

# Klinička vrijednost analize epigenetičkog potpisa u neurorazvojnim poremećajima

---

**Dobrošević, Matej**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:286881>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matej Dobrošević**

**Klinička vrijednost analize epigenetičkog potpisa u  
neurorazvojnim poremećajima**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Katušić-Bojanac. Predan je na ocjenu akademske godine 2023./2024.

# POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

**DNA** deoksiribonukleinska kiselina

**CpG** dinukleotid citozina i gvanina

**VUS** varijanta nepoznatog značaja

**CH<sub>3</sub>** metilna skupina

**DNMT** deoksiribonukleinska kiselina  
metiltransferaza

**5mC** 5-metilcitozin

**CH<sub>3</sub>CO** acetilna skupina

**HST** histon acetiltransferaza

**HDAC** histonske deacetilaze

**DMC** diferencijalno metilirani dinukleotid  
citozina i gvanina

**DMP** diferencijalno metilirana proba

**DMR** diferencijalno metilirana regija

**ADHD** Poremećaj pažnje i hiperaktivnost

**aCGH** komparativna genomska

hibridizacija na mikročipu

**CMA** analiza kromosomalnog  
mikropostroja

**ES** sekvenciranje egzoma

**WGS** sekvenciranje cijelog genoma

**RNA-seq** sekvenciranje ukupne RNA

**LoF** patološka varijanta gubitka funkcije

**PCR** lančana reakcija polimeraze

**NGS** sekvenciranje nove generacije

**SNP** polimorfizam jednog nukleotida

**SVM** Stroj potpornih vektora

**PLR** regularizirana logistička regresija

**RF** slučajna šuma

**MVP** patogenost metilacijske varijante

**XCI** inaktivacija X kromosoma

**WES** sekvenciranje cijelog egzoma

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	0
<b>2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI</b> .....	1
<b>2.1 Epigenetičke promjene</b> .....	1
<b>2.1.1 Metilacija DNA</b> .....	1
<b>2.1.2 Acetilacija histona</b> .....	2
<b>2.2 CpG otoci</b> .....	3
<b>2.3 Epigenetički potpis</b> .....	3
<b>3. NEURORAZVOJNI POREMEĆAJI</b> .....	5
<b>3.1. Obilježja, klasifikacija i klinička obrada</b> .....	5
<b>3.2. Utjecaj epigenetičke disregulacije na nastanak neurorazvojnih poremećaja</b> .....	6
<b>4. ANALIZA EPIGENETIČKOG POTPISA</b> .....	7
<b>4.1 Bisulfitna konverzija</b> .....	7
<b>4.2 Analiza metilacije DNA na hibridizacijskim čipovima</b> .....	8
<b>5. KLINIČKI ZNAČAJ</b> .....	11
<b>5.1 Neurorazvojni poremećaji s epigenetičkim potpisom</b> .....	11
<b>5.1.1. Analiza epigenetičkog potpisa X kromosoma</b> .....	15
<b>5.2 Ograničenja analize epigenetičkog potpisa</b> .....	16
<b>5.3 Korisnost analize epigenetičkog potpisa u klinici</b> .....	17
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	19
<b>7. ZAHVALE</b> .....	20
<b>8. LITERATURA</b> .....	21
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	26

# SAŽETAK

## **Klinička vrijednost analize epigenetičkog potpisa u neurorazvojnim poremećajima**

Matej Dobrošević

Neurorazvojni poremećaji skupina su poremećaja s teškoćama u osobnom, socijalnom, akademskom i/ili okupacijskom funkcioniranju, a za sve više njih se otkriva povezanost s promjenama u epigenomu pojedinca koje potom utječu na fenotip. Općenito, epigenetički mehanizmi omogućuju da se više različitih fenotipa ispolji kao produkt jednog genotipa. Promjena u metilaciji DNA pa tako i aktivnosti gena, dovodi se u vezu s nastankom raka i mnogih drugih bolesti. Epigenetički potpis uključuje, između ostalog, skup diferencijalno metiliranih citozina i specifičan je za točno određenu stanicu. Specifičan je s obzirom na tkivo, dob te prisutnu patologiju. Analiza obrasca metilacije DNA, odnosno epigenetičkog potpisa, može neizravno ukazati na promjene u ekspresiji raznih gena i promjene u efikasnosti raznih enzima i ostalih proteina uključenih u proces metilacije, te tako, bez sekvenciranja same patološke varijante, točno ukazati na njenu prisutnost i efekt. Kod velikog broja rijetkih neurorazvojnih poremećaja zamijećena je podliježuća patološka varijanta gena uključenih u proces metilacije DNA. Analiza metilacije DNA kvantificira stupanj metilacije DNA, te točno određuje koji CpGovi su metilirani ili nemetilirani. Dosadašnjim analizama epigenetički potpis je definiran za mnoge rijetke neurorazvojne poremećaje. Uspoređivanje epigenetičkog potpisa nedijagnosticiranih pacijenata s definiranim potpisima može pomoći postavljanju kliničke dijagnoze. Stoga se počeo koristiti u klasifikaciji varijanti nejasnog značaja i inicijalnom postavljanju dijagnoze, a potencijalno i kao metoda ranog probira, identifikacije mogućih meta za razvoj novih lijekova i korak ka personaliziranoj medicini.

Ključne riječi: epigenetički potpis; neurorazvojni poremećaji; metilacija DNA

# SUMMARY

## **Clinical value of epigenetic analysis in neurodevelopmental disorders**

Matej Dobrošević

Neurodevelopmental disorders are a group of disorders with difficulties in personal, social, academic and/or occupational functioning, and for more and more of them, a connection with changes in the epigenome of the individual is being discovered, which then affects the phenotype. In general, epigenetic mechanisms allow multiple different phenotypes to manifest as a product of a single genotype. Changes in methylation, and thus gene activity, are linked to the development of cancer and many other diseases. The epigenetic signature includes a set of differentially methylated cytosines specific to a particular cell. It is specific with respect to tissue, age, and the presence of pathology. Analysis of DNA methylation levels, or the epigenetic signature, can indirectly indicate changes in the expression of various genes and changes in the efficiency of various enzymes and proteins involved in the methylation process, and in this way, without sequencing the pathological variant itself, accurately indicate its presence and effect. In a large number of rare neurodevelopmental disorders, an underlying pathological variant of genes involved in the methylation process has been observed. Methylation analysis quantifies the degree of methylation and precisely determines which CpGs are methylated or unmethylated. Previous analyses have defined the epigenetic signature for many rare neurodevelopmental disorders. Comparison of the epigenetic signature of undiagnosed patients with defined signatures can help establish a clinical diagnosis. Thus, it has started to be used in the classification of variants of uncertain significance (VUS) and initial diagnosis. Also, potentially, as a method for early screening, identification of possible targets for the development of new drugs, and a step towards personalized medicine.

