ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ

ΕΛΕΝΗ-ΜΑΡΙΝΑ ΚΑΛΟΓΗΡΟΥ

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (IKY)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

AOHNA 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:	Κωνσταντίνος Ι. Τόσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
Μέλη:	Αλεξάνδρα Σκλαβούνου, Καθηγήτρια,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Βασίλειος Πετσίνης, Επίκουρος Καθηγητής,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:	Κωνσταντίνος Ι. Τόσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
Μέλη:	Αλεξάνδρα Σκλαβούνου, Καθηγήτρια,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Βασίλειος Πετσίνης, Επίκουρος Καθηγητής,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Ελένη Βασταρδή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Δημήτριος Βλαχοδημητρόπουλος, Αναπληρωτής
	Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Σταμάτιος Θεοχάρης, Καθηγητής,
	Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.
	Ευθυμία Κιτράκη, Καθηγήτρια,
	Οδοντιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Οδοντιατρικής του Ε.Κ.Π.Α., δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202, παρ. 2, Ν.5343/1932.

Στην Οικογένειά μου & στον Δάσκαλό μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗ	19
1.1. Ιστορική αναδρομή	19
1.2. Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων	21
1.3. Επιδημιολογικά δεδομένα	25
1.4. Δημογραφικά στοιχεία	26
1.5. Κλινικά χαρακτηριστικά	27
1.6. Ακτινογραφικά χαρακτηριστικά	28
1.7. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	29
1.8. Ιστογενετική προέλευση	35
1.9. Παθογένεια	40
1.9.1. Ο ρόλος του κυστικού επιθηλίου	. 40
1.9.2. Ο ρόλος του κυστικού τοιχώματος	. 41
1.9.3. Η σηματοδοτική οδός Sonic Hedgehog	. 42
1.9.4. Άλλες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις	. 44
1.10. Θεραπεία	47
1.11. Πρόγνωση	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ	51
2.1. Από το μετάγραφο στο μεταγράφωμα	51
2.2. Μέθοδοι μελέτης μεταγραφώματος	54
2.2.1. Μέθοδοι με βάση την υβριδοποίηση	. 55
2.2.2. Μέθοδοι με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	. 57
2.2.3. Μέθοδοι με βάση την αλληλούχηση	. 59
2.3. RNA-seq	62
2.3.1. Βασικές αρχές, πλεονεκτήματα και προκλήσεις	. 63

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2.3.2. Πλατφόρμες αλληλούχησης65
2.3.3. Πρωτόκολλο με την τεχνολογία της Illumina67
2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση72
2.4.1. Ποσοτικοποίηση
2.4.2. Διαφορική έκφραση74
2.4.3. Ομαδοποίηση δεδομένων76
2.4.4. Ανάλυση εμπλουτισμού77
2.5. Χρήση ιστών αρχείου σε πειράματα RNA-seq81
2.6. Whole transcriptome RNA-seq σε νόσους κεφαλής-τραχήλου85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΚΟΠΟΣ & ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ87
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ93
4.1. Εισαγωγή93
4.2. Σκοπός95
4.3. Υλικά & Μέθοδοι96
4.3.1. Επιλογή περιπτώσεων μελέτης96
4.3.2. Προετοιμασία τομών για απομόνωση RNA
4.3.3. Απομόνωση RNA 105
4.3.4. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος RNA109
4.3.5. Κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης112
4.3.6. RNA-seq 120
4.3.7. Βιοπληροφορική ανάλυση121
4.3.8. qPCR 127
4.3.8.1. Πρωτόκολλο qPCR127
4.3.8.2. Σχεδίαση εκκινητών128
4.3.8.3. Κανονικοποίηση με γονίδιο κυτταρικής οικονομίας
4.3.8.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

4.3.9. Ανοσοϊστοχημεία	133
4.3.9.1. Ανοσοϊστοχημική τεχνική	133
4.3.9.2. Αντισώματα	136
4.3.9.3. Ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση	147
4.3.10. Στατιστική ανάλυση	149
4.3.11. Οπτικοποίηση	150
4.4. Αποτελέσματα	151
4.4.1. Έλεγχος RNA και γενωμικής βιβλιοθήκης	151
4.4.2. Ποιοτικός έλεγχος δεδομένων αλληλούχησης	156
4.4.3. Σύγκριση νεότερων και παλαιότερων δειγμάτων	162
4.4.4. Σύγκριση δύο κύκλων αλληλούχησης	166
4.4.6. Το μεταγράφωμα της σποραδικής ΟΚΚ	169
4.4.6.1. Διαφορική έκφραση	169
4.4.6.2. Υποτροπές νς πρωτοπαθείς ΟΚΚ	175
4.4.6.3. Ανάλυση εμπλουτισμού	182
4.4.7. Το μεταγράφωμα της συνδρομικής ΟΚΚ	198
4.4.7.1. Διαφορική έκφραση	198
4.4.7.2. Συνδρομική vs σποραδική ΟΚΚ	203
4.4.7.3. Ανάλυση εμπλουτισμού	213
4.4.8. Ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων	221
4.4.9. Έλεγχος επικάλυψης με microarray GSE38494	225
4.4.10. qPCR	230
4.4.11. Ανοσοϊστοχημεία	235
4.5. Συζήτηση	251
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ	
ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ	267
5.1. Εισαγωγή	267
5.2. Σκοπός	268

5.3. Υλικά & Μέθοδοι	268
5.3.1. Στρατηγική αναζήτησης	269
5.3.2. Εξαγωγή δεδομένων	273
5.3.3. Αξιολόγηση κινδύνου μεροληψίας	278
5.3.4. Στατιστική ανάλυση	281
5.4. Αποτελέσματα	283
5.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά μελετών	283
5.4.2. Χαρακτηριστικά υποομάδων μελέτης	284
5.4.3. Χαρακτηριστικά ανοσοϊστοχημικών δεικτών	284
5.4.4. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης	285
5.4.5. Αποτελέσματα αξιολόγησης κινδύνου μεροληψίας	294
5.4.6. Μετα-ανάλυση	298
5.5. Συζήτηση	312
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	317
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	322
ABSTRACT	326
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	329
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο Βρετανός δημοσιογράφος και συγγραφέας Matt Ridley έχει παρομοιάσει το γονιδίωμα ως «ένα βιβλίο που γράφεται αφ' εαυτόν, προσθέτοντας, διαγράφοντας και τροποποιώντας συνεχώς το περιεχόμενό του για περισσότερο από 4 δισεκατομμύρια χρόνια». Αρχικό προϊόν του γονιδιώματος είναι το μεταγράφωμα, το οποίο αντιστοιχεί στο σύνολο των μορίων ριβονουκλεϊκών οξέων που εκφράζονται σε μία δεδομένη χρονική στιγμή σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό, αποτελώντας την «ταυτότητα» του. Η μελέτη του μεταγραφώματος συμβάλλει στον προσδιορισμό των γονιδίων που εμφανίζουν σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ φαινοτύπων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, καθώς και μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη της οδοντογενούς κερατινοκύστης, που εμφανίζει μεγάλο κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω της υψηλής συχνότητας και της επιθετικής βιολογικής της συμπεριφοράς, καθώς και της εμφάνισής της ως εκδήλωση του Συνδρόμου Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού εφαρμόζεται για πρώτη φορά η μέθοδος της RNA-αλληλούχησης στον ολικό ιστό της οδοντογενούς κερατινοκύστης και συγκρίνεται το μεταγραφικό προφίλ του σποραδικού και συνδρομικού υποτύπου της.

Η διατριβή αποτελείται από 3 κεφάλαια στο γενικό μέρος και 3 κεφάλαια στο ειδικό μέρος. Στο 1° κεφάλαιο συνοψίζονται οι τρέχουσες απόψεις σχετικά με τα δημογραφικά, κλινικοπαθολογικά και ακτινογραφικά χαρακτηριστικά, την ιστογενετική προέλευση, την παθογένεια, τη θεραπεία και την πρόγνωση της οδοντογενούς κερατινοκύστης. Στο 2° κεφάλαιο παρουσιάζονται οι τεχνικές μελέτης μεταγραφώματος, τα πλεονεκτήματα της RNA-αλληλούχησης, οι δυνατότητες εφαρμογής της σε ιστούς μονιμοποιημένους στη φορμόλη εγκιβωτισμένους στην παραφίνη και οι βασικές και αρχές βιοπληροφορικής ανάλυσης. Το 3° κεφάλαιο περιλαμβάνει το σκοπό και τους επιμέρους στόχους της μελέτης. Στο 4° κεφάλαιο περιλαμβάνεται η μεθοδολογία, τα αποτελέσματα και η συζήτηση των ευρημάτων σχετικά με το μεταγραφικό προφίλ της σποραδικής και συνδρομικής οδοντογενούς κερατινοκύστης, με την εφαρμογή RNA-

αλληλούχησης και βιοπληροφορικής ανάλυσης, αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και ανοσοϊστοχημείας. Το 5° κεφάλαιο περιλαμβάνει τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για τη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των δεικτών με τους βιβλιογραφία οποίους έχει συγκριθεί στην αγγλόφωνη το ανοσοϊστοχημικό προφίλ σποραδικής συνδρομικής της και οδοντογενούς κερατινοκύστης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν και τη συζήτηση της σημασία τους. Στο 6° κεφάλαιο παρουσιάζεται μία συνοπτική συζήτηση των δύο επιμέρους κεφαλαίων του ειδικού μέρους και τα κύρια συμπεράσματα της μελέτης. Η διδακτορική διατριβή ολοκληρώνεται με την ελληνική και την αγγλόφωνη περίληψη, τη λίστα συντομογραφιών και τις βιβλιογραφικές πηγές που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι δύο ακόλουθες δημοσιεύσεις έχουν προκύψει από τα αποτελέσματα των κεφαλαίων 4 και 5, αντίστοιχα:

- 1. Kalogirou EM, Foutadakis S, Koutsi MA, Vatsellas G, Vlachodimitropoulos D, Petsinis V, Sklavounou A, Agelopoulos M,[#] Tosios KI.[#] Decoding a gene expression program that accompanies the phenotype of sporadic and Basal Cell Nevus Syndrome-associated odontogenic keratocyst. J Oral Pathol Med. 2022, [#]equal contribution.
- Kalogirou EM, Thermos G, Zogopoulos V, Foutadakis S, Michalopoulos I, Agelopoulos M, Tosios KI. The immunohistochemical profile of basal cell nevus syndrome-associated and sporadic odontogenic keratocysts: a systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. 2021;25:3351-3367. doi: 10.1007/s00784-021-03877-w.

Η διδακτορική διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας Έρευνας της Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. (Αριθμός Πρωτοκόλλου #383/9.11.2018).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά τον Ουίνστον Τσώρτσιλ, «Η επιτυχία δεν είναι οριστική, η αποτυχία δεν είναι μοιραία. Αυτό που μετράει είναι η δύναμη να συνεχίζεις.» Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, και ιδιαίτερα των ετών εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, αισθάνθηκα πολλές φορές την ευλογία του Θεού, να αντλώ δύναμη από τους ανθρώπους που πιστεύουν σε εμένα και είναι πρόθυμοι να με στηρίξουν για την επίτευξη του στόχου μου.

Σταθερός «μοχλός δύναμης» της προσπάθειάς μου είναι ο Δάσκαλός μου και Επιβλέπων της διδακτορικής μου διατριβής, κ. Κωνσταντίνος Ι. Τόσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., το παράδειγμα του οποίου έχω την τύχη να παρακολουθώ από το 1° έτος των προπτυχιακών μου σπουδών το 2008. Ο κ. Τόσιος μου ενέπνευσε την αγάπη για τη Στοματολογία, την αφοσίωση στη μελέτη με γνώμονα τη φροντίδα των ασθενών και τη διδασκαλία των φοιτητών, και την τιμιότητα στην επιστημονική έρευνα, και με ανιδιοτέλεια στηρίζει κάθε πτυχή της πορείας μου. Του είμαι ευγνώμων και με τη διατριβή αποσκοπώ να δικαιώσω την εμπιστοσύνη του και να τον κάνω περήφανο.

Οι πιο απαιτητικοί στόχοι της διατριβής μου υλοποιήθηκαν χάρη στην καθοδήγηση και την επιμονή του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου, Ερευνητή Δ΄ στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.), του οποίου είμαι ευγνώμων για τη συμβολή του στο σχεδιασμό και την εκπόνηση της μελέτης, και την επίτευξη της χρηματοδότησής της, για την παροχή του εξοπλισμού του Εργαστηρίου του, και, ιδιαίτερα, γιατί μου εμφύσησε την επιστημονική ιδέα του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. Το ήθος και οι γνώσεις του κ. Αγγελόπουλου καθιστούν κάθε επιστήμονα που συνεργάζεται μαζί του πολύ τυχερό.

Την είσοδό μου στην οικογένεια της Στοματολογίας, πριν ακόμα γίνω δεκτή στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα το 2013, την οφείλω στην εμπιστοσύνη της κας. Αλεξάνδρας Σκλαβούνου, Καθηγήτριας Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. Την ευχαριστώ ειλικρινά για την τιμή να αποτελέσει μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, για την ενθάρρυνση και για την πάντα γεμάτη αγάπη αυστηρή κριτική με την οποία παροτρύνει τη συνέχιση των προσπαθειών μου. Ειλικρινά ευγνώμων για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή μου, για την ενθάρρυνση και την πάντα άμεση υποστήριξη αισθάνομαι προς τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Πετσίνη, που από το 4° έτος των προπτυχιακών μου σπουδών με τιμά με την εμπιστοσύνη του.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον κ. Σπύρο Φουταδάκη, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Κέντρου Βασικής Έρευνας Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α., για την πολύτιμη συμβολή του στη διεξαγωγή της μελέτης και, ιδιαιτέρως γιατί με μύησε στο συναρπαστικό κόσμο της βιοπληροφορικής, είχε ιώβειο υπομονή να επιλύει της απορίες μου και με ενθάρρυνε μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης.

Ένα, επίσης, τεράστιο ευχαριστώ στην κα Μαριάννα Κούτση, MSc, Υποψήφια Διδάκτωρ, Κέντρο Βασικής Έρευνας Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α., για την καθοριστική συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, την προθυμία να επιλύει τις απορίες μου, την εμψύχωση και την αισιοδοξία στις πιο απαιτητικές στιγμές της μελέτης.

Ειλικρινείς ευχαριστίες προς την κα. Μαρία Μάνου, MSc Τεχνολόγο NMTΣ, για την καθοριστική συμβολή της στο αρχικό στάδιο της πειραματικής δοκιμασίας που οδήγησε στην επιτυχία της μελέτης, το συγκινητικό ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, και γιατί με τιμά με τη φιλία της.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Δημήτριο Βλαχοδημητρόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α, για την καθοριστική συνεισφορά του στη διεξαγωγή των ανοσοϊστοχημικών πειραμάτων.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Νικόλαο Νικητάκη, Καθηγητή & Αναπληρωτή Πρόεδρο Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., για τις γνώσεις, τις ευκαιρίες και την ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ευχαριστώ θερμά την κα. Ευθυμία Κιτράκη, Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α., για την ευγενική παραχώρηση του εξοπλισμού του Εργαστηρίου Βιολογίας Στόματος, την ενθάρρυνση για την εκπόνηση της μελέτης και την προθυμία της για την επίλυση αποριών. Ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωνσταντίνο Τσιχλάκη, Ομότιμο Καθηγητή Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., για την πολύτιμη βοήθεια στην διαδικασία κατάθεσης του ερευνητικού πρωτοκόλλου της μελέτης.

Ειλικρινείς ευχαριστίες προς τον κ. Ιωάννη Βατσέλλα, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή, Κέντρου Βασικής Έρευνας Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α. για την πολύτιμη συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων γονιδιωματικής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Ιωάννη Μιχαλόπουλο και στον κ. Βασίλειο Ζωγόπουλο, MSc, Κέντρο Βιολογίας Συστημάτων, Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α., για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεξαγωγή της μετα-ανάλυσης που συμπεριλήφθηκε στη διατριβή.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Γεώργιο Βηλαρά, Τεχνολόγο, την κα. Μαρία Κεμερλή, Τεχνολόγο, και την κα. Λώρα Μελά, Τεχνολόγο για τις πολύτιμες συμβουλές σε ζητήματα της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής.

Ειλικρινείς ευχαριστίες προς τους αποφοίτους και μεταπτυχιακούς φοιτητές της Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Κλινικής, Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., κ.κ. Φαίδρα Καποπούλου, Ανδρέα Πρίγκο, Γεώργιο Νταγιάντη, Γεώργιο Γιαννούλη, Μαριαλένα Οικονόμου, Ιουλία Αράπη, Αδαμαντία Βλαχάκη και Δανάη Παπαβασιλείου, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη συλλογή των περιπτώσεων της μελέτης.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον κ. Γρηγόρη Θερμό, MSc Στοματολογίας, για την άριστη συνεργασία κατά τη διεξαγωγή και συγγραφή της συστηματικής ανασκόπησης που συμπεριλήφθηκε στη διατριβή, τις υπέροχες επιστημονικές συζητήσεις καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και τη ειλικρινή συμπαράσταση για την ολοκλήρωσή της.

Ένα, επίσης, τεράστιο ευχαριστώ στην κα. Μαρία Μπαλτά, MSc Περιοδοντολογίας, Υποψήφια Διδάκτωρ, Dental School, University of Oslo, το μεγάλο μου στήριγμα καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής και την καλύτερη -εξ' αποστάσεως- συντροφιά στις ατελείωτες ώρες διαβάσματος, για την πολύτιμη βοήθεια στη στατιστική ανάλυση και τις καίριες επιστημονικές παρατηρήσεις, και, κυρίως, γιατί με τιμά με την πολυετή φιλία της.

Απεριόριστες ευχαριστίες στην κα. Κωνσταντίνα Χατζηδημητρίου, MSc Παιδοδοντιατρικής, Υποψήφια Διδάκτωρ Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α., για την πολύτιμη βοήθειά της στην οπτικοποίηση αποτελεσμάτων με τη γλώσσα προγραμματισμού R, για την εμψύχωση σε όλες τις απαιτητικές στιγμές της διατριβής και ιδιαίτερα κατά την ολοκλήρωσή της, και κυρίως για τη στήριξη και την υπέροχη φιλία με την οποία με τιμά από το 1° έτος των προπτυχιακών μας σπουδών.

Επίσης, απεριόριστες ευχαριστίες στην κα. Κατερίνα Ακτύπη-Μπαμπουράνου, Χειρουργό Οδοντίατρο, για την πρόθυμη βοήθεια με την επιμέλεια του κειμένου της διατριβής, την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκειά της, γιατί δεν κουράστηκε να ακούει για την οδοντογενή κερατινοκύστη και τα βλαστοκύτταρα, και γιατί με τιμά με την ξεχωριστή φιλία της από την 1^η ημέρα εγγραφής μας στην Οδοντιατρική Σχολή.

Ειλικρινείς ευχαριστίες στον κ. Δημήτριο Μιχελογιαννάκη, Associate Professor and Assistant Program Director, Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Eastman Institute for Oral Health, Rochester NY, για τις πολύτιμες συμβουλές κατά το σχεδιασμό της συστηματικής ανασκόπησης που αποτέλεσε μέρος της διατριβής, την ακούραστη παροχή πρόσβασης σε βιβλιογραφικές πηγές, και κυρίως για τη στήριξη και την τιμητική φιλία του από το 1° έτος των προπτυχιακών μας σπουδών.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Πάρι Ταμιωλάκη, MSc Στοματολογίας, Specialty Registrar in Oral and Maxillofacial Pathology, St James's University Hospital, The Leeds Teaching Hospitals, UK, για την πολύτιμη βοήθεια στη συλλογή των περιπτώσεων της μελέτης και τις επιστημονικές συζητήσεις κατά τον αρχικό σχεδιασμό της.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Παναγιώτη Χριστόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., και τον Δρ. Ιωάννη Μελακόπουλο, Στοματικό και Γναθοπροσωπικό Χειρουργό, για την υποστήριξη στη συλλογή στοιχείων των ασθενών της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Ιωάννη Κούτλα, Associate Professor & Director, Division of Oral Pathology, School of Dentistry, University of Minnesota, για την παραχώρηση της υποτροφίας Georgios Koutlas Postgraduate Fellowship, κατά τη διάρκεια της οποίας διαμορφώθηκε μέρος της ερευνητικής ιδέας της μελέτης και για την πάντα πρόθυμη παροχή πρόσβασης σε βιβλιογραφικές πηγές. Ευχαριστώ ειλικρινά την κα. Ευγενία Γιαννοπούλου, MSc, Γραμματέα Κλινικής Στοματολογίας και Νοσοκομειακής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., για την υποστήριξη στη συλλογή στοιχείων των περιπτώσεων της μελέτης και στην επίλυση γραφειοκρατικών ζητημάτων, και ιδιαιτέρως γιατί με τιμά με τη φιλία της και με στηρίζει σε όλα τα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θερμά ευχαριστώ την κα. Παγώνα Κασίμη, Υπεύθυνη κοινωνικών υπηρεσιών-εργαλειοδοσίας, Κλινικής Στοματολογίας και Νοσοκομειακής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., για την υποστήριξη στη συλλογή στοιχείων του ιστορικού των ασθενών της μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ την κα. Παναγιώτα Μεχτερίδου, Τεχνολόγο Κλινικής Στοματολογίας και Νοσοκομειακής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., για την ευγενική βοήθεια στην ιστολογική τεχνική της μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωνσταντίνο Ζάγκα, MSc, για τη βοήθεια κατά τις αρχικές δοκιμασίες απομόνωσης RNA από τους ιστούς παραφίνης.

Ευχαριστώ ειλικρινά τη Δρ. Ευαγγελία Ζαμπέλη, Ρευματολόγο, για τη συγκινητική ενθάρρυνση για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ απεριόριστα την κα. Φρόσω Γαλανού, Χειρουργό Οδοντίατρο, για τη μοναδική φιλία της, την υποστήριξη και εμψύχωση σε όλα τα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, γιατί είναι πάντα κοντά μου στις δυσκολίες και πιο κοντά μου στις χαρές, και γιατί στην πιο απαιτητική περίοδο της διατριβής μου έκανε το πιο πολύτιμο και τιμητικό «δώρο».

Η διδακτορική μου διατριβή δε θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη στήριξη της οικογένειάς μου, στην οποία αφιερώνεται με όλη μου την αγάπη και την ευγνωμοσύνη. Στη γιαγιά μου Έλλη, στην οποία οφείλω ό,τι είμαι και ό,τι έχω καταφέρει στη ζωή μου, στον θείο μου Γιώργο, που είναι η δύναμή μου, το πρότυπό μου και ο λόγος που έγινα Οδοντίατρος, στη μητέρα μου Κατερίνα, που ενθαρρύνει και στηρίζει ακούραστα κάθε μου βήμα, στη θεία μου Ελένη που από τότε που ήμουν μαθήτρια υποστήριζε και εμψύχωνε όλες μου τις προσπάθειες, και στον θείο μου Άλκη, που με παροτρύνει με το παράδειγμά του να μη σταματάω να προσπαθώ να γίνομαι καλύτερος άνθρωπος.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΚΟΠΟΣ & ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗ

1.1. Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη καλά τεκμηριωμένη αναφορά μίας κύστης με ιστολογικά χαρακτηριστικά όμοια της μετέπειτα επονομαζόμενης οδοντογενούς κερατινοκύστης εντοπίζεται το 1876 στη γερμανόφωνη βιβλιογραφία και αποδίδεται στον Πολωνό χειρουργό J. Mikulicz.¹ Ο τελευταίος περιέγραψε μία μονόχωρη κυστική αλλοίωση στην κάτω γνάθο γυναίκας 19 ετών, που ιστολογικά επενδυόταν από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο πάχους 8-10 κυτταρικών σειρών, με αποπλατυσμένα εμπύρηνα κύτταρα στην ανώτερη στιβάδα, ατρακτοειδή κύτταρα στην ενδιάμεση στιβάδα και κύτταρα με ευμεγέθεις πυρήνες στους 2-3 κατώτερους επιθηλιακούς στίχους, χωρίς επιθηλιακές καταδύσεις ή παρουσία αδένων ή τριχοθυλακίων, την οποία χαρακτήρισε ως «δερμοειδή κύστη» (dermoide).^{1, 2}

Ο όρος «οδοντογενής κερατινοκύστη» (odontogenic keratocyst, OKK) αποτέλεσε μετάφραση του "Keratocyster", που προτάθηκε το 1956 από τον τότε τελειόφοιτο της Οδοντιατρικής σχολής της Κοπενχάγης και φοιτητή του Καθηγητή J. Pindborg, H. P. Philipsen, για να περιγράψει τις κύστεις των γνάθων στις οποίες παρατηρείται κερατινοποίηση σε μεγάλη έκταση του επενδυτικού τους επιθηλίου.^{3,4} Στην ίδια δημοσίευση, στη δανέζικη γλώσσα, το "Keratocyster" ακολουθούσε εντός παρενθέσεως η ονομασία "kolesteatomer",^{3, 4} δηλαδή «χολοεστεάτωμα» (choloesteatoma), που αντιστοιχεί σε «μια κυστική ή ανοιχτή μάζα κερατίνης με μία ζωντανή μήτρα (a cystic or "open" mass of keratin squames with a living "matrix")», με την οποία είχαν αναφερθεί κύστεις με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά αντίστοιχα της ΟΚΚ από το 1926.^{3, 5} Άλλα ονόματα που επινοήθηκαν για να περιγράψουν κύστεις με τους μικροσκοπικούς χαρακτήρες της ΟΚΚ ήταν «επιδερμοειδής κύστη των γνάθων» (epidermoid cyst of the jaws)^{3, 6} ή «βουτυρώδης κύστη» (buttery cyst).¹ Ο τελευταίος όρος ήταν ευρέως χρησιμοποιούμενος στη γαλλόφωνη βιβλιογραφία (ως kyste butyreux), ωστόσο έχει χρησιμοποιηθεί και για το χαρακτηρισμό άλλων οδοντογενών κύστεων εκτός της ΟΚΚ, όπως η οδοντοφόρος κύστη.¹

Ένας άλλος όρος που επί σειρά ετών θεωρήθηκε ταυτόσημος της ΟΚΚ ήταν η «αρχέγονη κύστη» (primordial cyst), η οποία περιγράφηκε για

πρώτη φορά το 1945 από τον H.B.G. Robinson, ως μια κύστη των γνάθων που προέρχεται από υπολείμματα της οδοντικής ταινίας ή του οργάνου της αδαμαντίνης και σχηματίζεται κατά τα αρχικά στάδια της οδοντογενέσης, πριν την καταβολή των ενασβεστιωμένων ιστών και μετά από εκφύλιση του αστεροειδούς δικτύου, σε θέσεις που θα αντιστοιχούσαν σε ελλείποντα ή υπεράριθμα δόντια.⁷ Στην πρώτη ταξινόμηση των οδοντογενών όγκων και κύστεων από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) το 1971, η επικρατούσα ονομασία που αντιστοιχούσε στην ΟΚΚ ήταν η *αρχέγονη κύστη* και η *κερατινοκύστη* συμπεριλήφθηκε εντός παρενθέσεως ως συνώνυμος όρος [primordial cyst (keratocyst)],⁸ ενώ το αντίστροφο προτάθηκε στη δεύτερη ταξινόμηση του ΠΟΥ το 1992 [odontogenic keratocyst (primordial cyst)].⁹ Ο όρος *αρχέγονη κύστη* διατηρήθηκε ως συνώνυμο στην τρίτη ταξινόμηση το 2005,¹⁰ ενώ απουσίαζε από το εδάφιο της ΟΚΚ στην τελευταία ταξινόμηση του ΠΟΥ το 2017.¹¹

Άλλη τροποποίηση στις εκδόσεις του ΠΟΥ σχετικά με την ΟΚΚ, αφορούσε αποδοχή ή ύπαρξης ενός στην μη της ορθοκερατινοποιημένου υποτύπου της (odontogenic keratocyst, orthokeratinized variant). Ο υπότυπος αυτός προτάθηκε από τον J. M. Wright το 1981 ως μία παραλλαγή της ΟΚΚ, που ιστολογικά χαρακτηριζόταν κατά κανόνα από ορθοκερατινοποιημένο επιθήλιο, με ή χωρίς την παρουσία κοκκώδους στιβάδας, ή σε κάποιες περιπτώσεις από παρακερατινοποιημένο ή μη κερατινοποιημένο επιθήλιο, από τη βασική στιβάδα του οποίου απουσίαζαν τα παθογνωμονικά ευρήματα της ΟΚΚ, δηλαδή η παραλληλία των κυττάρων και η πόλωση και υπερχρωμασία των πυρήνων.¹² Ο ορθοκερατινοποιημένος υπότυπος έγινε αποδεκτός ως ιστολογική παραλλαγή της ΟΚΚ στη δεύτερη έκδοση του ΠΟΥ το 1992,⁹ ενώ, αντίθετα, στην τρίτη έκδοση το 2005 υποστηρίχθηκε πως «μία κύστη που επενδύεται από ορθοκερατινοποιημένο επιθήλιο δεν εντάσσεται στο φάσμα της ΟΚΚ».¹⁰ Στην τέταρτη ταξινόμηση των οδοντογενών όγκων και κύστεων από τον ΠΟΥ το 2017 ο προαναφερθείς υπότυπος καταχωρήθηκε ως μία ανεξάρτητη από την OKK οντότητα, υπό τον όρο ορθοκερατινοποιημένη οδοντογενής κύστη (orthokeratinized odontogenic cyst).¹¹

Τέλος, η πιο αξιοσημείωτη αλλαγή του ΠΟΥ αναφορικά με την ΟΚΚ ήταν η ταξινόμησή της μεταξύ των οδοντογενών όγκων ή κύστεων. Στις

δύο πρώτες εκδόσεις, η ΟΚΚ καταχωρήθηκε ως οδοντογενής κύστη αναπτυξιακής αιτιολογίας.^{8,9} Στην τρίτη έκδοση το 2005, η βιολογική συμπεριφορά, τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, και το γενετικό προφίλ της ΟΚΚ θεωρήθηκαν περισσότερο συμβατά με νεόπλασμα, γι' αυτό και μεταφέρθηκε στην κατηγορία των οδοντογενών όγκων υπό όρο «κερατινοκυστικός οδοντογενής όγκος» (keratocystic τον odontogenic tumor).¹⁰ Μία παραλλαγή της τελευταίας ονομασίας αποτέλεσε ο όρος «κερατινοποιούμενος κυστικός οδοντογενής όγκος» (keratinizing cystic odontogenic tumor) που χρησιμοποιήθηκε από ορισμένους ερευνητές μετά το 2005.13, 14 Τα στοιχεία που υπαγόρευσαν την ένταξη της ΟΚΚ στην κατηγορία των οδοντογενών όγκων ήταν α) το τοπικά διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης της ΟΚΚ εντός των γνάθων, β) η αυξημένη τάση της να υποτροπιάζει μετά από θεραπεία. γ) ορισμένα ιστοπαθολογικά ευρήματα, όπως οι εκβλαστήσεις των κυττάρων της βασικής στιβάδας προς το συνδετικό ιστός και ο αυξημένος αριθμός μιτώσεων σε κύτταρα της παραβασικής στιβάδας, καθώς και δ) χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, για παράδειγμα στο PTCH1.¹⁵ Εντούτοις, τα στοιχεία αυτά αναθεωρήθηκαν στη τελευταία έκδοση του ΠΟΥ το 2017 και κρίθηκαν ως ανεπαρκή για να υποστηρίξουν με βεβαιότητα τη νεοπλασματική φύση της ΟΚΚ, οδηγώντας στην επαναταξινόμησή της μεταξύ των οδοντογενών κύστεων υπό τον όρο «οδοντογενής κερατινοκύστη» (odontogenic keratocyst),¹¹ που έκτοτε τυγχάνει ευρείας αποδοχής στη διεθνή βιβλιογραφία και θα χρησιμοποιηθεί με το ακρωνύμιο ΟΚΚ στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

1.2. Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων

Η ΟΚΚ μπορεί να συνιστά ανεξάρτητη παθολογική κατάσταση σε έναν ασθενή (σποραδική OKK) ή να αναπτύσσεται στο πλαίσιο συνδρόμου (συνδρομική ΟΚΚ).¹¹ Το συχνότερα σχετιζόμενο με την ΟΚΚ σύνδρομο είναι το Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων [ΣΣΒΚ, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 109400], (Gorlin-Goltz επονομαζόμενο σύνδρομο Gorlin-Goltz και ως syndrome), από τα ονόματα των δύο ερευνητών που το καθιέρωσαν το 1960.¹⁶ Το ΣΣΒΚ έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία με τουλάχιστον είκοσι διαφορετικά ονόματα,^{17, 18} με συχνότερα χρησιμοποιούμενα τα Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome και Basal Cell Nevus Syndrome. Ο επιπολασμός του ΣΣΒΚ εκτιμάται κατά μέσο όρο σε 1 ανά 60.000 άτομα, ενώ εμφανίζει μεγάλη διακύμανση ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, από 1 ανά 30827 έως 1 ανά 256000 άτομα.^{19, 20} Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας ή εμφανίζεται *de novo*, συχνότερα σε άτομα της καυκάσιας φυλής. Οι πρώτες εκδηλώσεις του συνδρόμου παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς στην 1^η έως 3^η δεκαετία της ζωής, χωρίς προτίμηση φύλου.¹⁹⁻²²

Η ΟΚΚ ανήκει στις συχνότερες εκδηλώσεις του ΣΣΒΚ και μπορεί να αποτελέσει το πρώτο σημείο που οδηγεί στη διάγνωση του συνδρόμου σε ασθενείς στις πρώτες δύο δεκαετίες της ζωής.^{19, 23} Σύμφωνα με μία συστηματική ανασκόπηση που εξέτασε τον επιπολασμό των διαφόρων εκδηλώσεων του συνδρόμου σε 251 ασθενείς από χώρες της Ανατολικής Ασίας και 405 ασθενείς από κράτη της Νότιας Ευρώπης, περιπτώσεις ΟΚΚ διαγνώστηκαν στο 90% και 70% των ασθενών με ΣΣΒΚ, αντίστοιχα.²⁴ Στα συνήθη κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΣΒΚ ανήκουν, επίσης, δερματικές βλάβες, όπως τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα και τα βοθρία στις παλάμες ή τα πέλματα, σκελετικές ανωμαλίες, στη θωρακική κοιλότητα, όπως δισχιδείς πλευρές, ή την κρανιοπροσωπική χώρα, όπως μακροκεφαλία και το χαρακτηριστικό «χονδροειδές προσωπείο» ("coarse face"), καθώς και εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, με συνηθέστερες τις ενασβεστιώσεις στο δρέπανο του εγκεφάλου.^{21, 23} Οι ασθενείς με ΣΣΒΚ μπορεί να εμφανίσουν σημεία από τους οφθαλμούς, όπως υπερτελορισμό ή στραβισμό, καθώς και παθήσεις του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως υπογοναδισμό.^{21, 23} Πιθανή είναι, ακόμα, η ανάπτυξη καλοήθων και κακοήθων όγκων, όπως μυελοβλάστωμα, μηνιγγίωμα, ίνωμα των ωοθηκών, ινοσάρκωμα των ωοθηκών ή των γνάθων, καρδιακό ίνωμα και εμβρυϊκό ραβδομύωμα.¹⁹ Οι εκδηλώσεις από τη στοματογναθική περιοχή περιλαμβάνουν, εκτός της ΟΚΚ, υποπλασία άνω γνάθου, υπερπλασία κάτω γνάθου με συνοδό προγναθισμό, χειλεοσχιστία, υπερωιοσχιστία, υψηλή γωνιώδη υπερώα, διαταραχές σύγκλεισης, αγενεσία δοντιών και έγκλειστα δόντια.^{21, 23}

Το γενετικό υπόβαθρο του ΣΣΒΚ περιλαμβάνει μεταλλάξεις σε μέλη της σηματοδοτικής οδού του Sonic Hedgehog, κυρίως στο γονίδιο *PTCH1* (χρωμόσωμα 9q22.32), στο οποίο έχουν αναφερθεί περισσότερες από 280 μεταλλάξεις, και σπανιότερα στα γονίδια *PTCH2* (χρωμόσωμα 1p34.1) ή *SUFU* (χρωμόσωμα 10q24.32), που προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό οδηγώντας στην εμφάνιση των αναπτυξιακών και νεοπλασματικών εκδηλώσεων του συνδρόμου.²² Οι περισσότερες μεταλλάξεις του PTCH1 σε ασθενείς με ΣΣΒΚ είναι πλαισιοτροπικές (frameshift), δηλαδή αφορούν σε προσθήκη ή διαγραφή αριθμού κωδικωνίων (τριπλέτας βάσεων) μη πολλαπλάσιου του 3, οδηγώντας σε τροποποίηση του πλαισίου ανάγνωσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ακολουθούμενες από τις ανερμηνεύσιμες (nonsense) μεταλλάξεις που οδηγούν στην εμφάνιση κωδικωνίων λήξης, με συνέπεια τον πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.²² Εκτός από τον κομβικό της ρόλο στην εμφάνιση της σχετιζόμενης με το ΣΣΒΚ ΟΚΚ, η οδός του Sonic Hedgehog έχει βρεθεί πως συμμετέχει στην παθογένεια και της σποραδικής ΟΚΚ,²⁵ και αναλύεται εκτενώς στην υποενότητα 1.9.3.

Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο PTCH1 έχει διαγνωστική αξία για την τεκμηρίωση του ΣΣΒΚ, η οποία, όμως, τις περισσότερες φορές επιτυγχάνεται με βάση τα κλινικά του χαρακτηριστικά.^{22, 26} Συγκεκριμένα, οι κλινικές και ακτινογραφικές εκδηλώσεις του συνδρόμου έχουν ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες, αναλόγως αν θεωρούνται ως μείζονα ή ελάσσονα κριτήρια, ο συνδυασμός των οποίων θέτει τη διάγνωσή του ΣΣΒΚ. Η αρχική κατηγοριοποίηση των εκδηλώσεων σε μείζονα και ελάσσονα κριτήρια προτάθηκε από τους Evans et al το 1993²⁷ και τροποποιήθηκε σε επόμενες μελέτες.^{23, 28, 29} Η τελευταία αναθεώρηση των διαγνωστικών κριτηρίων του ΣΣΒΚ αποτέλεσε τον πρωταρχικό σκοπό του πρώτου διεθνούς συνεδρίου που συνδιοργανώθηκε από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου του Saint Louis και το δίκτυο υποστήριξης της ζωής ατόμων με ΣΣΒΚ.²⁶ Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αναθεωρημένα μείζονα και ελάσσονα κριτήρια και οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για τη διάγνωση του συνδρόμου. Η ΟΚΚ ανήκει στα μείζονα κριτήρια και η διάγνωση πολλαπλών ΟΚΚ σε άτομα νεότερα των 20 ετών συνιστά αιτία διερεύνησης του ΣΣΒΚ.²⁶ Η διάγνωση του ΣΣΒΚ τίθεται είτε κλινικά όταν συνυπάρχουν δύο μείζονα κριτήρια ή ένα μείζον και δύο ελάσσονα κριτήρια, είτε, επί παρουσίας ενός μείζονος κριτηρίου, μετά από μοριακή επιβεβαίωση της *PTCH1* μετάλλαξης.²⁶

Πίνακας 1. Διαγνωστικά κριτήρια του ΣΣΒΚ και ενδείξεις μοριακού ελέγχου για την τεκμηρίωση του συνδρόμου.²⁶

Μείζονα κριτήρια	Ελάσσονα κριτήρια			
 ΒΚΚ σε ηλικία <20 ετών ή υπερβολικά μεγάλος αριθμός 	1. Ανωμαλίες των πλευρών			
ΒΚΚ, δυσανάλογος του ιστορικού έκθεσης στην ηλιακή	Σκελετικές δυσπλασίες και ακτινογραφικές μεταβολές			
ακτινοβολία και του τύπου δέρματος	(π.χ. σπονδυλικές ανωμαλίες, κυφοσκολίωση, βραχύ			
	τέταρτο μετακάρπιο, μεταξονική πολυδακτυλία)			
2. ΟΚΚ σε ηλικία <20 ετών	3. Μακροκεφαλία			
3. Βοθρία σε παλάμες και πέλματα	4. Υπερωιο-/χειλεοσχιστία			
4. Πεταλιώδης ενασβεστίωση στο δρέπανο του εγκεφάλου	5. Ωοθηκικό/καρδιακό ίνωμα			
 Μυελοβλάστωμα, κυρίως δεσμοπλαστικό 	Λεμφικές κύστεις μεσεντερίου			
 Συγγενής 1^{ου} βαθμού με ΣΣΒΚ 	 Οφθαλμικές ανωμαλίες (π.χ. στραβισμός, 			
	υπερτελορισμός, συγγενής καταρράκτης, γλαύκωμα,			
	κολόβωμα)			
Προϋποθέσεις για τη διάγνωση του ΣΣΒΚ				

α) 2 μείζονα κριτήρια **ή β)** 1 μείζον και 2 ελάσσονα κριτήρια **ή γ)** 1 μείζον κριτήριο και μοριακή επιβεβαίωση μετάλλαξης στο *PTCH1* γονίδιο

Σύσταση για μοριακό έλεγχο σε περιπτώσεις υψηλής υποψίας ΣΣΒΚ

1. Προγεννητικά, σε περιπτώσεις με γνωστή οικογενή μετάλλαξη.

