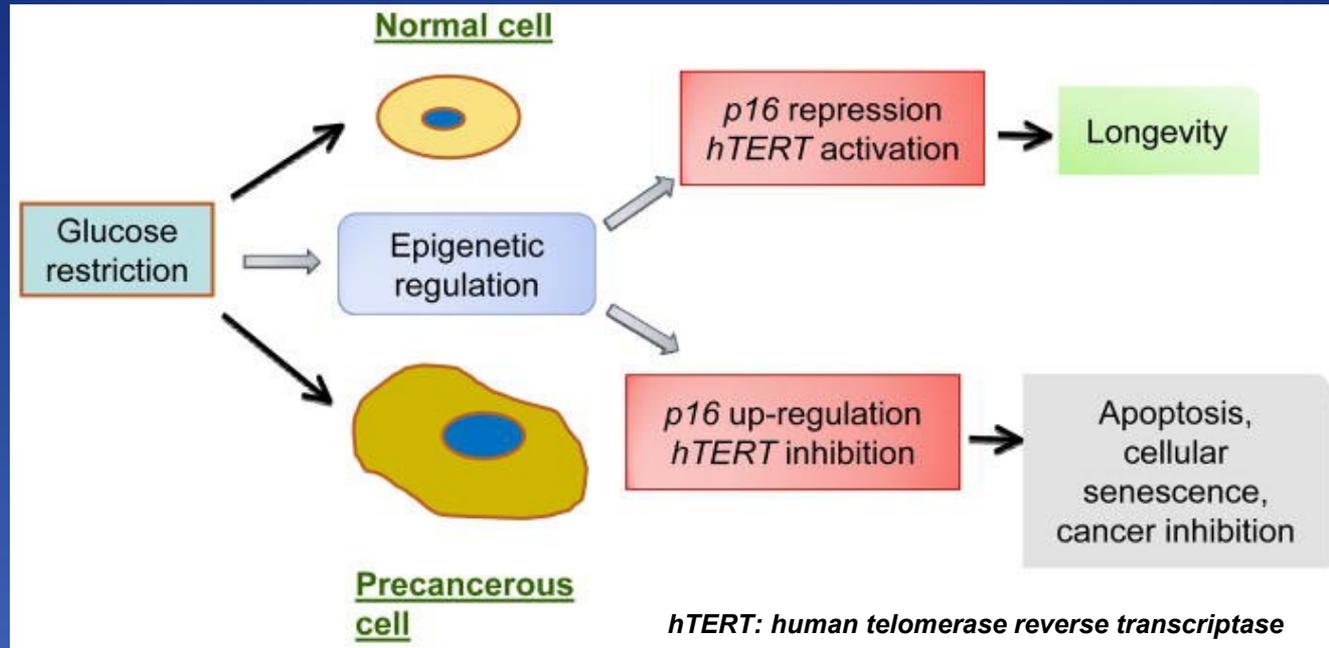


Επίδραση διατροφής με περιορισμό θερμίδων (caloric restriction) σε επιγενετικούς μηχανισμούς



- CR can act as an activator of SIRT1, which inhibits FOXO proteins, leading to a reduction in apoptosis
- CR has been characterized as a modulator of aberrant DNA methylation patterns, which are often associated with the aging process – preserves genome stability
- Studies have shown that hypermethylation of the *p16* promoter can be facilitated by CR, causing a notable decrease in *p16* expression and subsequent evasion of cellular senescence.