Key words: epigenetic signature, neurodevelopmental disorders, DNA methylation

# 1. UVOD

Iako pojedinačno rijetke, od rijetkih bolesti ukupno boluje 1% populacije. U nekim slučajevima, pacijenti konačnu dijagnozu dobivaju tek nakon više godina dijagnostičke „odiseje“. Iznimka nisu ni rijetki, genetski uzrokovani neurorazvojni poremećaji. Fenotip neurorazvojnih poremećaja uzrokovanih patološkim varijantama gena modulatora kromatina, osim što se uvelike međusobno preklapa među poremećajima, ponekad je suptilan i neprepoznatljiv. Genetska obrada ovih pacijenata često rezultira pronalaskom varijanti nepoznatog značaja (engl. *variant of uncertain/unknown significance, VUS*), što dodatno odgađa postavljanje ispravne dijagnoze i mogućnost terapijske intervencije. Ipak, posljednjih se godina kao potencijalno rješenje navedenog problema obećavajućom pokazala analiza epigenetičkog potpisa, tj. specifičnog profila metilacije genoma pacijenata oboljelih od neurorazvojnih poremećaja, pa je za velik broj njih isti i definiran. U skorijoj bi budućnosti klinička analiza epigenetičkog potpisa uzoraka krvi pacijenata sa simptomima neurorazvojnih poremećaja bila korisna za one koji još nemaju konačnu dijagnozu te za potencijalno postavljanje iste.



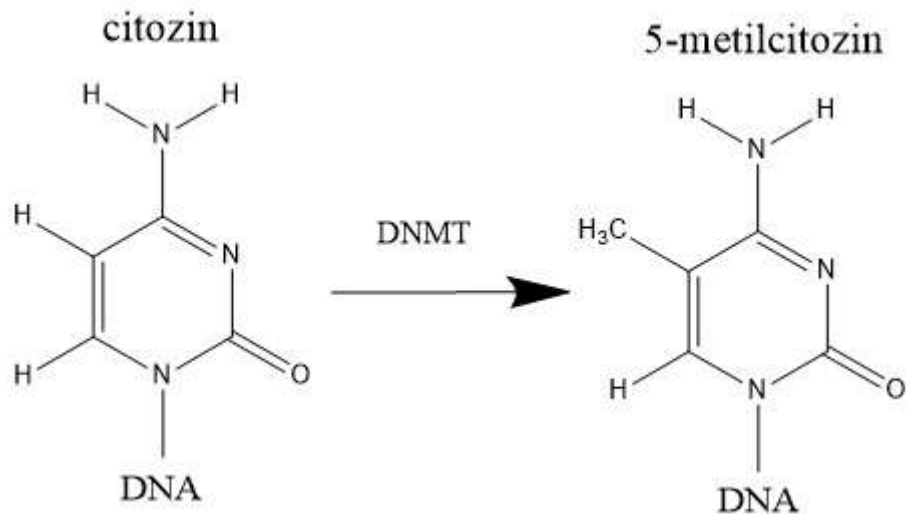
## 2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI

### 2.1 Epigenetičke promjene

Epigenetika podrazumijeva promjene u ekspresiji gena koje nisu rezultat promjene genetskog koda. Modificirajući sveukupnu strukturu i kondenzaciju kromatina produkti gena remodelatora kromatina utječu na povećanje ili smanjenje ekspresije određenih gena ili skupine gena u molekuli DNA formirajući time specifičnost organizacije kromatina u stanici koji zovemo epigenetički obrazac. Isti je često stabilan pa se prenosi tijekom dioba na stanice kćeri. Epigenetički obrasci omogućuju da se više različitih fenotipa ispolji kao produkt jednog genotipa. Neki od najčešćih epigenetičkih mehanizama su: metilacija DNA i acetilacija histona.(1) Osim patoloških varijanti gena remodelatora kromatina promjene mogu uzrokovati i okolišni uzroci.(2)

#### 2.1.1 Metilacija DNA

Metilacija DNA je biokemijski proces u kojemu se metilna skupina ( $\text{CH}_3$ ) kovalentno veže na peti ugljikov atom citozinskog prstena. Proces se odvija pod utjecajem enzima DNA-metiltransferaze (DNMT). Produkt ove reakcije je 5-metilcitozin (5mC).(slika1) Ekspresija gena može se utišati metilacijom njegove promotorne regije. Metilacija DNA je od presudne važnosti za procese: lionizacije, utišavanja aktivnosti embrionalnih i retroviralnih gena, tkivne specifičnosti i genetskog utiska (*imprinting*). Promjena u metilaciji, pa tako i aktivnosti gena, dovodi se u vezu s nastankom raka i mnogih drugih bolesti.(1,3,4)



Slika 1. Metilacija citozina uz enzim DNA-metiltransferazu.

## 2.1.2 Acetilacija histona

Acetilacija histona modifikacija je koja podrazumijeva adiciju acetilne skupine (CH<sub>3</sub>CO) na histonske proteine. Enzim histon-acetiltransferaza (HAT) dodaje acetilnu skupinu na lizinske ostatke slobodnih repova histona. Enzimi histonske deacetilaze (HDAC) uklanjaju acetilne skupine sudjelujući tako u obratnome procesu. Acetilacija neutralizira pozitivne naboje lizina, smanjujući time interakciju histona i negativno nabijene DNA. Rezultat je opuštenija struktura kromatina koja elementima transkripcije omogućuje pristup DNA. Na taj način također utječe na remodeliranje kromatina i poticanje transkripcije DNA.<sup>(5)</sup> Modifikacija histona je u nekim slučajevima ovisna o metilaciji DNA.<sup>(6)</sup>

## 2.2 CpG otoci

U genomu sisavaca najčešće su metilirani citozini popraćeni gvaninom (CpG) u 5' ka 3' smjeru. Simbol „p“ u izrazu CpG predstavlja fosfatnu skupinu koja ih spaja. Mjesta u genomu koja obiluju ovim dinukleotidom nazivaju se CpG otoci. Često se nalaze pri ili unutar samih promotora gena. Prosječne su duljine 300-3000 parova baza (bp) i nalaze se uz 40-60% promotorskih regija humanog genoma. Većinom su nemetilirani i omogućuju aktivnu transkripciju gena. Vezano za CpG otoke, definirani su i pojmovi CpG obala (regije do 2 kilobaze(kb) udaljene od CpG otoka), CpG priobalja (udaljenih 2-4 kb) te CpG mora (s udaljenošću većom od 4kb).(7–10)

## 2.3 Epigenetički potpis

Analizirajući metilaciju gena stanice mogu se definirati diferencijalno metilirani CpGovi (DMC), odnosno odgovarajuće diferencijalno metilirane probe (DMP). Regije uzastopnih DMC-ova ili DMP-ova u proksimitetu definira se kao diferencijalno metilirana regija (DMR). Specifični defekt metilacije koji zahvaća jedan DMC/DMP naziva se epigenetička varijanta (engl. *epigenetic variant*). Skup DMC-ova/DMR-ova specifičan za točno određenu stanicu jednoga tkiva naziva se epigenetički potpis (engl. *epigenetic signature*).(11) Osim što je specifičan za različite tipove stanica (npr. leukocite i neurone)(12), epigenetički potpis je specifičan i za različite poremećaje, te dob.(13,14) Naime, razni poremećaji mogu uzrokovati hipometilaciju genoma, hipermetilaciju genoma, ili oboje.(15,16) Dodatno tomu, analiza stupnja metilacije DNA, odnosno epigenetičkog potpisa, može neizravno ukazati na promjene u ekspresiji raznih gena i promjene u efikasnosti

raznih enzima i proteina uključenih u proces metilacije, te na taj način, bez sekvenciranja same patološke varijante, točno ukazati na njenu prisutnost.(17)