2. Σε ασθενείς με κλινικά σημεία ενδεικτικά του ΣΣΒΚ, που δεν πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια.

3. Προληπτικά σε άτομα που έχουν συγγενείς με ΣΣΒΚ, αλλά δεν πληρούν τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια.

Συντομογραφίες: ΣΣΒΚ=σύνδρομο σπιλοειδών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων, ΒΚΚ=βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, ΟΚΚ=οδοντογενής κερατινοκύστη

Ο μοριακός έλεγχος ενδείκνυται σε περιπτώσεις που τα κλινικά χαρακτηριστικά και το οικογενειακό ιστορικό κατατάσσουν ένα άτομο σε ομάδα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση ΣΣΒΚ (Πίνακας 1).²⁶ Λόγω του υψηλού κόστους του μοριακού ελέγχου και δεδομένου ότι η ανίχνευση *PTCH1* μετάλλαξης, παρότι συχνή, δεν επιβεβαιώνεται στο σύνολο των διαγνωσμένων με ΣΣΒΚ περιπτώσεων,^{26, 30} τα κλινικά κριτήρια θεωρούνται κατά κανόνα επαρκή για τη διάγνωση του συνδρόμου,^{22, 26} χωρίς, ωστόσο, να έχει προσδιοριστεί ποιος συνδυασμός κριτηρίων έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα για τη διάγνωση του ΣΣΒΚ.²²

Σπανιότερα, η ΟΚΚ έχει συσχετιστεί και με άλλα σύνδρομα εκτός του ΣΣΒΚ, όπως το στοματο-προσωπο-δακτυλικό σύνδρομο (orofacial digital syndrome),³¹ το σύνδρομο Ehlers Danlos,³² το σύνδρομο Noonan³³ και το σύνδρομο Simpson Golabi–Behmel.³⁴ Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο όρος συνδρομική ΟΚΚ θα χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη σχετιζόμενη με το ΣΣΒΚ ΟΚΚ. Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα επιδημιολογικά, κλινικά, ακτινογραφικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ΟΚΚ και επισημαίνονται τυχόν διαφορές τους μεταξύ της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ.

1.3. Επιδημιολογικά δεδομένα

Η ΟΚΚ αποτελεί τη 2^η πιο συχνή οδοντογενή κύστη αναπτυξιακής φύσης και την 3^η σε συχνότητα στο σύνολο των κύστεων των γνάθων, μετά τη φλεγμονώδους αιτιολογίας ακρορριζική κύστη και την αναπτυξιακής αιτιολογίας οδοντοφόρο κύστη.^{35, 36} Το ποσοστό των ΟΚΚ μεταξύ όλων των κύστεων των γνάθων κυμαίνεται μεταξύ 1,3% και 23%, με τις περισσότερες μελέτες να αναφέρουν ποσοστά μεγαλύτερα του 6%.³⁵ Τα διεθνή επιδημιολογικά δεδομένα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μίας πρόσφατης αναδρομικής μελέτης από την Ελλάδα, στην οποία η ΟΚΚ αντιστοιχούσε στο 8,2% επί συνόλου 5294 κύστεων των γνάθων που διαγνώστηκαν στο Εργαστήριο Στοματολογίας, της Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α. κατά τη διάρκεια 38 ετών.³⁶

Στη συντριπτική πλειοψηφία των ΟΚΚ δεν προϋπάρχει ιστορικό ΣΣΒΚ ή δεν τεκμηριώνεται η διάγνωσή του. Σύμφωνα με μία συστηματική ανασκόπηση που συμπεριέλαβε 3124 ΟΚΚ προερχόμενες από 27 δημοσιεύσεις, οι συνδρομικές ΟΚΚ αντιστοιχούσαν στο 6,4% των συνολικών περιπτώσεων ΟΚΚ, με το ποσοστό αυτό να είναι μεγαλύτερο σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους πληθυσμούς της λατινικής Αμερικής (11,97%) σε σχέση με δείγματα προερχόμενα από χώρες του Δυτικού κόσμου (6,37%) ή της Ανατολικής Ασίας (5,03%).³⁷ Στην προαναφερθείσα μελέτη των 5294 κύστεων των γνάθων από την Ελλάδα, 2,2% των ΟΚΚ προέρχονταν από ασθενείς ήδη διαγνωσμένους με ΣΣΒΚ, με το μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τη βιβλιογραφία να αποδίδεται στις περιορισμένες κλινικές πληροφορίες που ήταν αναδρομικά διαθέσιμες στους συγγραφείς.³⁶

1.4. Δημογραφικά στοιχεία

Στο σύνολό τους, οι ΟΚΚ δεν εμφανίζουν σημαντική προτίμηση φύλου. Σύμφωνα με μία πρόσφατη αναδρομική μελέτη 2497 μονήρων σποραδικών ΟΚΚ προερχόμενων από 10 Ιστοπαθολογικά Εργαστήρια Κεφαλής-Τραχήλου στη Βραζιλία, η αναλογία ανδρών:γυναικών ήταν 1,1:1.³⁸ Στην Ελλάδα, η αναλογία ανδρών:γυναικών για το σύνολο των ΟΚΚ έχει εκτιμηθεί στο 1,3:1.36 Ταυτόσημη αναλογία υπολογίστηκε σε μία συστηματική ανασκόπηση του 2017 που συμπεριέλαβε 2046 ΟΚΚ με γνωστό φύλο των ασθενών, 39 ενώ σε παλαιότερη συστηματική ανασκόπηση 3124 ΟΚΚ, το φύλο των ασθενών ήταν διαθέσιμο σε 3109 αναλογία ανδρών:γυναικών περιπτώσεις και η ήταν $1.5:1.^{37}$ Μεγαλύτερα ποσοστά υπέρ των ανδρών αποδίδονται στις συνδρομικές ΟΚΚ,⁴⁰ εύρημα όχι αποδεκτό σε όλες τις μελέτες,⁴¹ ή σε πολλαπλές ΟΚΚ, χωρίς να προσδιορίζεται αν οι τελευταίες σχετίζονταν με το ΣΣΒΚ.⁴²

Η ΟΚΚ μπορεί να διαγνωστεί σε ασθενή οποιασδήποτε ηλικίας, με μέση ηλικία πρώτης διάγνωσης συνήθως στην 4^η δεκαετία της ζωής.^{37,} ³⁸ Ελαφρά μεγαλύτερη ηλικία πρωτοδιάγνωσης (42,5±19,4 έτη) καταγράφηκε στην πρόσφατη αναδρομική μελέτη από τον Ελληνικό πληθυσμό.³⁶ Ανίχνευση της ΟΚΚ σε μικρότερη ηλικία παρατηρείται στις συνδρομικές περιπτώσεις, οι οποίες συνήθως διαγιγνώσκονται σε ασθενείς στις πρώτες 2 δεκαετίες ζωής.⁴⁰ Επισημαίνεται πως, επειδή η ΟΚΚ μπορεί να είναι ασυμπτωματική, η ηλικία της αρχικής διάγνωσης επηρεάζεται από το χρόνο του πρώτου ακτινογραφικού ελέγχου των γνάθων.⁴³

1.5. Κλινικά χαρακτηριστικά

Σε 40-50% των ασθενών η ΟΚΚ εκδηλώνεται ως μία αργά αυξανόμενη διόγκωση των γνάθων, ενίοτε συνοδευόμενη από πόνο, διάτρηση του φλοιώδους οστού, εκροή πυώδους υγρού, παραισθησία ή κινητικότητα των παρακείμενων της βλάβης δοντιών.^{38, 40, 44, 45} Αντίθετα, σε 5,5-77% των περιπτώσεων που συμπεριλαμβάνονται σε διαφορετικές μελέτες, η ΟΚΚ έχει αποτελέσει τυχαίο ακτινογραφικό εύρημα.^{38, 40, 45} Η ΟΚΚ μπορεί αυξανόμενη να καταλάβει μεγάλη έκταση στη γνάθο, έως και 15 εκατοστά, ενώ το μέσο μέγεθος των μονήρων ΟΚΚ έχει υπολογιστεί στα 3,6 ± 2,5 εκ.³⁸ Σπανιότερα, η ενδοοστική ανάπτυξη της ΟΚΚ μπορεί να θίξει το ζυγωματικό ή το κροταφικό οστούν, καθώς και τον οφθαλμικό κόγχο, ενώ επεκτεινόμενη έως τα μαλακά μόρια του προσώπου μπορεί να προκαλέσει δερματικά αποστήματα.^{46, 47}

Περισσότερο από τα 2/3 των συνολικών ΟΚΚ εμφανίζονται ως μονήρεις βλάβες.⁴² Σε ασθενείς διαγνωσμένους με ΣΣΒΚ αναφέρονται συνήθως 2 ή 3 ΟΚΚ,48 ενώ έχει περιγραφεί ταυτόχρονη παρουσία έως και 28 ΟΚΚ.²³ Επισημαίνεται, ότι οι πολλαπλές ΟΚΚ στους ασθενείς με ΣΣΒΚ εμφανίζονται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ζωής τους, συνεπώς κατά την αρχική διάγνωση του συνδρόμου δεν αποκλείεται να έχει διαπιστωθεί μία μονήρης ΟΚΚ.⁴⁹ Η πλειοψηφία των ΟΚΚ (>65%) εμφανίζεται στην κάτω γνάθο, ιδιαίτερα στην οπίσθια περιοχή που εκτείνεται από την εγγύς επιφάνεια του 1° γομφίου έως τον κλάδο και τη γωνία της γνάθου.^{35, 36, 38-40, 42} Προσβολή της άνω γνάθου παρατηρείται πιο συχνά στις συνδρομικές ΟΚΚ, γεγονός που αποδίδεται στο ότι κατά κανόνα εμφανίζουν πολλαπλές βλάβες, άρα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εντόπισης και στην άνω γνάθο.41 Σύμφωνα με μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση που εστίασε στην ανάπτυξη της ΟΚΚ σε γειτνίαση με τα δόντια, στην κάτω γνάθο παρατηρείται 21% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της ΟΚΚ στην οπίσθια των δοντιών περιοχή συγκριτικά με την οδοντοφόρα περιοχή της γνάθου, ενώ, αντίθετα, στην άνω γνάθο σημειώνεται 43% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της ΟΚΚ στην περιοχή αντίστοιχα με τα δόντια σε σχέση με την οπίσθιες αυτών θέσεις.⁵⁰ Τέλος, σε ποσοστό <0,5% των συνολικών ΟΚΚ, παρατηρείται εξωοοστική εντόπιση, η οποία σύμφωνα με ανασκόπηση της αγγλόφωνης βιβλιογραφίας έως το 2020 είχε περιγραφεί σε λιγότερες από 40 περιπτώσεις, με συχνότερη θέση τα παρειακά ούλα στην περιοχή

αντίστοιχα με τους άνω τομείς έως προγόμφιους, ακολουθούμενη από τα κάτω ούλα και τον παρειακό βλεννογόνο.⁵¹ Μεταξύ των περιφερικών ΟΚΚ, περιορισμένες περιπτώσεις διαγνώστηκαν σε ασθενείς με ΣΣΒΚ.^{52, 53}

1.6. Ακτινογραφικά χαρακτηριστικά

Σε >90% των περιπτώσεων η ΟΚΚ απεικονίζεται ακτινογραφικά ως μία ακτινοδιαυγαστική αλλοίωση, η μορφολογία της οποίας μπορεί να ποικίλει από μονόχωρη (>70%) με σαφώς περιγεγραμμένα, συνήθως ακτινοσκιερά, όρια έως πολύχωρη με ασαφή όρια, που ενίστε δίνουν την εντύπωση πολλαπλών κοιλάνσεων ("scalloping margins"), γεγονός που έχει συσχετιστεί με το διαφορετικό δυναμικό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του επενδυτικού επιθηλίου της (Εικ. 1.1).40,44,54 Σπάνια, χαρακτήρες εμφανίζει απεικονιστικούς OKK μικτής η αλλοίωσης.44 ακτινοδιαυγαστικής/ ακτινοσκιερής Συνοδά ακτινογραφικά ευρήματα είναι η απώθηση δοντιών, σε περίπου 30% των ΟΚΚ, η απορρόφηση ριζών σε <10% των περιπτώσεων και η οστική διεύρυνση σε >40% των ΟΚΚ.⁵⁴ Τα σημεία διεύρυνσης του φλοιώδους οστού και τυχόν διαβρώσεις στην επιφάνειά του γίνονται αντιληπτά κυρίως μέσω της αξονικής τομογραφίας, η οποία ενδείκνυται για την ακριβέστερη απεικόνιση των ορίων των πολύχωρων βλαβών και συνεισφέρει ιδιαίτερα στην περίπτωση των συνδρομικών ΟΚΚ για την ανίχνευση των πολλαπλών ενδοοστικών αλλοιώσεων.55, 56 Αυξημένη απεικονιστική ακρίβεια μπορεί να εξασφαλισθεί, επίσης, μέσω της μαγνητικής τομογραφίας με ενισχυμένη αντίθεση και σταθμισμένη διάχυση (contrast-enhanced & diffusion-weighted magnetic resonance imaging), στην οποία η ΟΚΚ εμφανίζεται ως αλλοίωση ποικίλης έντασης σήματος, από υπόπυκνη έως υπέρπυκνη, με την τελευταία να παρατηρείται σε περιπτώσεις που εμπεριέχονται φολίδες κερατίνης εντός της κυστικής κοιλότητας.⁵⁷

Με βάση την εντόπισή της ΟΚΚ σε σχέση με παρακείμενα δόντια έχουν προταθεί 4 ακτινογραφικοί τύποι: α) αυτός που αναπτύσσεται στη θέση προϋπάρχοντος δοντιού (replacement type), β) αυτός που σχετίζεται με έγκλειστο δόντι (envelopmental type), με εικόνα που μιμείται την οδοντοφόρο κύστη, γ) αυτός που εντοπίζει σε παρακείμενη θέση της ρίζας ενός δοντιού (collateral type), παρόμοια με την πλάγια περιοδοντική κύστη, και δ) αυτός που αναπτύσσεται μακριά από τα δόντια (extraneous type), για παράδειγμα στον κλάδο της κάτω γνάθου.⁵⁸ Συσχέτιση της ΟΚΚ με έγκλειστο δόντι έχει αναφερθεί σε 30-50% των περιπτώσεων,⁴⁰ για τις οποίες έχει προταθεί και ο όρος "follicular keratocyst".⁵⁹ Στις περισσότερες περιπτώσεις η μύλη του έγκλειστου δοντιού περιβάλλεται από την ΟΚΚ στην περιοχή της αδαμαντινο-οστεϊνικής ένωσης ή περικλείεται ολόκληρο το δόντι εντός της ΟΚΚ, ενώ λιγότερο συχνά η οστεολυτική βλάβη περιλαμβάνει τμήμα μόνο της ρίζας του δοντιού.⁵⁴ Το συχνότερο έγκλειστο δόντι με το οποίο έχει συσχετιστεί η ΟΚΚ είναι ο κάτω τρίτος γομφίος.⁴⁰ Στις περιπτώσεις πολλαπλών ΟΚΚ έχει παρατηρηθεί σημαντικά αυξημένη πιθανότητα μία από αυτές να σχετίζεται με έγκλειστο δόντι.⁴²



Εικ. 1.1 ΟΚΚ με εικόνα πολύχωρης ακτινοδιαύγασης στην οπίσθια δεξιά κάτω γνάθο, που αποτέλεσε τυχαίο ακτινογραφικό εύρημα σε άνδρα 29 ετών.

1.7. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Τα ακόλουθα ιστοπαθολογικά κριτήρια που τεκμηριώνουν τη διάγνωση της ΟΚΚ προτάθηκαν από τους Pindborg και Hansen το 1963:³

- λεπτό, ομοιόμορφου πάχους κυστικό επιθήλιο, χωρίς ή με ελάχιστες καταδύσεις.
- Βασική στιβάδα με κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα σε πασσαλοειδή διάταξη.
- iii. Λεπτού πάχους ακανθωτή στιβάδα που συχνά εμφανίζει άμεση μετάβαση από τη βασική στιβάδα.
- iv. Τα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας συχνά εμφανίζουν ενδοκυττάριο οίδημα.

- ν. Η επιφανειακή στιβάδα είναι κυρίως παρακερατίνη, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και ορθοκερατίνη.
- vi. Η επιφανειακή στιβάδα είναι κυματοειδής.
- vii. Το κυστικό τοίχωμα ινώδους συνδετικού ιστού είναι κατά κανόνα λεπτού πάχους και συνήθως ελεύθερο φλεγμονής (Εικ. 1.2).

Η παρουσία κατά κανόνα παρακερατινοποιημένου, με ή χωρίς κατά θέσεις συνύπαρξη ορθοκερατινοποιημένου, επιθηλίου αποτελεί χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό εύρημα OKK. της ωστόσο κερατινοποίηση, είτε με τη μορφή της παρακερατίνης είτε της ορθοκερατίνης, έχει παρατηρηθεί στο επενδυτικό επιθήλιο διαφόρων οδοντογενών κύστεων, όπως η οδοντοφόρος και η ακρορριζική κύστη.⁶⁰ Η αιτιολογία της κερατινοποίησης στις οδοντογενείς κύστεις δεν έχει αποσαφηνιστεί, παρότι θεωρείται εγγενής ιδιότητα του οδοντογενούς επιθηλίου.⁶⁰ Συγκεκριμένα για την ορθοκερατίνη, πιθανολογείται πως είτε αποτελεί de novo χαρακτηριστικό κατά την ανάπτυξη της κύστης είτε οφείλεται σε μεταπλασία λόγω φλεγμονής.61 Φολίδες κερατίνης παρατηρούνται συχνά εντός του κυστικού αυλού.62 Ένα χαρακτηριστικό μικροσκοπικό γνώρισμα της ΟΚΚ που τη διαφοροποιεί από τις άλλες κύστεις των γνάθων, οι οποίες μπορεί να εμφανίσουν κερατινοποίηση, είναι η μορφολογία των κυττάρων της βασικής στιβάδας. Τα τελευταία έχουν σχήμα κυβοειδές έως υψηλό κυλινδρικό με ανάστροφα πολωμένους βαθυχρωματικούς πυρήνες.60 Τα υψηλά κυλινδρικά κύτταρα της βασικής στιβάδας πιστεύεται πως προσομοιάζουν τις (προ)αδαμαντινοβλάστες του αναπτυσσόμενου οδοντικού σπέρματος,^{60, 63} που θα περιγραφεί αναλυτικά στην υποενότητα 1.8.

Το κερατινοποιημένο επιθήλιο χωρίς επιθηλιακές καταδύσεις είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό εύρημα στην ΟΚΚ, στην οποία απουσιάζει η φλεγμονή από το κυστικό τοίχωμα. Αντίθετα σε περιπτώσεις έντονης φλεγμονώδους διήθησης του τοιχώματος παρατηρείται απώλεια αυτών των χαρακτηριστικών από τα υπερκείμενα της φλεγμονής επιθηλιακά τμήματα, τα οποία μπορεί να υπερπλασία ή και παρουσία σωματίων εμφανίζουν υαλίνης (Rushton).^{3, 48, 60} Εικόνα καταδύσεων παρατηρείται, επίσης, στις ΟΚΚ με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding) προς το κυστικό τοίχωμα (Εικ. ακανόνιστη 1.3A), θέσεις οποίες ενίοτε συνυπάρχει στις υπερακάνθωση.^{44, 48, 60} Σε εντοπισμένες θέσεις το επιθήλιο της ΟΚΚ

μπορεί να είναι ατροφικό ή μη κερατινοποιημένο, ή να εμφανίζει ένα υπερβασικό χάσμα (suprabasal split).^{44, 60, 64} Επίσης, μπορεί να ανιχνευτούν βλεννώδη κύτταρα, διαυγή κύτταρα, κροσσωτά κύτταρα αναπνευστικού τύπου επιθηλίου ή μελανοκύτταρα, 44, 60 καθώς και σμηγματογόνοι αδένες.⁶⁰ Σε σπάνιες περιπτώσεις το επενδυτικό επιθήλιο της OKK εμφανίζει στοιχεία αδαμαντινοβλαστικής εκτροπής,^{44, 60} που πληρούν τα κριτήρια των Vickers και Gorlin,⁶⁵ δηλαδή τα κύτταρα της βασικής στιβάδας έχουν υπερχρωματικούς πυρήνες που είναι παράλληλα διατεταγμένοι και πολωμένοι, ενώ παρατηρείται, επίσης, κυτταροπλασματική κενοτωπιώδης εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων, κυρίως της βασικής στιβάδας. Τα παραπάνω στοιχεία είναι ενδεικτικά της πολυδύναμης ικανότητας διαφοροποίησης του επιθηλίου της ΟΚΚ, που μπορεί να αποκτά ποικίλα μορφολογικά πρότυπα.60,66 Άλλα ασυνήθιστα ιστοπαθολογικά ευρήματα είναι οι μιτώσεις στα επιθηλιακά κύτταρα της παραβασικής στιβάδας ή στα ενδιάμεσα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας, και η παρουσία στοιχείων επιθηλιακής δυσπλασίας.44,60,66

Αντίθετα, ιδιαίτερα συχνά παρατηρείται αποκόλληση του κυστικού επιθηλίου από το συνδετικό ιστό, που έχει καταγραφεί σε έως 98% των ΟΚΚ.⁶² Αυτή η υποεπιθηλιακή αποκόλληση έχει θεωρηθεί ως αποτέλεσμα των χειρισμών κατά την αφαίρεση της ΟΚΚ (preparation artifact).⁶⁶ Επειδή, όμως, αποκόλληση του επιθηλίου δεν παρατηρείται εξίσου συχνά σε άλλες οδοντογενείς κύστεις, πιθανώς υποδηλώνει ενδογενή χαρακτηριστικά της ΟΚΚ, όπως η αυξημένη λυσοσωμική ενζυματική δραστηριότητα στο επιθήλιο⁶⁷ ή η αναδιοργάνωση των υποεπιθηλιακών κολλαγόνων ινών σε ένα νέο πρότυπο που ευνοεί την αποκόλληση.⁶⁶ Συχνή είναι και η παρουσία δορυφόρων/θυγατρικών κύστεων (satellite/ daughter cysts) (Εικ. 1.3B), εκβλαστήσεων οδοντογενούς επιθηλίου χωρίς κυστική εκφύλιση ή υπολειμμάτων οδοντογενούς επιθηλίου (Εικ. 1.3Γ) εντός του τοιχώματος της κύριας κυστικής κοιλότητας.^{44, 48, 62, 64} Ο όρος «δορυφόρες» θεωρείται καταλληλότερος για να περιγράψει τις δευτερεύουσες κυστικές κοιλότητες, καθώς πιστεύεται πως προέρχονται από επιθηλιακά υπολείμματα γειτονικά αυτών που έδωσαν γένεση στην κύρια κυστική βλάβη, ενώ αντίθετα δεν μπορεί να τεκμηριωθεί πως εξορμώνται από το επενδυτικό επιθήλιο της κύστης, ώστε να θεωρηθούν «θυγατρικές» βλάβες. 42, 48 Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι δορυφόρων κύστεων: α)

στρογγυλού σχήματος κυστικές κοιλότητες που επενδύονται από αποπλατυσμένα ή κυβοειδή κύτταρα και περιλαμβάνουν φολίδες κερατίνης εντός του αυλού τους, οι οποίες μπορεί να καταλάβουν μεγάλο μέγεθος, β) πλακώδεις δομές με κεντρική κυστική εκφύλιση, εντός της οποίας υπάρχουν επιθηλιακά υπολείμματα και γ) μικρές, ακανόνιστου σχήματος κυστικές κοιλότητες που επενδύονται με παρόμοιας μορφολογίας επιθήλιο με αυτό της κύριας κυστικής Επίσης, έχει κοιλότητας.⁴² αναφερθεί περίπτωση OKK με κοκκιοκυτταρική μεταβολή στα επιθηλιακά κύτταρα των δορυφόρων κύστεων.⁶⁸ Η ακριβής συχνότητα των δορυφόρων κύστεων θα προϋπέθετε τη μελέτη πολλαπλών σειριακών τομών,62 κάτι το οποίο απουσιάζει από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Άλλα ιστοπαθολογικά ευρήματα στο κυστικό τοίχωμα είναι η υποεπιθηλιακή υαλινοποίηση του συνδετικού ιστού, οι δυστροφικές ενασβεστιώσεις, και η παρουσία χόνδρου ή επιθηλιακών νησιδίων με αδαμαντινοβλαστικούς χαρακτήρες, καθώς και οι εναποθέσεις κοκκίων αιμοσιδηρίνης, τα κοκκιώματα κρυστάλλων χοληστερόλης, τα γιγαντοκύτταρα ξένου σώματος και τα σωμάτια Russell σε θέσεις με έντονη φλεγμονώδη διήθηση, η οποία συνήθως είναι μικτού ή χρόνιου τύπου.^{44, 48, 60, 62, 64}

Ακόμα, έχουν περιγραφεί μεμονωμένα περιστατικά ενός συμπαγούς υποτύπου (solid variant) της ΟΚΚ, τα οποία αποτελούνται από πολλαπλές κυστικές κοιλότητες, με επενδυτικό επιθήλιο με τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν,³ και επιθηλιακά νησίδια εντός πυκνού ινώδους συνδετικού ιστού.⁶⁹⁻⁷¹ Δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν ο συμπαγής υπότυπος εμφανίζει ιδιαίτερη βιολογική συμπεριφορά συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΟΚΚ,⁷⁰ ή εάν ταυτίζεται ιστογενετικά με το κερατοκυστικό αδαμαντινοβλάστωμα.⁷² Τέλος, έως το 2015 είχε αναφερθεί ανάπτυξη πρωτοπαθούς ενδοοστικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σε 26 περιπτώσεις ΟΚΚ, οι οποίες προέρχονταν από ασθενείς με και χωρίς ΣΣΒΚ.⁷³ Ο παθογενετικός μηχανισμός κακοήθους εξαλλαγής στην ΟΚΚ δεν έχει αποσαφηνιστεί, ενώ πιθανολογείται η συμμετοχή της χρόνιας φλεγμονής του κυστικού τοιχώματος.⁷³

Από τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν, η παρουσία επιθηλιακών εκβλαστήσεων, δορυφόρων κύστεων και επιθηλιακών νησιδίων στο κυστικό τοίχωμα έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες μελέτες πιο συχνά στις συνδρομικές ΟΚΚ,^{44, 48, 60, 66, 74} χωρίς,

ωστόσο, να υπάρχει ομοφωνία στη βιβλιογραφία για το αν η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις συνδρομικές περιπτώσεις συγκριτικά με τις σποραδικές.⁴⁴



Εικ. 1.2 (Α) Τα τυπικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ΟΚΚ περιλαμβάνουν ένα λεπτό, ομοιόμορφου πάχους κυστικό επιθήλιο, χωρίς καταδύσεις, με κυματοειδή παρακερατινοποιημένη στιβάδα, και βασική στιβάδα με κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα σε πασσαλοειδή διάταξη. Το κυστικό τοίχωμα αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό, συνήθως ελεύθερο φλεγμονής. (Β) Συχνά το επιθήλιο της ΟΚΚ αποκολλάται (βέλος) από το κυστικό τοίχωμα. Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.



Εικ. 1.3 Συχνά ιστοπαθολογικά ευρήματα στην ΟΚΚ είναι (Α) οι επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding) προς το κυστικό τοίχωμα, και η παρουσία (Β) δορυφόρων/θυγατρικών κύστεων και (Γ) νησιδίων οδοντογενούς επιθηλίου (βέλη) εντός του κυστικού τοιχώματος. Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.

1.8. Ιστογενετική προέλευση

Η προέλευση της ΟΚΚ έχει αποδοθεί σε επιθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από δύο πιθανές πηγές:

α) την οδοντική ταινία ή τα ενδοοστικά υπολείμματά της, ή

β) τις εντός του συνδετικού ιστού προεκτάσεις των κυττάρων της βασικής στιβάδας του καλυπτικού επιθηλίου του στοματικού βλεννογόνου (oral epithelium).⁷⁵

Η πρώτη θεωρία συνδέει την ανάπτυξη της ΟΚΚ με παθολογική εκτροπή των επιθηλιακών υπολειμμάτων που παραμένουν στις γνάθους μετά το πέρας του σχηματισμού των δοντιών, φαινόμενο το οποίο έχει συσχετιστεί και με το σχηματισμό οδοντογενών όγκων, όπως το αδαμαντινοβλάστωμα.^{76, 77} Καθοριστικό ρόλο σε αυτόν τον παθογενετικό μηχανισμό, όπως και στη φυσιολογική οδοντογένεση, διαδραματίζουν οι επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις.^{75, 78} Η απαρχή αυτών των αλληλεπιδράσεων τοποθετείται κατά την εμβρυογένεση, αμέσως μετά των σχηματισμό των τριών βλαστικών δερμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα) και των εμβρυϊκών δομών που προκύπτουν από αυτά, όπως είναι, για παράδειγμα, το επιφανειακό εξώδερμα (surface ectoderm) και η, επίσης εξωδερμικής προέλευσης, **νευρική ακρολοφία** (neural crest) (Εικ. 1.4). Από την σχηματίζεται ένας ιδιαίτερος τύπος τελευταία εξωδερμικού μεσεγχύματος με αποκλειστική εντόπιση στην περιοχή κεφαλήςτραχήλου, το *εξωμεσέγχυμα*.



Εικ. 1.4 Κατά την 3^η εμβρυϊκή εβδομάδα, από (Α) το δίστιβο βλαστικό δίσκο σχηματίζονται (Β) τα τρία βλαστικά δέρματα. Στη συνέχεια, το εξώδερμα διαφοροποιείται σε εξειδικευμένες δομές, όπως το επιφανειακό εξώδερμα, ο νευρικός σωλήνας και η νευρική ακρολοφία.

Κατά την 6^η εμβρυική εβδομάδα, το προερχόμενο από το επενδυτικό εξώδερμα αρχέγονο στοματικό επιθήλιο (primitive oral epithelium ή primitive stomatodeum), διαφοροποιείται περαιτέρω, υπό την επίδραση του εξωμεσεγχύματος, στο οδοντογενές επιθήλιο, το οποίο καλύπτει την κορυφή της άνω και κάτω φατνιακής ακρολοφίας υπό τη μορφή μίας ταινιοειδούς πάχυνσης με πεταλοειδές σχήμα (Εικ. 1.5Α), που ονομάζεται **οδοντική ταινία** (dental lamina).^{79, 80} Σε παρειακή εντόπιση της οδοντικής ταινίας σχηματίζεται μία δεύτερη, παροδική επιθηλιακή πάχυνση (προστομιακή ταινία ή vestibular lamina) (Εικ. 1.5B), από την επέκταση της οποίας θα προκύψει το προστόμιο (oral vestibule) που ενώνει το βλεννογόνο της φατνιακής ακρολοφίας με το βλεννογόνο χειλέων ή παρειών.⁷⁹⁻⁸¹ Η οδοντική ταινία συνιστά μία δεξαμενή οδοντογενών βλαστοκυττάρων, που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του δείκτη βλαστοκυττάρων SOX2, και εξασφαλίζουν την ικανότητα σχηματισμού των δοντιών.^{82, 83} Η διαφοροποίηση του αρχέγονου στοματικού επιθηλίου σε οδοντική ταινία αποτελεί το αρχικό στάδιο (initial stage) της οδοντογένεσης και ακολουθείται από το στάδιο του πλακοδίου (placode stage) και των οδοντοβλαστημάτων (bud stage), κατά τα οποία παρατηρείται αυξημένη πυκνότητα των εξωμεσεγχυματικών κυττάρων (Εικ. 1.5B). Σε απάντηση της εξωμεσεγχυματικής πύκνωσης, τα επιθηλιακά κύτταρα της οδοντικής ταινίας πολλαπλασιάζονται στις δέκα προκαθορισμένες θέσεις μελλοντικής ανατολής των νεογιλών δοντιών σε κάθε γνάθο, σχηματίζοντας σφαιροειδείς προσεκβολές που διηθούν το υποκείμενο εξωμεσέγχυμα. Σε επόμενο στάδιο (cap stage), τα κύτταρα της οδοντικής ταινίας συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, υπό την επίδραση των επίσης πολλαπλασιαζόμενων εξωμεσεγχυματικών κυττάρων, και οργανώνονται στην επιθηλιακή δομή που είναι γνωστή ως όργανο αδαμαντίνης (Εικ. 1.5B).⁸⁰ Η μητρική (parental) οδοντική ταινία ενώνεται με το όργανο της αδαμαντίνης με μία επιθηλιακή «γέφυρα» (πλευρική ταινία ή lateral lamina), ενώ επεκτείνεται προς τις γλωσσικές επιφάνειες των γνάθων, στις μελλοντικές θέσεις ανατολής των μόνιμων διαδόχων των νεογιλών δοντιών, αλλά και με οπίσθια κατεύθυνση, προς τη θέση δηλαδή καταβολής των μόνιμων γομφίων (διάδοχος ταινία ή successional/accessional lamina) (Εικ. 1.5B).^{79, 84} Ακολουθεί το στάδιο του κώδωνα (bell stage) (Εικ. 1.5B), κατά το οποίο το όργανο της αδαμαντίνης διαφοροποιείται σε τέσσερις μορφολογικά διαφορετικούς πληθυσμούς επιθηλιακών κυττάρων: α) το έξω
αδαμαντινικό επιθήλιο, β) το αστεροειδές δίκτυο, γ) την ενδιάμεση στιβάδα και δ) το έσω αδαμαντινικό επιθήλιο. Το έσω αδαμαντινικό επιθήλιο γειτνιάζει με τα μεσεγχυματικά κύτταρα του οδοντικού σπέρματος (κύτταρα οδοντικής θηλής) και υπό την αλληλεπίδρασή τους διαφοροποιείται περαιτέρω σε επιμηκυσμένα κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα με πυρήνα τοποθετημένο μακριά από τη βάση του, τις προαδαμαντινοβλάστες, και εν τέλει στις αδαμαντινοβλάστες αδαμαντίνη. που σχηματίζουν την Αντίστοιχα, αρχικά τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα της οδοντικής θηλής διαφοροποιούνται τελικώς σε οδοντινοβλάστες, που συγκροτούν το οργανικό υπόστρωμα του δοντιού, την οδοντίνη. Μετά το σχηματισμό της αδαμαντίνης και της οδοντίνης της μύλης του δοντιού, το έσω και έξω αδαμαντινικό επιθήλιο ενώνονται κάτω από τον αυχένα της μύλης σε μία δίστιβη επιθηλιακή στιβάδα (έλυτρο της ρίζας ή του Hertwig), από την επέκταση της οποίας προκύπτει η ρίζα του δοντιού (advanced bell stage).⁸⁰

Στο τέλος του σταδίου του κώδωνα (Εικ. 1.5Β), η οδοντική ταινία που σχημάτισε το όργανο της αδαμαντίνης διασπάται και υπολείμματά της (dental lamina rests, DLRs) παραμένουν υπό μορφή νησιδίων (νησίδια Serres) εντός του συνδετικού ιστού των ούλων ή των γνάθων, ή στην κάψα ινώδους συνδετικού ιστού που περιβάλλει τη μύλη εγκλείστων δοντιών (οδοντοθυλάκιο ενκλείστων δοντιών, ΟΘΕ).77, 79, 80 DLRs προκύπτουν και από τη διάσπαση της successional/accessional dental lamina (Εικ. 1.5B), ενώ ενδοοστικά επιθηλιακά υπολείμματα μπορούν να παραμείνουν, επίσης, μετά από εκφύλιση του ελύτρου του Hertwig (επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez).⁷⁹ Τέλος, στο στάδιο ωρίμανσης του δοντιού, οι αδαμαντινοβλάστες μετατρέπονται από κυλινδρικά σε κυβοειδή κύτταρα, όμοια με αυτά του έξω αδαμαντίνης αδαμαντινικού επιθηλίου, και το όργανο της συρρικνώνεται και παραμένει ως *λεπτυθέν επιθήλιο αδαμαντίνη*ς.⁸⁰

Η οδοντική ταινία αποτελεί την πηγή προέλευσης της ΟΚΚ, σύμφωνα με την τελευταία έκδοση του ΠΟΥ.¹¹ Στοιχείο που συνάδει με αυτήν τη θεωρία προέλευσης είναι η παρακερατινοποίηση, που αποτελεί ένα μείζον ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό της ΟΚΚ και δεν παρατηρείται συχνά σε άλλες οδοντογενείς κύστεις. Διατηρώντας το δυναμικό του προγονικού ιστού της, δηλαδή του αρχέγονου στοματικού επιθηλίου, η οδοντική ταινία εμφανίζει τη δυνατότητα κερατινοποίησης, που,

αντίθετα, είναι περιορισμένη στα διαφοροποιημένα οδοντογενή επιθήλια, όπως είναι το λεπτυθέν επιθήλιο της αδαμαντίνης που επενδύει τις οδοντοφόρους κύστεις και τα επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez που σχετίζονται με τις οδοντογενείς κύστεις φλεγμονώδους αιτιολογίας.⁷⁵ Επίσης, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του SOX2 σε μεγάλη έκταση του επιθηλίου της ΟΚΚ,85 που θεωρείται δείκτης ενδεικτικός ενός πληθυσμού βλαστοκυττάρων της οδοντικής ταινίας⁷⁶ και των υπολειμμάτων της στα ΟΘΕ,⁷⁷ συνηγορεί υπέρ αυτής της θεωρίας προέλευσης. Η SOX2 έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του αδαμαντινοβλαστώματος έχει, επίσης, συσχετισθεί με πιθανή προέλευση του όγκου από την οδοντική ταινία.⁷⁶ Σύμφωνα, μάλιστα, με μία μελέτη που εξέτασε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών την έκφραση των μεταγράφων πολλαπλών γονιδίων μεταξύ του αδαμαντινοβλαστώματος και της ΟΚΚ, η τελευταία εμφανίζει υπερέκφραση του SOX2.⁸⁶

Η δεύτερη θεωρία της πιθανής προέλευσης της ΟΚΚ από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του καλυπτικού επιθηλίου του στοματικού βλεννογόνου προτάθηκε για να εξηγήσει την ανάπτυξη της ΟΚΚ σε περιοχές της γνάθου, όπου δεν αναπτύσσονται δόντια και άρα δεν αναμένονται DLRs, όπως είναι ο κλάδος της κάτω γνάθου.⁸⁷ Εντούτοις, DLRs έχουν παρατηρηθεί στις γνάθους άπω του τρίτου γομφίου, αντίστοιχα με την περιοχή ανάπτυξης τέταρτου γομφίου, στη θέση στην οποία αναμένεται η επέκταση της διαδόχου ταινίας που αντιστοιχεί στον τρίτο γομφίο.⁷⁶ Τα υπολείμματα της διαδόχου ταινίας έχουν θεωρηθεί ως πιθανή πηγή προέλευσης και για οδοντογενείς όγκους, όπως ο αδενοματοειδής οδοντογενής όγκος, σε περιπτώσεις που δε σχετιζόταν με έγκλειστο δόντι.⁸⁸ Επίσης, επιθηλιακά υπολείμματα με λανθάνον δυναμικό οδοντογενούς διαφοροποίησης που καταλείπονται κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης σε θέσεις χωρίς άμεση συσχέτιση με την οδοντοφυΐα θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων, όπως οδοντονενών όγκων και κύστεων.⁸¹ Αντίστοιχα, δεδομένης της γειτνίασης του προστόμιου με τον παρειακό βλεννογόνο, τα υπολείμματα της προστομιακής ταινίας έχουν θεωρηθεί ως πιθανή πηγή προέλευσης των κερατινοκύστεων που αναπτύσσονται στις παρειές και έχουν ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά όμοια των ΟΚΚ.^{89,90}



Εικ. 1.5 Στάδια οδοντογένεσης. (Α) Κατά την 6^η εμβρυϊκή το αρχέγονο στοματικό επιθήλιο διαφοροποιείται υπό τη μεσεγχυματική επίδραση σε μία ταινιοειδή πάχυνσης με πεταλοειδές σχήμα (οδοντική ταινία, dental lamina) που καλύπτει την κορυφή των φατνιακών ακρολοφιών. (Β) Τα κύτταρα της οδοντικής ταινίας πολλαπλασιάζονται περαιτέρω στις δέκα προκαθορισμένες θέσεις μελλοντικής ανατολής των νεογιλών δοντιών και στα επόμενα στάδια διαφοροποιούνται σε επιμέρους τμήματα (πλευρική ταινία, διάδοχος ταινία) και εξειδικευμένες επιθηλιακές δομές, όπως το όργανο της αδαμαντίνης, ενώ σε παρειακή εντόπιση σχηματίζεται μία δεύτερη επιθηλιακή πάχυνση (προστομιακή ταινία). Στο τέλος του σταδίου του κώδωνα τα επιμέρους τμήματα (†) τους παραμένουν στο συνδετικό ιστό, από τα οποία μπορεί να αναπτυχθούν οδοντογενείς όγκοι και κύστεις.