Επίδραση του περιορισμού γλυκόζης στους επιγενετικούς μηχανισμούς

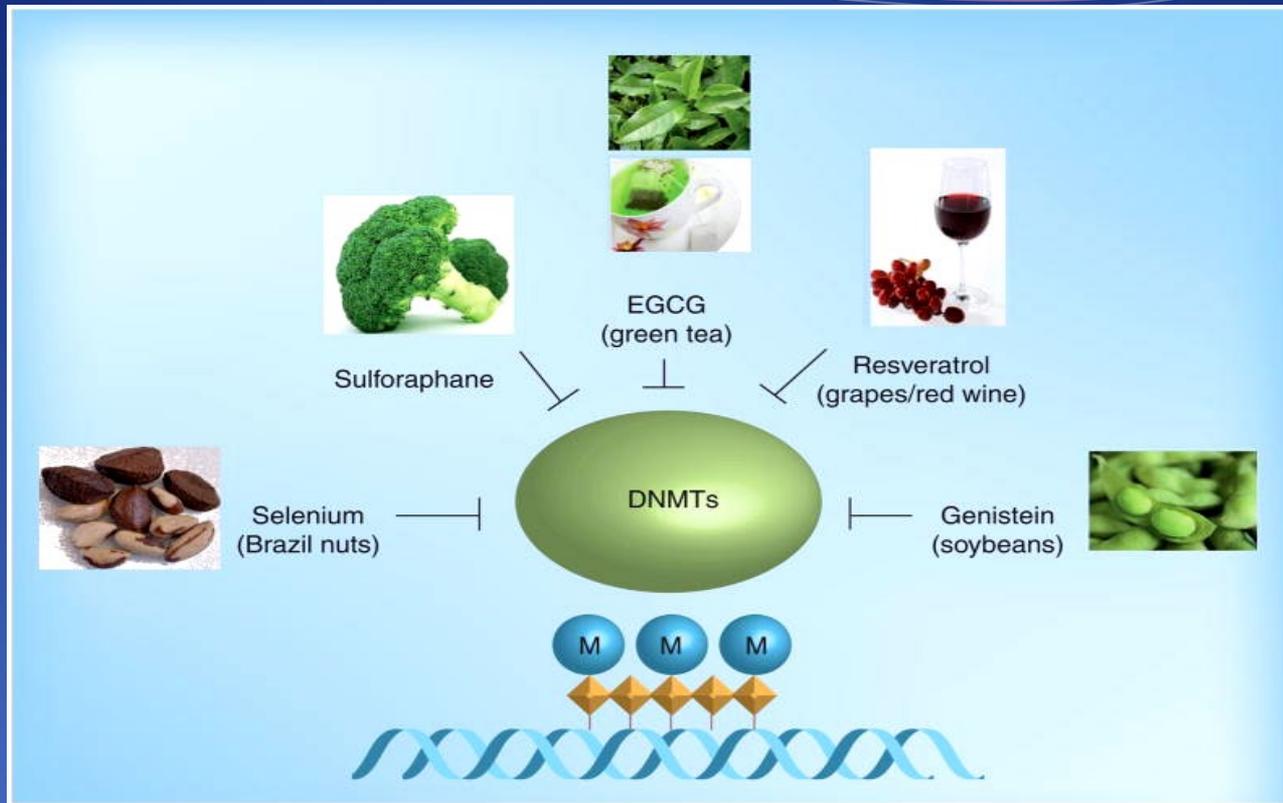


Glucose restriction can impact epigenetic regulation in both normal and cancer cell:

-In normal cells, it leads to *p16* repression (inhibits cellular senescence) and activates *hTERT*

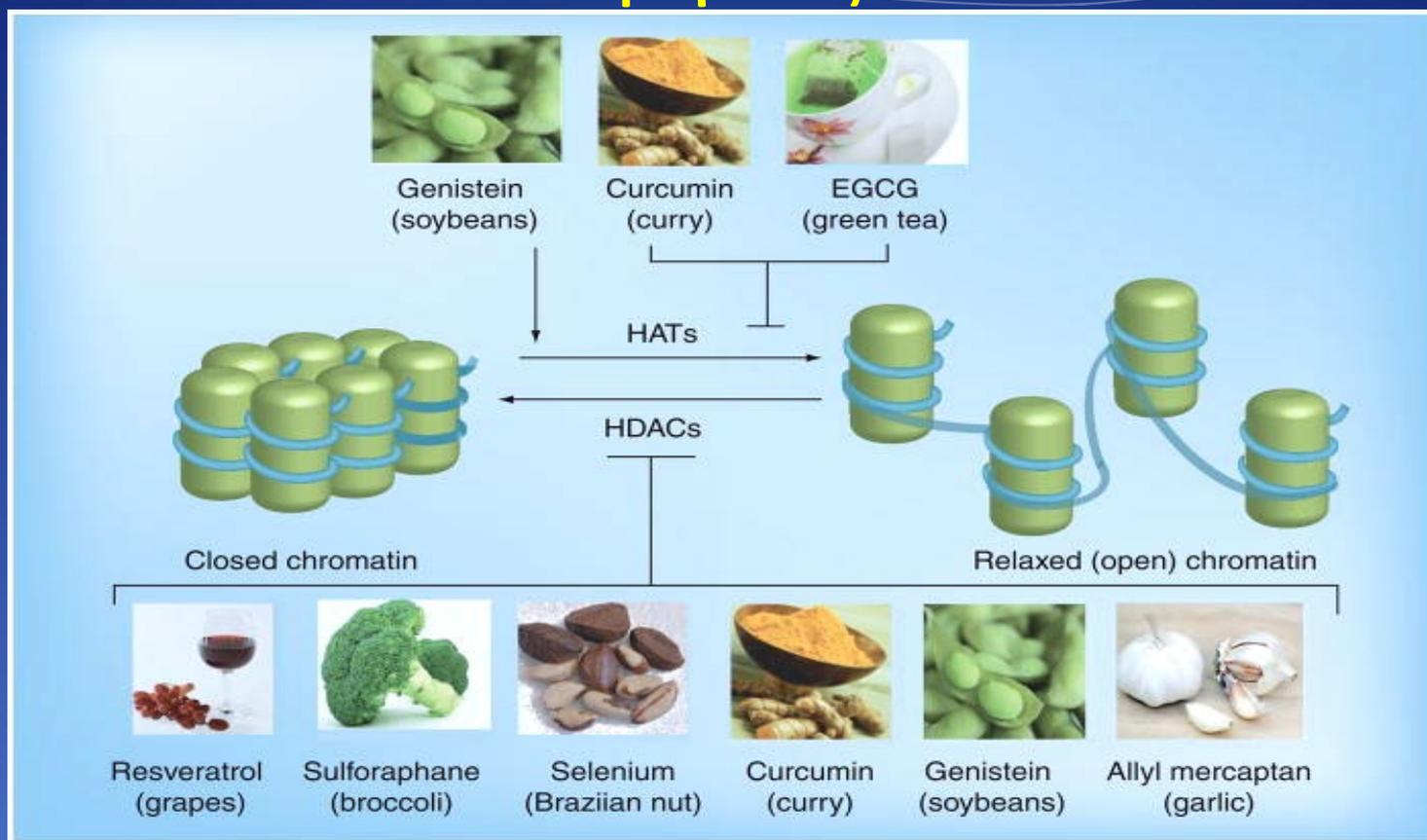
-In precancerous cells, the opposite effects on *p16* and *hTERT* lead to apoptosis, cellular senescence and cancer inhibition of the glucose restricted cells