## 3. NEURORAZVOJNI POREMEĆAJI

### 3.1. Obilježja, klasifikacija i klinička obrada

Neurorazvojni poremećaji skupina su poremećaja koji nastupaju pri razvojnem periodu, većinom prije polaska u školu i karakterizirani su teškoćama u osobnom, socijalnom, akademskom i/ili okupacijskom funkcioniranju. Prezentiraju se negativnim (npr. manjak koncentracije) i pozitivnim (npr. prenaplašene repetitivne radnje) simptomima. Uključuju intelektualne teškoće, poremećaje komunikacije, poremećaje iz spektra autizma, ADHD, specifične poremećaje učenja, poremećaje pokreta te ostale neurorazvojne poremećaje.(18)

Rijetke bolesti su definirane kao one s incidencijom  $>1/2000$ . Iako je sama etiologija neurorazvojnih poremećaja vrlo kompleksna i nije u potpunosti razjašnjena, kod velikog broja poremećaja je zamijećena genetska podloga.(19) U ovim poremećajima su zabilježeni deficiti čimbenika remodeliranja kromatina, proliferacije, sinaptogeneze i diferencijacije stanica mikroglije. (20) Njihova klinička slika se uvelike preklapa te često uključuje zaostanak u psihomotornom, govornom i mentalnom razvoju, hipotoniju i autistično ponašanje. Navedeno je primjenjivo i na sljedeće primjere takvih poremećaja: Sotos sindrom (1-9/100 000), Kabuki sindrom (1-9/100 000) i Coffin-Siris sindrom( $<1/1\ 000\ 000$ ). (21)

Standardna klinička obrada pacijenata s karakterističnim simptomima neurorazvojnih poremećaja obuhvaća komparativnu genomsku hibridizaciju na mikročipu (Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)), analizu kromosomalnog mikropostroja (chromosomal microarray analysis (CMA)) i „trio“ sekvenciranje egzoma (ES).(22) Trio sekvenciranje egzoma podrazumijeva analizu egzoma pacijenta, te njegovih bioloških roditelja. Ponekad korištenje

kombinacije ovih dijagnostičkih metoda samo po sebi nije dostatno za postavljanje dijagnoze. Kao dijagnostički postupci druge linije, kombinacija sekvenciranja cijelog genoma (WGS), sekvenciranja ukupne RNA (RNA-seq) i analize epigenetičkog potpisa, daju dobre rezultate u klasifikaciji nedijagnosticiranih slučajeva neurorazvojnih poremećaja.(23)

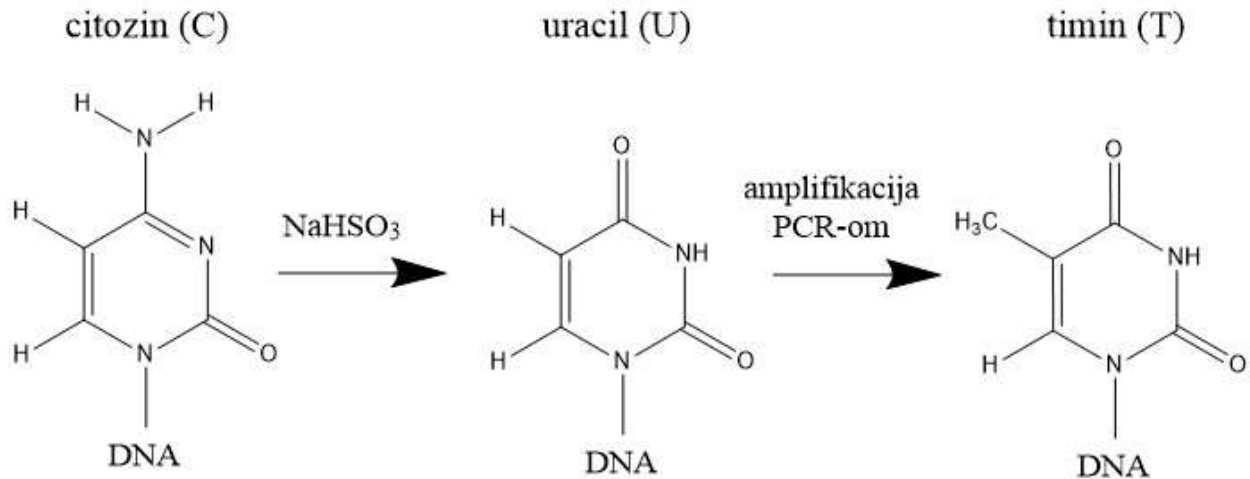
## **3.2. Utjecaj epigenetičke disregulacije na nastanak neurorazvojnih poremećaja**

Pravilna ekspresija gena uključenih u proces prekrajanja RNA, nekodirajućih RNA, DNA metiltransferaza, demetilaza, histonskih acetiltransferaza i deacetilaza nužna je za održavanje homeostaze tkiva te razvoj i diferencijaciju stanica koje ga čine.(24) Patološke varijante koje uzrokuju gubitak funkcije (LoF) tih gena mogu u ključnom razvojnem periodu onemogućiti pravilan razvoj i povezivanje moždanih struktura.(25,26) Analizirani uzorci pacijenata oboljelih od neurorazvojnih poremećaja pokazali su alterirani epigenetički profil gena uključenih u procese razvoja živčanog sustava, neurogenezu, sinaptičku transmisiju i signalizaciju.(27) Koliko su produkti gena remodelatora kromatina presudni u razvoju neurološkog sustava govori i činjenica da se neurorazvojni poremećaji javljaju već i pri haploinsuficijenciji mnogih od njih.(15,17,28,29) Potpuni gubitak funkcije istih, embrionalno je letalan.(30) Primjeri su prisustvo patoloških varijanti SPEN gena čija haploinsuficijencija uvelike doprinosi nastanku neurorazvojnog poremećaja i prisustvo patoloških varijanti ARID1B gena koje se fenotipski ispoljavaju u vidu ageneze corpora callosa. (31,32)

## 4. ANALIZA EPIGENETIČKOG POTPISA

### 4.1 Bisulfitna konverzija

Proces analize epigenetičkog potpisa lako je prilagodljiv za rutinsko određivanje u kliničkim laboratorijima. Epigenetički potpis zapravo predstavlja obrazac metilacije baze citozina, koja je visoko stabilan analit. Metilirani i nemetilirani citozini lako se razlikuju ako se DNA izolirana iz uzoraka pacijenata (najčešće krvi) provede kroz postupak tzv. bisulfitne konverzije, tako što se denaturira i potom tretira natrijevim bisulfitom. Taj proces transformira nemetilirane citozine u uracil, dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni. Tijekom amplifikacije DNA PCR-om uracili su stoga u amplificiranim sekvencama zamijenjeni timinom. (slika 2) Ova promjena omogućuje diferencijaciju metiliranih i nemetiliranih CpGova kod korištenja daljnjih metoda, mikropostroja ili sekvenciranja nove generacije (NGS). Analiza metilacije na taj način može kvantificirati stupanj metilacije, te točno odrediti koji CpGovi su metilirani ili nemetilirani. U slučaju da je uzorak krvi nedostupan, analiza se može provesti i na uzorcima drugih tkiva, poput fibroblasta. (33) U slučaju neurorazvojnih poremećaja, idealan uzorak za analizu bili bi neuroni, no oni nisu dostupni neinvazivnim uzorkovanjem.