1.9. Παθογένεια

Επειδή τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των οδοντογενών βλαβών πιστεύεται πως προσομοιάζουν τα επιμέρους μορφολογικά χαρακτηριστικά της οδοντικής διάπλασης, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη φυσιολογική οδοντογένεση, όπως η ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια των οδοντογενών όγκων και κύστεων.⁹¹ Συγκεκριμένα στην ΟΚΚ, η ανάπτυξη του σποραδικού και συνδρομικού της φαινότυπου αντανακλά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυστικού επιθηλίου και του τοιχώματος, και διαμορφώνεται υπό την επίδραση της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog, με πιθανή συμμετοχή άλλων γενετικών ή/και επιγενετικών τροποποιήσεων.63, 92-94

1.9.1. Ο ρόλος του κυστικού επιθηλίου

Ο προεξέχον ρόλος του κυστικού επιθηλίου στην παθογένεια της ΟΚΚ υποδηλώνεται από τα παθογνωμονικά ιστοπαθολογικά της χαρακτηριστικά, που αφορούν στην μορφολογία των κυττάρων της βασικής στιβάδας και στην επιφανειακή παρακερατινοποίηση.⁶³ Επίσης, η ανάπτυξη της ΟΚΚ είναι συνυφασμένη με το αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του επιθηλίου της, όπως έχει αναδειχθεί από τα αποτελέσματα ιστοπαθολογικών, ιστοχημικών, ανοσοϊστοχημικών και *in vitro* μελετών.^{63, 94-96}

Στα ιστολογικά ευρήματα που είναι ενδεικτικά της ενεργού πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας συγκαταλέγονται οι επιθηλιακές εκβλαστήσεις προς το κυστικό τοίχωμα, στις οποίες ενίοτε συνυπάρχει ακανόνιστη υπερακάνθωση,⁶⁰ και ο αυξημένος αριθμός μιτώσεων στα κύτταρα της ενδιάμεσης επιθηλιακής στιβάδας, που είναι ανάλογος αυτού που παρατηρείται σε οδοντογενείς όγκους.^{44, 60, 63} Ακόμα, στην ΟΚΚ σημειώνεται αυξημένη παρουσία κυττάρων θετικών νια ιστοχημικούς (AgNORs) και ανοσοϊστοχημικούς (Ki-67, p53, PCNA) κυτταρικού πολλαπλασιασμού συγκριτικά δείκτες με άλλες οδοντογενείς κύστεις.63,94,96 Η έκφραση αυτών των δεικτών, όπως, επίσης, της ογκοπρωτεΐνης Cyclin D1 και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, που αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, είναι εντονότερη στα κύτταρα της ενδιάμεσης επιθηλιακής στιβάδας, που θεωρούνται ο κατεξοχήν κυτταρικός πληθυσμός που συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό της ΟΚΚ.^{94, 96} Αντίθετα, έχει βρεθεί αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων, θετικών με την τεχνική TUNEL, στην επιφανειακή στιβάδα της ΟΚΚ, στοιχείο που θεωρείται πως αντισταθμίζει το μεγάλο δυναμικό πολλαπλασιασμού, διατηρώντας έτσι το ομοιόμορφο πάχος του επιθηλίου της και αποτρέποντας το σχηματισμό ογκόμορφων μαζών,⁹⁴ συντελώντας έτσι σε ένα μοναδικό πρότυπο πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης.⁶³

Επιπρόσθετα, τα επιθηλιακά κύτταρα της ΟΚΚ εμφανίζουν αυξημένη έκφραση ενζύμων που συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό συγκριτικά με τις φλεγμονώδεις οδοντογενείς κύστεις, στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της τοπικά επιθετικής συμπεριφοράς και του αυξημένου κινδύνου υποτροπής, εάν κατά την αφαίρεσή της παραμείνουν τμήματα του κυστικού επιθηλίου ενδοοστικά.^{67, 95} Τέλος, τα επιθηλιακά κύτταρα της ΟΚΚ, εκφράζουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες IL-1a, IL-1b και IL-6, και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNFa).⁹⁷ Η IL-1a διεγείρει την έκφραση πρωτεολυτικών ενζύμων από τα επιθηλιακά κύτταρα (MMP9) και τις ινοβλάστες του κυστικού τοιχώματος (proMMP1, proMMP2, proMMP3, MT1-MMP), και επάγει τη σύνθεση του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων (M-CSF), της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και του ρυθμιστή των οστεοκλαστών RANKL από τις ινοβλάστες, προάγοντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα που συντελεί στην ενδοοστική ανάπτυξη της ΟΚΚ.⁹⁷⁻¹⁰⁰

1.9.2. Ο ρόλος του κυστικού τοιχώματος

Το κυστικό τοίχωμα μεσεγχυματικού ιστού δεν αποτελεί μόνο δομικό στοιχείο της ΟΚΚ, αλλά επηρεάζει καταλυτικά τη μορφολογία και τη βιολογική της συμπεριφορά.⁷⁵ Η επίδραση του μεσεγχύματος στα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του επιθηλίου της ΟΚΚ αναδείχθηκε από την υποδόρια μεταμόσχευση ανθρώπινων ΟΚΚ σε αθυμικά ποντίκια, οι οποίες διατήρησαν τα παθογνωμονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων της βασικής στιβάδας, δηλαδή πασσαλοειδή διάταξη και βαθυχρωματικούς πυρήνες, μόνο όταν υποστηρίζονταν από το κυστικό τοίχωμα της ΟΚΚ, ενώ τα στοιχεία αυτά απουσίαζαν όταν ο συνδετικός ιστός προερχόταν από τον ξενιστή.¹⁰¹ Επίσης, η απώλεια των τυπικών ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών του επιθηλίου σε θέσεις με έντονη φλεγμονώδη διήθηση του κυστικού τοιχώματος συνηγορεί υπέρ του κρίσιμου ρόλου του τελευταίου στο φαινότυπο της ΟΚΚ.⁹⁴ Το πάχος και η διάταξη των κολλαγόνων ινών του κυστικού τοιχώματος έχουν συσχετισθεί με τη βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ. Σύμφωνα με μελέτες που εξέτασαν στο πολωτικό μικροσκόπιο τομές ΟΚΚ χρωσμένες με Picrosirius red, το τοίχωμα της ΟΚΚ αποτελείται κυρίως από λεπτές, παράλληλα διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου που φαίνονται πράσινες ή πρασινο-κίτρινες στο πολωμένο φως, και σε μικρότερο ποσοστό από παχιές ίνες, που αποκτούν κιτρινο/κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα στο πολωμένο φως.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Αυτή η εικόνα πιστεύεται πως αντιστοιχεί σε προκολλαγόνο, ενδιάμεσα ινίδια κολλαγόνου ή παθολογικό κολλαγόνο, και προσομοιάζει το πρότυπο ινών που έχει παρατηρηθεί στους οδοντογενείς όγκους, ενώ διαφέρει από τις παχιές ίνες που έχει συσχετισθεί με την τοπικά επιθετική, ανάλογη νεοπλάσματος, συμπεριφορά της ΟΚΚ.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Η αυξημένη παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων στο κυστικό τοίχωμα θεωρείται πως ενισχύει την ικανότητα διάσπασης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ), που ευνοεί την ενδοοστική επέκταση της ΟΚΚ.^{67, 106, 107} Σύμφωνα, μάλιστα, με πρωτεομική μελέτη που εξέτασε τις βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών της ΟΚΚ σε σχέση με αυτές του στοματικού βλεννογόνου, η απορρύθμιση της μονοπατιών οργάνωσης και αποδόμησης της ΕΘΟ ήταν μεταξύ των βασικών μοριακών αλλαγών που χαρακτηρίζουν την ΟΚΚ.¹⁰⁸ Επίσης, η ενζυμική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων που προήλθαν in vitro από ΟΚΚ ήταν αυξημένη στις θέσεις που αυτά γειτνίαζαν με τις in vitro αναπτυσσόμενες ινοβλάστες της ΟΚΚ, υποδεικνύοντας πως η μεταβολική ικανότητα της βλάβης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παρουσία του κυστικού τοιχώματος.¹⁰⁹ Τέλος, το μη συμμετρικό, πολυκεντρικό πρότυπο αύξησης «ως συστάδες» (clusters), με πολλαπλασιασμό ταυτόχρονο ορισμένων τμημάτων κυστικού επιθηλίου και τοιχώματος, που παρατηρήθηκε με αυτοραδιογραφία σε σειριακές τομές ιστοτεμαχίων ΟΚΚ,¹¹⁰ θεωρείται ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της βλάβης που αντανακλά τη σημασία της αλληλεπίδρασης επιθηλίου-μεσεγχύματος για την ανάπτυξή της.95

1.9.3. Η σηματοδοτική οδός Sonic Hedgehog

Η σηματοδοτική οδός Sonic Hedgehog διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και τη διάπλαση επιθηλιακών οργάνων, όπως είναι η επιδερμίδα, το τριχοθυλάκιο, και τα δόντια.¹¹¹ Στην κορυφαία

άνωθεν θέση του μονοπατιού είναι τα γονίδια PTCH1 και SMO, που κωδικοποιούν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Patched Homolog 1 και Smoothened, αντίστοιχα, καθώς και το γονίδιο PTCH2, που εμφανίζει 54% ομολογία με το *PTCH1*.^{92, 94, 112} Το *PTCH1* ασκεί ανασταλτική δράση στο SMO στην κυτταρική μεμβράνη, εμποδίζοντας την προς τα κάτω μεταγωγή του σήματος, που προϋποθέτει την απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων GLI1,-2,-3 από το σύμπλεγμα SUFU/GLI στο κυτταρόπλασμα και τη μετακίνησή τους στον πυρήνα του κυττάρου, όπου επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων.^{92, 94} Η οδός ενεργοποιείται, όταν το γονίδιο SHH συνδέεται στον υποδοχέα PTCH1, εμποδίζοντας την ανασταλτική του δράση στο SMO. Επίσης, μεταλλάξεις, απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH) ή επινενετικές τροποποιήσεις στο PTCH1, μπορεί να το απενεργοποιήσουν, οδηγώντας τελικώς στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού.¹¹³ Τα GLI1 και GLI2 είναι ενεργοποιητές της έκφρασης των γονιδίων-στόχων, ενώ το GLI3 δρα ως ενεργοποιητής ή καταστολέας.⁹¹ Μεταξύ των γονιδίων που επάγονται από την ενεργοποίηση της οδού Sonic Hedgehog είναι τα CCND1 και BCL2, που κωδικοποιούν το ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου Cyclin D1 και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2, αντίστοιχα, με απότοκο τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς, επίσης, μεταγραφικός 0 παράγοντας SOX2 και τα μέλη της οδού PTCH1 και GLI1.^{91, 92, 114}

Γενετικές αλλαγές που υποστηρίζουν την εμπλοκή της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog στην παθογένεια της ΟΚΚ περιλαμβάνουν μεταλλάξεις που αναστέλλουν το *PTCH1* ή ενεργοποιούν το *SMO*, και LOH σε γονίδια-μέλη της οδού, π.χ., *PTCH1*, *PTCH2*, *SUFU*.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Οι πιο συχνά παρατηρούμενες γενετικές αλλαγές είναι οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTCH1*, που έχουν αναφερθεί σε >90% των συνδρομικών και των σποραδικών ΟΚΚ.^{25, 113, 117} Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί μέσω των οποίων η απενεργοποίηση του *PTCH1* μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σποραδικής ή συνδρομικής ΟΚΚ:

α) Θεωρία δύο χτυπημάτων (double hit theory): Στη συνδρομική ΟΚΚ, μία σωματική μετάλλαξη ή LOH αποτελεί το "2ο χτύπημα" στα κύτταρα των ασθενών με ΣΣΒΚ, που έχουν ήδη το "1ο χτύπημα" της γενετικής μετάλλαξης του *PTCH1*. Παρόμοιο αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει μετά από δύο σωματικές μεταλλάξεις ή μία σωματική μετάλλαξη σε συνδυασμό με LOH στα δύο αλληλόμορφα του *PTCH1*, στην περίπτωση της σποραδικής ΟΚΚ.^{93, 94, 113}

β) Θεωρία απλοανεπάρκειας (haploinsufficiency theory): Μεταλλάξεις που οδηγούν στη σίγαση του ενός αλληλομόρφου του *PTCH1*, με αποτέλεσμα να εκφράζεται μόνο ένα αλληλόμορφο, το οποίο δεν επαρκεί για τη σύνθεση της απαιτούμενης ποσότητας πρωτεΐνης.^{93, 94}

γ) Μεταλλάξεις στο ένα αλληλόμορφο του PTCH1, που οδηγούν στη σύνθεση παθολογικής (mutant) πρωτεΐνης, που ανταγωνίζεται τη δράση ή την εντόπιση της φυσιολογικής (wild-type) πρωτεΐνης στο κύτταρο, ή παρεμβάλλεται στη σύνδεσή της με το SMO.¹¹³

Το αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων ή LOH στο *PTCH1* έχει συμπεριληφθεί στα επιχειρήματα υπέρ της νεοπλασματικής φύσης της OKK.⁶³ Ωστόσο, LOH στη χρωμοσωμική περιοχή 9q22.3, όπου εδράζεται το *PTCH1*, έχουν περιγραφεί και σε άλλες αναπτυξιακές οδοντογενείς κύστεις, όπως η οδοντοφόρος κύστη και η ορθοκερατινοποιημένη οδοντογενής κύστη,¹¹⁸ γεγονός που σύμφωνα με την τελευταία έκδοση του ΠΟΥ καθιστά αυτές τις γενετικές αλλαγές ανεπαρκείς για την κατάταξη της OKK μεταξύ των οδοντογενών όγκων.¹¹

1.9.4. Άλλες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις

Σε αντίθεση με την πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζουν την εμπλοκή της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog στην παθογένεια της ΟΚΚ, περιορισμένες μελέτες έχουν αναδείξει τη συμμετοχή άλλων γονιδιακών μονοπατιών στην ανάπτυξη και τη βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ. Συγκεκριμένα, μία μελέτη μεταγραφώματος με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, που εφαρμόστηκε στο RNA που απομονώθηκε από τα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδας της ΟΚΚ, περιέγραψε δύο υποομάδες ΟΚΚ, σε μία εκ των οποίων ήταν ενεργοποιημένη η PI3K/AKT σηματοδοτική οδός και στην άλλη η οδός που σχετίζεται με τη MAP κινάση (MAPK).¹¹⁹ Υπέρ της συμμετοχής αυτών των δύο οδών στην παθογένεια της ΟΚΚ συνηγορούν οι μεταλλάξεις στο ΜΑΡΚ1 γονίδιο που έχουν βρεθεί σε 10 σποραδικές ΟΚΚ,¹²⁰ και η ανοσοϊστοχημική έκφραση στο επιθήλιο της ΟΚΚ πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια-μέλη αυτών των οδών, όπως οι p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308), p-RPS6, και NK-1R,^{121, 122} καθώς και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth

factor receptor, EGFR) που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω των μονοπατιών PI3K/AKT και RAS/RAF/MAPK.¹²³⁻¹²⁶ Την εμπλοκή της τελευταίας σηματοδοτικής οδού στην παθογένεια της ΟΚΚ υποστηρίζει και μια πρωτεομική μελέτη που συνέκρινε την έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ της ΟΚΚ, της ακρορριζικής κύστης και του φυσιολογικού βλεννογόνου.¹²⁷ Αντίθετα, αντικρουόμενα αποτελέσματα υπάρχουν σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο BRAF, που αποτελεί ρυθμιστή της οδού της ΜΑΡΚ, στην ΟΚΚ. Δύο μελέτες υποστηρίζουν πως οι BRAF p.V600E μεταλλάξεις είναι σπάνιες στην ΟΚΚ,^{128, 129} ενώ μία τρίτη μελέτη τις εντόπισε σε 24/38 περιπτώσεις ΟΚΚ.¹³⁰ Επίσης, τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα της έκφρασης μελών της σηματοδοτικής οδού WNT στην ΟΚΚ, όπως των WNT1, WNT5A, WNT10A, και β-catenin, είναι ενδεικτικά της πιθανής συμμετοχής του μονοπατιού στην παθογένειά της.¹³¹⁻¹³⁷ Ακόμα, μία μελέτη έδειξε την υπερέκφραση mRNA ή/και πρωτεϊνών των γονιδίων YAP, TAZ, TEAD1, και TEAD4, που αποτελούν μέλη του Hippo μονοπατιού, στην ΟΚΚ, καθώς και την συν-εντόπιση των πρωτεϊνών ΥΑΡ και ΤΑΖ με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στους πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων της ΟΚΚ, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή της οδού στο αυξητικό δυναμικό της.138

Μία επιπρόσθετη γενετική αλλαγή που έχει περιγραφεί στην ΟΚΚ και συνηγορεί υπέρ της επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς της είναι η **LOH στα ογκοκατασταλτικά γονίδια** *CDKN2A*, *TP53*, *MCC*, *TSLC1*, *LTAS2* και *FHIT*.^{63, 94} Πιθανολογείται, επίσης, η συμμετοχή **επιγενετικών τροποποιήσεων** στην παθογένειά της, επειδή έχει βρεθεί μεθυλίωση στα γονίδια *CDKN1A* και *LINE-1* στον ολικό ιστό και το επιθήλιο της OKK, αντίστοιχα,^{139, 140} και σε 22 γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση,¹⁴¹ και έχει επιβεβαιωθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση των DNA μεθυλτρασφερασών *DNMT1*, *DNMT3A*, και *DNMT3B*, στο κυστικό της επιθήλιο.^{142, 143} Τέλος, η μειωμένη έκφραση των *MIR15A* και *MIR16-*1, που αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, στην OKK συγκριτικά με τα οδοντοθυλάκια εγκλείστων δοντιών, έχει συσχετισθεί με την αυξητική της τάση.¹⁴⁴



Εικ. 1.6 Οι κύριοι παθογενετικοί μηχανισμοί στην ΟΚΚ. Κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΚΚ διαδραματίζουν τα κύτταρα του κυστικού επιθηλίου, (Α) που εμφανίζουν ισχυρή πυρηνική έκφραση δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και αντιαποπτωτικών μορίων. Το κυστικό τοίχωμα, (Β) το οποίο εμφανίζει ένα πρότυπο ινών που προσομοιάζει αυτό των οδοντογενών όγκων, συμμετέχει στην επιθετική βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ και (Γ) μέσω αλληλεπίδρασης με προφλεγμονώδη επιθηλιακά μόρια, επάγει οστεολυτικούς μηχανισμούς. (Δ) Τέλος, ο φαινότυπος της ΟΚΚ διαμορφώνεται υπό την επίδραση πολλών σηματοδοτικών οδών, όπως του Sonic Hedgehog, η ενεργοποίηση των οποίων συντελεί στο αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού των κυττάρων της ΟΚΚ.

1.10. Θεραπεία

Η αντιμετώπιση της ΟΚΚ, που αποσκοπεί στην καθολική εξάλειψη της βλάβης και στην ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εμφάνισης υποτροπής,¹⁴⁵ επιτυγχάνεται με παρόμοια μέσα στις σποραδικές και συνδρομικές περιπτώσεις.¹⁴⁶ Πιο αναλυτικά, για τη θεραπεία της ΟΚΚ εφαρμόζονται οι ακόλουθες χειρουργικές μέθοδοι:

- Αποσυμπίεση, με τη δημιουργία οπής στο οστούν πάνω από την ΟΚΚ, όπου μέσω της τοποθέτησης παροχέτευσης διατηρείται η επικοινωνία με την κυστική κοιλότητα.^{147, 148}
- Μαρσιποποίηση, με τη δημιουργία οστικού παραθύρου πάνω από την ΟΚΚ για περιοδικό καθαρισμό της κοιλότητας, την αφαίρεση τμήματος του κυστικού τοιχώματος και τη συρραφή των ορίων της βλάβης με τον υπερκείμενο στοματικό βλεννογόνο.¹⁴⁸
- 3. Εκπυρήνιση, με πλήρη αφαίρεση της ΟΚΚ, χωρίς την μακροσκοπική παραμονή υπολειμμάτων της εντός του οστού, ακολουθούμενη από συρραφή των χειλέων του υπερκείμενου στοματικού βλεννογόνου, ή και αφαίρεση του υπερκείμενού της στοματικού βλεννογόνου.¹⁴⁸
- Αποσυμπίεση ή μαρσιποποίηση, συνδυασμένη με εκπυρήνιση σε δεύτερο χρόνο, με προτεινόμενο ελάχιστο ενδιάμεσο διάστημα τους 9 μήνες.¹⁴⁷
- 5. Εκπυρήνιση συνδυασμένη με μέσα χημικού ή θερμικού καυτηριασμού. Στα τελευταία περιλαμβάνονται το διάλυμα Carnoy και η τροποποιημένη εκδοχή του χωρίς χλωροφόρμιο, η κρυοθεραπεία με υγρό άζωτο,^{145, 149} και η τοπική εφαρμογή του αναστολέα της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog 5-φθοριοουρακίλης.^{150, 151}
- 6. Ριζική χειρουργική αντιμετώπιση, με συνδυασμό εκπυρήνισης με περιφερική οστεοτομία, που περιλαμβάνει αφαίρεση 1,5-2mm έως 1cm υγιούς οστού περιφερικά των ορίων της βλάβης, ή και συνοδό οριακή ή τμηματική γναθεκτομή.^{145, 147}

Δεδομένου ότι καμιά από τις προαναφερθείσες θεραπευτικές μεθόδους δεν έχει εξαλείψει τα ποσοστά υποτροπής της ΟΚΚ,

περιορισμένα, αλλά ενθαρρυντικά δεδομένα υποστηρίζουν την εφαρμογή μοριακών στόχων θεραπείας, όπως είναι οι αναστολείς της σηματοδοτικής οδού του Sonic Hedgehog.¹¹⁵ Συγκεκριμένα, η βισμοδεγίμπη (Erivedge[®]), που δρα αποκλείοντας την άνωθεν ρυθμιστή της οδού πρωτεΐνη SMO, έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων για από του στόματος χορήγηση, σε ασθενείς με προχωρημένα βασικοκυτταρικά καρκινώματα, που δεν μπορούν να ακτινοθεραπεία, αντιμετωπιστούν **χειρουργικά** ń με ń που μετά από χειρουργική αφαίρεση.²² Н υποτροπίασαν λήψη 270mg/ημέρα βισμοδεγίμπης για 2 έτη για τη θεραπεία μεταστατικού βασικοκυτταρικού καρκινώματος από έναν ασθενή με ΣΣΒΚ οδήγησε σε σημαντική μείωση του ακτινογραφικού μεγέθους πολλαπλών ΟΚΚ στην κάτω γνάθο, χωρίς να αναφερθούν φαρμακευτικές παρενέργειες.¹⁵² Επίσης, μείωση των διαστάσεων έως και πλήρη εξαφάνιση των ΟΚΚ παρατηρήθηκε σε 4 από 6 ασθενείς με ΣΣΒΚ που συμμετείχαν σε κλινική δοκιμή της βισμοδεγίμπης για την πρόληψη βασικοκυτταρικού καρκινώματος, στους οποίους χορηγήθηκαν 150mg/ημέρα για 11-24 μήνες, με σύντομα μεσοδιαστήματα διακοπής του φαρμάκου λόγω ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως απώλεια νεύσης, τριχόπτωση, μυϊκές κράμπες, και γαστρεντερικές διαταραχές.153

Θεραπεία εκλογής της ΟΚΚ παραμένει η χειρουργική αντιμετώπιση, ενώ η μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών θεωρείται εξίσου σημαντική, για την πρόληψη των υποτροπών, αλλά και την έγκαιρη διάγνωση άλλων σημείων του ΣΣΒΚ, του οποίου η ΟΚΚ συχνά αποτελεί την 1^η εκδήλωση.^{19, 21, 23} Το πιο αυστηρό πρωτόκολλο παρακολούθησης που έχει προταθεί συστήνει λήψη πανοραμικής ακτινογραφίας κάθε 6 μήνες για τα πρώτα 2 έτη, κάθε 12 μήνες για τα επόμενα 5 έτη και ανά 2 έτη για 10 χρόνια, ακόμα και επί απουσίας συμπτωμάτων.¹⁴⁹ Ειδικά για τους ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΣΒΚ, πριν την εμφάνιση ΟΚΚ, συστήνεται ετήσιος προληπτικός ακτινογραφικός έλεγχος των γνάθων από την ηλικία των 3 ετών, ενώ μετά την ανάπτυξη της πρώτης ΟΚΚ, ο έλεγχος προτείνεται να γίνεται κάθε 6 μήνες έως ότου δεν εμφανιστεί νέα ΟΚΚ για δύο χρόνια ή μέχρι την ηλικία των 21 ετών.²⁶ Επίσης, στα αδέρφια ασθενών με ΣΣΒΚ συστήνεται προληπτικός ακτινογραφικός έλεγχος των γνάθων από την ηλικία των 8 ετών.¹⁹

1.11. Πρόγνωση

Η πρόγνωση της ΟΚΚ καθορίζεται από τη δυνατότητα πρόληψης των υποτροπών και την έγκαιρη διάγνωσή τους. Σύμφωνα με μία συστηματική ανασκόπηση 6427 ΟΚΚ, χωρίς ελάχιστο χρονικό διάστημα παρακολούθησης, παρατηρήθηκαν υποτροπές στο 21,1%.³⁹ Ο κίνδυνος σημαντικά υποτροπής ήταν μεγαλύτερος στις συνδρομικές περιπτώσεις, στις ακτινογραφικά πολύχωρες ακτινοδιαυγαστικές βλάβες, και σε αυτές που αντιμετωπίστηκαν μόνο με μαρσιποποίηση συγκριτικά με τις περιπτώσεις στις οποίες έγινε εκπυρήνιση ή ριζική χειρουργική αφαίρεση.³⁹ Με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής έχουν συσχετιστεί, επίσης, κάποια ιστοπαθολογικά ευρήματα, με συχνότερα την παρουσία επιθηλιακών εκβλαστήσεων, δορυφόρων κύστεων ή επιθηλιακών νησιδίων στο κυστικό τοίχωμα, την αποκόλληση του επιθηλίου, και την υποεπιθηλιακή υαλινοποίηση.^{45, 154-156}

Σε μία άλλη συστηματική ανασκόπηση 2287 σποραδικών ΟΚΚ με ελάχιστο χρονικό διάστημα παρακολούθησης το 1 έτος, το ποσοστό υποτροπής ήταν 16,6% ανεξαρτήτως της χειρουργικής μεθόδου αντιμετώπισης.¹⁵⁷ Το μέγιστο ποσοστό υποτροπής παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις που αντιμετωπίστηκαν μόνο με μαρσιποποίηση (32,3%),¹⁵⁷ γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στην παραμονή υπολειμμάτων του κυστικού επιθηλίου, που διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού.¹⁴⁸ Αυξημένο ήταν και το ποσοστό υποτροπών των περιπτώσεων που υποβλήθηκαν μόνο σε εκπυρήνιση (23,1%),157 γεγονός που έχει συσχετισθεί με πιθανή παραμονή επιθηλιακών υπολειμμάτων λόγω θραύσης του λεπτού επιθηλίου της ΟΚΚ κατά την εκπυρήνιση.¹⁴⁷ Αντίθετα, το ελάχιστο ποσοστό υποτροπών σημειώθηκε μετά ριζική χειρουργική αφαίρεση (8,4%),¹⁵⁷ η οποία, όμως, συνοδεύεται από αυξημένη νοσηρότητα, συγκριτικά με τη συντηρητική αντιμετώπιση, λόγω καταγμάτων της γνάθου και δυσμορφιών προσώπου.^{145, 147}

Η πλειονότητα των υποτροπών σημειώνεται εντός των πρώτων 5 ετών, ωστόσο υποτροπές έχουν αναφερθεί ακόμα και μετά από 10 έως 41 χρόνια από την αρχική διάγνωση της ΟΚΚ.^{158, 159} Τέλος, σε μία συστηματική ανασκόπηση 108 σποραδικών ΟΚΚ, με ελάχιστο μέσο ή διάμεσο διάστημα παρακολούθησης ανά μελέτη τα 5 έτη, το συνολικό ποσοστό υποτροπών ήταν 23,15%.¹⁵⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ

2.1. Από το μετάγραφο στο μεταγράφωμα

Η γενετική πληροφορία ενός οργανισμού είναι καταχωρημένη στο γονιδίωμά του, δηλαδή στο ολικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) ή, στην περίπτωση ορισμένων ιών, στο ολικό ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Η δομική μονάδα των νουκλεϊκών οξέων είναι τα **νουκλεοτίδια**, κάθε ένα εκ των οποίων αποτελείται από τη δεοξυριβόζη, μία φωσφορική ομάδα και μία αζωτούχο βάση, εκ των αδενίνη (Α), θυμίνη (Τ) στο DNA ή ουρακίλη (U) στο RNA, γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C). Στο δίκλωνο μόριο DNA παρατηρείται συμπληρωματικότητα των απέναντι βάσεων των δύο κλώνων, συγκεκριμένα μεταξύ Α-Τ και C-G.¹⁶⁰ Επίσης, το RNA εμφανίζει συμπληρωματικότητα ως προς τις αζωτούχες βάσεις με το DNA που αποτέλεσε το "καλούπι" για το σχηματισμό του, δηλαδή όταν σε μία περιοχή στο DNA υπάρχουν κατά σειρά οι βάσεις Α, Τ, G και C, στην αντίστοιχη περιοχή του RNA παρατηρούνται σε σειρά οι βάσεις U, A, C και G.¹⁶¹ Η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το RNA (με εξαίρεση ότι περιέχει Τ στις θέσεις που στο mRNA υπάρχει U) ονομάζεται κωδική αλυσίδα (coding strand) ή νοηματική αλυσίδα (sense strand), ενώ η συμπληρωματική της αλυσίδα περιγράφεται ως μη κωδική (non-coding strand) ή αντισημαίνουσα/αντινοηματική ή αντίστροφη (antisense strand) (Εικ. 2.1). Η μη κωδική αλυσίδα είναι αυτή που χρησιμοποιείται ως καλούπι για το σχηματισμό του RNA.¹⁶²



Εικ. 2.1 Το DNA καθορίζει την αλληλουχία βάσεων στο RNA.

Το DNA οργανώνεται σε τμήματα με καθορισμένη αλληλουχία βάσεων, που ονομάζονται **γονίδια**. Παρότι ο αριθμός των γονιδίων είναι ο ίδιος σε όλα τα κύτταρα, σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό εκφράζονται διαφορετικά γονίδια, ανάλογα με τις ιδιότητες και τις λειτουργίες του.¹⁶³ Η γονιδιακή έκφραση ξεκινάει με τη διαδικασία της μεταγραφής, κατά την οποία η αλληλουχία DNA ενός γονιδίου αποτελεί το πρότυπο για το σχηματισμό μίας αλληλουχίας RNA που ονομάζεται μετάγραφο (transcript), και συνεχίζεται με τη διαδικασία της μετάφρασης, με τελικό προϊόν μία πρωτεΐνη (Εικ. 2.2). Οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων, που κωδικοποιούνται τελικά σε πρωτεΐνη, ονομάζονται εξώνια (coding sequence exons, CDS) και μεταξύ αυτών παρεμβάλλονται μη κωδικές αλληλουχίες που ονομάζονται εσώνια ή ιντρόνια (introns). Επίσης, κάποια εξώνια στο 5' ή 3' άκρο του γονιδίου περιλαμβάνουν αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions, UTRs) που δεν κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνη, και ονομάζονται 5' UTR exons και 3' UTR exons, αντίστοιχα.¹⁶⁴ Καθοριστικό ρόλο στη μεταγραφή νονιδίων συγκεκριμένων σε κάθε κύτταρο, ιστό, ń όργανο διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors, **TFs)**, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προσδένονται σε μία αλληλουχία που ονομάζεται υποκινητής (promoter) και βρίσκεται «άνωθεν» (upstream) της έναρξης ενός γονιδίου. Οι TFs τροποποιώντας τη συγγένεια του υποκινητή με το ένζυμο RNA πολυμεράση που καταλύει τη μεταγραφή, επάγουν είτε την ενεργοποίηση, δηλαδή την έκφραση του γονιδίου, είτε τη σίγαση αυτού.¹⁶⁵ Οι υποκινητές δε μεταγράφονται, αλλά ασκούν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή, καθώς αποτελούνται από ένα «εγγύς» τμήμα (core promoter), το πέρας του οποίου σηματοδοτεί τη θέση έναρξης της μεταγραφής (transcription start site, TSS), και ένα «άπω» τμήμα (proximal promoter) που περιλαμβάνει αλληλουχίες για την εκλεκτική πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, τα επονομαζόμενα μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (TF motifs).^{163, 165} Η μεταγραφή κάθε γονιδίου ολοκληρώνεται στη **θέση** τέλους της μεταγραφής (transcription end site, TES) (Eικ. 2.2).¹⁶²



Εικ. 2.2 Η ροή της γενετικής πληροφορίας.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα (human genome, hg) αποτελείται από περίπου 3,2 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (base pairs, bp), οι οποίες κατανέμονται σε 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων (22 αυτοσωμικά και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων Χ, Υ). Τα χρωμοσώματα εντοπίζονται στον πυρήνα όλων των κυττάρων, έχουν μήκος 50000-250000bp,¹⁶⁴ και εκτιμάται πως περιέχουν συνολικά 20000-25000 γονίδια που κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες (protein-coding genes).¹⁶⁶ Τα τμήματα των γονιδίων που κωδικοποιούνται μεταγράφονται στο αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA), το οποίο αποτελεί ένα μικρό ποσοστό (2-4%) του ολικού RNA ενός κυττάρου. Την πλειοψηφία του RNA (80-90%) καταλαμβάνει το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA), ενώ μικρότερα ποσοστά αντιστοιχούν στο μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA, 5–15%) και σε μη-κωδικοποιούμενα RNA (noncoding RNA, ncRNA, 1%) που εντοπίζονται είτε εντός των γονιδίων, στα εσώνια, ή σε περιοχές μεταξύ των γονιδίων (intergenic regions).¹⁶⁷ Στις τελευταίες θέσεις παρατηρούνται, επίσης, ψευδογονίδια (pseudogenes), που δημιουργούνται, για παράδειγμα, μέσω ρετρομετάθεσης.¹⁶⁸ Τα ψευδογονίδια μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων από τα οποία προήλθαν, ενώ περίπου 20% των ψευδογονιδίων είναι μεταγραφικά ενεργά.^{168, 169}

Η γνώση της αλληλουχίας του μεταγράφου καθιστά δυνατή την πρόβλεψη της αλληλουχίας του γονιδίου, μέσω της σύνθεσης του συμπληρωματικού κλώνου DNA (complementary DNA, cDNA) με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, γεγονός που αποτέλεσε βασική αρχή των τεχνικών μελέτης του μεταγραφώματος.¹⁷⁰ Ο όρος μεταγράφωμα (transcriptome) επινοήθηκε από τον Γάλλο Βιολόγο Charles Auffray το 1996 σε μία γαλλόφωνη δημοσίευση για να περιγράψει «το σύνολο μεταγράφων»,¹⁷¹ ενώ ένα χρόνο αργότερα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην αγγλόφωνη βιβλιογραφία ως η «ταυτότητα» του γονιδιώματος και των μεταγραφικών του επιπέδων.¹⁷² Έκτοτε το μεταγράφωμα έχει επικρατήσει ως συνώνυμο του ολικού RNA που αναγνωρίζεται μία δεδομένη χρονική στιγμή σε ένα κύτταρο, έναν ιστό ή έναν οργανισμό, δηλαδή αφορά σε όλα τα κωδικοποιούμενα και μη-κωδικοποιούμενα σε πρωτεΐνες μόρια RNA.¹⁷³

2.2. Μέθοδοι μελέτης μεταγραφώματος

Η μελέτη μεταγραφώματος (transcriptomic analysis), επονομαζόμενη και ως τρανσκριπτομική (transcriptomics), αποτελεί μέθοδο ελέγχου κάθε πληροφορίας που σχετίζεται με το RNA, όπως είναι η ύπαρξη/απουσία και το επίπεδο έκφρασης των μεταγράφων, καθώς επίσης η δομή, η εντόπιση, οι λειτουργίες, και ο βαθμός αποδόμησής (degradation).¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Οι στόχοι της τους τρανσκριπτομικής περιλαμβάνουν την καταγραφή όλων των ειδών των μεταγράφων, την ερμηνεία των λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος (functional annotation of the genome) και τον προσδιορισμό της μεταγραφικής δομής των γονιδίων, δηλαδή του σημείου έναρξης της μεταγραφής, των 5' και 3' άκρων και των προτύπων *ωρίμανσης* ή ματίσματος των μεταγράφων (splicing patterns ή alternative splicing events), καθώς και των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων.^{174, 175} Η ανάλυση του μεταγραφώματος μπορεί να διαλευκάνει τη σχέση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου, να αναδείξει τα ενεργά γονίδια που εκφράζονται σε μία δεδομένη χρονική στιγμή και να αποκαλύψει διαφορές στη γονιδιακή έκφραση (differential expression) μεταξύ διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών, ιστών, ή οργανισμών.^{173, 177} Η μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων κατά τη διάρκεια διαφορετικών φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών της μεταγραφικής και μεταμεταγραφικής γονιδιακής ρύθμισης και των κυτταρικών αποκρίσεων στα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα,178 καθώς και των πολύπλοκων μηχανισμών που διέπουν τα αναπτυξιακά στάδια ή σχετίζονται με την εμφάνιση νοσημάτων.^{175, 176}

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μεθόδων μελέτης μεταγραφώματος (Εικ. 2.3):^{175, 176, 179}

α) αυτές που στηρίζονται στην **υβριδοποίηση** (hybridization approaches)

β) αυτές που στηρίζονται στην τεχνική **αλυσιδωτής αντίδρασης** πολυμεράσης (polymerase chain reaction-based approaches), και

γ) αυτές που βασίζονται σε μεθόδους **αλληλούχησης** (sequence-based approaches).