Επίδραση στη μεθυλίωση του DNA από διατροφικούς παράγοντες



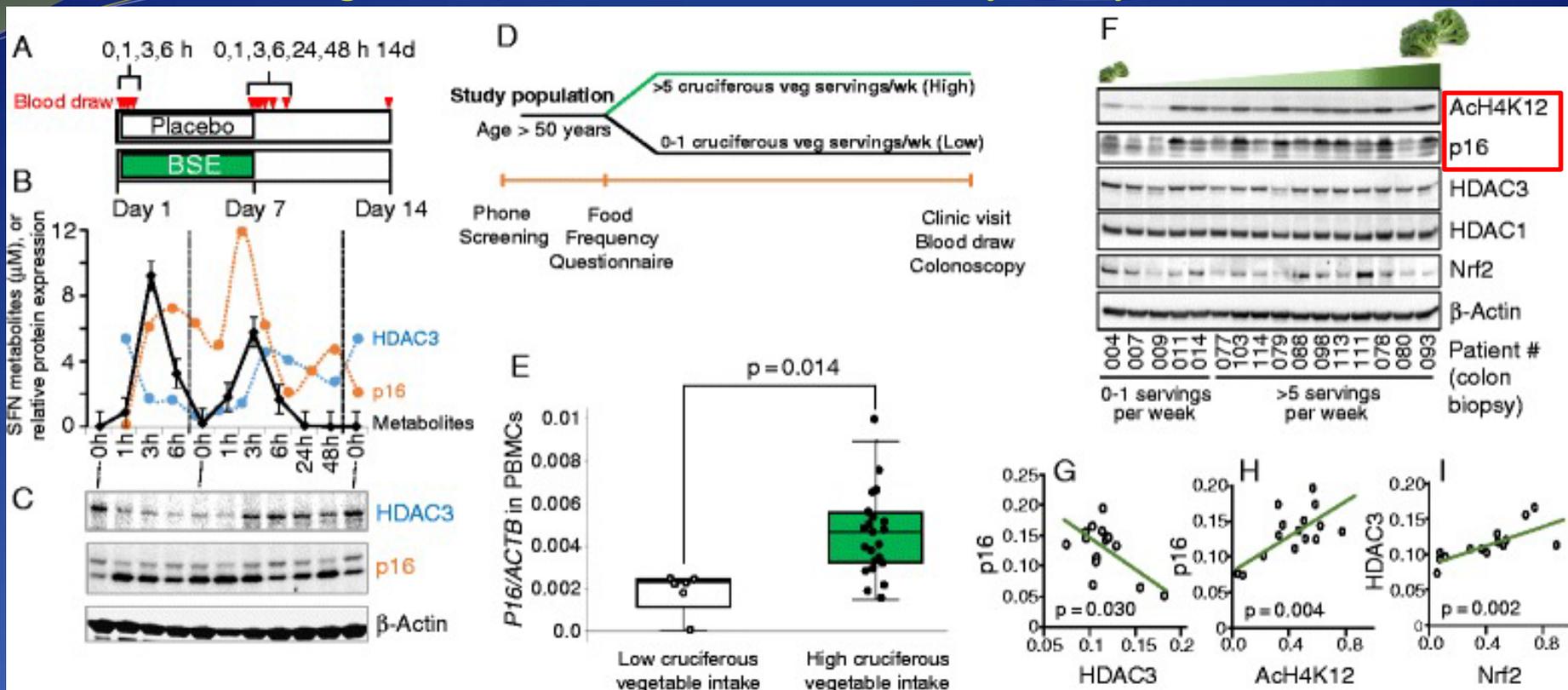
- DNMTs catalyze DNA methylation by adding a methyl group to cytosines of CpG dinucleotides
- **Hypermethylation of CpG dinucleotides** or CpG islands by DNMTs usually results in transcriptional gene silencing and **gene inactivation**
- Several bioactive compounds found in foods (e.g., EGCG in green tea) act as dietary inhibitors of DNA methyltransferases and also alter gene expression