Slika 2. Bisulfitna konverzija nemetiliranih citozina, te zamjena novonastalih uracila timinom tijekom PCR reakcije.

## 4.2 Analiza metilacije DNA na hibridizacijskim čipovima

Kako je rečeno, bisulfitno konvertirana DNA podliježe potom postupku sekvenciranja ili analize hibridizacijom na čipu. Najdetaljnija metoda, kojom se može procijeniti metilacija na ~28 milijuna CpG mjesta u ljudskom genomu je bisulfitno sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome bisulfite sequencing*, WGBS). Ipak, u dosadašnjim istraživanjima kohorti pacijenata uglavnom se ne koristi ova metoda zbog velike potrebe za stručnim kadrom za obradu ovako složenih podataka kao i visokih troškova. Stoga se metilacija humanih uzoraka analizira uglavnom metodom hibridizacije na čipu, gdje se najčešće koristi Illumina HumanMethylation450 (HM450) BeadChip. U njenom slučaju, bisulfitno konvertirana DNA hibridizira s unaprijed dizajniranim sondama/probama koje razlikuju metilirana (citozin) i nemetilirana (uracil) CpG mjesta. Proces uključuje dodavanje označenog nukleotida s fluorescentnom bojom, a skeniranje detektira omjer fluorescentnog signala iz nemetilirane probe prema metiliranoj probi. Udio metilacije DNA na određenom CpG mjestu (beta vrijednost metilacije ( $\beta$ )) izračunava se kao omjer metiliranog



signala prema ukupnom signalu (metilirani + nemetilirani). Rezultat prethodno navedenih postupaka iskazuje se kao  $\beta$ -vrijednost koja u rasponu od 0 do 1 predstavlja stupanj metilacije određene probe. Kako bi se stupanj metilacije prikazao preciznije u slučajevima gdje se on približava ekstremima (0 ili 1), u daljnjim koracima koristi se M vrijednost izračunata prema formuli:

$$M = \log_2\left(\frac{\beta}{1-\beta}\right)$$

M vrijednost jednaka je nuli za  $\beta=0.5$ , pa tako, hipometiliranim probama ( $\beta<0.5$ ) dodjeljuje negativne vrijednosti, a hipermetiliranim ( $\beta>0.5$ ) pozitivne vrijednosti. Prikazuje razliku u naizgled sličnim  $\beta$ -vrijednostima na sljedeći način: (tablica 1.)

Tablica 1. odnosi M i  $\beta$ -vrijednosti

<b><math>\beta</math>- vrijednost</b>	<b>M vrijednost</b>
<b>0,99</b>	<b>6,6293566</b>
<b>0,9999</b>	<b>13,287568</b>
<b>0,01</b>	<b>-6,6293566</b>
<b>0,0001</b>	<b>-13,287568</b>

Dobiveni rezultati su tada normalizirani. FunNorm, Noob i Illumina normalizacijske funkcije su se pokazale kao superiorne nad ostalim upotrebljivanim.(34) Daljnja bioinformatička analiza uključuje odabiranje samo pouzdanih proba metodama poput isključivanja onih sa spolnih kromosoma, većom vjerojatnošću da je dobiveni rezultat lažno pozitivan (p vrijednost) pri detekciji, manjom razlikom u razinama metilacije i onih s poznatim polimorfizmima jednog

nukleotida (SNP). Ukoliko su podatci bili prikupljeni iz različitih ustanova, provedena je minimalizacija razlika među njima kako bi se izbjegli negativni utjecaji efekta serije („batch effect“). Analiza je prilagođena sastavu krvi prema udjelima različitih krvnih stanica. Nakon toga, valjanost epigenetičkog potpisa provjerava se uspoređujući probe određene kao unikatne za poremećaj sa svim dotad definiranim epigenetičkim potpisima i uklanjaju se ukoliko nisu dovoljno unikatne s obzirom na zdrave kontrole i dosad definirane poremećaje. Kao zadnji korak, model strojnog učenja (Stroj potpornih vektora (SVM), regularizirane logističke regresije (PLR) ili, manje poželjno, slučajnih šuma (RF)) (34) trenira se rezultatnim DMC-ovima ili DMR-ovima kako bi raspoznao epigenetičke potpise vezane uz određeni poremećaj. Ustanovljeni epigenetički potpis istraživači prikazuju u vidu toplinske karte (heatmap), dendrograma uz usporedbu s ostalim neurorazvojnim poremećajima ili vrijednosti patogenosti metilacijske varijante (engl. *methylation variant pathogenicity* (MVP)). MVP je vrijednost između 0 i 1 koja analizirani uzorak metilacije uspoređuje s testnim i kontrolnim uzorcima tijekom određivanja epigenetičkog potpisa. Veća MVP vrijednost predstavlja uzorak sličniji testnim uzorcima i time sugerira prisustvo poremećaja, dok niža MVP vrijednost predstavlja uzorak sličniji zdravim kontrolama i sugerira odsustvo poremećaja. (35)

## 5. KLINIČKI ZNAČAJ

### 5.1 Neurorazvojni poremećaji s epigenetičkim potpisom

Tablica 2 sadrži popis rijetkih neurorazvojnih poremećaja s genetskom podlogom za koje je u literaturi pronađen i definiran epigenetički potpis. (15,27–31,36–46) Pouzdanost u primjeni većine navedenih potpisa dokazana je istraživanjem Levy i sur. provedenoga od 2019.-2021. godine analizom uzoraka krvi 5 612 ispitanika. (27) Nju su svojim istraživanjima potvrdili Giuli i sur. te van der Laan i sur. 2023. godine. (34,41) Definirani epigenetički potpisi već se koriste u kliničkom radu putem projekata poput kanadskog EpiSign-CAN projekta i „EpiPro“ Manchesterskog projekta.

Tablica 2- popis rijetkih neurorazvojnih poremećaja s genetskom podlogom za koje je u literaturi pronađen i definiran epigenetički potpis.