Εικ. 2.3 Μέθοδοι μελέτης μεταγραφώματος.

2.2.1. Μέθοδοι με βάση την υβριδοποίηση

Οι μέθοδοι αυτής της κατηγορίας, δηλαδή η αποτύπωση Northern και οι μικροσυστοιχίες, στηρίζονται στην ικανότητα ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίσει ζεύγη βάσεων εκλεκτικά με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο με συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων.¹⁷⁶

Αποτύπωση Northern

Η αποτύπωση Northern (Northern Blot) αναπτύχθηκε το 1977 ως μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μίας συγκεκριμένης RNA αλληλουχίας.¹⁸⁰ Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά διαχωρισμό των μορίων RNA ενός δείγματος με βάση το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Τα διαχωρισμένα μόρια RNA μεταφέρονται σε μία πορώδη μεμβράνη (π.χ. φύλλο νιτροκυτταρίνης ή θετικά φορτισμένη νάιλον μεμβράνη), η οποία επωάζεται με ένα ανιχνευτή, ραδιοεπισημασμένο δηλαδή μία αλληλουχία RNA, ολιγονουκλεοτιδική μονόκλωνου cDNA μία αλληλουχία, ή συμπληρωματική με το γονίδιο υπό μελέτη, ώστε να πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση. Η επισημασμένη με τον ανιχνευτή μεμβράνη υπόκειται, εν συνεχεία, σε αυτοραδιογραφία, ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα του γονιδίου στόχου.¹⁸¹ Παρά το πλεονέκτημα της μεθόδου να συγκρίνει την ποσότητα του RNA διαφορετικών δειγμάτων πάνω στην ίδια μεμβράνη, επιλέγεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του RNA μόνο μικρού αριθμού γονιδίων.¹⁸¹

Μικροσυστοιχίες

Σε αντίθεση με την προηγούμενη τεχνική, οι μικροσυστοιχίες ως που αναπτύχθηκαν μέθοδος (microarrays) μελέτης του μεταγραφώματος στα μέσα της δεκαετίας του 1990, έχουν την ικανότητα να υπολογίζουν ταυτόχρονα τα επίπεδα έκφρασης έως και χιλιάδων μεταγράφων.^{182, 183} Το όνομα της τεχνικής προέκυψε από το ότι χρησιμοποιούν μικροσκοπικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων (κλώνους cDNA ή ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες τουλάχιστον 25 βάσεων) ως ανιχνευτές (probes), οι οποίοι είναι ακίνητα στοιχισμένοι σε συγκεκριμένη διάταξη πάνω σε γυάλινες πλάκες (υπόστρωμα).¹⁸⁴ Οι ανιχνευτές έχουν ακριβείς θέσεις πάνω στη μικροσυστοιχία και ο σχεδιασμός τους γίνεται με βάση την αλληλουχία του μεταγράφου του γονιδίου στόχου, έτσι ώστε να ανιχνεύουν εκλεκτικά το mRNA με βάση το οποίο έχουν σχεδιαστεί, χωρίς ταυτόχρονα να υβριδοποιούνται με άλλη αλληλουχία του δείγματος.¹⁸⁵ Οι mRNA αλληλουχίες των υπό δειγμάτων επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές, μελέτη διαφορετικές για κάθε ομάδα μελέτης, και περιέχονται σε ένα διάλυμα που ονομάζεται εκχύλισμα προς υβριδοποίηση.¹⁸⁶ Το εκχύλισμα προς διέρχεται πάνω από το υπόστρωμα υβριδοποίηση και οι επισημασμένες mRNA αλληλουχίες υβριδοποιούνται με ανιχνευτές που είναι ακινητοποιημένοι στην επιφάνειά του. Ακολουθεί σάρωση, επεξεργασία των δεδομένων με ειδικό για τη μικροσυστοιχία λογισμικό και ψηφιακή μετατροπή των εικόνων σε σήματα φθορισμού διαφορετικού χρώματος και έντασης. Τέσσερα διαφορετικά χρώματα προκύπτουν ανάλογα με το αν το γονίδιο, με βάση την αλληλουχία του οποίου κατασκευάστηκε ο ανιχνευτής, εκφράζεται στα δείγματα της μίας (διαφορετικό χρώμα για κάθε μία) ή και δύο ομάδων μελέτης (τρίτο χρώμα) ή σε καμία από αυτές (τέταρτο χρώμα).¹⁸⁴ Η ένταση του σήματος αποτυπώνει το βαθμό στον οποίο μία αλληλουχία του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση συνδέεται με τον αντίστοιχο ανιχνευτή στη μικροσυστοιχία και θεωρείται ανάλονη της συγκέντρωσης αυτής της αλληλουχίας στο υπό μελέτη δείγμα (Εικ. 2.4).^{184, 185} Ο υβριδισμός μεταξύ συμπληρωματικών αλληλουχιών αποτελεί παράδειγμα ειδικής δέσμευσης (specific binding). Παράλληλα με αυτόν μπορεί να συμβεί μη ειδική δέσμευση (non-specific binding) αλληλουχιών στη μικροσυστοιχία.¹⁸⁷ Η τυχαία διακύμανση του σήματος φθορισμού λόγω της μη ειδικής δέσμευσης ενός υβριδοποιημένου

ζεύγους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται *θόρυβος υποβάθρου* (background noise).^{187, 188}



Εικ. 2.4 Σε ένα πείραμα με μικροσυστοιχία, το cDNA από τις δύο ομάδες δειγμάτων επισημαίνεται με διαφορετικού χρώματος φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες ενεργοποιούνται και εκπέμπουν μόνο σε δίκλωνη διαμόρφωση, όταν δηλαδή υβριδοποιηθούν με κάποιο ανιχνευτή στο στερεό υπόστρωμα. Στο παράδειγμα της εικόνας, όταν ένας ανιχνευτής συνδεθεί με σημασμένη cDNA αλληλουχία της ομάδας ελέγχου ή της πειραματικής ομάδας, εκπέμπεται σήμα πράσινο ή κόκκινο, αντίστοιχα, με ένταση ανάλογη του βαθμού σύνδεσης. Όταν ο ανιχνευτής υβριδοποιηθεί και με τις δύο αλληλουχίες εκπέμπεται κίτρινο σήμα, ενώ όταν σε καμία από τις δύο ομάδες δεν εκφράζεται η συμπληρωματική αλληλουχία ενός ανιχνευτή, στην αντίστοιχη θέση εμφανίζεται μαύρο σήμα.

Οι μικροσυστοιχίες έχουν υψηλή απόδοση σε σχετικά χαμηλό κόστος. Ωστόσο εμφανίζουν μειονεκτήματα συγκριτικά με τις μεθόδους τρανσκριπτομικής με βάση την αλληλούχηση, όπως το ότι προϋποθέτουν προϋπάρχουσα γνώση της αλληλουχίας των γονιδίων στόχων και συνεπώς αδυναμία ανίχνευσης νέων μεταγράφων ή μελέτης του ολικού μεταγραφώματος.^{175, 189} Επιπλέον, ενέχουν τον κίνδυνο διασταυρούμενης υβριδοποίησης των ανιχνευτών που περιλαμβάνουν αλληλουχίες με υψηλή ομολογία, με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα θορύβου υποβάθρου.¹⁷⁵

2.2.2. Μέθοδοι με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) εισήχθη το 1983 ως μέθοδος ικανή να ανιχνεύσει μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία που εμπεριέχεται σε ένα μείγμα νουκλεϊκών οξέων και να την ενισχύσει εκλεκτικά, χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιγραφής του DNA.¹⁹⁰ Κάθε κύκλος PCR οδηγεί σε διπλασιασμό της αρχικής ποσότητας DNA και περιλαμβάνει τρία στάδια:¹⁹¹

α) στάδιο *αποδιάταξης,* στο οποίο με αύξηση της θερμοκρασίας, στους 95°C για 30-60 δευτερόλεπτα, διαχωρίζονται οι δύο κλώνοι του DNA,

β) στάδιο υβριδοποίησης, στο οποίο με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για 30 δευτερόλεπτα, επιτυγχάνεται υβριδισμός των εκκινητών (primers) στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες-στόχους στο εκμαγείο (template) DNA και

γ) στάδιο επιμήκυνσης, στο οποίο αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 72°C δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες, ώστε η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) να καταλύσει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας, επιμηκύνοντας με κατεύθυνση 5' προς 3' τις αλληλουχίες των υβριδοποιημένων εκκινητών και χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον κάθε ένα από τους δύο κλώνους του αρχικού δίκλωνου μορίου DNA.

Η αντίστροφη μεταγραφή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) αποτελεί μία παραλλαγή της PCR, στην οποία η αλληλουχία-στόχος προς ενίσχυση είναι RNA μόριο. Η παραλλαγή συνίσταται στο ότι το RNA μετατρέπεται αρχικά σε cDNA, με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και τη διαμεσολάβηση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, ακολουθούμενη από τα στάδια της κλασσικής PCR. Έτσι από ένα αρχικό μόριο RNA προκύπτουν στο τέλος του πρώτου κύκλου δύο μόρια DNA, η ποσότητα των οποίων διπλασιάζεται σε κάθε έναν από τους διαδοχικούς κύκλους που ακολουθούν.¹⁹²

Η μελέτη των μεταγράφων με την τεχνική της PCR βασίζεται στην ιδιότητά της όχι μόνο να ανιχνεύει αλλά και να ποσοτικοποιεί το DNA στόχο (quantitative PCR, qPCR). Η ποσοτικοποίηση μπορεί να συμβεί είτε στο τέλος της αντίδρασης είτε σε πραγματικό χρόνο (real time PCR).¹⁹³ Στην τελευταία περίπτωση χρησιμοποιούνται είτε φθορίζουσες χρωστικές, που ενσωματώνονται απευθείας στο επαυξανόμενο δίκλωνο DNA, είτε ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (ανιχνευτές) συμπληρωματικές προς την αλληλουχία-στόχο, οι οποίες κατά την υβριδοποίησή τους με αυτήν ή μετά από υδρόλυση παράγουν ένα σήμα φθορισμού.¹⁹⁴ Η χρήση ανιχνευτών επισημασμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση πολλών γονιδίων.¹⁹⁴

Η μέθοδος *qPCR* σε πραγματικό χρόνο καταγράφει την κινητική του πολλαπλασιασμού του DNA και ποσοτικοποιεί, μέσω της τιμής του σήματος φθορισμού, το επαυξημένο DNA προϊόν που έχει παραχθεί στο τέλος κάθε κύκλου, του οποίου η ποσότητα είναι άμεσα ανάλογη με την αρχική ποσότητα του DNA μορίου που αποτέλεσε τον κλώνοεκμαγείο κατά την έναρξη της διαδικασίας.¹⁹⁵ Η τεχνική αυτή υπερτερεί σε ευαισθησία και ακρίβεια της αποτύπωσης Northern για την ποσοτικοποίηση μικρού αριθμού γονιδίων.¹⁹⁴ Αντίθετα υστερεί έναντι των μικροσυστοιχιών και των τεχνικών μελέτης μεταγραφώματος που βασίζονται στην αλληλούχηση, όπως η RNA-αλληλούχηση, οι οποίες δύνανται να προσδιορίσουν τα επίπεδα έκφρασης που αντιστοιχούν σε χιλιάδες μετάγραφα έως και το συνολικό μεταγράφωμα ενός κυττάρου, ιστού ή οργανισμού.¹⁷⁶ Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, πως η *qPCR* επιλέγεται συχνά ως μέθοδος επαλήθευσης των αποτελεσμάτων για μεμονωμένα γονίδια που έχουν προκύψει από πειράματα RNAαλληλούχησης.¹⁹⁶

2.2.3. Μέθοδοι με βάση την αλληλούχηση

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην αλληλούχηση, δηλαδή στον προσδιορισμό της σειράς (αλληλουχίας) των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων μίας συγκεκριμένης περιοχής του νουκλεϊκού οξέος, υπερέχουν των προηγούμενων τεχνικών μελέτης του μεταγραφώματος, καθώς δεν προϋποθέτουν προηγούμενη γνώση της συγκεκριμένης γονιδιακής αλληλουχίας που ανιχνεύουν.¹⁶⁷

Πρώτη γενιά αλληλούχησης

Οι πρώτες τρανσκριπτομικές μέθοδοι της κατηγορίας αυτής περιλάμβαναν τη χρήση «ετικετών αλληλουχίας» και αποτέλεσαν εξέλιξη των τεχνικών που εισήχθησαν τη δεκαετία του 1970 για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA θραυσμάτων και είναι γνωστές ως πρώτη γενιά αλληλούχησης (First Generation Sequencing). Η πρώτη γενιά αλληλούχησης περιλαμβάνει την αλληλούχηση κατά Sanger¹⁹⁷ και την αλληλούχηση κατά Maxam-Gilbert.¹⁹⁸ Η αλληλούχηση κατά Sanger αφορούσε αρχικά στην επονομαζόμενη plus and minus μέθοδο, με την οποία επιτεύχθηκε η πρώτη αλληλούχηση γονιδιώματος, συγκεκριμένα του βακτηριοφάγου φΧ174. Με την τεχνική αυτή γίνεται επεξεργασία ραδιοσημασμένου και χημικά επεξεργασμένου DNA, το μήκους του οποίου υπολογίζεται μετά από διάσπαση, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα χημική πολυακρυλαμίδης.¹⁹⁹ Μια παραλλαγή αυτής της μεθόδου γνωστή και ως μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας (chain termination method) ή μέθοδος διδεοξυνουκλεοτιδίου (dideoxynucleotide method) προτάθηκε το 1977 και έχει καθιερωθεί έκτοτε ως η αλληλούχηση κατά Sanger.¹⁹⁷ Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο, στην οποία συμμετέχει ένας συνθετικά σημασμένος εκκινητής, που υβριδοποιείται στον ένα κλώνο DNA, η DNA πολυμεράση που καταλύει την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, και χημικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια (dideoxynucleotides, ddNTPs). Тα νουκλεοτίδια επισημαίνονται με ραδιενεργό ισότοπο, ειδικό για κάθε μία από τις αζωτούχες βάσεις (δηλ. ddGTP, ddATP, ddTTP και ddCTP), και εισερχόμενα στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA προκαλούν πρόωρο τερματισμό της επιμήκυνσής της. Αυτό συμβαίνει γιατί το ddNTP έχει ένα άτομο υδρογόνου στον 3' άνθρακα της δεοξυριβόζης του αντί για ένα υδροξύλιο και έτσι όταν ενσωματώνεται σε τυχαία θέση στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο, με αποτέλεσμα να σταματά η επιμήκυνση του DNA. Τα θραύσματα DNA που προκύπτουν έχουν διαφορετικό μήκος, το οποίο προσδιορίζεται από την απόσταση της θέσης ενσωμάτωσης του αντίστοιχου ddNTP από το άκρο του εκκινητή, και με βάση αυτό διαχωρίζονται με 5′ αυτοραδιογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.¹⁹⁷ Λόγω του υψηλού κόστους και της χρονοβόρας διαδικασίας της, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της τεχνολογίας της επόμενης γενιάς αλληλούχησης, η εφαρμογή της πλέον έχει περιοριστεί.^{200, 201}

Η αλληλούχηση κατά Maxam-Gilbert είναι γνωστή ως μέθοδος χημικής αποικοδόμησης του DNA (Maxam-Gilbert chemical degradation method). Στηρίζεται στη χρήση χημικών ουσιών που προκαλούν κενά/διαλείμματα (breaks) σε μία ή δύο αζωτούχες βάσεις, καταργώντας έτσι τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς τους, δηλαδή τους δεσμούς που ενώνουν το υδροξύλιο του 3' άνθρακα της πεντόζης ενός νουκλεοτιδίου με τη φωσφορική ομάδα που είναι συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Η χημικά τροποποιημένη αζωτούχος βάση απομακρύνεται από τη δεοξυριβόζη και στο σημείο αυτό γίνεται διάσπαση των νουκλεοτιδίων και αποκόπτεται ο κλώνος του DNA, ο οποίος στην αρχή της διαδικασίας είχε σημανθεί στο ένα άκρο του. Τα θραύσματα του DNA που διαχωρίζονται προκύπτουν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία με βάση το μήκος τους, που υπολογίζεται ως η απόσταση του σημασμένου άκρου του DNA κλώνου έως τη δεοξυριβόζη στο σημείο κοπής.¹⁹⁸ Η αλληλούχηση κατά Maxam-Gilbert θεωρήθηκε αρχικά αποτελεσματική για την αλληλούχηση μικρών πολυμερών νουκλεοτιδίων, αλλά οι κίνδυνοι που ενέχει από τη χρήση τοξικών και ραδιενεργών χημικών ουσιών, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της τεχνικής αλληλούχησης κατά Sanger περιόρισαν το εύρος της εφαρμογή της.²⁰¹

Τεχνικές με βάση ετικέτες αλληλουχίας

Η πρώτη τεχνική που εφαρμόστηκε για την ανάλυση του ανθρώπινου μεταγραφώματος ήταν οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs). Οι ESTSs είναι αλληλουχίες mRNA, συνήθως μήκους 200-800 βάσεων που αντιστοιχούν σε ένα γονίδιο ή τμήμα αυτού. Επισημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες και λειτουργούν ως δείκτες ανίχνευσης γονιδίων λόγω της ιδιότητάς τους να προσδένονται, μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων, σε μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος. Με τη μέθοδο των ESTs έγινε για πρώτη φορά το 1991 ανάλυση 609 mRNA αλληλουχιών του ανθρώπινου εγκεφάλου με μέσο μήκος 397±99 βάσεις.²⁰² Παρόμοιες μέθοδοι αυτής της κατηγορίας που εφαρμόστηκαν τα επόμενα χρόνια ήταν η *σειριακή* ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) και παραλλαγές αυτής, όπως η Cap Analysis of Gene Expression (CAGE).^{175, 176} Το πρωτόκολλο της SAGE περιλάμβανε τη χρήση ετικετών μικρής αλληλουχίας, μήκους 10-27 βάσεων από προκαθορισμένες θέσεις του cDNA, που παρείχαν επαρκή γενετική πληροφορία για να χαρακτηρίσουν ένα μετάγραφο, και τη σειριακή σύνδεση των αλληλουχιών σε μία αλυσίδα που μέσω αλληλούχησης καθιστούσε δυνατή την ανάλυση του μεταγραφώματος.²⁰³ Η SAGE έχει εφαρμοστεί για τη διερεύνηση του μεταγραφικού προφίλ διαφόρων ασθενειών,

όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο σακχαρώδης διαβήτης και το σύνδρομο Down, αλλά οι σχετικά κοπιώδεις εργαστηριακές δοκιμασίες που απαιτεί, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νεότερων τεχνικών αλληλούχησης, έχουν περιορίσει την εφαρμογή της.¹⁶⁷

Επόμενη γενιά αλληλούχησης

Η τεχνολογία της επόμενης γενιάς ή νέας γενιάς αλληλούχησης (Next Generation Sequencing, NGS) αποτέλεσε τη συνέχεια των τεχνικών πρώτης γενιάς αλληλούχησης και δεν αφορά σε μία συγκεκριμένη τεχνική, αλλά περιλαμβάνει ένα σύνολο τεχνολογιών ("Seg" protocols) που αποσκοπούν στον προσδιορισμό της αλληλουχίας σε επίπεδο όχι μόνο ενός γονιδίου ή μίας περιοχής αυτού, αλλά έως και ολόκληρου του γονιδιώματος (genome wide).^{167, 204} Για παράδειγμα, η **RNA**αλληλούχηση (RNA sequencing, RNA-seq) αφορά στη μελέτη του μεταγραφώματος, η Chip-Seq στη μελέτη της αλληλεπίδρασης DNAπρωτεϊνών, η DNase-Seq στον προσδιορισμό των πιο ενεργών ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων, η CNV-Seq στη μελέτη της ποικιλίας του αριθμού αντιγράφων (copy number variation) ενός ή περισσοτέρων γονιδίων, και η methyl-Seg στη μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων σε επίπεδο όλου του γονιδιώματος.¹⁶⁷ Η RNA-seq είναι μία προηγμένη μέθοδος αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (high throughput) που εφαρμόζεται από το 2006,²⁰⁵ τα χαρακτηριστικά της οποίας θα αναπτυχθούν εκτενώς στην επόμενη ενότητα του κεφαλαίου.

2.3. RNA-seq

Ως εξελιγμένη μέθοδος των τεχνολογιών NGS, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ακινητοποίηση των μεταγράφων είτε άμεσα σε μία στερεή επιφάνεια ή υπόστρωμα (immobilization by primer or template), είτε έμμεσα μέσω σύνδεσής τους στην πολυμεράση που συνδέεται με το υπόστρωμα (immobilization by linking a polymerase to the support), η τεχνική RNA-seq έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης αλληλούχησης δισεκατομμυρίων μεταγράφων που απέχουν μεταξύ τους,¹⁶⁷ γι' αυτό αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνική για την ανάλυση του μεταγραφώματος κυττάρων και ιστών.^{173, 189}

2.3.1. Βασικές αρχές, πλεονεκτήματα και προκλήσεις

Βασική αρχή της RNA-seq είναι η μετατροπή του RNA (ολικού ή κατατετμημένου, για παράδειγμα σε τμήματα πλούσια σε αδενίνη) σε μία βιβλιοθήκη cDNA αλληλουχιών, στις οποίες προσδένονται προσαρμογείς (adapters) σε ένα ή και στα δύο άκρα τους. Κάθε cDNA τμήμα, χωρίς ή με ενίσχυση, για παράδειγμα μέσω άλλης τεχνικής όπως η PCR, αλληλουχείται, δηλαδή «χαρτογραφείται», έτσι ώστε να προκύψουν μικρού μήκους αλληλουχίες, γνωστές ως «αναγνώσματα» (reads) από τις οποίες αποτελείται. Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια του κεφαλαίου, τα reads είτε αντιστοιχίζονται σε ένα γονιδίωμα αναφοράς (reference genome) (Εικ. 2.3) είτε συνενώνονται de novo χωρίς να λαμβάνεται υπόψη κάποια γνωστή αλληλουχία, με στόχο να παραχθεί ένας μεταγραφικός χάρτης γονιδιακής κλίμακας (genomescale transcription *map*) αποτελούμενος από τη δομή του μεταγραφώματος και από το επίπεδο έκφρασης κάθε γονιδίου σε αυτό.¹⁷⁵

Η RNA-seq εμφανίζει ποικίλα **πλεονεκτήματα**^{167, 175, 206} συγκριτικά με τις προηγούμενες μεθόδους τρανσκριπτομικής, γεγονός που διευρύνει τις δυνατότητες εφαρμογής της. Πιο αναλυτικά η RNA-seq:

α) Δεν προϋποθέτει γνώση συγκεκριμένης αλληλουχίας των γονιδίων που ανιχνεύει. Συνεπώς δεν περιορίζεται στην ανίχνευση μεταγράφων που αντιστοιχούν σε γνωστές γονιδιακές αλληλουχίες και μπορεί να ανιχνεύσει νέες, άγνωστες αλληλουχίες.^{167, 175}

β) Συμβάλλει στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των μεταγράφων, καθώς, εκτός από τις διαφορές στη γονιδιακή έκφραση, παρέχει πληροφορίες σχετικά με ισομορφές γονιδίων, αλληλουχίες ιντρονίων, non-coding RNAs και διαγονιδιακών περιοχών, μικρές προσθήκες ή διαγραφές νουκλεοτιδίων, καθώς και μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) ή γονιδιακής σύντηξης (gene fusion), καθώς και πληροφορίες για τις αλληλουχίες στη θέση έναρξης της μεταγραφής και στα 5' και 3' όρια των μεταγράφων.^{167, 175, 177, 207}

γ) Μπορεί να ανιχνεύσει γονίδια με πολύ μικρά ή πολύ μεγάλα επίπεδα έκφρασης και έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης των διαφορών που υπάρχουν στη γονιδιακή έκφραση, με μικρότερο ποσοστό ψευδούς ανίχνευσης ενός γονιδίου ως διαφορικώς εκφραζόμενο.^{179, 207} Ενώ οι μικροσυστοιχίες θεωρούνται αξιόπιστες στην ανίχνευση διαφορών της τάξεως x2 φορές μεταβολή των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων, η RNA-seq ανιχνεύει αξιόπιστα διαφορές μεγέθους x1,25 φορές.¹⁷⁷ Επίσης, δεν έχει ανώτατο όριο για ποσοτικοποίηση των μεταγράφων, το οποίο καθορίζεται από τον αριθμό των αλληλουχιών που αναγνωρίζει. Κατά συνέπεια, μπορεί να ανιχνεύσει ένα μεγάλο δυναμικό εύρος διαφορών των επιπέδων έκφρασης, ακόμα και μεγαλύτερες από 9000 φορές.¹⁷⁵

δ) Στα σύγχρονα πρωτόκολλά της, επιτρέπει οι προσαρμογείς που προσδένονται στα δύο άκρα των τμημάτων της cDNA να έχουν γνωστό προσανατολισμό $5 \rightarrow 3'$ ή $3' \rightarrow 5'$, ώστε να χρησιμοποιούνται ως σημεία αναφοράς για να προσδιορίζεται ο προσανατολισμός (sense/antisense) του μεταγράφου (strand-specific ή stranded sequencing).²⁰⁷

ε) Παρέχει τη δυνατότητα για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των μεταγράφων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη μεγάλη θετική συσχέτιση που έχουν τα αποτελέσματα της RNA-seq με την ποσοτική τρανσκριπτομική μέθοδο qPCR.^{175, 208}

στ) Εμφανίζει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων.^{175, 208}

ζ) Μπορεί να εφαρμοστεί σε πολύ μικρή ποσότητα απομονωμένου RNA. Κατά κανόνα, ένα 1 μg RNA θεωρείται επαρκές.^{173, 177}

η) Εξασφαλίζει σε μεγαλύτερο βαθμό αντιστοίχιση των αλληλουχιών σε μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος, γι' αυτό έχει πολύ μικρό θόρυβο υποβάθρου, δηλαδή τυχαία αντιστοίχιση.¹⁷⁵

θ) Με τις νεότερες εξελίξεις της, παρέχει τη δυνατότητα να συμπεριληφθούν εκατοντάδες δείγματα σε έναν κύκλο αλληλούχησης (multiplexed sequencing), καθώς το κάθε ένα σημαίνεται με διαφορετικό κωδικό (barcode), με αποτέλεσμα σημαντική μείωση του κόστους της πειραματικής διαδικασίας.²⁰⁹

Οι αρχικές **προκλήσεις** της RNA-seq αφορούσαν στις υψηλές απαιτήσεις των πειραματικών πρωτοκόλλων κυρίως για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης και της strand-specific αλληλούχησης, στο μικρό μήκος (συνήθως 50-100bp) των reads **(short reads)**²¹⁰ που προέκυπταν

αυξάνοντας τη δυσκολία αντιστοίχισης στο γονιδίωμα αναφοράς, καθώς και στις πολύπλοκες βιοπληροφορικές αναλύσεις που προϋπέθετε η ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης.^{170, 175} Διανύοντας την 3^η δεκαετία από τις πρώτες εφαρμογές της RNA-seq, οι προκλήσεις στην τεχνική και στην υπολογιστική επεξεργασία των δεδομένων αποτελούν ζητήματα ρουτίνας, που διεκπεραιώνονται με επιτυχία σε σύντομο χρόνο και σε ολοένα και πιο ανταγωνιστικό κόστος. Επίσης, οι διαρκώς εξελισσόμενες τεχνολογίες επιτρέπουν την αλληλούχηση μεγαλύτερου μήκους (>1000bp) reads (long reads)²¹⁰ ή την απευθείας αλληλούχηση του RNA, χωρίς την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης (direct sequencing), ενώ τέλος έχει καταστεί εφικτό να εφαρμόζεται η αλληλούχηση όχι μόνο στο ολικό RNA ενός ιστού (bulk RNA-seq), αλλά ακόμα και σε μεμονωμένα κύτταρα (single-cell RNAseq) ή σε ομάδες κυττάρων με συγκεκριμένη τοπογραφική εντόπιση στον ιστό (spatial RNA-seq), παρέχοντας έτσι πιο αναλυτικές πληροφορίες για το ρόλο και τις λειτουργίες τους.^{211, 212}

2.3.2. Πλατφόρμες αλληλούχησης

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες πλατφόρμες, δηλαδή μηχανήματα και μέθοδοι υπολογιστικής επεξεργασίας δεδομένων που προκύπτουν με RNA-seq, οι οποίες διαφέρουν ως προς την ταχύτητα, το **βάθος αλληλούχησης (sequencing depth)**, δηλαδή το συνολικό αριθμό χαρτογραφημένων αναγνωσμάτων, το **μήκος αναγνωσμάτων (read length)** σε bp που αναλύουν, καθώς και το μέγεθος των ψηφιακών δεδομένων που προκύπτουν από την εφαρμογή τους.²⁰⁴

Η αρχική εφαρμογή της RNA-seq έγινε με την πλατφόρμα της εταιρείας 454/Roche,^{205, 213} που χρησιμοποιεί την τεχνολογία πυροαλληλούχησης (pyrosequencing), με την οποία πραγματοποιείται αλληλούχηση σε πραγματικό χρόνο, με προσθήκη νουκλεοτιδίων, κατά την ενσωμάτωση των οποίων παράγεται φως, ως αποτέλεσμα μίας χημικής αντίδρασης οξείδωσης (ανίχνευση χημειοφωταύγειας).²⁰⁴ Ακολούθησαν πειράματα RNA-seq με την πλατφόρμα της **Illumina**, που αρχικά ονομαζόταν Solexa,^{189, 214} η τεχνολογία της οποίας βασίζεται στην **αλληλούχηση** μέσω σύνθεσης (sequence by synthesis),^{204, 212} που θα παρουσιαστεί εκτενώς σε επόμενη ενότητα του κεφαλαίου. Άλλες NGS πλατφόρμες είναι η Applied Biosystems/Life/APG SOLiD, η Helicos BioSciences HeliScope, η Ion Torrent, η Pacific Biosciences και η Oxford nanopore, με τις δύο τελευταίες να εξασφαλίζουν τα μεγαλύτερου μήκους reads

(>1kbp).^{200, 204} Τα μεγάλα μήκους reads υπερτερούν σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στην ανίχνευση ισομορφών γονιδίων.²¹² Μολονότι με την τεχνολογία της Illumina παράγονται μικρού μήκους reads, η υψηλή απόδοση και ακρίβεια σε συνδυασμό με την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης σε προσιτό κόστος, συντέλεσε σύντομα στη δημοφιλία της συγκριτικά με την προϋπάρχουσα τεχνολογία της 454/Roche,^{170, 179} και την καθιέρωσε την τελευταία δεκαετία ως κυρίαρχη τεχνολογία αλληλούχησης.^{215, 216}

Το αρχικό μηχάνημα της Illumina ήταν το Genome Analyzer II (GAIIx),²¹⁷ ενώ μεταξύ των νεότερων μηχανημάτων, που συνεχώς εξελίσσονται, υπάρχουν διαφοροποιήσεις ως προς το μέγιστο μήκος των reads της αλληλούχησης, το συνολικό αριθμό reads που προκύπτουν σε κάθε κύκλου αλληλούχησης, το χρόνο ολοκλήρωσης ενός κύκλο αλληλούχησης και τον όγκο δεδομένων που παράγουν (Πίνακας 2.1).²¹⁸ Από τις επιμέρους πλατφόρμες της Illumina, επικράτησαν για πολλά χρόνια οι HiSeq λόγω της παραγωγής μεγάλου όγκου δεδομένων σε προσιτή τιμή,²¹⁷ με το **HiSeq 4000** να εξασφαλίζει δισεκατομμύρια reads για 12 ανθρώπινα δείγματα σε έναν κύκλο αλληλούχησης σε 1-3,5 ημέρες.²¹⁹ Επίσης, μία εναλλακτική πρόταση από την εταιρεία για τη μελέτη ολικού μεταγραφώματος με βελτιωμένη ταχύτητα είναι το NextSeq 550, με το οποίο ένας κύκλος αλληλούχησης για 8 δείγματα μπορεί να ολοκληρωθεί ακόμα και εντός 11 ωρών.²²⁰

	Μέγιστο μήκος reads*	Reads ανά κύκλο αλληλούχησης	Χρόνος κύκλου αλληλούχησης	Όγκος δεδομένων
MiniSeq	2×150bp	7-25×10 ⁶	4-24 ώρες	1,65–7,5Gb
MiSeq	2×300bp	1-25×10 ⁶	5–55 ώρες	0,3–15Gb
Hiseq 2000	2×100bp	έως 2×10 ⁹	1,5-8 ημέρες	26-200Gb
Hiseq 2500	2×125bp	έως 4×10 ⁹	7 ώρες-6 ημέρες	10-1000Gb
Hiseq 4000	2×150bp	έως 5×10 ⁹	<1-3,5 ημέρες	210-1500Gb
HiSeq xTen	2×150bp	έως 6×10 ⁹	<3 ημέρες	1600-1800Gb
NextSeq 550	2×150bp	130-400×10 ⁶	11–29 ώρες	20–120Gb
NextSeq 1000&2000	2×150bp	100×10 ⁶ -1,2×10 ⁹	11-48 ώρες	30-360Gb
NovaSeq 6000	2×250bp	έως 20×10 ⁹	13–44 ώρες	65–6000Gb

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά των διαφορετικών πλατφορμών αλληλούχησης με την τεχνολογία της Illumina.

*Το μέγιστο μήκος των reads είναι η τιμή μετά την ένδειξη "×". Το "2x" συμβολίζει τη δυνατότητα αλληλούχησης από τα δύο άκρα (paired-end sequencing).

2.3.3. Πρωτόκολλο με την τεχνολογία της Illumina

Με την τεχνολογία της Illumina ο προσδιορισμός των αζωτούχων βάσεων κάθε θραύσματος γίνεται με βάση το σήμα που εκπέμπεται κατά την προσθήκη κάθε επόμενης βάσης κατά τη σύνθεση του θραύσματος με καλούπι έναν ακινητοποιημένο κλώνο-εκμαγείο. Μετά την απομόνωση του RNA, ακολουθούμενη από τον ποσοτικό και ποιοτικό του έλεγχο, το πρωτόκολλο της RNA-seq για τη μελέτη του ολικού μεταγραφώματος με την τεχνολογία της Illumina περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:^{189, 204, 221, 222}

1. Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Library Preparation). Με εκμαγείο το απομονωμένο RNA σχηματίζεται το δίκλωνο DNA, το οποίο κατατμείται για να σχηματιστούν τυχαία θραύσματα μικρού μήκους (fragments). Στη συνέχεια, ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, που ονομάζονται προσαρμογείς (adapters) προσδένονται στα 5' και 3' άκρα κάθε θραύσματος. Οι adapters φέρουν συγκεκριμένα barcodes, δηλαδή μεμονωμένες αλληλουχίες, που είναι διαφορετικές για κάθε δείγμα, έτσι ώστε κατά την μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων να μπορεί να γίνει ταυτοποίηση του θραύσματος με το δείγμα στο οποίο ανήκει. Το σύνολο των θραυσμάτων μαζί με τους προσαρμογείς αποτελεί τη γενωμική βιβλιοθήκη. Τέλος, με την τεχνική της PCR ενσωματώνονται ειδικά άκρα εκκινητών, (P5 στον 1ο κλώνο και P7 στο 20),²²³ στα θραύσματα, έτσι ώστε να επιτραπεί η αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων (Εικ. 2.5).^{189, 204, 221, 222}



Εικ. 2.5 Η προετοιμασία της γενωμικής βιβλιοθήκης ολοκληρώνεται με την προσθήκη των adapters και των ειδικών άκρων στα DNA θραύσματα.

2. Ενίσχυση συμπλέγματος (Cluster amplification). Τα μονόκλωνα μόρια DNA ακινητοποιούνται πάνω σε μία στερεή επιφάνεια-πλάκα εργασίας (flow cell), η οποία περιλαμβάνει ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συμπληρωματικές προς τους adapters (Εικ. 2.6Α). Οι αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικές του flow cell ενώνονται συμπληρωματικά μέσω υβριδισμού με τους adapters του ενός άκρου των μονόκλωνων θραυσμάτων cDNA, ενώ οι adapters του άλλου άκρου αναδιπλώνουν σε σχήμα «γέφυρας» πάνω στο flow cell για να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (bridge amplification) (Εικ. 2.6Β). Μόλις τα θραύσματα cDNA ακινητοποιηθούν πάνω στο flow cell, ενισχύονται με PCR ώστε να δημιουργηθούν χιλιάδες συμπλέγματα (clusters) θραυσμάτων (Εικ. 2.6Γ). Μετά τη δημιουργία των συμπλεγμάτων, οι βιβλιοθήκες είναι έτοιμες για αλληλούχηση. Οι συντεταγμένες κάθε cluster πάνω στο flow-cell είναι σημαντικές για τον ποιοτικό έλεγχο των δεδομένων αλληλούχησης που θα προκύψουν.^{189, 204, 221, 222}



Εικ. 2.6 Η ενίσχυση συμπλέγματος περιλαμβάνει (Α) τον υβριδισμό των adapters με ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες πάνω σε στερεή επιφάνεια, (Β) την αναδίπλωση των μορίων DNA σε σχήμα «γέφυρας», και (Γ) την ενίσχυση με PCR ώστε να δημιουργηθούν χιλιάδες αντίγραφα κάθε μορίου DNA που σχηματίζουν συμπλέγματα.

3. Αλληλούχηση (sequencing). Πραγματοποιείται ταυτόχρονη αλληλούχηση σε όλα τα clusters, βάση προς βάση, με τη χρήση 4 φθοριζουσών χρωστικών, κάθε μία εκ των οποίων είναι συνδεδεμένη με τις 4 αζωτούχες βάσεις (Α, Τ, G και C). Κατά την προσθήκη μίας συμπληρωματικής βάσης στο κάθε cluster εκπέμπεται το αντίστοιχο χρώμα φθορισμού, που καταγράφεται ως φθορίζουσα εικόνα του flow cell, και το χρώμα συμβάλει στην ταυτοποίηση της βάσης, με τη διαδικασία "base calling" (Εικ. 2.7).



Εικ. 2.7 Αλληλούχηση με σύνθεση σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Illumina.

Αφού προστίθεται κάθε βάση, φθορίζουσα ŋ χρωστική απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε επόμενη βάση, συνολικά n φορές, όπου n ίσο με το μήκος των reads (reads length), που προκαθορίζεται από τον χρήστη, έτσι ώστε να σχηματιστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες των clusters. Η αλληλούχηση μπορεί να πραγματοποιείται από το ένα άκρο (αλληλούχηση ενός άκρου, sinale-end sequencing) ή και από τα δύο άκρα (αλληλούχηση άκρου ζεύγους, paired-end sequencing) του read (Εικ. 2.8). Όταν πραγματοποιείται paired-end sequencing, για κάθε θραύσμα (fragment) cDNA της βιβλιοθήκης, δημιουργούνται 2 reads, ένα από κάθε άκρο του θραύσματος. Πρώτα αλληλουχείται το ένα άκρο προς μία κατεύθυνση και στη συνέχεια το άλλο άκρο προς την αντίστροφη κατεύθυνση. Με την παραπάνω διαδικασία, για κάθε δείγμα που αλληλουχείται παράγονται εκατομμύρια reads.^{189,} 204, 221, 222



Εικ. 2.8 Για κάθε θραύσμα DNA προκύπτουν reads από το ένα ή και τα δύο άκρα του, ανάλογα αν γίνεται single-end ή paired-end αλληλούχηση, αντίστοιχα.