Επίδραση στις τροποποιήσεις των ιστονών από διατροφικούς παράγοντες



- Inhibition of **histone acetylation** is done mostly by phytochemicals such as EGCG, genistein and curcumin through inactivation of histone acetyl transferase enzyme
- Inhibition of **deacetylation** of relaxed chromatin is accomplished by some other phytochemicals: sulforaphane, curcumin, genistein, phenyl isothiocyanate, organosulfur compound, resveratrol and indol 3 carbinol

Healthy human subjects given a broccoli sprout extract, or consuming high levels of cruciferous vegetables, have altered HDAC3 and p16 expression



Rajendran, *Clin Epigenetics*. 2015; 7(1): 102.

a Human subjects consumed a **broccoli sprout extract** supplement (BSE, 200 µmol SFN equivalent, IND #111736) or a placebo for 7 days, and blood was drawn at the times indicated.

b Total levels of SFN and its metabolites in plasma (*black symbols*), and **b, c** HDAC3 and p16 protein expression changes in circulating PBMCs.

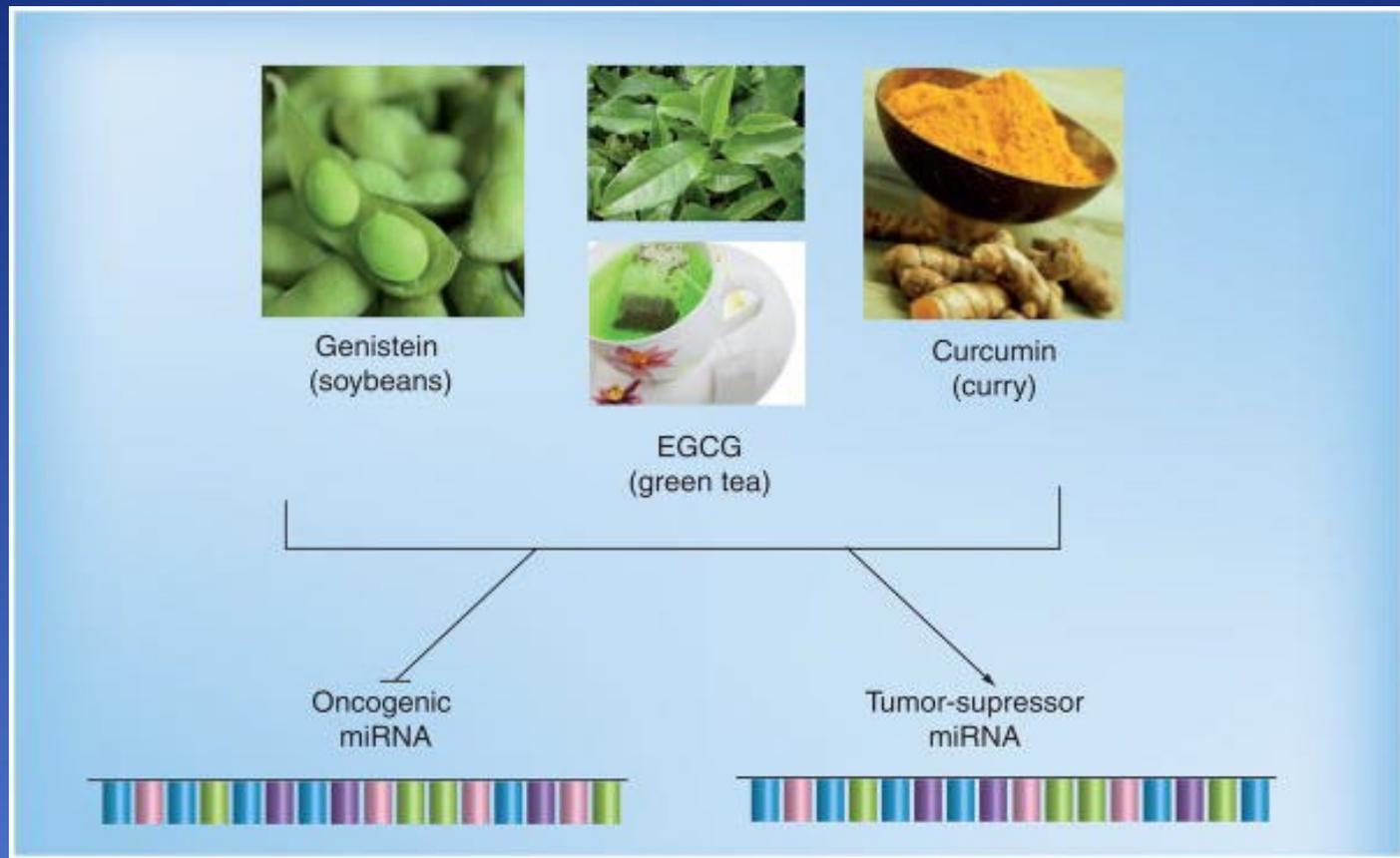
d Study design in screening colonoscopy patients.