SINDROM	INTERNACIONALNA KRATICA SINDROMA	PODLIJEŽUĆI GEN ILI REGIJA
Arboleda-Tham sindrom	ARTHS	<i>KAT6A</i>
Au-Kline sindrom	AKS	<i>HNRNPK</i>
Autizam, predispozicija za, 18	AUTS18	<i>CHD8</i>
Autosomalno-dominantni poremećaj intelektualnog razvoja-65	KDM4B	<i>KDM4B</i>
BCL11B-povezani poremećaj	BCL11B-RD	<i>BCL11B</i>
Beck-Fahrner sindrom	BEFAHRS	<i>TET3</i>
Blefarofimoza intelektualne poteškoće SMARCA2 sindrom	BISS	<i>SMARCA2</i>
Börjeson-Forssman- - Lehmann sindrom	BFLS	<i>PHF6</i>

CDK13-povezani poremećaj	CDK13-RD	<i>CDK13</i>
Cerebelarna ataksija, gluhoća, i narkolepsija, autosomalno-dominantni	ADCADN	<i>DNMT1</i>
CHARGE sindrom	CHARGE	<i>CHD7</i>
Chr16p11.2 delecijski sindrom, 593-KB	Chr16p11.2del	<i>Chr16p11.2del</i>
Chung-Jansen sindrom	CHUJANS	<i>PHIP</i>
Clark-Baraitser sindrom	CLABARS	<i>TRIP12</i>
Coffin-Siris sindrom-1,2	CSS_c.6200	<i>ARID1B</i> <i>ARID1A</i>
Coffin-Siris sindrom-1,2,3,4;	BAFopathy	<i>ARID1B</i> <i>ARID1A</i> <i>SMARCB1</i> <i>SMARCA4</i> <i>SMARCA2</i>
Coffin-Siris sindrom-4	CSS4_c.2650	<i>SMARCA4</i>
Coffin-Siris sindrom-9	CSS9	<i>SOX11</i>
Cohen-Gibson sindrom; Weaver sindrom	PRC2	<i>EED</i> <i>EZH2</i>
Cornelia de Lange sindrom 1,2,3,4	CdLS	<i>NIPBL</i> <i>SMC1A</i> <i>SMC3</i> <i>RAD21</i>
Delecija 1p36 sindrom	del1p36	<i>SPEN</i>
Distonija 28, nastup u djetinjstvu	DYT28	<i>KMT2B</i>
Down sindrom	Down	<i>Chr21 trisomy</i>

Epileptična encefalopatija, nastup u djetinjstvu	EEOC	<i>CHD2</i>
Floating-Harbor sindrom	FLHS	<i>SRCAP</i>
Gabriele-de Vries sindrom	GADEVS	<i>YY1</i>
Genitopatelarni sindrom	GTPTS	<i>KAT6B</i>
Hao-Fountain sindrom	HAFOUS	<i>USP7</i>
Helsmoortel-van der Aa sindrom	HVDAS_C	<i>ADNP</i>
Helsmoortel-van der Aa sindrom	HVDAS_T	<i>ADNP</i>
Hunter McAlpine kraniosinostoza sindrom	HMA	<i>Chr5q35-qter dup</i>
Imunodeficijencija-centromerna nestabilnost-anomalije lica sindrom 1	ICF_1	<i>DNMT3B</i>
Imunodeficijencija-centromerna nestabilnost-anomalije lica sindrom 2,3,4	ICF_2_3_4	<i>ZBTB2</i> <i>CDCA7</i> <i>HELLS</i>
JARID2-neurorazvojni sindrom	JARID2	<i>JARID2</i>
Kabuki sindrom 1, 2	Kabuki	<i>KMT2D</i> <i>KDM6A</i>
KDM2B-povezani sindrom	KDM2B	<i>KDM2B</i>
Kleefstra sindrom 1	Kleefstra	<i>EHMT1</i>
Koolen de Vreis sindrom	KDVS	<i>KANSL1</i>
Luscan-Lumish sindrom	LLS	<i>SETD2</i>
Menke-Hennekam sindrom 1,2	MKHK_ID4	<i>CREBBP</i> <i>EP300</i>
Mentalna retardacija, autosomalno-dominantni	MRD23	<i>SETD5</i>

Mentalna retardacija, autosomalno-dominantni 51	MRD51	<i>KMT5B</i>
Miopatija, laktička acidoza, i sideroplastična anemija 2	MLASA2	<i>YARS2</i>
Mowat-Wilson sindrom	MOWS	<i>ZEB2</i>
MSL2-povezani poremećaj	MSL2-RD	<i>MSL2</i>
Ohdo sindrom, SBBYSS varijanta	SBBYSS	<i>KAT6B</i>
Phelan-McDermid sindrom	PHMDS	<i>Chr22q13.3del</i>
Pitt-Hopkins sindrom	PTHS	<i>TCF4</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja s napadajima i jezičnom odgodom	IDDSELD	<i>SETD1B</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, autosomalno-dominantni 21 sindrom	IDD21	<i>CTCF</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani 93	MRX93	<i>BRWD3</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani 97	MRX97	<i>ZNF711</i>
poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani, sindromski, Armfield tip	MRXSA	<i>FAM50A</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani, sindromski, Claes-Jensen tip	MRXSCJ	<i>KDM5C</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani, sindromski, Nascimento-tip	MRXSN	<i>UBE2A</i>
Poremećaj intelektualnog razvoja, X-vezani, Snyder-Robinson tip	MRXSSR	<i>SMS</i>
PURA-povezani neurorazvojni poremećaj	PURA-NDD	<i>PURA</i>
Rahman sindrom	RMNS	<i>HIST1H1E</i>

Razvojna i epileptična encefalopatija 54	DEE54	<i>HNRNPU</i>
Renpenning sindrom	RENS1	<i>PQBPI</i>
Rubinstein-Taybi sindrom 1	RSTS1	<i>CREBBP</i>
Rubinstein-Taybi sindrom 2	RSTS2	<i>EP300</i>
Sotos sindrom 1	Sotos	<i>NSDI</i>
SRSF1-povezani poremećaj	SRSF1	<i>SRSF1</i>
Tatton-Brown-Rahman sindrom	TBRS	<i>DNMT3A</i>
Velokardiofacialni sindrom	VCFS	<i>Chr22q11.2del</i>
Wiedemann-steiner sindrom	WDSTS	<i>KMT2A</i>
Williams-Beuren delecijski sindrom	Williams	<i>Chr7q11.23del</i>
Williams-Beuren duplikacijski sindrom	Dup7	<i>Chr7q11.23dup</i>
Witteveen-Kolk sindrom	WITKOS	<i>SIN3A</i>
Wolf-Hirschhorn sindrom	WHS	<i>Chr4p16.13del</i>
X-vezani alfa-talasemija/mentalna retardacija sindrom	ATRX	<i>ATRX</i>

### 5.1.1. Analiza epigenetičkog potpisa X kromosoma

Neurorazvojni poremećaji uzrokovani patološkim varijantama na X kromosomu pokazali su se zahtjevnima za dijagnosticirati analizom epigenetičkog potpisa. Razlika u njegovom broju među spolovima, ali i neuravnotežena lionizacija, odnosno inaktivacija X kromosoma (engl. *skewed XCI*) mogu doprinijeti razlikama u metilacijskom profilu, ali i spolnoj specifičnosti epigenetičkog potpisa.(47) Iz tih razloga, DMC-ovi X kromosoma se najčešće isključuju iz analize u svrhu lakše obrade podataka, ali promjene metilacije gena X kromosoma ostaju presudne u identifikaciji nekih

poremećaja poput delecija 1p36 sindroma.(31) Na primjer, podvrste poremećaja iz spektra autizma uzrokovane patološkim varijantama na genu X kromosoma pokazuju spolnu specifičnost u vidu tri puta veće incidencije u muškaraca, što sugerira protektivnu ulogu prisutnosti dva X kromosoma i mozaicizma u žena.(48)