- 4. Ποιοτικός έλεγχος αλληλούχησης και συναρμολόγηση (assembly). Τα δεδομένα που προκύπτουν από την αλληλούχηση αποθηκεύονται σε αρχεία FastQ, κάθε ένα εκ των οποίων περιλαμβάνει μία αλληλουχία βάσεων, καθώς και ένα σκορ βεβαιότητας σωστής ανίχνευσης κάθε βάσης της αλληλουχίας.²²⁴ Στην περίπτωση της paired-end sequencing προκύπτουν δύο αρχεία, όπου το ένα αρχείο περιλαμβάνει το read που αλληλουχήθηκε προς τη μία κατεύθυνση και το άλλο αρχείο το read που αλληλουχήθηκε προς την αντίστροφη φορά.²²⁵ Πιο αναλυτικά, ένα αρχείο FastQ έχει την ακόλουθη δομή, που απεικονίζεται σε 4 σειρές:^{224, 225}
 - 1^η σειρά: Ξεκινάει με το σύμβολο "@" και ακολουθείται από τον τίτλο και μια προαιρετική περιγραφή, ενδεικτική της αλληλουχίας που έπεται,
 - 2^η σειρά: η **αλληλουχία βάσεων** του read,
 - 3^η σειρά: Περιλαμβάνει το σύμβολο "+",
 - 4^η σειρά: Περιλαμβάνει ένα σκορ ποιότητας (Quality score, Q-score, ή Phred score), που απεικονίζεται ως μία αλληλουχία κωδικοποιημένη σύμφωνα με τον American Standard Code for Information Interchange (ASCII) με αριθμό χαρακτήρων ίσων με τις βάσεις του read. Το Q-score (q) κάθε βάσης ισούται με τον αρνητικό λογάριθμο με βάση το 10 της πιθανότητας (p) να έχει αναγνωστεί λάθος η συγκεκριμένη βάση, πολλαπλασιαζόμενο με την τιμή 10, δηλ. q=-10 x log₁₀(p).²²⁴ Ως βάσεις με καλή ποιότητα θεωρούνται αυτές με q>20,²²⁶ οι οποίες έχουν πιθανότητα να είναι λάθος μικρότερη από 0,01. Συνήθως οι βάσεις χαμηλής ποιότητας παρατηρούνται κοντά στο 3' άκρο του read.²²⁷

Ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιείται με προγράμματα βιοπληροφορικής, όπως το FastQC,²²⁸ το οποίο αξιολογεί διάφορες ποιοτικές παραμέτρους, όπως α) την ποιότητα των βάσεων κάθε αλληλούχησης, β) το ποσοστό περιεκτικότητας σε βάσεις GC, γ) τη ποσότητα αδιάβαστων βάσεων, δ) το ποσοστό διπλασιασμένων αλληλουχιών, και ε) την κατανομή μήκους των αλληλουχιών. Μετά το τέλος του ποιοτικού ελέγχου γίνεται **αποκοπή (trimming)** των adapters από τα άκρα των reads, καθώς και των βάσεων χαμηλής ποιότητας και γίνεται επανέλεγχος της συνολικής ποιότητας των reads.²²⁶ Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη *συναρμολόγηση (assembly)* των reads, η οποία πραγματοποιείται με έναν από τους δύο ακόλουθους τρόπους:²²⁹

α) συναρμολόγηση με αντιστοίχιση (alignment) των reads σε ένα γονιδίωμα αναφοράς (reference based assembly ή co-assembly), κατά την οποία η αλληλουχία βάσεων κάθε read αντιστοιχίζεται στη συμπληρωματική της στο γονιδίωμα αναφοράς,^{225, 229} όπως είναι για παράδειγμα το ανθρώπινο γονιδίωμα hg19/GRCh37.²³⁰

β) de novo συναρμολόγηση, όταν δεν υπάρχει γονιδίωμα αναφοράς για αντιστοίχιση. Σε αυτή την περίπτωση τα reads, με βάση την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τους, συναρμολογούνται σε μεγαλύτερες συνεχόμενες αλληλουχίες (contigs).²²⁹

Μετά τη συναρμολόγηση ακολουθεί η ευθυγράμμιση των reads σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Η διαδικασία της ευθυγράμμισης παρέχει μία πρώτη ένδειξη της επιτυχίας της αλληλούχησης, με βάση τον υπολογισμό των reads που κατάφεραν να χαρτογραφηθούν με βάση το γονιδίωμα αναφοράς (mapped reads) και, ειδικότερα, αυτών που αντιστοιχήθηκαν σε μία μοναδική θέση του γονιδιώματος (uniquely mapped reads).²³¹ Δεδομένου ότι τα reads που παράγονται κατά την αλληλούχηση έχουν πολύ μικρότερο μήκος από τα μετάγραφα των δειγμάτων, είναι αναμενόμενο, σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ των μεταγράφων, να προκύπτουν reads που αντιστοιχίζονται σε περισσότερες από μία θέσεις του γονιδιώματος αναφοράς (multi-mapped reads).²³² Το ποσοστό των τελευταίων ποικίλει ανάλογα με την πολυπλοκότητα του μεταγραφώματος και το μήκος των reads,²³² και συνήθως αφορά στο 5reads,²³³ ενώ μειώνεται σημαντικά 40% των mapped όταν πραγματοποιείται paired-end αλληλούχηση, καθώς τα δύο άκρα του θραύσματος cDNA από το οποίο προκύπτουν τα reads θα πρέπει να χαρτογραφηθούν κοντά στο γονιδίωμα αναφοράς.²³⁴ Επιπλέον, η μελέτη των δεδομένων που προκύπτουν από την RNA-seq περιλαμβάνει τον έλεγχο κατανομής των mapped reads σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, για παράδειγμα εξώνια, ιντρόνια, αμετάφραστες ή διαγονιδιακές περιοχές,²²⁵ με ειδικά προγράμματα, όπως είναι για παράδειγμα το RSeQC.²³⁵ Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο για την εκτίμηση της ποιότητας των αποτελεσμάτων της RNA-seq και της ύπαρξης τυχόν πιθανών σφαλμάτων κατά τα στάδια της απομόνωσης RNA, της κατασκευής της βιβλιοθήκης ή της αλληλούχησης.²²⁵ Τέλος, είναι δυνατή η *οπτικοποίηση* της αντιστοίχισης των reads στις περιοχές του γονιδιώματος αναφοράς, μέσω ειδικών λογισμικών, όπως είναι το *Integrated Genome Viewer (IGV)*, το οποίο απεικονίζει τις συντεταγμένες των χρωμοσωμάτων στα οποία αντιστοιχίζονται τα reads και παρέχει πληροφορίες για την ποιότητα της αντιστοίχισης.^{236, 237}

2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση

Η αξιοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από τη μελέτη ολικού μεταγραφώματος με τη μέθοδο της RNA-seq μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης αποσκοπεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη διαμόρφωση ενός συγκεκριμένου φαινότυπου, μέσω της ανάδειξης διαφορών στη γονιδιακή έκφραση.¹⁷⁵ Πρωταρχικά ανίχνευση στάδια πριν την των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων είναι η ευθυγράμμιση των αναγνωσμάτων (reads) που προέκυψαν από την αλληλούχηση σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος και ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων (gene counts). Ακολουθεί ο υπολογισμός των ΔΕΓ, η **ομαδοποίηση** των **δεδομένων** με βάση το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, καθώς και η ανάλυση εμπλουτισμού που αναδεικνύει τις οικογένειες γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του υπό μελέτη φαινοτύπου²²⁵

2.4.1. Ποσοτικοποίηση

Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων αποσκοπεί στη σύγκριση του προφίλ νονιδιακής έκφρασης μεταξύ δειγμάτων που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους.¹⁷⁵ Η σύγκριση αυτή δε γίνεται απευθείας ακατέργαστες τιμές των αναγνωσμάτων τις με βάση που χαρτογραφούνται ανά γονίδιο (raw reads), καθώς αυτό θα οδηγούσε σε μεροληψία (bias) στα αποτελέσματα, λόγω του διαφορετικού βάθους αλληλούχησης μεταξύ των δειγμάτων, και των διαφορετικών τιμών των γονιδίων ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα, που οφείλονται είτε σε βιολογικές παραλλαγές (biological variance) μεταξύ των δειγμάτων, είτε σε τεχνικά ζητήματα, για παράδειγμα σχετιζόμενα με την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης κάθε δείγματος, καθώς και του
διαφορετικού μήκους των γονιδίων, στα οποία αντιστοιχίζονται τα reads που προκύπτουν από την αλληλούχηση (Εικ. 2.9).^{234, 238-240} Για παράδειγμα, αν ορισμένα γονίδια εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε ένα δείγμα, αυτά αναμένεται να περιλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό των reads που αλληλουχήθηκαν σε αυτό, με αποτέλεσμα, το επίπεδο έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων να είναι υποεκτιμημένο.^{232, 240} Επίσης, ο αριθμός των reads που αλληλουχήθηκαν σε ένα γονίδιο είναι ανάλογος του μήκους του γονιδίου, καθώς περισσότερα reads αναμένεται να χαρτογραφηθούν σε γονίδια με μεγαλύτερος μήκος, με αποτέλεσμα τα γονίδια αυτά να έχουν μεγαλύτερη ισχύ να ανιχνευθούν ως διαφορικώς εκφραζόμενα.²³²

Για την εξάλειψη της μεροληψίας στην ποσοτικοποίηση προηγείται το στάδιο *κανονικοποίησης (normalization)* των τιμών των read counts, με την οποία καθίσταται δυνατή η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης διαφορετικών γονιδίων στο ίδιο δείγμα και μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η μέθοδος κανονικοποίησης διαφέρει ανάλογα με το αν αποσκοπεί σε συγκρίσεις επιπέδων έκφρασης γονιδίων του ίδιου δείγματος ή διαφορετικών δειγμάτων, ανάλογα με το είδος της αλληλούχησης (single- ή paired-end), καθώς και με το λογισμικό πακέτο εύρεσης των ΔΕΓ που χρησιμοποιείται.^{232, 234, 239-241}



Εικ. 2.9 Η ανάγκη κανονικοποίησης έγκειται στην αδυναμία σύγκρισης των reads (που απεικονίζονται ως οριζόντιες μαύρες γραμμές), τα οποία αντιστοιχήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς ανάμεσα σε γονίδια διαφορετικού μήκους, όπως τα Α και Β, καθώς και μεταξύ δειγμάτων με διαφορετικό βάθος αλληλούχησης, όπως τα δείγματα 1 και 2.

2.4.2. Διαφορική έκφραση

Με την ανάλυση διαφορικής έκφρασης επιδιώκεται να αναδειχθούν τα γονίδια, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων εμφανίζουν σημαντική μεταβολή μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων.²³⁴

Η παράμετρος που προσδιορίζει τη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που έχουν προκύψει από πειράματα με την τεχνική της RNAseq είναι το Fold-Change (FC). Η τιμή του FC για κάθε γονίδιο προσδιορίζει το επίπεδο επαγωγής ή καταστολής του γονιδίου και υπολογίζεται ως ο λόγος της μέσης τιμής των normalized counts του γονιδίου στην πειραματική ομάδα προς τη μέση τιμή των normalized ελέγχου.²⁴² counts στην ομάδα Συνήθως χρησιμοποιείται n λογαριθμημένη με βάση το 2 τιμή του FC (log₂FC), το πρόσημο της οποίας είναι ενδεικτικό της κατεύθυνσης επαγωγής, με τιμές >0 ή <0 να αντιστοιχούν σε γονίδια με μεγαλύτερες ή μικρότερες μέσες τιμές των normalized counts στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα.²⁴³ Ο λογαριθμικός μετασχηματισμός λειτουργεί ως ένα επιπλέον μέσο κανονικοποίησης που περιορίζει το εύρος των τιμών των normalized counts και την επίδραση των ακραίων τιμών, αυξάνοντας τη συμμετρία των δειγμάτων. 244, 245

Η εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας της μεταβολής στα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου μεταξύ των δύο συγκρινόμενων ομάδων αποδίδεται με μία τιμή *p-value*, διαφορετική για κάθε γονίδιο, η οποία περιγράφει την πιθανότητα να ισχύει η μηδενική υπόθεση, δηλαδή τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου να μη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων και η μεταβολή που προσδιορίστηκε να οφειλόταν στην τύχη.²⁴⁶ Επειδή, όμως, στα πειράματα που γίνονται με την τεχνική της RNA-seq ελέγχεται ταυτόχρονα ένας πολύ μεγάλος αριθμός υποθέσεων, ίσος με τον αριθμό των γονιδίων που ανιχνεύονται, η πιθανότητα ενός ψευδώς σημαντικού αποτελέσματος είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τον έλεγχο μόνο μίας υπόθεσης. Αυτή η πιθανότητα κατά τον έλεγχο πολλαπλών υποθέσεων έχει περιγραφεί ως family-wise error rate (FWER).²⁴⁷ Έχουν προταθεί διάφορες στατιστικές διορθώσεις αυτής της πιθανότητας, με μία ευρέως χρησιμοποιούμενη την **Bonferroni correction**,²⁴⁸ η οποία, όμως, θεωρείται πολύ συντηρητική και με μειωμένη ισχύ στην ανίχνευση γονιδίων που είναι διαφορικώς εκφραζόμενα.²⁴⁷ Μία εναλλακτική μέθοδος στατιστικής προσαρμογής της τιμής του p-value, με μεγαλύτερη ισχύ, εισήχθη από τους Benjamini and Hochberg²⁴⁹ και τροποποιήθηκε από τον Storey²⁵⁰ και αφορά στην αναμενόμενη αναλογία των ψευδώς σημαντικών αποτελεσμάτων επί του συνόλου των σημαντικών αποτελεσμάτων (*False Discovery Rate, FDR*).^{247, 251} Στην παρούσα διατριβή η χρήση του όρου *p-adjusted* θα αναφέρεται στη FDR στατιστική διόρθωση του p-value (*FDR-adjusted p-value*).

Η πιθανότητα ανίχνευσης γονιδίων ως ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά διαφορικώς εκφραζόμενα επηρεάζεται, επίσης, από τον αριθμό των βιολογικών ή τεχνικών επαναλήψεων που περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα RNA-seq.²⁵² Ως βιολογικές επαναλήψεις (biological replicates) ορίζονται οι μετρήσεις που γίνονται σε δείγματα προερχόμενα από διαφορετικούς δότες, π.χ., ασθενείς, ενώ ως τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates) θεωρούνται τα δείγματα που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή ή οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου δείγματος, για παράδειγμα σε διαφορετικά μηχανήματα ή με εφαρμογή διαφορετικών πειραματικών πρωτοκόλλων (Εικ. 2.10).²¹² Η επαληψιμότητα των αποτελεσμάτων που χαρακτηρίζει την RNA-seq ως τεχνική εξασφαλίζει μεγάλη ισχύ στην ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών, ακόμα και με τη χρήση μικρού αριθμού επαναλήψεων, με ελάχιστο προτεινόμενο αριθμό ανά ομάδα μελέτης τις 3^{253} ή, πιο αυστηρά, τις 6^{252} βιολογικές επαναλήψεις. Με βάση τα αποτελέσματα ανάλυσης ισχύος (power analysis) με το RNASeqPower στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιεί το μοντέλο της αρνητικής διωνυμικής κατανομής (Negative Binomial model),²⁵⁴ μια σύγκριση δύο ομάδων, με 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά ομάδα, έχει 87% στατιστική ισχύ στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% να ανιχνεύσει γονίδια, η έκφραση των οποίων έχει διαφορά τουλάχιστον 2 φορές μεταξύ των ομάδων.²⁵⁵ Αν συμπεριληφθούν 5 βιολογικές επαναλήψεις ανά ομάδα, η στατιστική ισχύ αυξάνεται στο 98% στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%, με την προϋπόθεση ότι δεν παρατηρείται μεγάλη απόκλιση στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των επαναλήψεων κάθε ομάδας.²⁵⁵ Η αρνητική διωνυμική κατανομή είναι περισσότερο δημοφιλής στις αναλύσεις διαφορικής έκφρασης συγκριτικά με την κανονική κατανομή ή την κατανομή Poisson, λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας που παρατηρείται στα δεδομένα που προκύπτουν με τη μέθοδο της RNA-seq.²⁴⁶



Εικ. 2.10 Τα δείγματα 1_{A/B}, 2_{A/B} και 3_{A/B} προέρχονται από διαφορετικούς ασθενείς και αποτελούν βιολογικές επαναλήψεις. Αντίθετα τα Α και Β, προήλθαν από τον ίδιο ασθενή, για παράδειγμα με εφαρμογή διαφορετικών πρωτοκόλλων, και αποτελούν τεχνικές επαναλήψεις. Επίσης, τα 3_{B-i} και 3_{B-ii} είναι και αυτά τεχνικές επαναλήψεις, γιατί αποτελούν μετρήσεις του δείγματος 3_B σε δύο διαφορετικά μηχανήματα.

2.4.3. Ομαδοποίηση δεδομένων

Ο μεγάλος όγκος πληροφοριών που χαρακτηρίζει τα αποτελέσματα της μελέτης γονιδιακής έκφρασης, δημιουργεί την ανάγκη προσδιορισμού υποσυνόλων δεδομένων, για παράδειγμα γονίδια με κοινές ιδιότητες ή δείγματα με παρόμοια πρότυπα γονιδιακής έκφρασης.²⁵⁶

Ένας διαδεδομένος τρόπος ομαδοποίησης δεδομένων αφορά στην *ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA),* μια μαθηματική μέθοδο που αποσκοπεί στη μείωση του αριθμού των διαστάσεων για ένα σύνολο των δεδομένων, διατηρώντας τη μέγιστη διακύμανσή τους.²⁵⁷ Πιο αναλυτικά, κάθε βιολογική επανάληψη του πειράματος, δηλαδή κάθε δείγμα μελέτης, θα μπορούσε να τοποθετεί στο χώρο σε ένα σημείο που προσδιορίζεται από *n* διαστάσεις, όπου *n* ίσο με τα γονίδια , οι τιμές έκφρασης των οποίων έχουν υπολογιστεί με την RNA-seq μέθοδο για αυτό το δείγμα. Η PCA μετασχηματίζει τα δεδομένα γραμμικά σε ένα νέο σύστημα συντεταγμένων, όπου οι κύριες συνιστώσες κατά φθίνουσα σειρά (*PC1: x-άξονα, PC2: y-άξονας, κοκ*) αποτυπώνουν τη μεγαλύτερη διασπορά μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων, επιτρέποντας έτσι να αναδειχθούν υποσύνολα δειγμάτων με κοινά χαρακτηριστικά, καθώς και περιπτώσεις **ακραίων δειγμάτων (outliers)**, που προτείνεται να εξαιρούνται από την περαιτέρω ανάλυση.^{257, 258}

Ο πιο δημοφιλής τρόπος ομαδοποίησης των δειγμάτων της μελέτης είναι η **ιεραρχική συσταδοποίηση (hierarchical clustering)**, η οποία διαχωρίζει τα δείγματα σε επιμέρους *συστάδες (clusters)* με βάση κοινά τους χαρακτηριστικά, δημιουργώντας μία διάταξη στο χώρο που απεικονίζεται ως δενδρόγραμμα. Η απόσταση των clusters επηρεάζεται από το βαθμό ομοιότητας στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των δειγμάτων.²⁵⁶ Κάθε επανάληψη πειράματος, π.χ., κάθε δείγμα μελέτης, θεωρείται ως ένα cluster και τα δύο clusters με τη μικρότερη απόσταση ενώνονται σε ένα νέο cluster. Το τελευταίο, εν συνεχεία θα συνδεθεί με το επόμενο cluster με το οποίο έχει τη μικρότερη απόσταση, και η διαδικασία θα επαναληφθεί έως ότου όλες οι επαναλήψεις του πειράματος να είναι ενωμένες με τα σκέλη του δενδρογράμματος. Το τα σκέλη ύψος που έχουν του δενδρογράμματος είναι αντιπροσωπευτικό της απόστασης, δηλαδή της έλλειψης ομοιότητας μεταξύ των clusters.^{256, 259} Το πιο διαδεδομένο μέτρο απόστασης για συνεχή, αριθμητικά δεδομένα είναι η Ευκλείδεια απόσταση, η οποία συνεκτιμά ως ισότιμα όλα τα γνωρίσματα, εν προκειμένου την έκφραση όλων των γονιδίων που λαμβάνονται υπόψη, για τη διάταξη των δειγμάτων στο δενδρόγραμμα.^{256, 260} Υπάρχουν διάφοροι μαθηματικοί αλγόριθμοι συνδέσεων των clusters, εκ των οποίων ιδιαίτερα δημοφιλής θεωρείται ο μέσος όρος της συστάδας (average clustering) που βασίζεται στη μέση ομοιότητα των σημείων (δηλαδή στη μέση τιμή της έκφρασης γονιδίων που λαμβάνονται υπόψη) ενός cluster με το άλλο.^{256, 261}

2.4.4. Ανάλυση εμπλουτισμού

Η ανάλυση εμπλουτισμού (enrichment analysis) ή λειτουργική ανάλυση (functional analysis) αποτελεί την κατεξοχήν βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, καθώς περιορίζει την πολυπλοκότητα της ταυτόχρονης μελέτης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμφανίζουν διαφορική έκφραση μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων, παρέχοντας μία μηχανιστική προσέγγιση στους βιολογικούς μηχανισμούς που διέπουν τον υπό μελέτη φαινότυπο.²⁶² Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ομαδοποίησης γονιδίων σε οικογένειες με κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι οι γονιδιακές οντολογίες (gene ontologies) και τα μονοπάτια γονίδιων (gene pathways), και στην ανάδειξη αυτών που είναι *εμπλουτισμένα*, δηλαδή περιέχουν στατιστικά σημαντικό αριθμό ΔΕΓ.²⁶³ Οι γονιδιακές οντολογίες αφορούν σε ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με **βιολογικές διεργασίες** (biological processes), μοριακές λειτουργίες (molecular functions) ή κυτταρικά διαμερίσματα (cellular components).²⁶⁴ Δύο από τα πιο γνωστά δημόσια διαθέσιμα αποθετήρια είναι το Gene Ontology (GO) (http://geneontology.org/) για τις γονιδιακές οντολογίες^{265, 266} και το Kyoto Encyclopedia Genes and of Genomes (KEGG) (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html) για τα μονοπάτια γονιδίων.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Έχουν περιγραφεί τρεις γενιές ανάλυσης εμπλουτισμού, οι οποίες εφαρμόζουν διαφορετικά κριτήρια για το χαρακτηρισμό μίας ομάδας γονιδίων ως εμπλουτισμένη:^{262, 263, 270}

1η γενιά - Ανάλυση υπερεκπροσώπησης

Η ανάλυση υπερεκπροσώπησης (Overrepresentation analysis, ORA) παρέχει την πιο άμεση λειτουργική κατηγοριοποίηση των δεδομένων αλληλούχησης, εκτιμώντας αν το ποσοστό των ΔΕΓ που ανήκουν σε μία οντολογία ή μονοπάτι υπερβαίνει το ποσοστό των γονιδίων που μπορεί να ανιχνευθούν τυχαία. Η ORA λαμβάνει υπόψη της μόνο τη λίστα των ΔΕΓ, αλλά όχι την τιμή επαγωγής/καταστολής (log₂FC) ή στατιστικής σημαντικότητας (π.χ., p-adjusted) κάθε ενός εξ αυτών, και αναδεικνύει ως σημαντικά εμπλουτισμένα μονοπάτια αυτά που περιλαμβάνουν περισσότερα ΔΕΓ σε σχέση με αυτά που θα περιλαμβάνονταν τυχαία, με βάση τη συνολική λίστα γονιδίων.^{262, 263} Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι χωρίς να προϋποθέτει προηγούμενη γνώση (nonknowledge-driven analysis) παρέχει ένα βιολογικό υπόβαθρο στα δεδομένα αλληλούχησης, επιτρέποντας διατύπωση έτσι τn πειραματικών υποθέσεων για περαιτέρω μελέτη.²⁶³ Ωστόσο, η ORA αντιμετωπίζει ως ίσης βαρύτητας και ανεξάρτητα μεταξύ τους όλα τα ΔΕΓ, γεγονός που αποτελεί υπεραπλούστευση των βιολογικών φαινομένων και συγκαταλέγεται ως μειονέκτημα της μεθόδου.²⁶² Παραδείγματα προγραμμάτων που εκτελούν ORA είναι το διαδικτυακά προσβάσιμο Enrichr^{271, 272} και το clusterProfiler,²⁷³ με ειδικό κώδικα σε νλώσσα προγραμματισμού R.

2^η γενιά - Ανάλυση λειτουργικής κατηγορίας

Η ανάλυση λειτουργικής κατηγορίας *(Functional Class Scoring, FCS)* στηρίζεται στην υπόθεση ότι, εκτός από τα γονίδια με μεγάλες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων, τα γονίδια με μικρότερες αλλαγές, που όμως σχετίζονται λειτουργικά σε κοινές ομάδες, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη του υπό μελέτη φαινότυπου.²⁶² Έτσι, υπερέχει συγκριτικά με την ORA στο ότι μπορεί να ανιχνεύσει μικρές αλλαγές που αθροιστικά έχουν σημαντική επίδραση στο φαινότυπο, αλλά παρόμοια με την ORA, και η FCS αντιμετωπίζει όλα τα γονίδια ως ανεξάρτητα μεταξύ τους.^{262, 263}

Η FCS περιλαμβάνει διάφορες στατιστικές δοκιμασίες, αρχικά σε επίπεδο κάθε γονιδίου (gene-level statistic), ώστε προσδιοριστούν τα ΔΕΓ, και στη συνέχεια συνεκτιμώντας τα στατιστικά αποτελέσματα όλων των γονιδίων μεμονωμένων οικογενειών γονιδίων (single pathway-level statistic). Τέλος, μέσω μίας τιμής εμπλουτισμού (enrichment score) εκτιμά τη συσχέτιση της διαφορικής έκφρασης με τον φαινότυπο ενδιαφέροντος, με την τιμή του p-value (ή, πιο αυστηρά, του p-adjusted) να αντιστοιχεί στην πιθανότητα η συσχέτιση να οφείλεται στην τυχαιότητα.^{262, 274} Έχουν περιγραφεί δύο ήδη μηδενικών υποθέσεων (Ho) που προσπαθεί να απορρίψει η FCS:

α) Η competitive Ho συγκρίνει τα γονίδια που ανήκουν σε μία οικογένεια με αυτά που δεν ανήκουν στην οικογένεια (background list) ως προς το φαινότυπο ενδιαφέροντος, θεωρώντας ότι τα γονίδια αυτής της οικογένειας είναι τόσο διαφορικώς εκφραζόμενα όσο και τα γονίδια που δεν ανήκουν στην οικογένεια στον υπό μελέτη φαινότυπο.²⁷⁵

β) Η self-contained Ηο συγκρίνει τη σχέση των γονιδίων μίας οικογένειας με το φαινότυπο ενδιαφέροντος με τη σχέση των ίδιων γονιδίων με διαφορετικούς φαινότυπους, θεωρώντας ότι κανένα από τα γονίδια αυτής της οικογένειας δεν είναι διαφορικώς εκφραζόμενα.²⁷⁶

Εκ των δύο αυτών μηδενικών υποθέσεων, η πρώτη εφαρμόζεται πιο συχνά σε προγράμματα FCS, καθώς θεωρείται πιο ειδική στο να αποδώσει τη βιολογική ερμηνεία στην ανάλυση και να προσεγγίσει πολύπλοκους φαινότυπους.²⁷⁷

Μια διαδεδομένη εφαρμογή της FCS είναι η Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), με την οποία συσχετίζεται η αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση με έναν από δύο συγκρινόμενους φαινότυπους (ασθενών ή μαρτύρων).²⁷⁸ Τα γονίδια που ανιχνεύονται κατατάσσονται σε μία λίστα L σύμφωνα με το μέγεθος διαφορικής έκφρασης, με αυτά τα οποία βρίσκονται στα άκρα της λίστας να είναι αυτά που συμβάλλουν στη φαινοτυπική διάκριση. Η GSEA αξιολογεί κατά πόσο τα μέλη ενός συνόλου γονιδίων S (που αποτελούν μία οντολογία ή ένα μονοπάτι) βρίσκονται στα άκρα της λίστας L ή είναι τυχαία κατανεμημένα σε αυτήν. Η υπερεκπροσώπηση του συνόλου S στα άκρα της λίστας εκτιμάται με το enrichment score (ES), η τιμή του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού τυχαίας κατανομής των γονιδίων του S στη λίστα L. Επίσης, δεδομένου του ελέγχου πολλαπλών υποθέσεων (πολλαπλά σύνολα S1, S2, Sn) που πραγματοποιούνται παράλληλα, η τιμή του ES για το σύνολο S_x κανονικοποιείται με βάση το μέγεθος του συνόλου S_x και έτσι προκύπτει το normalized enrichment score (NES) με το οποίο απεικονίζονται τα αποτελέσματα της GSEA, η στατιστική σημαντικότητα των οποίων αποδίδεται με την FDR-adjusted τιμή του p-value.^{279, 280}

3^η γενιά - Ανάλυση τοπολογίας μονοπατιού

Σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες γενιές, η ανάλυση τοπολογίας μονοπατιού (Pathway Topology) συνεκτιμά τη θέση των γονιδίων εντός του εμπλουτισμένου μονοπατιού.²⁸¹ Μία εξελιγμένη εκδοχή της είναι η Signaling Pathway Impact Analysis (SPIA), η οποία εξετάζει συνδυαστικά την υπερεκπροσώπηση των ΔΕΓ σε ένα μονοπάτι και τη διατάραξη που προκαλείται σε όλη την τοπολογία του μονοπατιού λόνω νονιδιακή έκφραση.^{263,} 282 των αλλανών στην н υπερεκπροσώπηση του μονοπατιού υπολογίζεται μέσω της πιθανότητας (pNDE) να εμφανιστεί σε ένα μονοπάτι τυχαία (δηλαδή ανεξάρτητα από τον υπό μελέτη φαινότυπο) τουλάχιστον αριθμός (N) διαφορικών εκφραζόμενων (differentially expressed, DE) γονιδίων ίσος με τον πραγματικό αριθμό των DE που έχουν βρεθεί. Η pNDE δε σχετίζεται με το μέγεθος των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων, δηλαδή το log₂FC. Για τη διατάραξη (perturbation) του μονοπατιού εκτιμάται η πιθανότητα (pPERT) να παρατηρηθεί μία τυχαία διατάραξη στο μονοπάτι η οποία να είναι μεγαλύτερη από την συνολικά παρατηρούμενη διατάραξη που σχετίζεται με το φαινότυπο

ενδιαφέροντος. Η συνολική διατάραξη στο μονοπάτι προκύπτει με βάση τους επιμέρους "παράγοντες διατάραξης" (perturbation factors, PFs) των γονιδίων του. Για κάθε γονίδιο (G_i) του μονοπατιού, ο PF υπολογίζεται ως το άθροισμα της αλλαγής των επιπέδων έκφρασης του G_i στις συγκρινόμενες ομάδες και μίας γραμμικής συνάρτησης των παραγόντων διατάραξης των ανωτέρω (upstream) γονιδίων του G_i κανονικοποιημένων με το σύνολο των downstream του G_i γονιδίων στο μονοπάτι. Συνεπώς, μεγαλύτερη διατάραξη στο μονοπάτι συμβαίνει όσο μεγαλύτερο είναι το επίπεδο επαγωγής των πιο upstream γονιδίων του. Από τη συνεκτίμηση των δύο πιθανοτήτων (pNDE και pPERT) προκύπτει μία συνολική πιθανότητα, το πρόσημο της οποίας είναι ενδεικτικό για το αν το μονοπάτι στον υπό μελέτη φαινότυπο είναι ενεργοποιημένο (+) ή κατεσταλμένο (-).²⁸²

Παρά την υπεροχή της συγκριτικά με τις δύο προηγούμενες γενιές στην ανάδειξη της σχέσης γονιδίων εντός ενός μονοπατιού, η ανάλυση τοπολογίας έχει περιορισμούς, καθώς δε συνεκτιμά την αλληλεπίδραση γονιδίων που ανήκουν σε περισσότερα του ενός μονοπάτια (overlapping genes), ενώ, επίσης, έχει εφαρμογή μόνο στα KEGG pathways, αλλά όχι στις γονιδιακές οντολογίες.^{262, 263, 278}

2.5. Χρήση ιστών αρχείου σε πειράματα RNA-seq

Μία πρόκληση για τις τεχνολογίες της νέας γενιάς αλληλούχησης και ειδικότερα για την RNA-seq, ήταν η εφαρμογή τους σε αρχειακό υλικό, συγκεκριμένα σε **ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και** εγκιβωτισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), λόγω του μεγάλου βαθμού αποδόμησης (degradation) του RNA που εμφανίζουν συχνά τα FFPE δείγματα, εξαιτίας:

α) αυτόλυσης των κυττάρων, κατά το διάστημα παραμονής των ιστών αμέσως μετά την αφαίρεσή τους εκτός μονιμοποιητικού μέσου, ή ανεπαρκούς μονιμοποίησης του κεντρικού τμήματος μεγάλων ιστοτεμαχίων²⁸³

β) χημικών τροποποιήσεων που προκαλούνται κατά τη μονιμοποίηση των ιστών στη φορμόλη, λόγω της προσθήκης μονο-μεθυλομάδων στα νουκλεοτίδια, ιδίως αυτών που περιέχουν ως βάση την αδενίνη, και της δημιουργίας διασταυρούμενων δεσμών (cross-links) μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων,²⁸⁴

γ) έκθεσης των ιστών σε ποικίλες συνθήκες θερμοκρασίας μετά τη μονιμοποίησή τους,²⁸³

δ) αποδόμησης του RNA από ένζυμα που το διασπούν (RNases) και χημικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν κατά το χρονικό διάστημα εγκιβωτισμού των μονιμοποιημένων ιστών στην παραφίνη, παραγόντων που επηρεάζουν αρνητικά την ποσότητα του RNA που μπορεί να απομονωθεί,²⁸⁵ και

ε) επιμόλυνσης των ιστών και καταστροφής τους κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA, από τις RNases που υπάρχουν στο δέρμα, τα υφάσματα, και τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία.^{286, 287}

Εξαιτίας των μοριακών μεταβολών που συμβαίνουν στο RNA κατά την παραμονή του στη φορμόλη και τον εγκιβωτισμό στην παραφίνη, οι οποίες οδηγούν σταδιακά στον κατακερματισμό του σε μικρότερου μήκους θραύσματα (fragmented RNA), αναμένεται να απομονωθεί από τα FFPE δείγματα μικρότερη ποσότητα και γαμηλότερης ποιότητας RNA, συγκριτικά με τα νωπά ιστοτεμάχια.^{283, 288} Ωστόσο, μία σειρά μελετών στην αγγλόφωνη βιβλιογραφία έχει αποδείξει την αποτελεσματική εφαρμογή της RNA-seq ως μέθοδο ανάλυσης του ολικού μεταγραφώματος (whole transcriptome) σε ανθρώπινα FFPE δείγματα, κυρίως κακοηθών νεοπλασμάτων, τα οποία στην πλειοψηφία τους ήταν αποθηκευμένα από λίγους μήνες έως και 34 έτη (Πίνακας 2.2). Αξιοσημείωτη είναι, επίσης, μία περίπτωση αλληλούχησης RNA που απομονώθηκε από ιστό πνεύμονα ασθενούς που κατέληξε από γρίπη το 1918 και ήταν εγκιβωτισμένο στην παραφίνη για >90 έτη, το οποίο εμφάνιζε παρόμοιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης με ιστό πνεύμονα θανόντος από γρίπη το 2009.²⁸⁹ Τέλος, η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της RNA-seq, όταν αυτή εφαρμόστηκε στην ίδια μελέτη σε RNA που απομονώθηκε από νωπούς κατεψυγμένους (freshfrozen) και από FFPE ιστούς, έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση στον αριθμό των reads ή των γονιδίων που ανιχνεύθηκαν στις δύο κατηγορίες δειγμάτων. 290-297

Συγγραφείς	Ιστοί προέλευσης	Αριθμός δειγμάτων	Χρόνος αποθήκευσης δειγμάτων	Πλατφόρμα αλληλούχησης	
			5-12,4 έτη		
Sinicropi et al 2012 ²⁹⁸	καρκίνοι μαστού	136	διάμεση ηλικία: 8 5 έτη	Illumina Hiseq 2000	
Morlan et al 2012 ²⁹⁹	καρκίνοι μαστού	4*	<1 έτος	Illumina GAIIx/Hiseg 2000	
N. 10010 ²⁸⁹		2	>90 έτη (n=1)		
Xiao et al 2013 ²⁰⁵	lung (influenza virus)		<4 έτη (n=1)	Illumina GAIIx	
Norton et al 2013 ²⁹⁶	όγκοι μαστού	9	0,4-4,3 έτη	Illumina Hiseq 2000	
	καρκίνοι προστάτη, εντέρου,		2 ແກ່ນຂດ-		
Hedegaard et al 2014 ²⁹³	ουροδόχου κύστης, φυσιολογικό	73	20.3 έτη	Illumina Hiseq 2000	
	ήπαρ, έντερο, αμυγδαλή		-, [
Li et al 2014 ²⁹⁵	διαυγοκυτταρικοί καρκίνοι νεφρού	2	2 έτη	Illumina GAIIx	
Morton et al 2014 ³⁰⁰	πνεύμονες	18	≤3 έτη	Illumina GAIIx	
Graw et al 2015 ²⁹²	όγκοι μήτρας	6	<1,5 έτος	Illumina Hiseq 2500	
Guo et al 2016 ³⁰¹	καρκίνοι μαστού	4	8-9 έτη	Illumina Hiseq 2000	
Eikrem et al 2016 ²⁹⁰	διαυγοκυτταρικοί καρκίνοι νεφρού,	32	<2.5 έτη	Illumina Hiseg 2500	
	φυσιολογικοί νεφροί		, 1		
Brayer et al 2016 ³⁰²	αδενοειδή κυστικά καρκινώματα,	25	<9 έτη**	Ion Proton	
	φυσιολογικοι σιελογονοι αδενες				
Esteve-Codina et al 2017 ²⁹¹	γλοιοβλαστώματα	4	8-11 έτη	Illumina Hiseq 2000	

Πίνακας 2.2 Μελέτες με εφαρμογή RNA-seq σε FFPE δείγματα με γνωστό χρόνο αποθήκευσης.