e Relative mRNA expression of p16 in subjects reporting low (0–1 servings/week) vs. high (>5 servings/week) cruciferous vegetable intake for 3wks.

f Immunoblotting of colon biopsies, arranged left to right according to cruciferous vegetable intake.

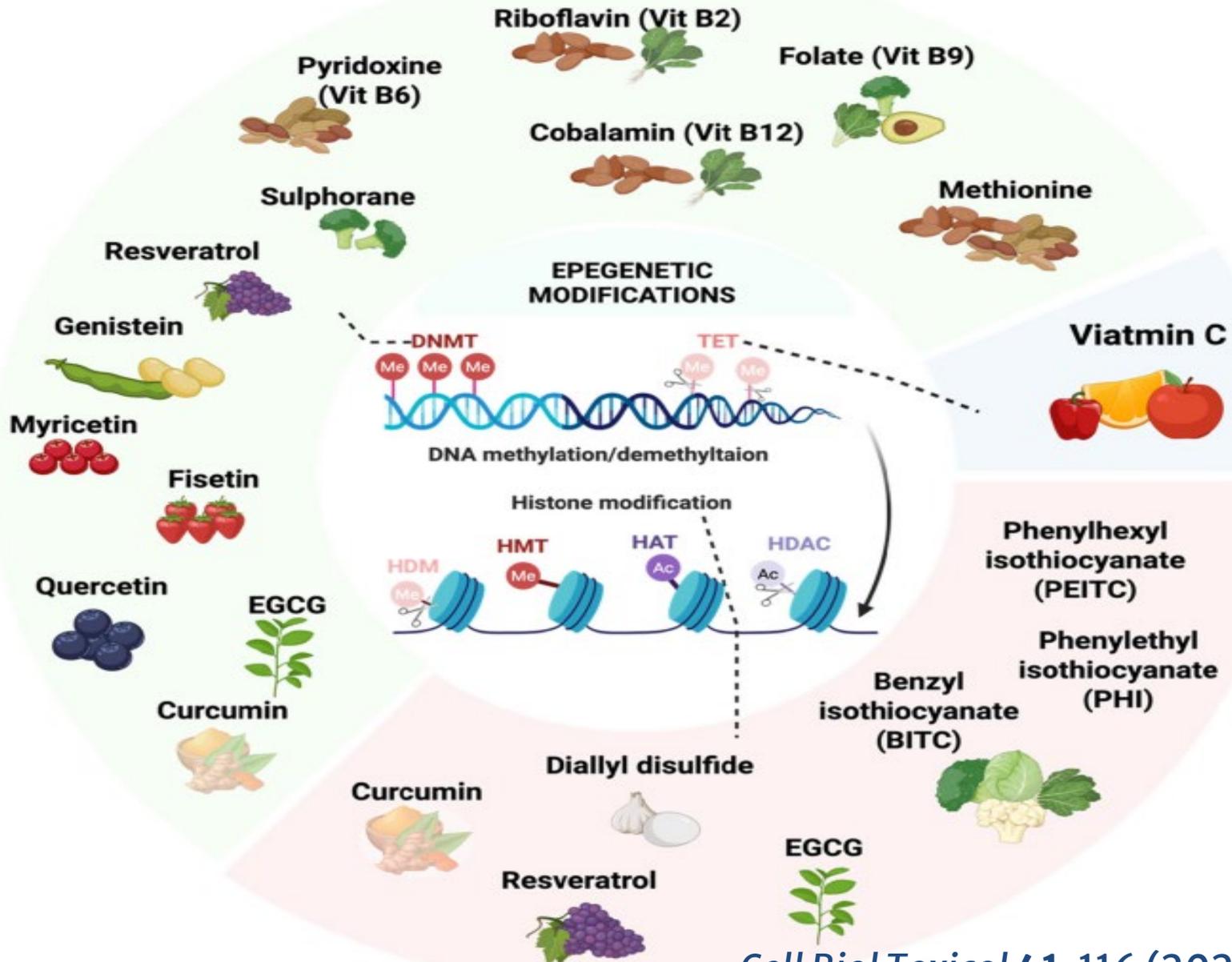
g–i Associations between p16, HDAC3, ACh4K12, and Nrf2 normalized to β-actin