## **5.2 Ograničenja analize epigenetičkog potpisa**

U rijetkim slučajevima, uzorci ispitanika iz kohorti za utvrđivanje epigenetičkog potpisa s dokazanom patološkom varijantom podliježućeg gena ipak nisu imali karakterističan epigenetički potpis, što bi sugeriralo kompleksnost koju bismo mogli pripisati mozaicizmima, genetskim čimbenicima, no i utjecaju okoliša.(43) Ne postoje objavljene smjernice za kliničku interpretaciju rezultata analize epigenetičkog potpisa, pa je svakodnevna uporaba ove dijagnostičke metode dostupna samo vrlo malom broju centara sa stručnjacima u navedenom području. U pitanje se dovodi razlučivost ove metode pri ekstremnim slučajevima. Na primjer, u razlučivanju Sotos i TBRS sindroma koji uzrokuju drastičnu hipometilaciju cijeloga genoma uz preklapanje mnogih proba među tim sindromima. Iako je specifičnost analize epigenetičkog potpisa uvijek vrlo visoka (94-100%), njena osjetljivost značajno pada korištenjem malih uzoraka ispitanika za definiranje metilacijskog obrasca specifičnog za poremećaj.(49) Veću skupinu ispitanika teško je pribaviti uslijed rijetkosti ovih neurorazvojnih poremećaja. Korišteni postupak identifikacije unikatnog epigenetičkog potpisa za pojedini poremećaj nije uniforman, te se u nekim koracima razlikuje među grupama istraživača što može dovesti do grešaka. Kako je već rečeno, većina istraživača koristi Infinium HumanMethylation EPIC BeadChip (IMEPIC) ili Infinium HumanMethylation EPICv2 BeadChip (IMEPICv2), koje su slične, ali ipak svaka promjena korištenih metoda uključuje dodavanje i uklanjanje nekolicine obrađivanih CpGova. Mijenjanje metoda i efekt serije,



gdje pojedinci iz serije često nisu upareni s kontrolama iz iste serije, dodatno smanjuju robusnost definiranih epigenetičkih potpisa. Rješenje za povećanje robusnosti pretrage se nudi u vidu standardizacije analize na razini DMR-ova umjesto DMC-ova pri budućim određivanjima epigenetičkog potpisa.(34,50) Uz navedeno, isključivanje proba spolnih kromosoma koji su se pokazali ključni u identificiranju pojedinih poremećaja, identifikaciju više epigenetičkih potpisa za istu patološku varijantu i ponekada neinterpretabilnih rezultata (kod manjih uzoraka- npr. kohorte od 5 ispitanika) možemo zaključiti da zasad još imamo ograničeno razumijevanje epigenetičkih potpisa.(51)

### **5.3 Korisnost analize epigenetičkog potpisa u klinici**

Glavna klinička uloga analize epigenetičkog potpisa je procjena i klasifikacija poremećaja za koje je prethodnom genetičkom obradom utvrđeno prisustvo samo varijanata nepoznatog značenja (VUS) i potencijalno postavljanje dijagnoze genetski nerazriješenim slučajevima pacijenata. Prednost je što ne zahtjeva analiziranje uzoraka ostalih članova obitelji. Za neurorazvojne poremećaje s kvalitetno određenim epigenetičkim potpisom, njegova analiza je visoko specifična i osjetljiva dijagnostička metoda. (27,49) Ukoliko analiza ne ispolji podudarnost uzorka s nekim od neurorazvojnih poremećaja s dobro definiranim epigenetičkim potpisom, ona pouzdano isključuje dijagnoze svih poremećaja uključenih u analizu. Dijagnostikom poremećaja koristeći epigenetički potpis omogućeno je i proširenje poznatih fenotipskih karakteristika vezanih uz njega metodom reverzne fenotipizacije.(39) Analiza epigenetičkog potpisa koristi se i za potvrdu kliničke sumnje kada varijanta koja obično uzrokuje poremećaj nije pronađena ili za reklasifikaciju pacijenata kojima je inicijalno dijagnosticiran pogrešni poremećaj.(47) Ova metoda omogućuje

postavljanje dijagnoze i bez da je poznata podliježuća patološka varijanta.(52) Analiza epigenetičkog potpisa ispoljila je dijagnozu u slučajevima kada analiza kromosomalnog mikropostroja (*chromosomal microarray analysis (CMA)*) i sekvenciranje cjelokupnog egzoma (WES) nisu identificirali podliježuće delecije u zahvaćenim genima. Nadalje, kombinacija analize epigenetičkog potpisa i sekvenciranja egzoma pokazalo je odlične rezultate u klasifikaciji klinički nejasnih slučajeva neurorazvojnih poremećaja.(47) Analiza pojedinaca sa simptomima neurorazvojnih poremećaja pokazala se učinkovita i u postavljanju dijagnoze prije nastupa simptoma. Na taj način omogućena je pravovremena terapijska intervencija.(53) Zbog toga se u slučaju inkonkluzivnih rezultata sekvenciranja cijeloga egzoma (WES) kao idući korak preporučuje analiza epigenetičkog potpisa i sekvenciranje cijelog genoma (WGS), te PhenoScore. PhenoScore je računalni softver baziran na umjetnoj inteligenciji koji identificira i klasificira dizmorfije lica vezane uz sindromske poremećaje.(17) Primjerice, metilacijski specifičan mikropostroj istovremeno i s visokom osjetljivošću procjenjuje prisutnost poremećaja genomskog utiska (engl. *genomic imprinting*) i sindroma fragilnog X.(54) Unatoč provođenju analize epigenetičkog potpisa, klinička procjena ostaje presudna u postavljanju ispravne dijagnoze. Navedeno se može prikazati primjerom WHS i Rauch-Steindl (RAUST) sindroma. WHS je uzrokovan delecijom regije kratkog kraka 4. kromosoma. Unutar te regije nalazi se gen NSD2, čije patološke varijante uzrokuju RAUST sindrom. Klinička slika ovih sindroma se uvelike poklapa, no RAUST sindrom, za razliku od WHS-a ne uzrokuje epilepsiju i karakteristične dizmorfije lica. Analizom epigenetičkog potpisa pacijenta oboljelog od RAUST sindroma dobiva se rezultat koji ukazuje na prisustvo WHS-a. Samo kliničar može primijetiti izostanak epilepsija i dizmorfija u kliničkoj slici te time ispravno dijagnosticirati pacijenta.(55)

## 6. ZAKLJUČAK

Precizna i definitivna molekularna dijagnoza omogućuje prenatalnu dijagnostiku i kvalitetno genetsko savjetovanje što je poglavito važno kod neurorazvojnih poremećaja. U takvim slučajevima, analiza epigenetičkog potpisa je visoko specifična i osjetljiva laboratorijska metoda koja se pokazuje sve češće ključna za objašnjenje simptoma i dobivanje precizne dijagnoze. Daljnjim proširivanjem popisa takvih poremećaja ova metoda se sve više približava svakodnevnoj kliničkoj uporabi. Istraživanje u tom smjeru već se provodi kroz velike projekte (npr. kanadskog EpiSign-CAN i „EpiPro“ koje provode znanstvenici sa sveučilišta u Manchesteru). Analiza epigenetičkog potpisa ima brojne prednosti poput potencijalnog smanjenja troškova ako se uvede u standardnu obradu. Time bi se smanjili troškovi skupe metode sekvenciranja cijelog genoma koja je po današnjim standardima u klinici hijerarhijski ispred epigenetičkih analiza. S druge strane, prepreka uvođenju analize epigenetičkog potpisa u svakodnevni klinički rad je činjenica da je analiza metilacije genoma, odnosno epigenetičkog potpisa dijelom komercijalizirana dijagnostička metoda pa mnogi podatci nisu u potpunosti i ažurno objavljeni u znanstvenoj literaturi. Objavljivanjem tih podataka, potvrđivanje pouzdanosti analize epigenetičkog potpisa u slučajima nedefiniranog razvojnog poremećaja bi se značajno ubrzao ulazak ove metode u svakodnevni klinički rad. Na kraju, bolje poznavanje epigenetičkih mehanizama koji dovode do razvoja neurorazvojnih poremećaja omogućilo bi pristup potencijalnim novim metama za razvoj lijekova.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Ani Katusić Bojanac na ponuđenoj temi, podršci, pomoći, pristupačnosti, ljubaznosti i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i najbližim prijateljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom studija.