Συγγραφείς	Ιστοί προέλευσης	Αριθμός δειγμάτων	Χρόνος αποθήκευσης δειγμάτων	Πλατφόρμα αλληλούχησης
Haile et al 2017 ³⁰³	λεμφώματα	4	1-34 έτη	Illumina Hiseq 2500
Vukmirovic et al 2017 ²⁹⁷	πνεύμονες με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση	12	διάμεση ηλικία: 6 έτη	Illumina Hiseq 2000
Jovanovic et al 2017 ³⁰⁴	καρκίνοι μαστού	21	<10 έτη (n=17) >10 έτη (n=4)	Illumina Hiseq (n=11) MiSeq (n=10)
Kresse et al 2018 ³⁰⁵	σαρκώματα	5	2-5 έτη	Illumina MiSeq
Li et al 2018 ²⁹⁴	καρκίνοι μαστού	9	8 ημέρες- 8,8 μήνες	Illumina Hiseq 2000
Pennock et al 2019 ³⁰⁶	καρκίνοι μαστού	58	2-23 έτη	Illumina Hiseq 2500
Zhao et al 2019 ³⁰⁷	αδενοκαρκινώματα μήτρας	66	7-32 έτη	Illumina NextSeq 500

*4 τεχνικές επαναλήψεις του ίδιου ομογενοποιημένου (pooled) ιστού προερχόμενου από πολλαπλούς όγκους μαστού, χωρίς να αναφέρεται ο ακριβής αριθμός τους

**η ηλικία ήταν διαθέσιμη στα 14 αδενοειδή κυστικά καρκινώματα

2.6. Whole transcriptome RNA-seq σε νόσους κεφαλής-τραχήλου

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο όλου του γονιδιώματος προσφέρει τη δυνατότητα σφαιρικής προσέγγισης των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τα ανθρώπινα νοσήματα και παράλληλα στερείται της προκατάληψης (bias) των μελετών που στοχεύουν σε μικρό αριθμό γονιδίων, συχνά υπερεκτιμώντας την επίδραση αυτών στην εμφάνιση μίας παθολογικής κατάστασης.³⁰⁸ Αντίστοιχα, η μελέτη ολικού μεταγραφώματος (whole transcriptome) συμβάλλει του σημαντικά στην ανάδειξη των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζουν διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ενός φυσιολογικού ιστού ή την εκτροπή του προς έναν παθολογικό φαινότυπο, καθώς, επίσης, των αλλαγών που διαφοροποιούν τους υπότυπους ενός νοσήματος.³⁰⁹ Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και των μεταβολών της καθιστά δυνατή την εν τω βάθη διερεύνηση της παθογένειας μίας νόσου, την ανεύρεση βιοδεικτών με διαγνωστική ή προγνωστική αξία, και τη διαμόρφωση εξατομικευμένων σχημάτων θεραπείας.^{179, 309}

Η μελέτη ολικού μεταγραφώματος με την τεχνική της RNA-seq έχει εφαρμοστεί την τελευταία δεκαετία σε φρέσκους κατεψυγμένους και FFPE ιστούς ασθενών με νοσήματα στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου, όπως οι δυνητικά κακοήθεις διαταραχές και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, τα νεοπλάσματα των σιελογόνων αδένων και οι οδοντογενείς όγκοι. Πιο αναλυτικά, η ανάλυση του ολικού μεταγραφώματος με τη μέθοδο RNA-seq έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ΔΕΓ μεταξύ περιπτώσεων λευκοπλακίας που εμφάνισαν ή όχι κακοήθη εξαλλαγή,³¹⁰ τον προσδιορισμό των κοινών γονιδίων που υπερεκφράζονταν ή υποεκφράζονταν στον ομαλό λειχήνα και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, συγκριτικά με τον φυσιολογικό παρειακό βλεννογόνο,³¹¹ καθώς και των γονιδίων με διαφορική έκφραση μεταξύ του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος γλώσσας και του παρακείμενου κλινικά υγιούς βλεννογόνου.^{312, 313} Επίσης, η μελέτη του ολικού μεταγραφώματος με την RNA-seq έχει συμβάλλει στην ανάδειξη αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση που την ανάπτυξη κακοηθών νεοπλασμάτων χαρακτηρίζουν των σιελογόνων αδένων, όπως το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα,^{302, 314} το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα, το υαλινοποιημένο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα,³¹⁵ και το επιθηλιο-μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα.³¹⁶

Οι μελέτες ολικού μεταγραφώματος με την RNA-seq τεχνική στους οδοντογενείς όγκους και κύστεις είναι περιορισμένες. Το 2021 δημοσιεύθηκε η πρώτη μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος της RNA-seq για την ανάλυση του ολικού μεταγραφώματος στο **αδαμαντινοβλάστωμα**. Συγκεκριμένα, το ολικό RNA απομονώθηκε από νωπούς κατεψυγμένους ιστούς 5 περιπτώσεων που διαγνώστηκαν ως συμπαγές/πολυκυστικό αδαμαντινοβλάστωμα και συγκρίθηκαν με 3 περιπτώσεις οδοντοθυλακίων που συναφαιρέθηκαν κατά την εξαγωγή τρίτων γομφίων.³¹⁷ Η ίδια τεχνική είχε εφαρμοστεί, επίσης, στο ολικό RNA μίας περίπτωσης οδοντογενούς καρκινώματος με κύτταρα φαντάσματα και το μεταγράφωμά της είχε συγκριθεί με αυτό άλλων κακοήθων όγκων που αντλήθηκε από τη βάση The Cancer Genome Atlas (TCGA).³¹⁸

Μέχρι το χρόνο ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η μέθοδος whole transcriptome RNA-seq δεν έχει εφαρμοστεί για την ανάλυση των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης της ΟΚΚ. Δεδομένης της σπανιότητας των οδοντογενών όγκων και κύστεων, η χρήση των FFPE ιστών που παραμένουν για σειρά ετών αποθηκευμένοι στα αρχεία ιστοπαθολογικών εργαστηρίων χωρίς να απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες (π.χ., θερμοκρασίας) για τη διατήρησή τους, μπορεί να διευκολύνει σημαντικά στη μελέτη των οδοντογενών βλαβών με μεθόδους βασισμένες στα "Seq" πρωτόκολλα και τις "-omics" τεχνολογίες, όπως η γονιδιωματική (genomics), η τρανσκριπτομική (transcriptomics), η επιγονιδιωματική (epigenomics), η μεταβολομική (metabolomics), κ.α.³¹⁹ Ειδικά στην περίπτωση της ΟΚΚ, η μελέτη του συνόλου των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης κωδικών και μη κωδικών μεταγράφων αναμένεται να συμβάλλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθογένειά της και μπορούν να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους.¹¹⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΚΟΠΟΣ & ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση και ο χαρακτηρισμός του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης που διέπει το φαινότυπο της οδοντογενούς κερατινοκύστης (ΟΚΚ). Πιο αναλυτικά, γενικός στόχος ήταν να προσδιοριστούν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ΟΚΚ και των υποτύπων της, στο επίπεδο ολόκληρου του μεταγραφώματος. Για την επίτευξη αυτού του στόχου ως πειραματική ομάδα επιλέχθηκαν ιστοτεμάχια ολικής ΟΚΚ, δηλαδή ιστοτεμάχια που περιλαμβάνουν και το επιθήλιο, το οποίο φέρει τα παθογνωμονικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της οντότητας,¹¹ αλλά και το κυστικό τοίχωμα, το οποίο έχει βρεθεί πως σχετίζεται με την ανάπτυξη και τη βιολογική συμπεριφορά της.⁹⁵ Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οδοντοθυλάκια εγκλείστων δοντιών (ΟΘΕ), τα οποία έχουν επιλεγεί σε πολλές μελέτες ως ομάδα μαρτύρων της ΟΚΚ.^{144, 320-323} Τα ΟΘΕ συνδυάζουν το οδοντογενές μεσέγχυμα και επιθήλιο, καθώς περιέχουν εξωμεσέγχυμα και υπολείμματα της οδοντικής ταινίας,77 η οποία αποτελεί τον πιο ευρέως αποδεκτό ιστό προέλευσης της ΟΚΚ.¹¹

Επιμέρους στόχοι της μελέτης ήταν:

- Ο χαρακτηρισμός του ολικού μεταγραφώματος της ΟΚΚ. Για την επίτευξη αυτού του στόχου διαμορφώθηκε η ακόλουθη υπόθεση: Η ιδιαίτερη βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ αντανακλά διαφορές στο μεταγράφωμα των δύο αυτών οντοτήτων. Αντίστοιχα, η μηδενική υπόθεση είναι ότι δεν υπάρχουν διαφορές στο μεταγράφωμα της ΟΚΚ και του ΟΘΕ.
- 2. Η διερεύνηση διαφορών στο μεταγράφωμα της υποτροπής και της πρωτοπαθούς σποραδικής ΟΚΚ. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, θα ελεγχθεί η επικάλυψη των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) των υποτροπών σε σχέση με το ΟΘΕ με τα ΔΕΓ των πρωτοπαθών βλαβών σε σχέση με το ΟΘΕ. Επιπλέον θα υπολογιστούν τα ΔΕΓ των υποτροπών vs πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ, με βάση την ακόλουθη υπόθεση: Οι διαφορές μεταξύ των πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ και των υποτροπών πιθανώς αντανακλούν αλλαγές μεταγραφώματος. Αντίστοιχα, η μηδενική υπόθεση είναι ότι δεν υπάρχουν διαφορές στο μεταγράφωμα της πρωτοπαθούς σποραδικής ΟΚΚ και της υποτροπής σποραδικής ΟΚΚ.

- 3. Η διερεύνηση διαφορών στο μεταγράφωμα της συνδρομικής και της σποραδικής ΟΚΚ. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα ελεγχθεί η επικάλυψη των ΔΕΓ κάθε υποτύπου ΟΚΚ σε σχέση με το ΟΘΕ και επιπλέον θα υπολογιστούν τα ΔΕΓ της συνδρομικής ΟΚΚ vs τη την ακόλουθη σποραδική OKK, με βάση υπόθεση: Οι κλινικοπαθολογικές διαφορές μεταξύ της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ ενδεχομένως αντανακλούν παραλλαγές στο μεταγράφωμα των δύο υποτύπων. Αντίστοιχα, η μηδενική υπόθεση είναι ότι δεν υπάρχουν διαφορές στο μεταγράφωμα της σποραδικής και της συνδρομικής ΟΚΚ.
- 4. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της RNA-sequencing (RNA-seq) της παρούσας μελέτης με τα δημοσιευμένα διαθέσιμα δεδομένα από μία προηγούμενη μελέτη που εξέτασε το μεταγράφωμα της ολικής ΟΚΚ με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών.⁸⁶ Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα εφαρμοστούν προγράμματα βιοπληροφορικής χρησιμοποιώντας δεδομένα ανάλυσης τα της μελέτης μικροσυστοιχιών,⁸⁶ που είναι διαθέσιμα στην Gene Expression Omnibus (GEO) database του National Center of Biotechnology Information (NCBI) υπό τον αριθμό πρόσβασης GSE38494, με βάση την ακόλουθη **υπόθεση:** Κοινές γονιδιακές αλλαγές που είναι καθοριστικές στη διαμόρφωση του φαινοτύπου της ΟΚΚ θα πρέπει να ανιχνεύονται (ως ΔΕΓ) κατά την εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών. Αντίστοιχα, η μηδενική υπόθεση είναι ότι δεν υπάρχουν κοινά ΔΕΓ στην ΟΚΚ μεταξύ της παρούσας μελέτης που θα εφαρμόσει RNA-seq και της προηγούμενης μελέτης μικροσυστοιχιών.⁸⁶
- 5. Έλεγχος επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν με τη μέθοδο της RNA-seq. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα εφαρμοστεί σε επιλεγμένες περιπτώσεις η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου [real-time Polymerase Chain Reaction (gPCR)] και της ανοσοϊστοχημείας, με βάση τις ακόλουθες **υποθέσεις:** α) Γονίδια που ανιχνεύονται ως διαφορικώς εκφραζόμενα μεταξύ της ΟΚΚ και του ΟΘΕ θα πρέπει να εμφανίζουν σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης και με τη μέθοδο της gPCR. β) Τα πρωτεϊνικά προϊόντα γονιδίων με σημαντική επαγωγή στην ΟΚΚ σύμφωνα με την RNA-seq, θα πρέπει να υπερεκφράζονται στον ιστό της ΟΚΚ με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Αντίστοιχα, οι μηδενικές υποθέσεις είναι: α) Με την gPCR

δεν ανιχνεύονται διαφορές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που βρέθηκαν ως διαφορικώς εκφραζόμενα μεταξύ της ΟΚΚ και του ΟΘΕ με την RNA-seq. β) Τα πρωτεϊνικά προϊόντα γονιδίων με σημαντική επαγωγή στην ΟΚΚ με την RNA-seq δεν ανιχνεύονται ως υπερεκφρασμένα στον ιστό της ΟΚΚ με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας

6. Η διερεύνηση γονιδιακών διαφορών που έχουν αναφερθεί μεταξύ της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα γίνει συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αναφορικά με μελέτες που εξετάζουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση μορίων στους δύο υπότυπους της ΟΚΚ, με βάση την ακόλουθη υπόθεση: Οι κλινικοπαθολογικές διαφορές μεταξύ της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ, οι οποίες παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 1, ενδεχομένως υποστηρίζονται από διαφορές στο ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δύο υποτύπων. Αντίστοιχα, η μηδενική υπόθεση είναι ότι δεν υπάρχουν διαφορές στο ανοσοϊστοχημικό προφίλ της σποραδικής και της συνδρομικής ΟΚΚ.

Οι επιμέρους στόχοι 1-5 αποτελούν αντικείμενο του κεφαλαίου 4, ενώ η επιστημονική υπόθεση του στόχου 6 προσεγγίζεται στο κεφάλαιο 5 της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ

4.1. Εισαγωγή

Παρά την επαναταξινόμηση της οδοντογενούς κερατινοκύστης (ΟΚΚ) μεταξύ των οδοντογενών κύστεων αναπτυξιακής αιτιολογίας στην τελευταία αναθεώρηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ),¹¹ τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της, όπως η τοπικά διηθητική ενδοοστική ανάπτυξη, η αυξημένη τάση υποτροπών και η συχνή εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών, θεωρούνται ακόμα από ορισμένους προσομοιάζουν ερευνητές πως στη βιολογική συμπεριφορά οδοντογενών νεοπλασμάτων και χρήζουν περαιτέρω μελέτης.¹¹⁵ Έχουν περιγραφεί ορισμένες μοριακές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη της ΟΚΚ, τόσο σε σποραδικές περιπτώσεις όσο και σε ασθενείς με Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (ΣΣΒΚ), και εστιάζουν στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog, για παράδειγμα μέσω μεταλλάξεων στο γονίδιο PTCH1 και της υπερέκφρασης downstream μορίων, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας *GLI1*.³²⁴⁻³²⁶ Ωστόσο, το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που διέπει την ανάπτυξη του φαινοτύπου της ΟΚΚ δεν έχει μέχρι και σήμερα αποσαφηνιστεί.

Η χρυσή σταθερά για το χαρακτηρισμό του γονιδιακού προφίλ και τη συσχέτισή του με το φαινότυπο μίας κατάστασης θεωρείται η τεχνική της RNA-αλληλούχησης (RNA-sequencing, RNA-seq), η οποία μέσω της τεχνολογίας της αλληλούχησης νέας γενιάς μπορεί να εξασφαλίσει τη μελέτη του ολικού μεταγραφώματος κυττάρων ή ιστών.^{173, 175} Στην περίπτωση ασθενειών, η RNA-seq μπορεί να αποκαλύψει νέα γονίδια που να αποτελέσουν διαγνωστικούς δείκτες ń στόχους εξατομικευμένης θεραπείας, καθώς και να αναδείξει γονιδιακές οντολογίες και σηματοδοτικά μονοπάτια που χαρακτηρίζουν την ασθένεια ή συγκεκριμένους υπότυπους της.¹⁷⁵ Μέχρι τη στιγμή της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, το μεταγραφικό OKK έχει αποτελέσει αντικείμενο προφίλ της μελέτης 4 δημοσίευσεων,^{86, 119, 327,} 328 υλικό όλες με διαφορετικό και μεθοδολογία.

Στην πρώτη δημοσίευση, το 2014, εφαρμόστηκε RNA-seg σε ινοβλάστες που απομονώθηκαν από το κυστικό τοίχωμα 2 ΟΚΚ, χωρίς να διευκρινίζεται αν αφορούσαν σε σποραδικές ή συνδρομικές περιπτώσεις, με ομάδα ελέγχου ινοβλάστες ούλων.³²⁷ Μεταξύ των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) στις ινοβλάστες της ΟΚΚ περιλαμβάνονταν μόρια που σχετίζονται με το σχηματισμό και τη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ), για παράδειγμα το LOXL4, το οποίο προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, η υπερέκφραση του οποίου στην ΟΚΚ πιθανολογήθηκε πως συμμετέχει στην τοπικά επιθετική συμπεριφορά της.³²⁷ Το 2015 μία μελέτη με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών Affymetrix συνέκρινε το ολικό μεταγράφωμα 12 σποραδικών ΟΚΚ με αυτό 15 ενδοοστικών αδαμαντινοβλαστωμάτων και ανέδειξε πως στο μεταγραφικό προφίλ της ΟΚΚ επικρατούν γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, ενώ υποεκφρασμένα ήταν πολλά γονίδια που σχετίζονταν με την οδοντογένεση.⁸⁶ Επίσης, σε αυτή τη μελέτη, που αποτελεί την μοναδική εργασία που εξέτασε το μεταγράφωμα ολόκληρης της ΟΚΚ, δηλαδή του κυστικού επιθηλίου και τοιχώματος, επισημάνθηκε ως υπερεκφρασμένος στην ΟΚΚ ο δείκτης βλαστοκυττάρων SOX2.86 Ακολούθησε το 2016 μία δεύτερη μελέτη που εφάρμοσε την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών Agilent για να εξετάσει το μεταγράφωμα των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στιβάδας 20 ΟΚΚ, συγκριτικά με μεμονωμένους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν στην οδοντογένεση.¹¹⁹ Η μελέτη αυτή ανέδειξε δύο μεταγραφικούς υπότυπους της ΟΚΚ, ιεραρχικά ομαδοποιημένους με τις εκκριτικές αδαμαντινοβλάστες ή τις οδοντινοβλάστες, με παρόμοιο κλινικό προφίλ, δηλαδή ήταν όλες σποραδικές περιπτώσεις, χωρίς σημαντική διαφορά στον αριθμό πρωτοπαθών περιπτώσεων/ υποτροπών.¹¹⁹ Τέλος, το 2021 δημοσιεύθηκε μία μελέτη που εξέτασε με single cell RNA-seq 14.072 κύτταρα που απομονώθηκαν από 3 μονήρεις (χωρίς διευκρίνιση υποτύπου) ΟΚΚ και αποκάλυψε 5 υποπληθυσμούς των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στιβάδας, όλοι χαρακτηριζόμενοι από υπερέκφραση του γονιδίου KRT5, και 3 υποπληθυσμούς ινοβλαστών του κυστικού τοιχώματος, που διακρίνονταν από υπερέκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την ΕΘΟ (π.χ., SPP1, SFRP4), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ., MKI67, *TOP2A*) ή χημειοκίνες (π.χ., *CXCL1*, *CXCL12*).³²⁸

Μέχρι σήμερα δεν έχει εφαρμοστεί η τεχνική της RNA-seq για τη μελέτη του ολικού μεταγραφώματος της ΟΚΚ. Η ανάγκη ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης της ΟΚΚ εν συνόλω, δηλαδή του κυστικού επιθηλίου και κυστικού τοιχώματος έγκειται στο ότι το μεν επιθήλιο φέρει τα παθογνωμονικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της οντότητας,¹¹ αλλά και το κυστικό τοίχωμα δεν έχει απλά υποστηρικτικό, δομικό ρόλο, αλλά συμμετέχει στη διαμόρφωση της βιολογικής της συμπεριφοράς.⁹⁵ Επιπλέον, δεν έχει εξετασθεί το μεταγραφικό προφίλ των συνδρομικών ΟΚΚ, οι οποίες, όπως παρουσιάστηκε στο *κεφάλαιο* 1, εμφανίζουν ορισμένες κλινικοπαθολογικές διαφορές από τις σποραδικές περιπτώσεις, που ενδεχομένως αντανακλούν παραλλαγές στο μεταγράφωμα των δύο υποτύπων.

4.2. Σκοπός

Σκοπός της μελέτης είναι η αποκωδικοποίηση του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης που συνοδεύει το φαινότυπο της ΟΚΚ. Πιο αναλυτικά, ο σχεδιασμός της μελέτης αποσκοπεί:

- 1. στο χαρακτηρισμό του ολικού μεταγραφώματος της ΟΚΚ,
- στη διερεύνηση διαφορών στο μεταγράφωμα μεταξύ της υποτροπιάζουσας σποραδικής ΟΚΚ και της πρωτοπαθούς σποραδικής ΟΚΚ,
- 3. στη διερεύνηση διαφορών στο μεταγράφωμα μεταξύ του συνδρομικού και του σποραδικού υποτύπου της ΟΚΚ,
- στη σύγκριση των αποτελεσμάτων της RNA-seq με αυτά της προηγούμενης μελέτη που εξέτασε το μεταγράφωμα της ολικής OKK με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, και
- στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RNA-seq με τις μεθόδους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR) και της ανοσοϊστοχημείας.

4.3. Υλικά & Μέθοδοι

4.3.1. Επιλογή περιπτώσεων μελέτης

Για την επιλογή του υλικού της διδακτορικής διατριβής έγινε αναδρομική μελέτη των περιπτώσεων ΟΚΚ και ΟΘΕ που διαγνώστηκαν ιστοπαθολογικά στο Εργαστήριο της Κλινικής Στοματολογίας και Νοσοκομειακής Οδοντιατρικής, Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α.. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν οι αύξοντες αριθμοί των ΟΚΚ κατά το διάστημα 1/1/1987 έως 31/10/2019 και των ΟΘΕ μεταξύ 1/1/2010 και 31/10/2019. Από τα παραπεμπτικά ιστοπαθολογικής εξέτασης αντλήθηκαν οι ακόλουθες πληροφορίες, οι οποίες καταγράφηκαν ανωνυματοποιημένες:

- α) Το φύλο και η ηλικία των ασθενών κατά το χρόνο της βιοψίας.
- β) Η εντόπιση των ΟΚΚ και ΟΘΕ.
- γ) Η σχέση με έγκλειστο δόντι.
- δ) Ειδικά για τις ΟΚΚ, στοιχεία που τεκμηρίωναν ότι η περίπτωση αφορούσε σε ασθενή με ΣΣΒΚ ή σε υποτροπή προηγούμενης βλάβης με διάγνωση ΟΚΚ.
- ε) Ειδικά για τα ΟΘΕ, σημειώθηκαν οι περιπτώσεις που προήλθαν από εξαγωγές εγκλείστων δοντιών που πραγματοποιήθηκαν στην Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α. και εξαιρέθηκαν οι υπόλοιπες περιπτώσεις. Ο λόγος επιλογής αυτών των περιπτώσεων ήταν η δυνατότητα επιβεβαίωσης μέσω των διαθέσιμων προεγχειρητικών πανοραμικών ακτινογραφιών πως επρόκειτο για πλήρως έγκλειστα δόντια,³²⁹ στα οποία απουσίαζε η επικοινωνία του οδοντοθυλακίου με τη στοματική κοιλότητα, που αυξάνει την πιθανότητα δευτερογενούς φλεγμονής.³³⁰
- στ) Η **ημερομηνία διενέργειας της βιοψίας (ΗΜ_ΒΙΟ**), όπως είχε καταγραφεί από τον παραπέμποντα κλινικό.

Επειδή κρίσιμη παράμετρος για επιτυχή χρήση των ιστών που είναι μονιμοποιημένοι στη φορμόλη και εγκιβωτισμένοι στην παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) σε γονιδιωματικές τεχνικές είναι η ακεραιότητα του RNA, η οποία επηρεάζεται αρνητικά από τον παρατεταμένο **χρόνο μονιμοποίησης** του ιστού **σε φορμόλη** και το **χρόνο εγκιθωτισμού σε παραφίνη**, ιδίως όταν η φύλαξη των ιστών είναι σε θερμοκρασία δωματίου,³³¹ <u>απορρίφθηκαν</u> περιπτώσεις που κατά το Δεκέμβριο 2019:

- Παρέμεναν εγκιβωτισμένες στην παραφίνη για διάστημα μεγαλύτερο των 20 ετών,²⁹³ δηλαδή περιπτώσεις διαγνωσμένες πριν την 1/1/2000. Ο χρόνος εγκιβωτισμού στην παραφίνη υπολογίστηκε από το αρχείο του Ιστοπαθολογικού Εργαστηρίου, με βάση τον αύξοντα αριθμό καταχώρισης κάθε περίπτωσης στο Εργαστήριο.
- 2. Είχαν παραμείνει σε φορμόλη για διάστημα μεγαλύτερο των 2 ημερών.^{331, 332} Ο χρόνος παραμονής στη φορμόλη υπολογίστηκε κατά προσέγγιση με βάση την ΗΜ_ΒΙΟ και την ημερομηνία καταχώρησης (HM_KAT) στο αρχείο του Εργαστηρίου που κατά κανόνα^{*1} λαμβάνει χώρα 1 ημέρα πριν τον εγκιβωτισμό στην παραφίνη ως εξής:

χρόνος στη φορμόλη=(HM_KAT – HM_BIO) +1

Σημειώνεται (*1) πως για τις 27 περιπτώσεις που επιλέχθηκαν τελικά επιβεβαιώθηκε πως η παραλαβή στο Εργαστήριο δεν έγινε ημέρα Παρασκευή ή πριν από αργίες (π.χ. Χριστουγέννων, Μεγάλης Εβδομάδας ή Καλοκαιρινών διακοπών), γεγονός που θα συνεπαγόταν μεγαλύτερη καθυστέρηση έως τον εγκιβωτισμό στην παραφίνη.

Στη συνέχεια, συνεκτιμήθηκαν πληροφορίες που αντλήθηκαν από τα παραπεμπτικά ιστολογικής εξέτασης, τους ενημερωμένους μετά από επανεξέταση των ασθενών ηλεκτρονικούς φακέλους της Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., καθώς και προσωπική επικοινωνία με παραπέμποντες που διέθεταν κλινικά και ακτινογραφικά στοιχεία από τη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών, αναφορικά με την εμφάνιση υποτροπών και τη διάγνωση του ΣΣΒΚ και <u>απορρίφθηκαν</u> επιπλέον περιπτώσεις με:

- Πολλαπλές ΟΚΚ στον ίδιο ασθενή, στον οποίο δεν τεκμηριωνόταν αλλά ούτε μπορούσε να αποκλειστεί η διάγνωση ΣΣΒΚ, που εμφανίζεται κατά κανόνα με πολλαπλές ΟΚΚ.⁴⁹
- Υποτροπιάζουσες ΟΚΚ στον ίδιο ασθενή ηλικίας έως 20 ετών, στον οποίο δεν τεκμηριωνόταν αλλά ούτε μπορούσε να αποκλειστεί η

διάγνωση ΣΣΒΚ, που είναι ιδιαίτερα συχνό κατά τις πρώτες δύο δεκαετίες ζωής⁴⁰

 ΟΚΚ που είχαν προκύψει μετά από μερική βιοψία, καθώς τα χαρακτηριστικά τους ενδέχεται να διέφεραν από τα υπολειπόμενα τμήματα.

Επίσης, έγινε αναζήτηση των κύβων παραφίνης των περιπτώσεων με αποδεκτούς χρόνους μονιμοποίησης/εγκιβωτισμού, ελέγχθηκε η *επάρκεια του υλικού*, και <u>απορρίφθηκαν:</u>

6. Οι περιπτώσεις με περιορισμένο όγκο εγκιβωτισμένου ιστού, ώστε να αποφευχθεί η εξάντλησή του κατά τη διαδικασία προετοιμασίας των τομών για την απομόνωση RNA.

Τέλος, ελέγχθηκαν οι προϋπάρχουσες ιστολογικές τομές 5μm των περιπτώσεων με επαρκή εγκιβωτισμένο ιστό και συγκεντρώθηκαν οι περιπτώσεις που πληρούσαν τα ακόλουθα **ιστοπαθολογικά κριτήρια**:

- ΟΚΚ με παθογνωμονικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά¹¹ και απουσία έντονης φλεγμονώδους διήθησης του κυστικού τοιχώματος, οστεοδοκίδων ή τμημάτων του υπερκείμενου στοματικού βλεννογόνου (Εικ. 4.1Α),
- ΟΘΕ με τυπικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και παρουσία επιθηλιακών νησιδίων που θεωρούνται υπολείμματα της οδοντικής ταινίας,⁷⁷ καθώς και απουσία περιοχών έντονης φλεγμονώδους διήθησης, οστεοδοκίδων ή τμημάτων του υπερκείμενου στοματικού βλεννογόνο (Εικ. 4.1B).





Εικ. 4.1 (Α) Οδοντογενής Κερατινοκύστη. (Β) Οδοντοθυλάκιο εγκλείστου (βέλη: νησίδια οδοντογενούς επιθηλίου). Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.

Με βάση τα προαναφερθέντα, σημειωμένα με έντονη γραφή (bold), *κριτήρια*, προέκυψαν οι ακόλουθες υποομάδες μελέτης (Πίνακας 4.1, Εικ. 4.2):

- A1. 8 περιπτώσεις ΟΚΚ σχετιζόμενες με ΣΣΒΚ, προερχόμενες από 7 διαφορετικούς ασθενείς. 2 περιπτώσεις προήλθαν από τον ίδιο ασθενή και εντοπίζονταν 1 στην άνω γνάθο και 1 στην κάτω γνάθο (πειραματική ομάδα, υποομάδα: συνδρομικές ΟΚΚ, σΟΚΚ),
- Α2i. 6 περιπτώσεις σποραδικών ΟΚΚ που αποτελούσαν την πρωτοπαθή βλάβη σε 6 διαφορετικούς ασθενείς και καμία εξ' αυτών έως το 2019 που επιλέχθηκε το δείγμα δεν είχε υποτροπιάσει (πειραματική ομάδα, υποομάδα: σποραδικές, πρωτοπαθείς, μη υποτροπιάζουσες ΟΚΚ),
- A2ii. 3 περιπτώσεις σποραδικών ΟΚΚ που αποτελούσαν την πρωτοπαθή βλάβη σε 3 διαφορετικούς ασθενείς και στη συνέχεια υποτροπίασαν (πειραματική ομάδα, υποομάδα: σποραδικές, πρωτοπαθείς, υποτροπιάζουσες ΟΚΚ),
- A3. 4 περιπτώσεις σποραδικών ΟΚΚ που αποτελούσαν την υποτροπή προηγούμενων βλαβών σε 4 διαφορετικούς ασθενείς. Οι 2 από αυτές ήταν υποτροπή ΟΚΚ που συμπεριλήφθηκαν στην υποκατηγορία Α2ii (πειραματική ομάδα, υποομάδα: σποραδικές, υποτροπές ΟΚΚ),
- B. 6 περιπτώσεις ΟΘΕ προερχόμενα από 6 διαφορετικούς ασθενείς (ομάδα ελέγχου).

Περίπτωση	Φύλο	Ηλικία	Εντόπιση	Πληροφορίες
OKK-1	άνδρας	64	КГ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
OKK-2*1	άνδρας	33	КГ	υποτροπή (μετά από 4 έτη)
OKK-3	γυναίκα	65	КГ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
ОКК-4	άνδρας	17	КΓ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
				(σχέση με έγκλειστο δόντι)
OKK-5 ^{*2}	γυναίκα	70	КГ	υποτροπή (μετά από 4 έτη)
OKK-6	άνδρας	57	КГ	υποτροπή (μη διαθέσιμος χρόνος από πρωτοπαθή βλάβη)
OKK-7 ^{*1}	άνδρας	29	КΓ	πρωτοπαθής, υποτροπιάζουσα
OKK-8	άνδρας	64	КГ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
OKK-9	άνδρας	42	КГ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
	• •			(σχέση με έγκλειστο δόντι)
OKK-10	γυναίκα	58	КΓ	πρωτοπαθής, μη υποτροπιάζουσα
OKK-11 ^{*2}	γυναίκα	66	КГ	πρωτοπαθής, υποτροπιάζουσα
OKK-12	γυναίκα	62	КΓ	πρωτοπαθής, υποτροπιάζουσα
OKK-13	γυναίκα	74	КГ	υποτροπή (μη διαθέσιμος χρόνος από
				πρωτοπαθή βλάβη)
σΟΚΚ-1	άνδρας	18	КГ	ΣΣΒΚ, αδερφός με ΣΣΒΚ
				(σχέση με έγκλειστο δόντι)
σΟΚΚ-2	άνδρας	15	КГ	ΣΣΒΚ, αδερφός με ΣΣΒΚ
σΟΚΚ-3	άνδρας	18	КГ	ΣΣΒΚ, αδερφή και πατέρας με ΣΣΒΚ,
				σπίλοι προσώπου
σΟΚΚ-4	γυναίκα	15	КГ	ΣΣΒΚ
σΟΚΚ-5 ^{*3}	άνδρας	13	КГ	ΣΣΒΚ, πατέρας με ΣΣΒΚ
σΟΚΚ-6	γυναίκα	17	АГ	ΣΣΒΚ, αδερφός και πατέρας με ΣΣΒΚ,
				σπίλοι προσώπου
σΟΚΚ-7	άνδρας	16	КГ	ΣΣΒΚ (σχέση με έγκλειστο δόντι)
σΟΚΚ-8 ^{*3}	άνδρας	15	АГ	ΣΣΒΚ, πατέρας με ΣΣΒΚ
OOE-1	άνδρας	15	АГ	σχέση με έγκλειστο #18
OØE-2	γυναίκα	14	КГ	σχέση με έγκλειστο #38
OOE-3	άνδρας	13	КГ	σχέση με έγκλειστο #48
OOE-4	άνδρας	17	ΚГ	σχέση με έγκλειστο #48
OOE-5	άνδρας	16	КΓ	σχέση με έγκλειστο #48
OOE-6	άνδρας	9	АГ	σχέση με έγκλειστο άνω μεσόδοντα

Πίνακας 4.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών, εντόπιση βλαβών, υπότυπος της ΟΚΚ, και σχέση με έγκλειστα δόντια.

Συντομογραφίες: ΑΓ: άνω γνάθος, ΚΓ: κάτω γνάθος, ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, ΣΣΒΚ: σύνδρομο σπιλοειδών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων. ^{*1,2,3} Τα δείγματα με ίδια ένδειξη εκθέτη προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή.



Εικ. 4.2 Οι 21 ΟΚΚ και τα 6 ΟΘΕ που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

4.3.2. Προετοιμασία τομών για απομόνωση RNA

Σε όλες τις περιπτώσεις, το RNA προήλθε από ιστούς που είχαν μονιμοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης και είχαν εγκιβωτιστεί σε κύβους παραφίνης (Diawax, Diapath, Martinengo, Italy), κατά τη συνήθη ιστολογική τεχνική.333 Με βάση το επιλεχθέν πρωτόκολλο RNA αλληλούχησης (Quick Biology Inc., Pasadena, CA, USA), η απομόνωση RNA από FFPE δείγματα συστήνεται να γίνεται από συνολική επιφάνεια ιστού (δηλ. άθροισμα του εμβαδού όλων των τομών ανά περίπτωση) ≥150mm². Δεδομένου ότι η ΟΚΚ δεν αποτελεί ένα συμμετρικό ιστοτεμάχιο συγκεκριμένου σχήματος, είναι αναμενόμενο ότι διαφορετικές τομές θα έχουν διαφορές στο εμβαδόν της ιστικής επιφάνειας και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιθανό η επιφάνεια του ιστού προοδευτικά να μειώνεται. Για να εξασφαλιστεί, συνεπώς, επαρκής ποσότητα ιστού για απομόνωση RNA, στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε ο αριθμός των τομών με συνολικό εμβαδόν ≥250mm². Ο αριθμός των τομών παραφίνης διέφερε μεταξύ των περιπτώσεων και καθορίστηκε από το εμβαδόν του ιστού κάθε περίπτωσης, με την ακόλουθη διαδικασία:

 Έγινε κοπή 1 τομής πάχους 5μm από τους κύβους παραφίνης με χρήση μικροτόμου (Leica RM2145, Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, USA). Οι τομές απλώθηκαν σε υδατόλουτρο πάνω στη συσκευή Heidolph MR82 magnetic stirrer, ρυθμισμένη στους 62°C για 1 λεπτό, και επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες (SuperFrost®Plus, Menzel-Glaser, D-38116 Braunschweig, 25*75*1.0 mm, Art No.J1800AMNZ), που ήταν ηλεκτροθετικά φορτισμένες, ώστε να αποφευχθεί η αποκόλληση του ιστού κατά τα ακόλουθα πειραματικά στάδια. Για να ενισχυθεί η προσκόλληση των ιστών στις αντικειμενοφόρες πλάκες, οι τελευταίες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ξηρής θερμότητας (Heratherm, Thermo Scientific, USA) στους 64°C για 1 ώρα. Εν συνεχεία, στις τομές εφαρμόστηκε η χρώση ρουτίνας αιματοξυλίνη-ηωσίνη.³³⁴

- Έγινε σάρωση των αντικειμενοφόρων πλακιδίων που ήταν χρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη σε αρχική μεγέθυνση 20x μέσω ψηφιακής κάμερας OLYMPUS U-CMAD3 T7, U-TV1X-2 T7 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), οπτικού μικροσκοπίου OLYMPUS CX 23LEDRFS2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) και λογισμικού Windows 10 (Microsoft Corporation, NY, USA).
- 3. Μέσω του λογισμικού προβολής ψηφιοποιημένων ιστοπαθολογικών εικόνων ObjectiveView[™],³³⁵ υπολογίστηκε το μήκος μίας απόστασης χ σε μm σε ένα ιστοτεμάχιο (Εικ. 4.3Α).



Εικ. 4.3 Υπολογισμός εμβαδού ιστού με το (A) ObjectiveView™ και το (B) Image J.

4. Με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image J (version 1.52a)³³⁶ επιλέχθηκε η ίδια απόσταση χ, ορίστηκε το μήκος της (ως Known distance) σύμφωνα με το ObjectiveView[™] και στη συνέχεια επιλέχθηκε όλη η επιφάνεια του ιστού και υπολογίστηκε το εμβαδό της σε μm² (Εικ. 4.3B). Σε περιπτώσεις με πολλαπλά ιστοτεμάχια ανά τομή, υπολογίστηκε το εμβαδόν (Area) κάθε ιστοτεμαχίου και με το άθροισμά τους ορίστηκε το εμβαδόν ιστού ανά τομή (Πίνακας 4.2).

Η διαδικασία προετοιμασίας των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

- <u>Προετοιμασία κύβων παραφίνης</u>: Για τον κατά το δυνατό περιορισμό της ποσότητας παραφίνης που περιλαμβανόταν σε κάθε τομή, στις περιπτώσεις που περιείχαν διαφορετικά τμήματα ιστού σε απόσταση μεταξύ τους στον κύβο, προηγήθηκε τήξη της παραφίνης με τοποθέτηση των δειγμάτων σε μηχάνημα έγκλεισης ιστών σε παραφίνη (Embed 503, Kaltek, Padova, Italy) σε θερμοκρασία 65°C για 5-10 λεπτά και επανατοποθέτηση των ιστικών τμημάτων σε πλησιέστερες θέσεις.
- <u>Λήψη τομών:</u> Έγινε χάραξη των κύβων παραφίνης περιμετρικά του ιστού με αποστειρωμένη χειρουργική λαβίδα και αποκοπή της περιφερικής παραφίνης με χειρουργικό νυστέρι No 11. Η λήψη τομών 10μm έγινε με χρήση μικροτόμου (Leica RM2145, Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, USA).
- <u>Αποθήκευση τομών</u>: Οι τομές 10μm τοποθετήθηκαν σε προαριθμημένους σωλήνες (eppendorf tubes) χωρητικότητας 1,5ml, οι οποίοι είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο κλίβανο Tuttnauer 2340MK για 20 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε 1 eppendorf ανά δείγμα.
- 4. <u>Μέτρηση βάρους τομών</u>: Είχε προηγηθεί μέτρηση του βάρους των κενών eppendorf tubes με τη χρήση του ζυγού Mettler H33 στο Εργαστήριο Βιολογίας, Οδοντιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α.. Τα eppendorf tubes με τις τομές 10μm ζυγίστηκαν εκ νέου και από τη διαφορά του βάρους, δηλαδή τελικό-αρχικό βάρος, προέκυψε το βάρος τομών 10μm ιστού ανά περίπτωση.