Επίδραση στην έκφραση/δράση των miRNAs από διατροφικούς παράγοντες



- miRNAs serve as regulators of gene expression
- dietary agents target the miRNA of oncogenes and/or tumor suppressors and impact the expression level of miRNAs

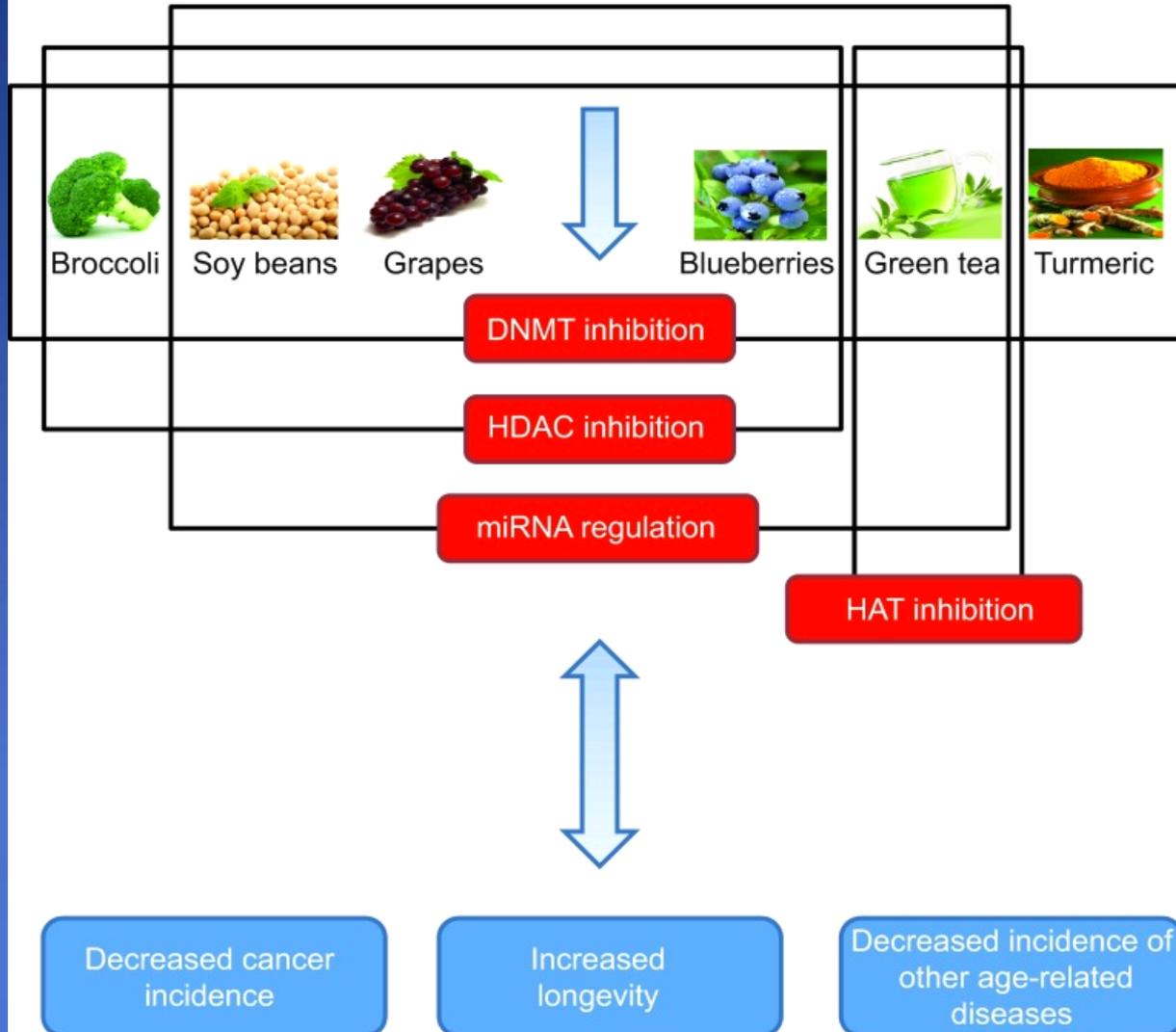
Epi-nutrients for cancer prevention



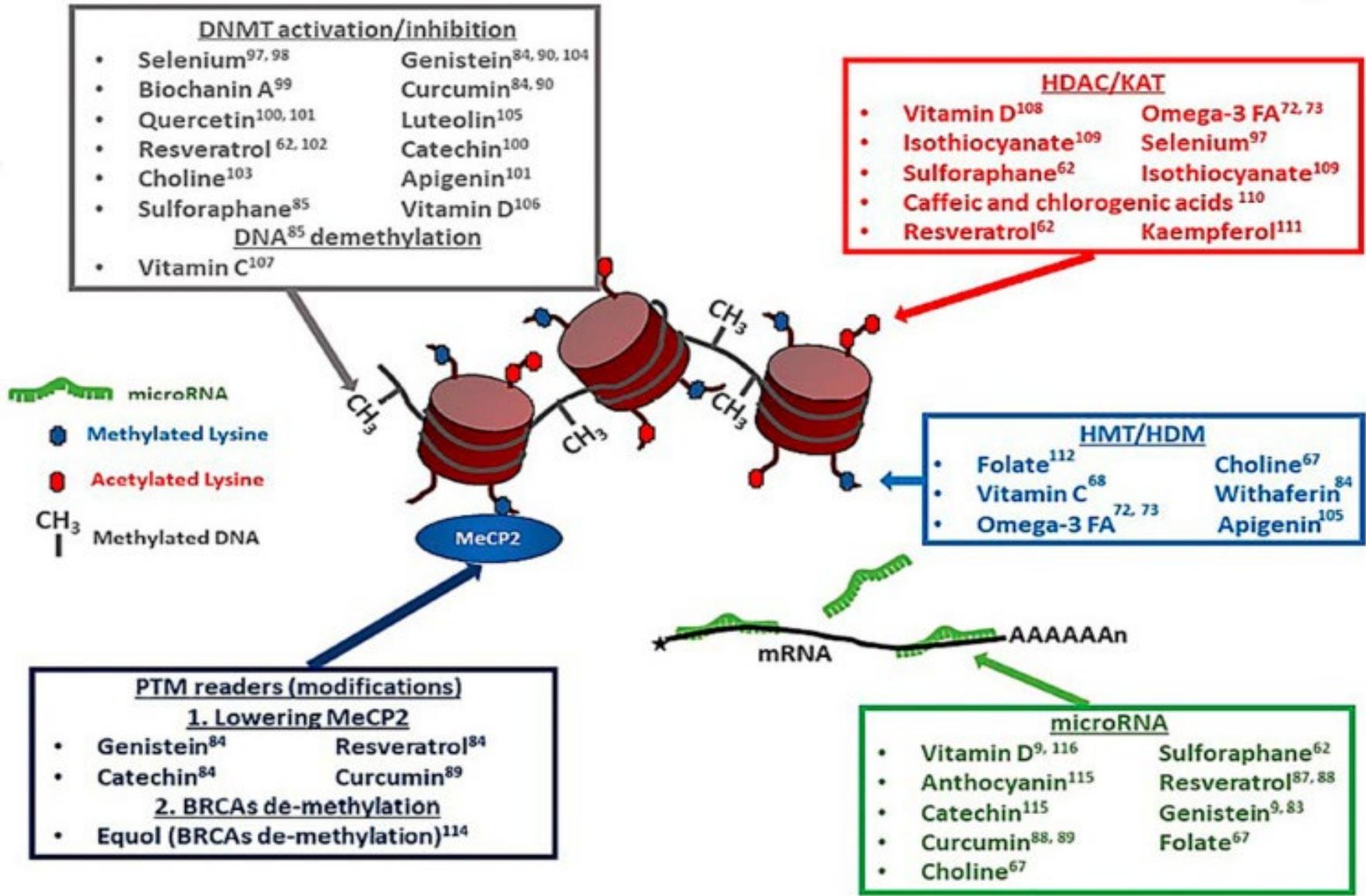
Bioactive compounds targeting epigenetic marks