Zahvaljujem Luciji Lasić mag. chem. na pomoći pri izradi ilustracija.

## 8. LITERATURA

1. Turnpenny P, Ellard S. EMERYJEVE OSNOVE MEDICNISKE GENETIKE. 14. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
2. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*. 2009 Mar;12(3):342–8.
3. Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*. 2017 May 8;10(1):23.
4. van Eijk KR, de Jong S, Boks MP, Langeveld T, Colas F, Veldink JH, et al. Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects. *BMC Genomics*. 2012 Nov 17;13(1):636.
5. Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*. 2004;93(1):57–67.
6. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009 May;10(5):295–304.
7. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987 Jul 20;196(2):261–82.
8. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):178–86.
9. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Mar 19;99(6):3740–5.
10. Wu C, Mou X, Zhang H. Gbdmr: identifying differentially methylated CpG regions in the human genome via generalized beta regressions. *BMC Bioinformatics*. 2024 Mar 5;25(1):97.
11. Aref-Eshghi E, Bend EG, Colaiacovo S, Caudle M, Chakrabarti R, Napier M, et al. Diagnostic Utility of Genome-wide DNA Methylation Testing in Genetically Unsolved Individuals with Suspected Hereditary Conditions. *Am J Hum Genet*. 2019 Apr 4;104(4):685–700.
12. Lee S, Menzies L, Hay E, Ochoa E, Docquier F, Rodger F, et al. Epigenotype–genotype–phenotype correlations in SETD1A and SETD2 chromatin disorders. *Hum Mol Genet*. 2023 May 11;32(22):3123–34.
13. Velasco G, Francastel C. Genetics meets DNA methylation in rare diseases. *Clin Genet*. 2019;95(2):210–20.
14. Trevino AE, Sinnott-Armstrong N, Andersen J, Yoon SJ, Huber N, Pritchard JK, et al. Chromatin accessibility dynamics in a model of human forebrain development. *Science*. 2020 Jan 24;367(6476):eaay1645.

15. Rooney K, van der Laan L, Trajkova S, Haghshenas S, Relator R, Lauffer P, et al. DNA methylation episinature and comparative epigenomic profiling of HNRNPU-related neurodevelopmental disorder. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2023 Aug;25(8):100871.
16. Lee S, Ochoa E, Barwick K, Cif L, Rodger F, Docquier F, et al. Comparison of Methylation Episignatures in KMT2B- and KMT2D-Related Human Disorders. *Epigenomics*. 2022 May 1;14(9):537–47.
17. D’Incal CP, Annear DJ, Elinck E, van der Smagt JJ, Alders M, Dingemans AJM, et al. Loss-of-function of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) by a splice-acceptor site mutation causes Helsmoortel-Van der Aa syndrome. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2024 Jun;32(6):630–8.
18. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington: American psychiatric association; 2013.
19. Cardoso AR, Lopes-Marques M, Silva RM, Serrano C, Amorim A, Prata MJ, et al. Essential genetic findings in neurodevelopmental disorders. *Hum Genomics*. 2019 Jul 9;13(1):31.
20. Nardone S, Sams DS, Reuveni E, Getselter D, Oron O, Karpuj M, et al. DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Transl Psychiatry*. 2014 Sep 2;4(9):e433.
21. Home - OMIM [Internet]. [cited 2024 Jun 13]. Available from: <https://www.omim.org/>
22. White-Brown A, Choufani S, Care4Rare Canada Consortium, Weksberg R, Dyment D. Missense variant in SRCAP with distinct DNA methylation signature associated with non-FLHS SRCAP-related neurodevelopmental disorder. *Am J Med Genet A*. 2023 Oct;191(10):2640–6.
23. Colin E, Duffourd Y, Tisserant E, Relator R, Bruel AL, Tran Mau-Them F, et al. OMIXCARE: OMICS technologies solved about 33% of the patients with heterogeneous rare neuro-developmental disorders and negative exome sequencing results and identified 13% additional candidate variants. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Oct 28;10:1021785.
24. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet*. 2013 Apr;132(4):359–83.
25. Haghshenas S, Foroutan A, Bhai P, Levy MA, Relator R, Kerkhof J, et al. Identification of a DNA methylation signature for Renpenning syndrome (RENS1), a spliceopathy. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2023 Aug;31(8):879–86.
26. Bukvic N, Chetta M, Bagnulo R, Leotta V, Pantaleo A, Palumbo O, et al. What Have We Learned from Patients Who Have Arboleda-Tham Syndrome Due to a De Novo KAT6A Pathogenic Variant with Impaired Histone Acetyltransferase Function? A Precise Clinical Description May Be Critical for Genetic Testing Approach and Final Diagnosis. *Genes*. 2023 Jan 7;14(1):165.
27. Levy MA, Relator R, McConkey H, Pranckeviciene E, Kerkhof J, Barat-Houari M, et al. Functional correlation of genome-wide DNA methylation profiles in genetic neurodevelopmental disorders. *Hum Mutat*. 2022 Nov;43(11):1609–28.