Tα eppendorf tubes με τις τομές 10μm ιστού διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου έως την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης του RNA που ακολούθησε άμεσα εντός των επόμενων ημερών. **Πίνακας 4.2** Χρονικό διάστημα αποθήκευσης κύβου παραφίνης, εμβαδόν της ιστικής επιφάνειας ανά τομή 5μm, συνολικός αριθμός τομών πάχους 10μm, εμβαδόν ιστικής επιφάνειας και βάρος συνολικών τομών ανά περίπτωση μελέτης.

Περίπτωση	Χρόνος	Εμβαδόν	Αριθμός	Συνολικό	Συνολικό
	αποθήκευσης	ιστού/τομή	τομών	εμβαδόν	βάρος
	(μήνες)	(mm²)	<i>10µ</i> m	ιστού τομών	τομών
				(mm²)	(gr)
OKK-1	148	9,3	31	288,3	0,0504
OKK-2 ^{*1}	23	19	17	323	0,0211
OKK-3	106	15	19	285	0,0163
OKK-4	86	32,7	8	261,6	0,0151
OKK-5 ^{*2}	114	11,1	25	277,5	0,033
OKK-6	36	29	11	319	0,0181
OKK-7 ^{*1}	74	12	24	288	0,0207
OKK-8	138	34	8	272	0,0108
OKK-9	202	48	6	288	0,0102
OKK-10	124	9	32	288	0,0403
OKK-11 ^{*2}	168	21,7	13	282,1	0,0168
OKK-12	108	7,3	36	262,8	0,0377
OKK-13	188	13	23	299	0,0335
σΟΚΚ-1	227	41,5	7	290,5	0,0153
σΟΚΚ-2	224	18	16	288	0,0187
σΟΚΚ-3	16	55,7	5	278,5	0,0147
σΟΚΚ-4	181	20,4	14	285,6	0,0261
σΟΚΚ-5 ^{*3}	82	32,5	9	292,5	0,0152
σΟΚΚ-6	17	51	6	306	0,0197
σΟΚΚ-7	229	51	6	306	0,0099
σΟΚΚ-8 ^{*3}	59	20	14	280	0,0168
OΘE-1	34	14,6	18	262,8	0,0112
OØE-2	32	20,6	13	267,8	0,0137
OOE-3	34	23,6	11	259,6	0,0063
ΟΘΕ-4	18	63	6	378	0,0064
OØE-5	19	9,5	31	294,5	0,0238
OΘE-6	19	26,2	12	314,4	0,0115

Συντομογραφίες: ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη. *1,2,3 Τα δείγματα με ίδια ένδειξη εκθέτη προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή.

4.3.3. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τις τομές 10μm εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του **AllPrep DNA/RNA FFPE Kit** (Qiagen, Valenica, California, USA, catalog number #80234). Τα στάδια της απομόνωσης του ολικού RNA ήταν τα ακόλουθα (Εικ. 4.4):

- 1. Αρχική προετοιμασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers) που χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα στάδια:
 - buffer RLT: θέρμανση με απαλή ανάδευση για να διαλυθούν τυχόν ιζήματα,
 - buffer FRN: αρχικά θέρμανση του δοχείου 14ml που περιείχε το buffer FRN με απαλή ανάδευση για να διαλυθούν τυχόν ιζήματα, προσθήκη 42ml ισοπροπανόλης 100% και ανάμειξη με ανακίνηση του δοχείου,
 - διάλυμα DNase I: έγχυση 550μl RNase-free ύδατος στο φιαλίδιο που περιείχε σε λυοφιλοποιημένη μορφή DNase I με τη χρήση RNase-free βελόνας και σύριγγας και ανάμειξη με ελαφρά ανακίνηση του φιαλιδίου,
 - buffer RPE: προσθήκη 44ml αιθανόλης 100% στο δοχείο 11ml που περιείχε το buffer RPE και ανάμειξη με ανακίνηση του δοχείου.
- 2. Προσθήκη 640μl διαλύματος αποπαραφινοποίησης (Zymo Research deparaffinization solution, catalog number #D3067-1-20) σε κάθε eppendorf tube, τα οποία εμπεριέχονται στο AllPrep DNA/RNA FFPE Kit. Η πλήρης απομάκρυνση της παραφίνης είναι κρίσιμη, έτσι ώστε να επιτευχθεί στη συνέχεια πλήρης έκθεση του ιστού στην πρωτεϊνάση Κ.
- Ανάδευση στη συσκευή Vortex για 10 δευτερόλεπτα και σύντομη (λίγα δευτερόλεπτα) φυγοκέντρηση στις 13.200rpm σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT), έως ότου παρατηρήθηκε ότι ο ιστός συγκεντρώθηκε στον πυθμένα κάθε eppendorf tube.
- Επώαση σε συσκευή ξηρής θέρμανσης (dry heating block) στους 56°C για 3 λεπτά.
- 5. Επώαση σε RT για 5 λεπτά.
- 6. Φυγοκέντρηση στις 13.200rpm σε RT για 2 λεπτά. Με τη χρήση πιπέτας απορρίφθηκε η υπερκείμενη φάση (supernant) και

υπολείμματα του διαλύματος αποπαραφινοποίησης από τα τοιχώματα του eppendorf tube, με προσοχή ώστε να μην ακουμπήσει το άκρο της πιπέτας στο σφαιρίδιο ή πελέτα ιστού που είχε σχηματιστεί στον πυθμένα του eppendorf tube.

- Επώαση σε συσκευή ξηρής θέρμανσης στους 37°C για 10 λεπτά, διατηρώντας το καπάκι των eppendorf tubes ανοιχτό, ώστε να στεγνώσει η πελέτα.
- Προσθήκη 150μl <u>buffer PKD</u> για επαναιώρηση της πελέτας και επαναλαμβανόμενο χτύπημα με το δάκτυλο (flicking) του eppendorf tube για να διαλυτοποιηθεί η πελέτα.
- 9. Προσθήκη **10μΙ <u>πρωτεϊνάσης Κ</u>**.
- 10. Ανάδευση σε συσκευή Vortex.
- 11. Επώαση σε συσκευή ξηρής θέρμανσης στους 56°C για 15 λεπτά.
- 12. Επώαση σε πάγο για 3 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 13.200rpm σε RT για 15 λεπτά, με στόχο την καθίζηση των προσμίξεων RNA στον πυθμένα των eppendorf tubes.
- Μεταφορά με προσοχή της πάνω φάσης (υδατικής φάσης) σε ένα véo eppendorf tube χωρητικότητας 2ml.
- 15. Επώαση σε συσκευή ξηρής θέρμανσης στους 80°C για 15 λεπτά. Αυτή η επώαση αποσκοπεί να αντιρροπήσει την τροποποίηση που έχουν υποστεί τα νουκλεϊκά οξέα λόγω της μονιμοποίησης του ιστού σε διάλυμα φορμαλδεΰδης.
- Σύντομη φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα στις 13.000rpm σε RT ώστε να πέσουν όλες οι σταγόνες από το καπάκι του eppendorf tube.
- 17. Προσθήκη **320μl <u>Buffer RLT</u>**.
- 18. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή Vortex για λίγα δευτερόλεπτα.
- 19. Προσθήκη **1120μΙ** <u>αιθανόλης (100%)</u>.
- 20. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή Vortex για λίγα δευτερόλεπτα.
- 21. Μεταφορά 700μΙ του διαλύματος (μαζί με τυχόν ιζήματα που περιλάμβανε) σε ένα νέο eppendorf tube χωρητικότητας 2ml (σωλήνας συλλογής), το οποίο περιλάμβανε τη στήλη (RNeasy MinElute spin column) μέσω της οποίας θα εκλουστεί το RNA.
- 22. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 10.000rpm σε RT. Αμέσως μετά απορρίφθηκε το υγρό που είχε περάσει μέσα από την στήλη και είχε συλλεχθεί στο σωλήνα συλλογής (flow-through), το οποίο περιλάμβανε το buffer RLT. Το στάδιο αυτό

επαναλήφθηκε έως ότου όλο το διάλυμα που προέκυψε με την προσθήκη της αιθανόλης μεταφέρθηκε στη στήλη.

- 23. Προσθήκη **350μl <u>Buffer FRN</u>** στη στήλη.
- 24. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 10.000rpm σε RT. Αμέσως μετά απορρίφθηκε το flow-through.
- 25. Σε ένα νέο eppendorf tube χωρητικότητας 2ml προστέθηκαν 10μl <u>DNase I stock solution</u> και 70μl <u>Buffer RDD</u> και έγινε ανάμιξη των δύο διαλυμάτων με προσεκτική ανακίνηση του eppendorf tube. Κατόπιν, 80μl αυτού του διαλύματος μεταφέρθηκαν απευθείας στη μεμβράνη της στήλης.
- 26. Επώαση στον πάγκο εργασίας σε RT για 15 λεπτά.
- 27. Προσθήκη **500μl <u>Buffer FRN</u>** στη στήλη.
- 28. Φυγοκέντρηση στις 10.000rpm σε RT για 15 δευτερόλεπτα.
- 29. Συλλογή του flow-through το οποίο περιείχε το RNA. Μεταφορά της στήλης σε ένα νέο eppendorf tube χωρητικότητας 2ml και μεταφορά σε αυτό και του flow-through.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000rpm σε RT για 15 δευτερόλεπτα και απόρριψη του flow-through, το οποίο τώρα περιλάμβανε το buffer FRN.
- 31. Προσθήκη **500μl <u>Buffer RPE</u>** στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000rpm σε RT για 15 δευτερόλεπτα, ώστε να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Αμέσως μετά έγινε απόρριψη του flow-through.
- 33. Επανάληψη βημάτων 31 και 32.
- 34. Μεταφορά της στήλης σε ένα νέο eppendorf tube χωρητικότητας 2ml.
- 35. Φυγοκέντρηση με ανοιχτό καπάκι στις 13.200rpm σε RT για 5 λεπτά. Η φυγοκέντρηση αυτή πρέπει να γίνεται με ανοιχτά καπάκια, προσανατολισμένα αντίθετα από τη φορά περιστροφής της φυγόκεντρου ώστε να επιτευχθεί εξάτμιση όλης της αιθανόλης από τη μεμβράνη της στήλης.
- 36. Μεταφορά της στήλης σε ένα νέο eppendorf tube χωρητικότητας
 1,5ml.
- 37. Προσθήκη RNase-free ύδατος (ddH₂O) κάθετα απευθείας πάνω στη μεμβράνη της στήλης σε τελικό όγκο 15-25μl, λαμβάνοντας υπόψη ότι η στήλη έχει όγκο 2μl.
- 38. Επώαση σε RT για 1 λεπτό.

- Φυγοκέντρηση στις 13.200rpm σε RT για 1 λεπτό για να εκλουστεί το RNA και απόρριψη της στήλης.
- 40. Αποθήκευση των eppendorf tubes με το RNA στους -80°C έως τα επόμενα πειραματικά στάδια.



Εικ 4.4 Στάδια απομόνωσης RNA. Από τους κύβους παραφίνης λήφθηκαν σε μικροτόμο τομές 10μm και τοποθετήθηκαν σε ειδικό διάλυμα για την απομάκρυνση της παραφίνης. Κατόπιν ανάδευσης στη συσκευή Vortex, επώασης σε συσκευή ξηρής θέρμανσης και φυγοκέντρηση, ο ιστός συγκεντρώθηκε ως σφαιρίδιο (πελέτα) στον πυθμένα του δοχείου. Ακολούθησε πέψη με πρωτεϊνάση K και μετά από φυγοκέντρηση σχηματίστηκαν δύο φάσεις. Η ανώτερη φάση μεταφέρθηκε σε νέο δοχείο και έγινε επώαση σε υψηλή θερμοκρασία σε συσκευή ξηρής θέρμανσης. Μετά από προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος και αιθανόλης, το διάλυμα μεταφέρθηκε στο δοχείο που περιείχε τη στήλη για την έκλουση του RNA. Έγινε προσθήκη του ενζύμου DNase, άλλων ρυθμιστικών διαλυμάτων και αιθανόλης, με ενδιάμεσα στάδια φυγοκέντρησης, και τέλος μετά από προσθήκη RNase-free ύδατος και φυγοκέντρησης έγινε έκλουση του RNA μέσω της στήλης.
4.3.4. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος RNA

Ο προσδιορισμός της **συγκέντρωσης** του RNA στα δείγματα έγινε με τη χρήση του NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), ενός φασματοφωτόμετρου πλήρους φάσματος (220-750nm), που παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.³³⁷ Η φωτομέτρηση για τα νουκλεϊκά οξέα πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 260nm και με βάση την τιμή της οπτικής απορρόφηση (A₂₆₀), το λογισμικό του Nanodrop υπολογίζει τη συγκέντρωση του RNA σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα καθαρά (συντελεστής αραίωσης=1) RNA μόρια συγκέντρωσης 40ng/μl έχουν στα 260nm απορρόφηση (A₂₆₀) ίση με 1 μονάδα:³³⁸

Συγκέντρωση (ng/μl)= A_{260} x 40 (ng/μl) x συντελεστής αραίωσης

Επιπλέον, με το λογισμικό του NanoDrop έγινε έλεγχος της καθαρότητας του RNA μέσω προσδιορισμού του λόγου της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm (A_{260/280}) και του λόγου της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 230nm (A_{260/230}). Ο λόγος A_{260/280} αποτελεί δείκτη παρουσίας προσμίξεων, καθώς οι πρωτεΐνες εμφανίζουν μέγιστο ποσοστό απορρόφησης στα 280nm, και θα πρέπει να είναι μεταξύ 1,8-2,2 για να θεωρηθεί ότι το RNA είναι υψηλής καθαρότητας.^{339, 340} Ο λόγος A_{260/230} είναι, επίσης, ενδεικτικός της καθαρότητας του RNA και της παρουσίας προσμίξεων, όπως EDTA, φαινόλες, με την καθαρότητα να αυξάνεται όσο ο λόγος πλησιάζει την τιμή 2.³⁴⁰

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA και των λόγων A_{260/280} και A_{260/230} κάθε δείγματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Ποσότητα 5μl από το RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα αραιώθηκε με 495μl ddH₂O (δηλαδή αραίωση 1:100 και συντελεστής αραίωσης=100) σε τελικό όγκο 500μl. Έγινε σύντομη ανάδευση του τελικού διαλύματος σε συσκευή Vortex.
- Τοποθετήθηκε στο NanoDrop 1μl ddH₂O, μηδενίστηκε η ένδειξη του οργάνου και ρυθμίστηκε για φωτομέτρηση RNA.
- Τοποθετήθηκε 1μl RNA στο NanoDrop και έγινε φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 230, 260 και 280nm και υπολογίστηκαν οι λόγοι Α_{260/280} και Α_{260/230}. Επίσης, με βάση τον τύπο

συγκέντρωση=A₂₆₀x40x100 (ng/μl) υπολογίστηκε η συγκέντρωση του RNA για κάθε δείγμα.

Ο έλεγχος της **ακεραιότητας** του RNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση 1μl RNA από κάθε δείγμα στα μηχανήματα Agilent 2100 Bioanalyzer ή Agilent 4200 TapeStation.³⁴¹ Το μηχάνημα Agilent 2100 Bioanalyzer στηρίζεται στη μικρορρευστονική ηλεκτροφόρηση (microfluidic electrophoresis), που πλεονεκτεί έναντι της παραδοσιακής μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα, χάρη στη μείωση του χρόνου εργασίας και στην απλοποίηση των διαδικασιών συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων. Η βασική αρχή λειτουργίας της συσκευής Agilent 2100 Bioanalyzer περιλαμβάνει α) τη μετακίνηση του RNA του δείγματος υπό μελέτη μέσω μικροδιαύλου από το «πηγάδι» (well) του δείγματος, β) την έγχυση του δείγματος στο κανάλι διαχωρισμού, γ) το διαχωρισμό μέσω ηλεκτροφόρησης των συστατικών του δείγματος και δ) το διαχωρισμό των συστατικών μέσω του φθορισμού και την αντιστοίχισή τους σε κορυφές στο ηλεκτροδιάγραμμα (electropherogram) ή σε ζώνες σε εικόνες που προσομοιάζουν πήκτωμα (gel-like images). Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται με βάση το μέγεθός τους, καθώς τα μικρά μόρια μετακινούνται ταχύτερα, εντός του πορώδους πηκτώματος, συγκριτικά με τα μεγαλύτερα. Έτσι, με βάση το χρόνο μετακίνησης κάθε συστατικού υπολογίζεται το μέγεθός του.^{341, 342} Με το μηχάνημα Agilent 2100 Bioanalyzer σε συνδυασμό με το RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) παρέχεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ηλεκτροφόρησης έως 12 RNA δειγμάτων σε μία πλακέτα (chip) σε χρονική διάρκεια <60 λεπτών.³⁴³ Το μηχάνημα Agilent 4200 TapeStation σε συνδυασμό με το Screen-Tape® R6K χρησιμοποιεί αναλώσιμες ταινίες (tapes) σε μέγεθος πιστωτικής κάρτας και μία ενσωματωμένη πιπέτα που μεταφέρει τα RNA δείγματα στη συσκευή ScreenTape. Μετά από αυτοματοποιημένη ηλεκτροφόρηση και απεικόνιση, τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα είναι διαθέσιμα σε περίπου 1 λεπτό, υπό μορφή ηλεκτροδιαγραμμάτων και εικόνων που προσομοιάζουν πήκτωμα, αντίστοιχα με το σύστημα Agilent 2100 Bioanalyzer.³⁴¹ Με το σύστημα Agilent 4200 TapeStation μπορούν να αναλυθούν έως και 96 RNA δείγματα σε μία ταινία σε χρονική διάρκεια <180 λεπτών.³⁴⁴ Με τα μηχανήματα Agilent 2100 Bioanalyzer ή Agilent 4200 TapeStation:

- Μελετήθηκαν τα ηλεκτροδιαγράμματα, ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη των κορυφών που αντιστοιχούν στις ριβοσωμικές υπομονάδες 18S και 28S, η εμφανής παρουσία ή η απουσία των οποίων αποτελεί ένδειξη ακεραιότητας ή αποδόμησης του RNA, αντίστοιχα. Ανάλογα με το βαθμό ακεραιότητας του RNA, μπορεί να παρατηρηθούν επιπλέον κορυφές στο διάγραμμα, οι οποίες αντιστοιχούν σε μικρά τμήματα RNAs (small RNAs), π.χ. rRNA ή tRNA. Όσο αποδομείται το RNA, οι κορυφές 18S και 28S εξαφανίζονται και προϊόντα αποδόμησης εμφανίζονται στην περιοχή ανάμεσα στην κορυφή 18S και στα small RNAs, που ονομάζεται ταχεία ζώνη (fast zone).³⁴⁵
- Ελέγχθηκε η ύπαρξη διακριτών ζωνών σε εικόνες που προσομοιάζουν πήκτωμα, οι οποίες σε περίπτωση ακέραιου RNA αντιστοιχούν στις 18S και 28S ριβοσωμικές υπομονάδες και στα small RNAs, ενώ αντίθετα σε αποδομημένο RNA οι ζώνες των 18S και 28S δεν ξεχωρίζουν και είναι ορατά προϊόντα αποδόμησης στη fast zone.³⁴⁵
- Υπολογίστηκαν οι ακόλουθοι δείκτες:
 - i) Οι δείκτες RNA Integrity Number (RIN) και RNA Integrity Number equivalent (RIN^e), που είναι ενδεικτικοί της ακεραιότητας του RNA. Ο δείκτης RIN της συσκευής Bioanalyzer αξιολογεί ολόκληρο το ηλεκτροφορητικό ίχνος για ένα δείγμα RNA, συμπεριλαμβανομένων των αναλογιών των κορυφών των ριβοσωμικών υπομονάδων, του διαχωρισμού των συστατικών και της παρουσίας προϊόντων αποδόμησης.³⁴⁶ Ο δείκτης RIN^e της συσκευής TapeStation αντιπροσωπεύει τη σχετική αναλογία του σήματος στη fast zone προς το σήμα της κορυφής 18S. Παρά τη βασίζονται, στην τεχνολογία μικρή διαφορά που έχει παρατηρηθεί υψηλή συσχέτιση (συντελεστής συσχέτισης $R^2 > 0.9$) μεταξύ των τιμών των δεικτών RIN και RIN^e, γεγονός που καθιστά τις τιμές τους άμεσα συγκρίσιμες.³⁴⁵ Και οι δύο δείκτες λαμβάνουν τιμές από 1 έως 10, με την τιμή 10 να αντιστοιχεί στη βέλτιστη ποιότητα του RNA.345, 346
 - ii) Οι δείκτες **DV200, DV100, DV50** στη συσκευή Bioanalyzer (ή οι **DV200'**, **DV100'**, **DV50'** στη συσκευή TapeStation), που αντιστοιχεί θραυσμάτων ποσοστό των RNA στο που αποτελούνται από >200, >100, ń >50 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα.^{307, 347}

4.3.5. Κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης

Η κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου του **KAPA Stranded RNA-Seq Kit with RiboErase** (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, catalogue number #KK8483), ως εξής (Εικ. 4.5):

Αρχική προετοιμασία αντιδραστηρίων

- 1. Προετοιμασία <u>Hybridization master mix</u> με ανάμειξη 4μl Hybridization Buffer, 4μl Hybridization Oligos (HMR) και 2μl ddH₂O και διατήρηση του τελικού διαλύματος των 10μl σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο Hybridization master mix περιέχει μονόκλωνους DNA ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές με αλληλουχίες συμπληρωματικές με τα rRNA των μεταγράφων και η προσθήκη του στο ολικό RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα οδήγησε στο σχηματισμό υβριδίων rRNA:DNA.
- 2. Προετοιμασία Depletion master mix με ανάμειξη 3μl Depletion Buffer και 2μl RNase Η και διατήρηση του τελικού διαλύματος των **5μΙ** σε θερμοκρασία δωματίου. Το ένζυμο RNase Η υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των υβριδίων rRNA:DNA, αποδομώντας εκλεκτικά το υβριδοποιημένο rRNA και καταλείποντας μονόκλωνο DNA και 5'-ολιγοριβονουκλεοτιδία που καταλήγουν σε φωσφορική ομάδα.
- 3. Προετοιμασία DNase digestion master mix με ανάμειξη 2,2μl DNase Buffer, 2μl DNase και 17,8μl ddH₂O και διατήρηση του τελικού διαλύματος των 22μl σε θερμοκρασία δωματίου. Το ένζυμο DNase είναι μία ενδονουκλεάση που διασπά το DNA και χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των DNA ανιχνευτών (που χρησιμοποιήθηκαν στο βήμα 1).
- 4. Προετοιμασία **2,4μΙ** φρέσκου διαλύματος <u>αιθανόλης 80%</u> με ανάμειξη αιθανόλης 100% και ddH₂O σε αραίωση 8:2.
- 5. Μεταφορά και διατήρηση των σφαιριδίων <u>KAPA Pure Beads</u> (φυλάσσονται στους 2°C έως 8°C) και του <u>διαλύματος PEG/NaCl</u> (φυλάσσεται στους -15°C έως -25°C) σε θερμοκρασία δωματίου.

Υβριδοποίηση με DNA ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές

6. Ανάμειξη 300ng (6 δείγματα) ή 500ng (21 δείγματα) ολικού RNA και ddH₂O σε τελικό όγκο 10μl. Ο όγκος του ολικού RNA (V₁)

υπολογίστηκε έτσι ώστε $V_1(\mu l) \times C_1 (ng/\mu l)=300 ή 500ng$, όπου C_1 ήταν η συγκέντρωση του ολικού RNA του δείγματος με βάση το NanoDrop. Αντίστοιχα, ο όγκος του ddH₂O υπολογίστηκε έτσι ώστε $V_{1+}V_2=10\mu l$.

 Προσθήκη 10μl από το <u>Hybridization master mix</u> και τοποθέτηση του τελικού όγκου 20μl σε θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler T100, Bio-Rad, USA) προ-ρυθμισμένο στους 95°C για 2 λεπτά.

Εξάντληση rRNA

- Μείωση θερμοκρασίας του θερμοκυκλοποιητή (με ταχύτητα -0,1°C/ δευτερόλεπτο) έως τους 45°C.
- Προσθήκη 5μl από το <u>Depletion master mix</u> και πολλαπλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας του τελικού όγκου 25μl (rRNA depleted RNA).
- Επώαση του τελικού όγκου 25μl στο θερμοκυκλοποιητή στους 45°C για 30 λεπτά.

Καθαρισμός rRNA depleted RNA με παραμαγνητικά σφαιρίδια

- 11. Προσθήκη 55μΙ καλά αναμεμειγμένων σε θερμοκρασία δωματίου <u>KAPA Pure Beads</u> και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 80μΙ να γίνει ομοιογενές. Το KAPA Pure Beads είναι ένα εναιώρημα παραμαγνητικών σφαιριδίων με επικάλυψη οξειδίου σιδήρου και καρβοξυλομάδων, σε ειδικό buffer πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) και χλωριούχου νατρίου (NaCl),³⁴⁸ που συμβάλλει στην αντιστρεπτή πρόσδεση (solid-phase reversible immobilization) νουκλεϊκών οξέων, όταν βρεθούν σε μαγνητικό πεδίο.^{349, 350}
- Επώαση του διαλύματος των 80μl σε RT για 5 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το RNA στα σφαιρίδια.
- Μεταφορά του διαλύματος σε μαγνητική βάση (magnetic rack) και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 14. Απομάκρυνση και απόρριψη **75μΙ** του υπερκείμενου.
- Διατήρηση δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200μl διαλύματος <u>80% αιθανόλης</u>.
- Επώαση δειγμάτων στη μαγνητική βάση σε RT για 30 δευτερόλεπτα.

- Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου, δηλαδή της αιθανόλης.
- 18. Επανάληψη βημάτων 15-17. Επιπλέον υπολείμματα αιθανόλης απομακρύνθηκαν με τη χρήση πιπέτας λεπτού άκρου με προσοχή χωρίς το στόμιο της πιπέτας να έρθει σε επαφή με τα σφαιρίδια.
- Επώαση των δειγμάτων σε RT για 3-5 λεπτά με ανοιχτά τα καπάκια των eppendorf tubes έως την πλήρη εξάτμιση αιθανόλης και το στέγνωμα των σφαιριδίων.

Πέψη με DNase

- Προσθήκη 22μl από το <u>DNase digestion master mix</u> στο eppendorf tube που περιέχει τα σφαιρίδια με το προσδεμένο rRNA depleted RNA και πολλαπλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας έως το διάλυμα να γίνει ομοιογενές.
- 21. Επώαση του διαλύματος σε RT για 3 λεπτά, ώστε το RNA να εκλουστεί από τα σφαιρίδια.
- 22. Μεταφορά του διαλύματος στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 23. Προσεκτική μεταφορά (χωρίς το στόμιο της πιπέτας να ακουμπήσει τα σφαιρίδια) 20μΙ του υπερκείμενου μετά από πέψη με το ένζυμο DNase (DNase-treated RNA) σε νέο eppendorf tube 1,5ml. Απόρριψη του προηγούμενου eppendorf tube με τα σφαιρίδια.
- 24. Επώαση του διαλύματος των 20μl στο θερμοκυκλοποιητή στους 37°C για 30 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η διάσπαση των DNA ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών. Στη συνέχεια το διάλυμα διατηρείται στους 4°C έως το επόμενο πειραματικό στάδιο.

Καθαρισμός DNase-treated RNA με παραμαγνητικά σφαιρίδια

- 25. Προσθήκη 44μl καλά αναμεμειγμένων σε θερμοκρασία δωματίου <u>KAPA Pure Beads</u> και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 64μl να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος των 64μl σε RT για 5 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το RNA στα σφαιρίδια.
- 27. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 28. Απομάκρυνση και απόρριψη 60μl από το υπερκείμενο.

29. Επανάληψη βημάτων 15-19 (beads-based clean-up).

Έκλουση RNA

- 30. Ανάμειξη 11μl Fragment, Prime and Elute Buffer και 11μl ddH₂O και προσθήκη του διαλύματος τελικού όγκου 22μl στο eppendorf tube με τα συνδεδεμένα με το DNase-treated RNA σφαιρίδια. Ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος σε RT για 3 λεπτά, ώστε το RNA να εκλουστεί από τα σφαιρίδια.
- Μεταφορά του διαλύματος στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 33. Προσεκτική μεταφορά **20μl** του υπερκείμενου που περιέχει το εκλουσμένο RNA (fragmented, primed RNA) σε νέο eppendorf tube 1,5ml. Απόρριψη του προηγούμενου eppendorf tube με τα σφαιρίδια. Το διάλυμα διατηρείται στον ξηρό πάγο έως το επόμενο πειραματικό στάδιο.
- 34. Παράλειψη του σταδίου κατακερματισμού (fragmentation) επειδή το αρχικά απομονωμένο RNA αποτελείτο κατά κανόνα από θραύσματα μήκους 100-200bp.

Σύνθεση μονόκλωνου DNA

- 35. Προσθήκη 10μl από το <u>1st strand synthesis master mix</u> (που προέκυψε με ανάμειξη 11μl 1st Strand Synthesis Buffer και 1μl KAPA Script) στα 20μl του fragmented, primed RNA και πολλαπλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας του τελικού διαλύματος 30μl, ενώ αυτό παραμένει στον ξηρό πάγο.
- 36. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 25°C για 10 λεπτά, για να γίνει επέκταση των εκκινητών (primer extension).
- 37. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 42°C για 15 λεπτά, για να γίνει σύνθεση του 1^{ου} κλώνου cDNA, η οποία πραγματοποιείται με τυχαίους εκκινητές (random primers).
- 38. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 70°C για 15 λεπτά, για να γίνει ενζυμική απενεργοποίηση. Στη συνέχεια το διάλυμα διατηρείται στους 4°C έως το επόμενο πειραματικό στάδιο.

Σύνθεση δίκλωνου DNA

- 39. Μεταφορά του διαλύματος των 30 μl στον ξηρό πάγο, προσθήκη 30μl από το 2nd strand synthesis and marking master mix (που προέκυψε με ανάμειξη 31μl 2nd Strand Marking Buffer και 2μl 2nd strand synthesis enzyme mix) και πολλαπλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας του τελικού διαλύματος 60μl, ενώ αυτό παραμένει στον ξηρό πάγο.
- 40. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 16°C για 60 λεπτά, για να γίνει σύνθεση του 2°^υ κλώνου DNA, με μετατροπή των υβριδίων cDNA:RNA σε δίκλωνο μόριο DNA (double stranded DNA, dsDNA) και η σήμανση του 2°^υ κλώνου με dUTP (2΄-δεοξυουριδίνη, 5΄τριφωσφορική ομάδα). Στη συνέχεια το διάλυμα διατηρείται στους 4°C έως το επόμενο πειραματικό στάδιο.

Καθαρισμός δίκλωνου DNA με παραμαγνητικά σφαιρίδια

- Προσθήκη 108μl καλά αναμεμειγμένων <u>KAPA Pure Beads</u> σε RT και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 168μl να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος των 168μl σε RT για 15 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το DNA στα σφαιρίδια.
- 43. Μεταφορά των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 44. Απομάκρυνση και απόρριψη **160μΙ** από το υπερκείμενο.
- 45. Επανάληψη βημάτων 15-19 (beads-based clean-up).

Προσθήκη 'Α' βάσεων στα 3΄ άκρα

- Προσθήκη 30μl <u>A-tailing master mix</u> (που προέκυψε με ανάμειξη 24μl ddH₂O, 3μl A-Tailing Buffer και 3μl A-Tailing Enzyme) στα δείγματα (δίκλωνο DNA συνδεδεμένο στα σφαιρίδια).
- 47. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 30°C για 30 λεπτά, για να γίνει η προσθήκη dAMP (5-μονοφωσφορικής δεοξυαδενοσίνης) στα 3' άκρα του dsDNA (A-tailed dsDNA).
- 48. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 60°C για 30 λεπτά, για να γίνει ενζυμική απενεργοποίηση. Στη συνέχεια το διάλυμα διατηρείται στους 4°C έως το επόμενο πειραματικό στάδιο.

Πρόσδεση των προσαρμογέων (adapters) στα DNA τμήματα

- Αραίωση των adapters, οι οποίοι φέρουν dTMP (μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη) στα 3΄ άκρα τους, αρχικής συγκέντρωσης 210nM σε τελική συγκέντρωση 15nM.
- 50. Προσθήκη 5μl του αραιωμένου adapters stock και 35μl Ligation master mix (που προέκυψε με ανάμειξη 16μl ddH₂O, 14μl Ligation Buffer και 5μl T4 DNA Ligase) στα 30μl του συνδεδεμένου στα σφαιρίδια A-tailed dsDNA και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 70μl να γίνει ομοιογενές.
- 51. Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή στους 20°C για 15 λεπτά, ώστε να γίνει η πρόσδεση των 3'-dTMP adapters στα 3'-dAMP τμήματα του dsDNA (adapter-ligated DNA).

1^{ος} καθαρισμός μετά την πρόσδεση των adapters

- 52. Προσθήκη 70μl του διαλύματος <u>PEG/NaCl</u> στα 70 μl του συνδεδεμένου στα σφαιρίδια adapter-ligated DNA και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 140μl να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος των 140μl σε RT για 15 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το DNA στα σφαιρίδια.
- 54. Μεταφορά των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 55. Απομάκρυνση και απόρριψη **135μl** από το υπερκείμενο.
- 56. Επανάληψη βημάτων 15-19 (beads-based clean-up).
- 57. Μεταφορά των δειγμάτων (DNA συνδεδεμένο σε σφαιρίδια) εκτός της μαγνητικής βάσης και προσθήκη 50μl διαλύματος <u>Tris-HCl</u> 10mM (pH=8).
- 58. Επώαση σε RT για 2 λεπτά, ώστε το DNA να εκχυλιστεί από τα σφαιρίδια (purified, adapter-ligated DNA).

2°ς καθαρισμός μετά την πρόσδεση των adapters

- 59. Προσθήκη **50μl** του διαλύματος <u>PEG/NaCl</u> στα **50μl** του συνδεδεμένου στα σφαιρίδια purified, adapter-ligated DNA και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου **100μl** να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος των 100μl σε RT για 15 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το DNA στα σφαιρίδια.

- 61. Μεταφορά των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 62. Απομάκρυνση και απόρριψη **95μΙ** από το υπερκείμενο.
- 63. Επανάληψη βημάτων 15-19 (beads-based clean-up).
- 64. Μεταφορά των δειγμάτων (DNA συνδεδεμένο σε σφαιρίδια) εκτός της μαγνητικής βάσης, προσθήκη 22μl διαλύματος <u>Tris-HCl</u> 10mM (pH=8).
- 65. Επώαση σε RT για 2 λεπτά, ώστε το DNA να εκχυλιστεί από τα σφαιρίδια (purified, adapter-ligated DNA).
- 66. Μεταφορά των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 67. Μεταφορά **20μl** του υπερκείμενου που περιέχει το εκλουσμένο purified, adapter-ligated DNA σε νέο eppendorf tube 1,5ml. Απόρριψη του προηγούμενου eppendorf tube με τα σφαιρίδια.

Ενίσχυση βιβλιοθήκης με PCR

- Προετοιμασία <u>Library amplification master mix</u> με ανάμειξη 25μl KAPA HiFi HotStart ReadyMix και 5μl Library Amplification Primer Mix.
- 69. Προσθήκη **30μl <u>Library amplification master mix</u> στα 20 μl** της adapter-ligated βιβλιοθήκης DNA και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου **50μl** να γίνει ομοιογενές.
- 70. Ενίσχυση με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

α. 98°C για 45 δευτερόλεπτα (1 κύκλος, στάδιο αρχικής αποδιάταξης)

β. 15 (20 δείγματα) ή 17 (7 δείγματα) κύκλοι:

98°C για 15 δευτερόλεπτα (στάδιο αποδιάταξης) 60°C για 30 δευτερόλεπτα (στάδιο υβριδοποίησης) 72°C για 30 δευτερόλεπτα (στάδιο επιμήκυνσης)

γ. 72°C για 5 λεπτά (1 κύκλος, στάδιο τελικής επιμήκυνσης)

δ. Αναμονή στους 4°C.

Κατά το βήμα αυτό ενισχύονται με PCR τα θραύσματα DNA που φέρουν αλληλουχίες adapters και στα δύο άκρα, ενώ ο dUTPσημασμένος κλώνος δεν ενισχύεται, επιτρέποντας εν συνεχεία την αλληλούχηση που αφορά συγκεκριμένο κλώνο (strand specific sequencing).

Καθαρισμός ενισχυμένης βιβλιοθήκης

- 71. Προσθήκη 50μl καλά αναμεμειγμένων σε RT <u>KAPA Pure Beads</u> στο διάλυμα 50 μl της ενισχυμένης βιβλιοθήκης DNA και ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι το διάλυμα τελικού όγκου 100μl να γίνει ομοιογενές.
- Επώαση του διαλύματος των 100μl σε RT για 15 λεπτά, ώστε να συνδεθεί το DNA στα σφαιρίδια.
- 73. Μεταφορά του διαλύματος στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 74. Απομάκρυνση και απόρριψη 95μl από το υπερκείμενο.
- 75. Επανάληψη βημάτων 15-19 (beads-based clean-up).
- 76. Μεταφορά των δειγμάτων εκτός της μαγνητικής βάσης και προσθήκη 22μl διαλύματος <u>Tris-HCl</u> 10mM (pH=8).
- Επώαση σε RT για 2 λεπτά, ώστε το DNA να εκχυλιστεί από τα σφαιρίδια.
- 78. Μεταφορά των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και επώαση έως το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- 79. Μεταφορά **20μl** του υπερκείμενου που περιέχει τη DNA βιβλιοθήκη σε vέο eppendorf tube 1,5ml και αποθήκευση στους -20°C. Απόρριψη του προηγούμενου eppendorf tube με τα σφαιρίδια.



Εικ. 4.5 Ροή εργασίας για την κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης.

Ανάλυση του μεγέθους της βιβλιοθήκης

Ανάλυση μεγέθους (bp) με χρήση 1μl της βιβλιοθήκης στο μηχάνημα Agilent 2100 Bioanalyzer.

Ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης

Η συγκέντρωση της βιβλιοθήκης υπολογίστηκε με το Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies, USA) χρησιμοποιώντας 1μl βιβλιοθήκης. Συγκεκριμένα, με βάση την ένδειξη συγκέντρωσης σε ng/μl από το Qubit και το μέγεθος της βιβλιοθήκης σε bp από το Bioanalyzer υπολογίστηκε η συγκέντρωση της βιβλιοθήκης σε nMol με τον ακόλουθο τύπο:³⁵¹

> συγκέντρωση (nMol) =συγκέντρωση (ng/μl) x10⁶ 660g/mol x μέγεθος (bp)

Η ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση βιβλιοθήκης για να πραγματοποιηθεί RNA-seq ήταν τα 3nMol.

4.3.6. RNA-seq

Πραγματοποιήθηκε διπλής κατεύθυνσης (paired-end) αλληλούχηση (μήκος ανάγνωσης 150bp) των 27 βιβλιοθηκών στο μηχάνημα HiSeq 4000 (Illumina Inc., San Diego, CA) από την QuickBiology (Quick Biology Inc., Pasadena, CA, USA). Αρχικά έγινε αλληλούχηση 6 βιβλιοθηκών (πυλωτική φάση πειράματος) και σε δεύτερη φάση ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση των υπόλοιπων βιβλιοθηκών. Επιπλέον, νια 7 επαναλήφθηκε paired-end βιβλιοθήκες αλληλούχηση (μήκος ανάγνωσης 150bp) στο μηχάνημα NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA) του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιωματικής στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.). Τα πρωτογενή δεδομένα αλληλούχησης από 18 δείγματα κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) του ιστότοπου National Center of Biotechnology Information (NCBI) και είναι διαθέσιμα με accession number **GSE180706**.