<i>Bioactive compound</i>	<i>Dietary source</i>	<i>Main molecular target(s)</i>	<i>Cancer type</i>
Sulforaphane	Vegetables such as broccoli, cabbage, and kale	H3 and H4 acetylation, H3K9ac, H3K9me3, HBD-2, H3K27me3, RAR β , HBD-2, p21, BAX/HDAC	Myeloma, prostate, leukemia, colorectal, breast
Curcumin	Turmeric	H3 and H4 acetylation, p53, GATA4, GZMB, PRF1, EOMES/HAT, HDAC	Leukemia, liver, cervical, pancreas
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	Green tea	H3 and H4 acetylation, H3K27m3, NF-kB, IL-6, BMI-1, EZH2, SUZ12/HAT, HDAC, HMT	Esophageal, skin, breast, lung, oral, hepatocellular
Butyrate	Cheese, butter colonic fermentation of dietary fiber	H3 and H4 acetylation HDAC, NRF2	Leukemia, colorectal, prostate
Resveratrol	Plants such as blueberries, mulberries, cranberries, peanuts, and grapes; its most abundant dietary source is red wine	TNF α , IL-8, RBP/SIRT1	Breast, prostate
Diindolylmethane (DIM) and indol-3-carbinol (I3C)	Brassica vegetables such as broccoli, Brussels sprouts, cabbage and kale	COX-2/HDAC	colon
Genistein	Soybeans and soy products	H3, H4, H2A and H2B acetylation, H3K4me2, H3K9me3, p21, p16, PTEN, p53, FOXA3, BTG3, RAR β , hTERT, CCLD/HAT, HDAC, SIRT1, p16	Esophageal, prostate, breast, renal
Phenethylisothiocyanate (PEITC)	Crucifer vegetables	H3 and H4 acetylation, p21, GSTP1/HDAC	Leukemia, prostate, pancreas, breast
Organosulfur compounds	Allium vegetables such as garlic	H3 and H4 acetylation, p21/HDAC	Breast, liver, colon
Quercetin	Buckwheat and citrus fruits	IP-10, MIP-2/HAT, SIRT1	Liver, skin
Ellagitannins	Pomegranates, raspberries, walnuts	HDAC and HAT	

Epigenetic diet



Dietary compounds affect different epigenetic mechanisms



Epigenetic diet compounds	Food sources	Epigenetic functions
EC, ECG, EGC and EGCG	Green tea	DNMT and HAT inhibitor, modulates miRNA
Resveratrol	Grapes, peanuts, mulberries, cranberries, blueberries	DNMT and HDAC inhibitor
Curcumin	Tumeric, curry	DNMT inhibitor and miRNA modulator
Genistein	Soybeans, fava beans	DNMT and HDAC inhibitor, enhances HATs, modulates miRNA
Isothiocyanates, sulforaphane	Broccoli, cabbage, kale, watercress	DNMT and HDAC inhibitor
Selenium	Brazilian nuts, chicken, game meat, beef	DNMT and HDAC inhibitor
Allyl mercaptan, organosulfur compounds	Garlic	HDAC inhibitor
Folate	Beans, grains, fortified breakfast cereals, pastas, green vegetables	Deficiencies alter DNA methylation patterns

Επιγενετική διατροφή – Μελλοντικές κατευθύνσεις

- Κυρίως χημειοπροφυλακτική δράση
- Πιθανή συνδυαστική εφαρμογή με φάρμακα για καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία
- Ανάγκη προσδιορισμού δοσολογίας βιοδραστικών ενώσεων και χρόνου χορήγησης
- Ανάγκη αποτελεσμάτων επιδημιολογικών μελετών για προσδιορισμό χημειοθεραπευτικής δράσης

Εκπαιδευτικοί στόχοι

- Ορισμός της επιγενετικής και τη σημασία της
- Κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί και τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτούς
- Συμμετοχή των επιγενετικών μηχανισμών στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης
- Τρόποι μελέτης των επιγενετικών τροποποιήσεων
- Θεωρητική προσέγγιση της στοχευμένης επιγενετικής θεραπείας
- Ρόλος της διατροφής στους επιγενετικούς μηχανισμούς
- Ορισμός και σύσταση της επιγενετικής δίαιτας

Προτεινόμενη βιβλιογραφία

1. Επιγενετική. Lyle Armstrong. Πανεπιστημιακές Εκδ. Κρήτης
2. Γονιδιώματα: Σύγχρονες ερευνητικές προσεγγίσεις. T.A.Brown. Εκδ. Πασχαλίδης
2. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705.
3. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. Mol Cancer Ther. 2009 Jun;8(6):1409-20.
4. Julie C. Kiefer. Epigenetics in development. Developmental Dynamics. Volume236, Issue4. April 2007. Pages 1144-1156
5. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. Sci Adv. 2016;2(7):e1600584. Published 2016 Jul 29. doi:10.1126/sciadv.1600584
6. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. Epigenomics. 2011 Aug;3(4):503-18. doi: 10.2217/epi.11.71. PMID: 22022340; PMCID: PMC3197720.
7. Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. J Exp Biol. 2015 Jan 1;218(Pt 1):59-70. doi: 10.1242/jeb.107110. PMID: 25568452; PMCID: PMC4286704.
8. Yang, C., Snelson, M., El-Osta, A. et al. Parental diet and offspring health: a role for the gut microbiome via epigenetics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 22, 755-772 (2025).