28. Caraffi SG, van der Laan L, Rooney K, Trajkova S, Zuntini R, Relator R, et al. Identification of the DNA methylation signature of Mowat-Wilson syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2024 Jun;32(6):619–29.
29. Verberne EA, van der Laan L, Haghshenas S, Rooney K, Levy MA, Alders M, et al. DNA Methylation Signature for JARID2-Neurodevelopmental Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 20;23(14):8001.
30. Bogaert E, Garde A, Gautier T, Rooney K, Duffourd Y, LeBlanc P, et al. SRSF1 haploinsufficiency is responsible for a syndromic developmental disorder associated with intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2023 May 4;110(5):790–808.
31. Radio FC, Pang K, Ciolfi A, Levy MA, Hernández-García A, Pedace L, et al. SPEN haploinsufficiency causes a neurodevelopmental disorder overlapping proximal 1p36 deletion syndrome with an epesignature of X chromosomes in females. *Am J Hum Genet.* 2021 Mar 4;108(3):502–16.
32. Yu Y, Yao R, Wang L, Fan Y, Huang X, Hirschhorn J, et al. De novo mutations in ARID1B associated with both syndromic and non-syndromic short stature. *BMC Genomics.* 2015 Sep 16;16(1):701.
33. Awamleh Z, Choufani S, Wu W, Rots D, Dingemans AJM, Nadif Kasri N, et al. A new blood DNA methylation signature for Koolen-de Vries syndrome: Classification of missense KANSL1 variants and comparison to fibroblast cells. *Eur J Hum Genet.* 2024 Mar;32(3):324–32.
34. Giuli E, Grolaux R, Macedo CZNM, Desmyter L, Pichon B, Neuens S, et al. Comprehensive evaluation of the implementation of epesignatures for diagnosis of neurodevelopmental disorders (NDDs). *Hum Genet.* 2023;142(12):1721–35.
35. Schenkel LC, Aref-Eshghi E, Rooney K, Kerkhof J, Levy MA, McConkey H, et al. DNA methylation epi-signature is associated with two molecularly and phenotypically distinct clinical subtypes of Phelan-McDermid syndrome. *Clin Epigenetics.* 2021 Jan 6;13:2.
36. Vos N, Haghshenas S, van der Laan L, Russel PKM, Rooney K, Levy MA, et al. The detection of a strong epesignature for Chung-Jansen syndrome, partially overlapping with Börjeson-Forssman-Lehmann and White-Kernohan syndromes. *Hum Genet.* 2024 May 24;
37. Karayol R, Borroto MC, Haghshenas S, Namasivayam A, Reilly J, Levy MA, et al. MSL2 variants lead to a neurodevelopmental syndrome with lack of coordination, epilepsy, specific dysmorphisms, and a distinct epesignature. *Am J Hum Genet.* 2024 May 28;S0002-9297(24)00164-2.
38. Karimi K, Mol MO, Haghshenas S, Relator R, Levy MA, Kerkhof J, et al. Identification of DNA methylation epesignature for the intellectual developmental disorder, autosomal dominant 21 syndrome, caused by variants in the CTCF gene. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2024 Mar;26(3):101041.
39. Xiao B, Dai W, Zhan Y, Qiu W, Zhang H, Liu D, et al. Genome-wide epigenetic signatures facilitated the variant classification of PURA gene and uncovered the pathomechanism of PURA-related neurodevelopmental disorders. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2024 May 17;101167.

40. van der Laan L, Rooney K, Alders M, Relator R, McConkey H, Kerkhof J, et al. Episignature Mapping of TRIP12 Provides Functional Insight into Clark-Baraitser Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 8;23(22):13664.
41. van der Laan L, Karimi K, Rooney K, Lauffer P, McConkey H, Caro P, et al. DNA methylation episignature, extension of the clinical features, and comparative epigenomic profiling of Hao-Fountain syndrome caused by variants in USP7. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2024 Mar;26(3):101050.
42. Coenen-van der Spek J, Relator R, Kerkhof J, McConkey H, Levy MA, Tedder ML, et al. DNA methylation episignature for Witteveen-Kolk syndrome due to SIN3A haploinsufficiency. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2023 Jan;25(1):63–75.
43. van der Laan L, Lauffer P, Rooney K, Silva A, Haghshenas S, Relator R, et al. DNA methylation episignature and comparative epigenomic profiling for Pitt-Hopkins syndrome caused by TCF4 variants. *HGG Adv.* 2024 Apr 2;5(3):100289.
44. Sabbagh Q, Haghshenas S, Piard J, Trouvé C, Amiel J, Attié-Bitach T, et al. Clinico-biological refinement of BCL11B-related disorder and identification of an episignature: A series of 20 unreported individuals. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2024 Jan;26(1):101007.
45. Rouxel F, Relator R, Kerkhof J, McConkey H, Levy M, Dias P, et al. CDK13-related disorder: Report of a series of 18 previously unpublished individuals and description of an epigenetic signature. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2022 May;24(5):1096–107.
46. Choufani S, McNiven V, Cytrynbaum C, Jangjoo M, Adam MP, Bjornsson HT, et al. An HNRNPK-specific DNA methylation signature makes sense of missense variants and expands the phenotypic spectrum of Au-Kline syndrome. *Am J Hum Genet.* 2022 Oct 6;109(10):1867–84.
47. Trajkova S, Kerkhof J, Sebastiano MR, Pavinato L, Ferrero E, Giovenino C, et al. DNA methylation analysis in patients with neurodevelopmental disorders improves variant interpretation and reveals complexity. *Hum Genet Genomics Adv [Internet].* 2024 Jul 18 [cited 2024 Jun 11];5(3). Available from: [https://www.cell.com/hgg-advances/abstract/S2666-2477\(24\)00048-4](https://www.cell.com/hgg-advances/abstract/S2666-2477(24)00048-4)
48. Schaafsma SM, Pfaff DW. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front Neuroendocrinol.* 2014 Aug;35(3):255–71.
49. Husson T, Lecoquierre F, Nicolas G, Richard AC, Afenjar A, Audebert-Bellanger S, et al. Episignatures in practice: independent evaluation of published episignatures for the molecular diagnostics of ten neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet.* 2024 Feb;32(2):190–9.
50. Chater-Diehl E, Goodman SJ, Cytrynbaum C, Turinsky AL, Choufani S, Weksberg R. Anatomy of DNA methylation signatures: Emerging insights and applications. *Am J Hum Genet.* 2021 Aug 5;108(8):1359–66.
51. Bend EG, Aref-Eshghi E, Everman DB, Rogers RC, Cathey SS, Prijoles EJ, et al. Gene domain-specific DNA methylation episignatures highlight distinct molecular entities of ADNP syndrome. *Clin Epigenetics.* 2019 Apr 27;11:64.
52. Foroutan A, Haghshenas S, Bhai P, Levy MA, Kerkhof J, McConkey H, et al. Clinical Utility of a Unique Genome-Wide DNA Methylation Signature for KMT2A-Related Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 5;23(3):1815.



53. Bouhamdani N, McConkey H, Leblanc A, Sadikovic B, Amor MB. Diagnostic utility of DNA methylation episignature analysis for early diagnosis of KMT2B-related disorders: case report. *Front Genet.* 2024;15:1346044.
54. Sadikovic B, Levy MA, Kerkhof J, Aref-Eshghi E, Schenkel L, Stuart A, et al. Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders. *Genet Med.* 2021;23(6):1065–74.
55. McConkey H, White-Brown A, Kerkhof J, Dymont D, Sadikovic B. Genetically unresolved case of Rauch-Steindl syndrome diagnosed by its wolf-hirschhorn associated DNA methylation episignature. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:1022683.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Matej Dobrošević

Datum rođenja: 31. srpnja 1999.

Mjesto rođenja: Osijek

e-mail: matej.dobrosevic@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2018.-2024. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

2014.-2018. III. Gimnazija Osijek, Osijek

2006.-2014. Osnovna škola „Retfala“, Osijek

### AKTIVNOSTI

2019./2020. volonterski rad u neuroonkološkom laboratoriju

2022.-2024. član Studentske linije za rijetke bolesti

2023.-2024. voditelj sekcije za onkologiju, BIUS

2024. član studentske sekcije za genetiku i metabolizam

### CERTIFIKATI I PRIZNANJA

2021.-2024. član znanstveno-programnog odbora HSSB-a i CROSS-a

2023. ALS certifikat

### POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Aktivno korištenje engleskog jezika u govoru i pisanju (C1)

Aktivno korištenje njemačkog jezika u govoru i pisanju (B1)

Poznavanje rada na računalu (MS Office, Internet)