4.3.7. Βιοπληροφορική ανάλυση

Η αρχική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την RNAαλληλούχηση έγινε με τη διαδικτυακή πλατφόρμα Galaxy (<u>https://usegalaxy.org</u>).³⁵² Τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε μορφή αρχείων FastQ ή bigwig και έγιναν τα ακόλουθα βήματα επεξεργασίας:

- Ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών ανάγνωσης (reads) με το εργαλείο FastQC²²⁸ (Galaxy Version 0.72+galaxy1). Ως κατώτατο όριο καλής ποιότητας θεωρήθηκε το 80%³⁵³ των βάσεων των reads με Q30 Phred score, που ισοδυναμεί με πιθανότητα λανθασμένης αντιστοίχισης βάσης 1 στις 1000 φορές, άρα 99,9% ακρίβεια.
- Αποκοπή των adapters από τα 3' άκρα των reads και απομάκρυνση των reads με χαμηλή ποιότητα, συγκεκριμένα μέσο ποιοτικό σκορ <20, με το Trim Galore software,³⁵⁴ έτσι ώστε κάθε read είχε τελικά μήκος 75bp.
- Στοίχιση των reads στο γονιδίωμα αναφοράς του ανθρώπου (GRCh37/hg19) με τον αλγόριθμο HISAT2³⁵⁵ (Galaxy Version 2.1.0+galaxy6), με τις επιλογές "paired-end", "stranded" και "reverse".
- Υπολογισμός του αριθμού των reads που είχαν στοιχηθεί σε στοιχεία που υπάρχουν στο γονιδίωμα με το εργαλείο htseq-count package³⁵⁶ (Galaxy Version 0.9.1+galaxy1), με τις επιλογές union mode, "stranded" και "reverse".
- 5. Έλεγχος της κατανομής των reads (assigned tags) σε στοιχεία του γονιδιώματος (π.χ. εξώνια, ιντρόνια, περιοχές μεταξύ των γονιδίων) με το RSeQC package²³⁵ και την εντολή "bam mapping stats", και υπολογισμός του "transcript integrity number".
- 6. Απεικόνιση της αντιστοίχισης των reads σε χρωμοσωμικές θέσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος, μέσω του προγράμματος IGV.^{236, 237}

Διαφορική έκφραση

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ δύο καταστάσεων, δηλαδή δύο υποομάδων μελέτης, και η ανίχνευση των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) έγινε με τον αλγόριθμο DESeq2 (Galaxy Version 2.11.40.6+galaxy1).³⁵⁷ Το DESeq2 εφαρμόζει την αρνητική διωνυμική κατανομή και ένα γενικευμένο γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης, ώστε να εξασφαλίσει συρρίκνωση της διασποράς (dispersion), δηλαδή της μεταβλητότητας των τιμών των

reads ενός γονιδίου μεταξύ των δειγμάτων.³⁵⁷ Για το σκοπό αυτό υπολογίζει έναν παράγοντα κανονικοποίησης (size factor), διαφορετικό για κάθε δείγμα, ο οποίος ισούται με τη διάμεση τιμή των λόγων της τιμής των reads κάθε γονιδίου στο δείγμα προς το γεωμετρικό μέσο όρο (geometric mean, GM) των τιμών του γονιδίου.³⁵⁸ Δηλαδή για κάθε δείγμα:

size factor= median $\left[\frac{\text{gene}_{A} \text{ reads}}{\text{GM-gene}_{A}} \frac{\text{gene}_{B} \text{ reads}}{\text{GM-gene}_{B}} \frac{\dots \text{gene}_{n} \text{ reads}}{\text{GM-gene}_{n}} \right]$

Σε κάθε δείγμα, οι αρχικές τιμές των reads κάθε γονιδίου διαιρούνται με τον παράγοντα κανονικοποίησης του δείγματος και έτσι προκύπτουν οι *κανονικοποιημένες τιμές (normalized counts).*³⁵⁷ Για κάθε γονίδιο, το *DESeq2* δίνει τη μέση τιμή των normalized counts σε όλα τα δείγματα **(base mean)**, τη λογαριθμημένη με βάση το 2 μεταβολή της έκφρασης μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων [log₂Fold-Change (FC)], το τυπικό σφάλμα για το log₂FC, την τιμή του p-value που προκύπτει από τη στατιστική δοκιμασία Wald test, και την False Discovery Rate (FDR)-προσαρμοσμένη τιμή του p-value (p-adjusted).³⁵⁷

Στην παρούσα μελέτη, **κριτήρια στατιστικής σημαντικότητας** για την ανεύρεση των ΔΕΓ θεωρήθηκαν τα ακόλουθα:

- i) FDR-adjusted p-value <0,05
- ii) |log₂FC|>1
- iii) base mean >20

Τα δύο πρώτα κριτήρια εφαρμόζονται συχνά σε παρόμοιες μελέτες. Το τελευταίο κριτήριο επιλέχθηκε, ώστε γονίδια με εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης να μην ανιχνευθούν ως ΔΕΓ.²⁵⁵ Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν τα ΔΕΓ για τις ακόλουθες συγκρίσεις:

- σποραδική ΟΚΚ (n=6) vs ΟΘΕ (n=6)
- συνδρομική ΟΚΚ (n=6) vs ΟΘΕ (n=6)
- συνδρομική ΟΚΚ (n=6) vs σποραδική ΟΚΚ (n=6)
- υποτροπή σποραδικής ΟΚΚ (n=3) vs ΟΘΕ (n=6)
- πρωτοπαθής σποραδική ΟΚΚ (n=3) vs ΟΘΕ (n=6)
- υποτροπή σποραδικής ΟΚΚ (n=3) vs πρωτοπαθής σποραδική ΟΚΚ (n=3)
- σποραδική ΟΚΚ (n=4) vs ΟΘΕ (n=3)

όπου n=βιολογικό αντίγραφο, δηλαδή δείγμα από διαφορετικό ασθενή. Σε όλες τις συγκρίσεις, τα ΔΕΓ υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα της 1^{ης} αλληλούχησης που πραγματοποιήθηκε από την QuickBiology (Quick Biology Inc., Pasadena, CA, USA), ενώ η τελευταία σύγκριση επαναλήφθηκε και με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη 2^{ης} αλληλούχηση, που διενεργήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής στο Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Ο έλεγχος της επικάλυψης ανάμεσα σε λίστες ΔΕΓ από επιμέρους συγκρίσεις έγινε με το **Venny 2.1**.²⁰⁰

Ομαδοποίηση δεδομένων

Έγινε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και ιεραρχική συσταδοποίηση με Ευκλείδεια απόσταση (με μέσο όρο συστάδας), χρησιμοποιώντας τη διαδικτυακή πλατφόρμα PCAGO (<u>https://pcago.bioinf.uni-jena.de/</u>),³⁵⁹ με βάση τα πρώτα (top) 500 ΔΕΓ κάθε σύγκρισης.

Ανάλυση εμπλουτισμού

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση εμπλουτισμού για γονιδιακές οντολογίες βιολογικών διεργασιών [Biological Process Gene Ontologies (GOs)] και βιολογικά μονοπάτια [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways] με τα ακόλουθα προγράμματα τριών γενιών²⁶² βιοπληροφορικής ανάλυσης:

- 1^η γενιά (ORA) με το *ClusterProfShinyORA*³⁶⁰ (<u>http://nasqar.abudhabi.nyu.edu/ClusterProfShinyORA/</u>) παράμετροι προγράμματος:
 - |log₂FC|>1
 - FDR-adjusted p-value <0,05
- 2^η γενιά (GSEA) με το WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit ³⁶¹ (<u>http://www.webgestalt.org/</u>) παράμετροι προγράμματος:
 - FDR-adjusted p-value <0,05
 - ο αριθμός γονιδίων ανά κατηγορία ≥20
- 3^η γενιά (SPIA) με το *Graphite Web tool*³⁶² (<u>http://graphiteweb.bio.unipd.it</u>) παράμετροι προγράμματος:
 - FDR-adjusted p-value <0,05
 - ο αριθμός γονιδίων ανά κατηγορία ≥20

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η **Molecular Signatures Database**³⁶³ μέσω του προγράμματος **Enrichr**,²⁷² για τα γονίδια που βρέθηκαν ως διαφορικώς εκφραζόμενα αποκλειστικά στη συνδρομική ΟΚΚ (vs OΘE) αλλά δεν ομαδοποιήθηκαν με την ανάλυση εμπλουτισμού σε κάποια GO ή KEGG pathway.

Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων

Αποσκοπώντας να προσδιοριστούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που είχαν σημαντική επίδραση στη διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ των συγκρινόμενων υποομάδων μελέτης, έγινε εύρεση των μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, δηλαδή των αλληλουχιών υψηλή συγγένεια για πρόσδεση μεταγραφικών βάσεων με παραγόντων, στους υποκινητές των ΔΕΓ. Τα εμπλουτισμένα μοτίβα, καθώς και τα ρυθμιστικά τους δίκτυα (regulatory networks) με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, αναγνωρίστηκαν με το online πρόγραμμα Integrated System for Motif Activity Response Analysis (ISMARA) (https://ismara.unibas.ch/mara/) και η επίδραση κάθε μοτίβου στη διαφορική έκφραση γονιδίων εκτιμήθηκε μέσω της τιμής Z (Z-value).³⁶⁴ Με βάση την κατεύθυνση της αλλαγής της γονιδιακής έκφρασης, το Ζvalue πολλαπλασιάστηκε με την τιμή +1 ή -1, ανάλογα με το αν το εμπλουτισμένο μοτίβο σχετιζόταν με επαγόμενα ή κατεσταλμένα γονίδια, αντίστοιχα.³⁶⁵ Ως στατιστικά σημαντικά εμπλουτισμένα μοτίβα θεωρήθηκαν αυτά με |Z-value|>3.366

Σύγκριση με δεδομένα μικροσυστοιχιών

Έγινε ανάκτηση των δεδομένων που είχαν προκύψει από τη μελέτη σποραδικής μεταγραφώματος της OKK και του αδαμαντινοβλαστώματος σε προηγούμενη έρευνα που χρησιμοποίησε την τεχνική των μικροσυστοιχιών Affymentrix⁸⁶ και ήταν προσβάσιμα μέσω της ηλεκτρονικής βάσης GEO του NCBI υπό τον αριθμό **GSE38494**. Χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις, επιλέγοντας δύο συγκρινόμενες ομάδες, η 1^η με 12 σποραδικές ΟΚΚ και η 2^η με 15 ενδοοστικά αδαμαντινοβλαστώματα. Αρχικά προέκυψαν 54675 ανιχνευτές (probes), ενώ θέτοντας ως προϋποθέσεις στατιστικής σημαντικότητας το |log₂FC|>1 και το padjusted<0,05 παρέμειναν 4877 ανιχνευτές. Σε 401 ανιχνευτές που δεν ήταν διαθέσιμο το γονίδιο οποίο αντιστοιχούσαν, στο χρησιμοποιήθηκε το **BioMart-Ensembl**³⁶⁷, το probe ID μετατράπηκε σε Ensemble ID και με τις επιλογές "database: Ensemble Genes 102", "dataset: Human genes", "Filters ⇒ Gene ⇒ Input microarray probes/probesets ID" και "AFFY HG U133 Plus 2" βρέθηκε το official gene symbol 102 ανιχνευτών. Οι 289 ανιχνευτές στους οποίους δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός του γονιδίου, εξαιρέθηκαν από την ανάλυση. Σε περίπτωση που πολλαπλοί ανιχνευτές αντιστοιχούσαν στο ίδιο γονίδιο, υπολογίστηκε το μέσο log₂FC, ενώ αν πολλαπλά ονόματα του ίδιου γονιδίου ήταν διαθέσιμα, συμπεριλήφθηκαν όλα στην ανάλυση.³⁶⁸ Τελικά προέκυψαν 1396 επαγόμενα 1605 και κατεσταλμένα γονίδια για τη σύγκριση σποραδική OKK VS αδαμαντινοβλάστωμα. Ο έλεγχος αλληλοεπικάλυψης των ΔΕΓ της σποραδική ΟΚΚ vs αδαμαντινοβλάστωμα με αυτά της σποραδικής ΟΚΚ vs ΟΘΕ και της συνδρομικής ΟΚΚ vs ΟΘΕ της παρούσας μελέτης έγινε με το **Venny 2.1**.²⁰⁰ Στη συνέχεια, έγινε 1^{ης} γενιάς ανάλυση εμπλουτισμού των κοινών στις δύο μελέτες ΔΕΓ με το πρόγραμμα Enrichr.^{271, 272} Το πρόγραμμα Enrichr υπολογίζει τον εμπλουτισμό μίας γονιδιακής οντολογίας ή ενός KEGG μονοπατιού μεταξύ της λίστας των επαγόμενων ή των κατεσταλμένων γονιδίων, αποδίδοντας μία τιμή pvalue και ένα z-score για κάθε εμπλουτισμένο όρο.²⁷² Το p-value προκύπτει με βάση το Fisher exact test που υπολογίζει την πιθανότητα οποιοδήποτε γονίδιο της λίστας που εισάγεται στο πρόγραμμα να συμπεριλαμβάνεται σε αυτήν τυχαία.²⁷² Επίσης, με μία τροποποίηση του Fisher exact test, το πρόγραμμα υπολογίζει το z-score με βάση την απόκλιση της παρατηρούμενης κατάταξης των οντολογιών/ μονοπατιών από την αναμενόμενη που έχει προκύψει με βάση τυχαίες λίστες του προγράμματος.²⁷² Τέλος, συνδυάζοντας το p-value και το zscore, το Enrichr υπολογίζει ένα combined score που αντικατοπτρίζει το βαθμό εμπλουτισμού κάθε όρου.²⁷²

Επικάλυψη με δημοσιευμένες λίστες γονιδίων

Προκειμένου να ανιχνευτούν τα ΔΕΓ που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, έγινε έλεγχος της επικάλυψης της λίστας των ΔΕΓ με πρόσφατα δημοσιευμένη **λίστα ανθρώπινων μεταγραφικών** παραγόντων.³⁶⁹ Επίσης, έγινε έλεγχος επικάλυψης της λίστας των ΔΕΓ με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται με συστατικά της ΕΘΟ (matrisome gene list).³⁷⁰ Ο έλεγχος της επικάλυψης ανάμεσα σε διαφορετικές λίστες γονιδίων έγινε με το **Venny 2.1**.²⁰⁰

Παράγοντας υπερεκπροσώπησης

Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας της επικάλυψης μεταξύ δύο λιστών γονιδίων έγινε μέσω του υπολογισμού του παράγοντα υπερεκπροσώπησης (representation factor, RF) μέσω του ιστότοπου http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html.^{371,} 372 0 RF αντιστοιχεί στον αριθμό των επικαλυπτόμενων γονιδίων μεταξύ δύο συνόλων γονιδίων διαιρεμένα με τον αναμενόμενο αριθμό επικαλυπτόμενων γονιδίων που θα προέκυπτε από δύο τυχαία επιλεγμένα ανεξάρτητα σύνολα γονιδίων.^{371, 372} Ο αναμενόμενος αριθμός επικαλυπτόμενων γονιδίων υπολογίστηκε ως το γινόμενο του αριθμού των ΔΕΓ κάθε λίστας, διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό γονιδίων στο γονιδίωμα, 373 ο οποίος στην παρούσα μελέτη ορίστηκε ως 23367, σύμφωνα με τα συνολικά γονίδια που προσδιορίστηκαν από τον αλγόριθμο DESeq2. Η τιμή RF>1 υποδηλώνει μεγαλύτερη επικάλυψη από ό,τι αναμενόταν για δύο ανεξάρτητες ομάδες, ενώ η τιμή RF<1 είναι ενδεικτική μικρότερης επικάλυψης από την τυχαία αναμενόμενη.³⁷²

4.3.8. qPCR

Με σκοπό να επιβεβαιωθεί το πρότυπο επαγωγής που παρατηρήθηκε με την τεχνική της RNA-seq, ελέγχθηκαν τα επίπεδα επαγωγής 9 γονιδίων με τη μέθοδο της PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR ή qPCR). Ως εκμαγείο κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν οι cDNA βιβλιοθήκες, η κατασκευή των οποίων περιγράφηκε στην ενότητα 4.3.5, από τρία ζεύγη OKK-OΘE.

4.3.8.1. Πρωτόκολλο qPCR

Η qPCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad (Bio-Rad CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System, CFX Manager Software), με ανάμειξη των ακόλουθων συστατικών:

- 10μΙ 2Χ <u>SYBR Green PCR Master Mix</u>, που περιείχε την iTaq DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα MgCl₂, και τη SYBR[®] Green Ι φθορίζουσα χρωστική,
- 1μl πρόσθιου εκκινητή (1μg/μl),
- 1μl ανάστροφου εκκινητή (1μg/μl),
- κατάλληλη ποσότητα cDNA δείγματος μελέτης,
- ddH_2O έως τελικό όγκο διαλύματος 20μl.

Για τον προσδιορισμό της κατάλληλης ποσότητας του cDNA δείγματος προστέθηκαν σταδιακά 0,5-2μl cDNA στην ίδια ποσότητα εκκινητή, σε σταθερή θερμοκρασία. Βέλτιστη συγκέντρωση θεωρήθηκε αυτή στην οποία το προϊόν της αντίδρασης προέκυψε πριν τους 29 κύκλους. Το ddH₂O χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, για να ελεγχθεί η απουσία γενωμικού DNA ή διμερών των εκκινητών, που μπορεί να σχηματιστούν ως παραπροϊόντα της αντίδρασης.

Το πρωτόκολλο της qPCR περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- 95°C για 3 λεπτά,
- για 40 κύκλους:
 - 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - 60-64°C για 45 δευτερόλεπτα.

Στο τέλος της αντίδρασης, ο θερμοκυκλοποιητής πραγματοποίησε την ανάλυση καμπύλης ενίσχυσης (amplification curve), με την οποία υπολογίστηκε η μεταβολή στην ένταση του φθορισμού, κατά τη διάρκεια των 40 κύκλων της PCR. Στην καμπύλη ενίσχυσης προσδιορίστηκε ο αριθμός των κύκλων της PCR που απαιτούνταν ώστε η συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου να φτάσει σε ανιχνεύσιμη ένταση φθορισμού, δηλαδή σε επίπεδα που το σήμα φθορισμού της να υπερβεί το σήμα από το «θόρυβο» της αντίδρασης (κατώφλι ή threshold), και ελέγχθηκε, επίσης, η παρουσία παραπροϊόντων στην αντίδραση. Όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική ποσότητα του γονιδίουστόχου στο υπό εξέταση δείγμα, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτήθηκαν για να είναι ανιχνεύσιμο το σήμα φθορισμού.³⁷⁴

4.3.8.2. Σχεδίαση εκκινητών

Στον Πίνακα 4.3 αναγράφονται οι πρόσθιες (forward) και ανάστροφες (reverse) αλληλουχίες των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τα 9 γονίδια στόχους και το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) GAPDH. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του **Primer-BLAST** (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/), σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις και επιπλέον με τις ακόλουθες επιλογές:

- θερμοκρασίας υβριδισμού (Tm) των εκκινητών: 58-68°C
- περιεκτικότητα των εκκινητών σε GC: 40-60%
- μήκος εκκινητών: 18-30bp
- μεγέθους του PCR προϊόντος: 90-250bp
- οργανισμός: Homo Sapiens
- βάση δεδομένων: Refseq mRNA

Τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάστηκαν, ώστε μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή να παρεμβάλλεται ένα εσώνιο, έτσι ώστε να περιοριστεί η ενίσχυση γενωμικού DNA και να καταστεί δυνατή η αναγνώριση εναλλακτικών ισομορφών των γονιδίων με την ανάλυση καμπύλης τήξης.³⁷⁵ Τέλος, ελέγχθηκε ότι οι τιμές Tm που προέκυψαν δε διέφεραν>5°C μεταξύ του πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή κάθε ζεύγους.

		Αλληλουχία (5΄→3΄)	Μήκος (bp)	Μήκος προϊόντος (bp)	Tm
ALDH3A1	F	CCTGAAGGTCAGATACCCCC	20	94	58,87
	R	TCCGATGGGACACAGTATGG	20		58 <i>,</i> 88
ATP12A	F	CTGGGTGTATGATGAGGTGCGG	22	157	63,00
	R	GAATAGCCCAGCAAACGGTCAG	22		61,83
EPCAM	F	GAGATGGGTGAGATGCATAGGG	22	119	60,03
	R	AGATGTCTTCGTCCCACGCAC	21		62,68
FETUB	F	CTGCCTTGTACCCTGAGCTG	20	204	60,39
	R	CTGGGCATTAGTTGCTCACG	20		59,27
GAPDH	F	CTGACTTCAACAGCGACACCC	21	175	61,47
	R	CTGGTGGTCCAGGGGTCTTAC	21		61,79
GRHL3	F	AGCTACCTGTTACCCACCACT	21	135	60,48
	R	CATCGACTCCTGTGGGTCATC	21		60,20
OVOL1	F	GACATGGGCCACTTGACAGA	20	101	59 <i>,</i> 96
	R	GTGAACAGGTCTCCACTGGG	20		59 <i>,</i> 96
SERPINB3	F	CACCGCTGTAGTAGGATTCGG	21	136	60,27
	R	CTACGGGGATGAGAATCTGCC	21		60,00
TACSTD2	F	CACGCTTCCTGATTCCTCGG	20	177	60,81
	R	TGTTGTTGGACCGAAAGGGG	20		60,47
TP63	F	TCGACATGCGATCTGGAAGG	20	189	59 <i>,</i> 90
	R	TCTCGGGGTGGGAAAGAGAT	20		59 <i>,</i> 96

Πίνακας 4.3 Αλληλουχίες εκκινητών (Integrated DNA Technologies) που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων μέσω Real Time qPCR.

Συντομογραφίες: F: Forward, R: Reverse, Tm: θερμοκρασία υβριδισμού

4.3.8.3. Κανονικοποίηση με γονίδιο κυτταρικής οικονομίας

Για τον υπολογισμό των επιπέδων επαγωγής (fold induction) των υπό εξέταση γονιδίων στην πειραματική ομάδα (OKK) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (OΘE), έγινε κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου υπό εξέταση με το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) GAPDH που χρησιμοποιήθηκε για την qPCR σε πραγματικό χρόνο. Αυτό έγινε με βάση τη διαφορά των κύκλων ποσοτικού προσδιορισμού (quantification cycle ή cycle threshold, Ct), δηλαδή των κύκλων της PCR, στους οποίους το προϊόν φθάνει σε ικανή συγκέντρωση, ώστε το σήμα φθορισμού να περνάει το ελάχιστο όριο (κατώφλι) και να είναι ανιχνεύσιμο, μεταξύ του γονιδίου κυτταρικής οικονομίας και του γονιδίου υπό μελέτη (gene of interest), δηλαδή:³⁷⁴

 $\Delta Ct = Ct_{gene}$ of interest - $Ct_{housekeeping gene}$

για την πειραματική ομάδα (ΔCtokk) και για την ομάδα ελέγχου (ΔCtobe).

Τα επίπεδα επαγωγής του γονιδίου προέκυψαν από την αρνητική τιμή της διαφοράς **ΔΔCt=ΔCt_{OKK} - ΔCt_{OΘE}** υψωμένη ως εκθέτη στο 2, με βάση τον ακόλουθο τύπο:³⁷⁶

Fold Induction = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.3.8.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της gPCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, που αποτελεί μια διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους.377 Λόγω της παρουσίας φωσφορικών ομάδων στο μόριό τους, τα νουκλεϊκά οξέα έχουν αρνητικό φορτίο εντός του ηλεκτρικού πεδίου, και μετακινούνται προς τα θετικά ηλεκτρόδια, με ταχύτητα ανάλογη του φορτίου τους και αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Δηλαδή, τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια το αρχικό σημείο.³⁷⁸ απομακρύνονται πιο γρήγορα από 0 πολυσακχαρίτης αγαρόζη έχει ουδέτερο φορτίο και δεν αλληλεπιδρά με τα μακρομόρια. Τα τελευταία, λόγω του διαφορετικού μεγέθους τους, διατάσσονται υπό μορφή διακριτών ζωνών μέσα στο πήκτωμα. Οι ζώνες καθίστανται ορατές λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.³⁷⁷ Σε κάθε μετά από ηλεκτροφόρηση, στο πήκτωμα φορτώνεται και ένας κλιμακωτός

δείκτης μοριακών βαρών (Ladder) ως μάρτυρας, έτσι ώστε τα μεγέθη των τμημάτων DNA που διαχωρίζονται να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με τα γνωστά μεγέθη του Ladder. Τέλος, για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), όπως είναι το TAE (Tris-Acetate-EDTA) και το TBE (Tris-Borate-EDTA).^{377, 378}

Με την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης επιβεβαιώθηκε το μέγεθος του προϊόντος που είχε σχηματιστεί στο τέλος της αντίδρασης της qPCR, η αρχική εκτίμηση του οποίου είχε προκύψει κατά το σχεδιασμό των πρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών των εκκινητών, και ελέγχθηκε η παρουσία παραπροϊόντων. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν:

5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

- 216g Tris Base (Fisher Chemical),
- 110g Boric acid (Fisher Chemical),
- 14,9g EDTA Biochemica (PanReac AppliChem),
- ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο 4L.

Πειραματική διαδικασία

- Καλή πλύση της συσκευής ηλεκτροφόρησης και των χτενακίων με ddH₂O.
- Παρασκευή διαλύματος 1Χ ΤΒΕ με προσθήκη σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο (500ml ή 1000ml) 1/5 του όγκου από το 5Χ TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA) και τα υπόλοιπα 4/5 συμπληρώνονται με ddH₂O.
- 3. Προσθήκη 50ml ή 100ml από το διάλυμα 1Χ ΤΒΕ σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητα <u>αγαρόζης 2%</u> (Certified Low Range Ultra Agarose της Biorad) στην κωνική φιάλη με το 1Χ ΤΒΕ διάλυμα.
- 5. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης στο φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανά τακτά χρονικά ανάδευση της φιάλης.
- Παραμονή διαλύματος αγαρόζης σε RT έως η θερμοκρασία του διαλύματος να γίνει περίπου 60°C.

- Προσθήκη περίπου 5μl <u>βρωμιούχου αιθιδίου</u> (EtBr) στην κωνική φιάλη και ανάδευση.
- 8. Τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τα χτενάκια και παραμονή έως να κρυώσει και να στερεοποιηθεί (για την επιτάχυνση της πήξης, το βήμα αυτό πραγματοποιείται στο cold room).
- Προσθήκη περίπου 15-20μl <u>βρωμιούχου αιθιδίου</u> (EtBr) στο διάλυμα 1X TBE.
- Προσεκτική αφαίρεση των χτενακίων μετά από την στερεοποίηση του πηκτώματος και αλλαγή της διάταξης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τοποθέτηση του διαλύματος 1Χ ΤΒΕ στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μέχρι η στάθμη να φτάσει την ειδική ένδειξη.
- 12. Σύνδεση των καλωδίων με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και την πηγή ρεύματος, έτσι ώστε ο θετικός πόλος να είναι στο κάτω μέρος της συσκευής (προς το μέρος που «μετακινείται» το δείγμα), ενώ ο αρνητικός πόλος να είναι στο πάνω μέρος της συσκευής (στο μέρος που βρίσκονται τα πηγαδάκια τοποθέτησης των δειγμάτων).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων και του Ladder στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης, άνοιγμα πηγής ρεύματος και ρύθμιση επιθυμητής ισχύος ρεύματος.

4.3.9. Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος εφαρμόστηκε στις 18 περιπτώσεις (12 περιπτώσεις ΟΚΚ, 6 περιπτώσεις ΟΘΕ) που συμπεριλήφθηκαν τελικά στη βιοπληροφορική ανάλυση. Για το σκοπό αυτό, έγινε λήψη 7 διαδοχικών τομών πάχους 3μm από τους κύβους παραφίνης με χρήση του μικροτόμου (Leica RM2145, Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, USA), οι οποίες απλώθηκαν σε υδατόλουτρο πάνω στη συσκευή Heidolph MR82 magnetic stirrer, ρυθμισμένη στους 62°C για 1 λεπτό, και επιστρώθηκαν σε ηλεκτροθετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες (TOMO Adhesion Microscope Slides, Matsunami glass, USA). Ακολούθως οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ξηρής θερμότητας (Heratherm, Thermo Scientific, USA) στους 64°C για 1 ώρα και αποθηκεύτηκαν σε RT.

4.3.9.1. Ανοσοϊστοχημική τεχνική

Τα στάδια της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής πραγματοποιήθηκαν στο αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας Leica BOND-MAX autostainer (Leica Biosystems, Melbourne, Australia), το οποίο διακρίνεται από μεγάλη ομοιομορφία χρώσης μεταξύ των διαφορετικών ιστικών δειγμάτων του ίδιου πειράματος και, κατά συνέπεια, υψηλή ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων.379 Τα αναπαραγωγιμότητα πλεονεκτήματα αυτά εξασφαλίζονται μέσω της ειδικής τεχνολογίας του Leica BOND-MAX autostainer, που επιτρέπει την απαλή και ομοιόμορφη τοποθέτηση των αντιδραστηρίων πάνω στις ιστικές τομές και παράλληλα μειώνει την εξάτμιση των αντιδραστηρίων, που τελικώς απομακρύνονται με αναρρόφηση κενού στο κάτω άκρο των πλακιδίων.³⁷⁹ Η ανάδειξη του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος επιτεύχθηκε με το σύστημα ανίχνευσης Bond Polymer refine detection system (DS9800, Leica-Microsystems, Newcastle upon Tyne). Αυτό το σύστημα ανίχνευσης δεν περιέχει βιοτίνη με αποτέλεσμα να υπερέχει ως προς την καθαρότητα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, καθώς μειώνεται ο κίνδυνος μη ειδικής χρώση υποστρώματος που οφείλεται στην ενδογενή βιοτίνη.³⁸⁰ Βασίζεται σε ένα πολυμερές σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου [horseradish peroxidase (HRP)], που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αφού συνδεθεί με το πρωτογενές αντίσωμα οπτικοποιείται από το μεθόδου χρωμογόνο. Το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημικής περιλάμβανε τα εξής στάδια:

Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση

- Έγινε αποπαραφίνωση με επώαση στο BOND™ Dewax Buffer (AR9222, Leica Microsystems) στους 72°C για 4 λεπτά.
- 2. Έγινε ενυδάτωση των ιστών με εμβάπτιση σε **<u>αιθανόλη 100%</u>**.
- Έγινε έκπλυση των ιστών με το <u>BOND™ Wash Solution</u> (AR9590, Leica Microsystems).

Αποκάλυψη αντιγονικότητας

Έγινε ανάκτηση των αντιγονικών επιτόπων επαγόμενη από 4. θερμότητα (Heat Induced Epitope Retrieval) με επώαση των ιστών στο Bond Epitope Retrieval Solution 2 (pH=9) (AP9640, Leica Microsystems) στους 100°C για 20 λεπτά. Αυτή η μέθοδος υγρής θερμικής επεξεργασίας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 95°C σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα μπορεί να αντιστρέψει ή να διαταράξει τις αλδεϋδικές διασυνδέσεις (aldehyde cross-links) των πρωτεϊνών, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης στη φορμόλη, και να αποκαταστήσει τη διαμόρφωση των αντιγονικών επιτόπων, που έχουν καταστεί μη αντιδραστικοί κατά διαδικασία μονιμοποίησης ή του εγκιβωτισμού τn στην παραφίνη.³⁸¹

Δέσμευση ενδογενούς υπεροξειδάσης

- 5. Έγινε επώαση των δειγμάτων σε υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (Peroxide Block 3%), το οποίο εμπεριέχετο στο Bond Polymer refine detection system kit, για 5 λεπτά σε RT. Δεδομένου ότι το πολυμερές στο σύστημα ανίχνευσης είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση, το στάδιο δέσμευσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης προηγείται, ώστε η τελευταία να κορεστεί με το υπόστρωμά της (υπεροξείδιο του υδρογόνου) για να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση οφειλόμενη στην ενδογενή υπεροξειδάση.³⁸²
- Ακολούθησε έκπλυση των ιστών με το <u>BOND[™] Wash Solution</u>, η οποία επαναλήφθηκε 3 φορές.

Χρώση

- Έγινε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, σε κατάλληλη τελική αραίωση (σε διάλυμα diluent reagent solution, cat. no. 003118, Thermo Fisher Scientific, Inc.) και χρόνο (Πίνακας 4.4).
- Έγιναν 3 εκπλύσεις των ιστών με το BOND[™] Wash Solution, διάρκειας 2 λεπτών η κάθε μία.
- 9. Στα πρωτογενή αντισώματα ποντικού (anti-p63, anti-SOX2, anti-IRF6, anti-E-cadherin) έγινε ενίσχυση με επώαση σε διάλυμα ενίσχυσης πρωτογενούς αντισώματος (rabbit anti mouse post primary linker reagent), το οποίο εμπεριέχετο στο Bond Polymer refine detection system kit, για 10 λεπτά. Το τελευταίο στάδιο παραλήφθηκε στα πρωτογενή αντισώματα κουνελιού (anti-KLF4, anti-OVOL1, anti-TROP2).
- Ακολούθησε επώαση με το <u>σύμπλεγμα δευτερογενούς</u> <u>αντισώματος-πολυμερούς σημασμένου με HRP</u>, το οποίο εμπεριέχετο στο Bond Polymer refine detection system kit, για 10 λεπτά.
- 11. Έγινε έκπλυση των ιστών με το **<u>BOND™ Wash Solution</u>**.
- 12. Έγινε έκπλυση με απιονισμένο νερό.

Χρωμογόνο-αντίχρωση

- Εφαρμόστηκε ως χρωμογόνο το διάλυμα 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), που εμπεριέχετο ως Mixed DAB Refine στο Bond Polymer refine detection system kit, για 10 λεπτά σε RT. Το DAB παράγει ένα σταθερό, αδιάλυτο στο νερό, καφέ ίζημα όταν οξειδώνεται από τις υπεροξειδάσες,³⁸³ επιτυγχάνοντας έτσι την οπτικοποίηση της χρώσης.
- Ως αντίχρωση εφαρμόστηκε η <u>αιματοξυλίνη</u> που περιλαμβανόταν στο Bond Polymer refine detection system kit, για 6 λεπτά.
- 15. Έγιναν 3 εκπλύσεις με το **BOND™ Wash Solution**.
- Εφαρμόστηκε το bluing reagent (Leica Microsystems), για 6 λεπτά, το οποίο τροποποιεί την αιματοξυλίνη σε πιο γαλάζια απόχρωση.^{384, 385}
- Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις, η 1^η και η 3^η με απιονισμένο νερό και η ενδιάμεση με το BOND[™] Wash Solution.

Αφυδάτωση-κάλυψη

18. Η αφυδάτωση των τομών έγινε με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε:

- αιθανόλη 95% (για 10 δευτερόλεπτα, 2 επαναλήψεις),
- αιθανόλη 100% (για 10 δευτερόλεπτα, 2 επαναλήψεις),
- ξυλόλη (για 10 δευτερόλεπτα, 2 επαναλήψεις).
- Ακολούθησε η κάλυψη των τομών (Surgipath Premier Cover Glass, 100 Precleaned-24x50#1, Leica Microsystems).

4.3.9.2. Αντισώματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 7 πρωτογενή αντισώματα, τα χαρακτηριστικά των οποίων συνοψίζονται στον Πίνακα 4.4. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ισοτυπικά αντισώματα σε ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα που αντικαθιστούσαν (Πίνακας 4.5). Με βάση τα αποτελέσματα της RNA-seq και της βιοπληροφορικής ανάλυσης, που ανέδειξαν ως σημαντικά υπερεκφρασμένα γονίδια στην ΟΚΚ αυτά που σχετίζονταν με την ανάπτυξη της επιδερμίδας/δέρματος, καθώς και διάφορους δείκτες βλαστοκυττάρων και γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, επιλέχθηκε να ελεγχθεί η πρωτεϊνική έκφραση και η τοπογραφική εντόπιση των ακόλουθων μορίων:

p63

Η πρωτεΐνη p63 κωδικοποιείται από το γονίδιο TP63 (tumor protein *p63)*, που αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας της πρωτεΐνης p53, και εμφανίζει δύο πρωτεϊνικές ισομορφές, που διαφοροποιούνται με βάση το αν περιέχουν ή όχι μία υπομονάδα ενεργοποίησης στο αμινοτελικό άκρο (N-terminal transactivation domain), την TAp63 και DNp63 ισομορφή, αντίστοιχα.³⁸⁶ Η *ΤΑρ63* ισομορφή προάγει την απόπτωση, ενώ η DNp63 ισομορφή δρα ανασταλτικά στη μεσολαβούμενη από το ρ53 σύλληψη του κυτταρικού κύκλου, ευνοώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.^{387, 388} Η p63 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανανέωση των επιθηλιακών αποτελώντας έναν βλαστοκυττάρων, κορυφαίο ρυθμιστή της εξωδερμικής διαφοροποίησης, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δρα ως ογκογόνος παράγοντας.^{386, 389-391}

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ένα μονοκλωνικό IgG2a αντίσωμα ποντικού (κλώνος 4A4) έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου p63 (SKU: 163, Biocare Medical, Concord, CA) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:100 για 20 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Το συγκεκριμένο αντίσωμα αναγνωρίζει και τις δύο ισομορφές της p63.392 Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκίνου προστάτη, στα όρια του οποίου υπήρχαν τμήματα προστάτη αδένα χωρίς κακοήθη εξαλλαγή με υπερπλασία της βασικής στιβάδας.³⁹³ Στο ιστοτεμάχιο παρατηρήθηκε η αναμενόμενη ισχυρή πυρηνική έκφραση στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του τμήματος προστάτη αδένα χωρίς κακοήθη εξαλλαγή, η οποία κατά κανόνα απουσίαζε από το τμήμα του καρκίνου (Εικ. 4.6). Ως αρνητικός μάρτυρας αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με ισοτυπικό ίδιας τάξης (mouse IgG2a, sc-3878, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) σε ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5). Με βάση προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν τον κλώνο 4A4 σε ποικίλες αραιώσεις (1:25 έως 1:150), αναμένεται ισχυρή πυρηνική έκφραση της p63 στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδας και των ενδιάμεσων στιβάδων, αλλά σπάνια της επιφανειακής στιβάδας στην ΟΚΚ.³⁹⁴⁻³⁹⁷ Επίσης, πυρηνική έκφραση της p63 αναμένεται και στα οδοντογενή επιθηλιακά υπολείμματα (dental lamina rests, DLRs) που εντοπίζονται εντός του συνδετικού ιστού στα ΟΘΕ.³⁹⁸



Εικ. 4.6 (Α) Ισχυρή πυρηνική έκφραση της p63 στα κύτταρα της βασικής στιβάδας του τμήματος προστάτη αδένα χωρίς κακοήθη εξαλλαγή και (Β) απουσία έκφρασης στο τμήμα καρκινώματος προστάτη (κλίμακα: 50μm).

SOX2

Η πρωτεΐνη SOX2 κωδικοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα SOX2 (SRY-box transcription factor 2), ο οποίος εκφράζεται στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και τα βλαστοκύτταρα των ενηλίκων ιστών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ιστών εξωδερμικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου του οδοντογενούς επιθηλίου, διατήρηση της ομοιοστασίας του καλυπτικού καθώς και στη επιθηλίου.^{76, 399} Το SOX2 αποτελεί έναν από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες, η εξωγενής χορήγηση των οποίων σε διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα μπορεί να επάγει τον επαναπρογραμματισμό τους σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs), μέσω της διαδικασίας του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. 400 Εκτός από το ρόλο του στη φυσιολογική ανάπτυξη, η SOX2 συμμετέχει στην ογκογένεση, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση κακοηθών νεοπλασμάτων προερχόμενων από διάφορους ιστούς, όπως είναι το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στόματος ή δέρματος. 401

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ένα μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα ποντικού (κλώνος IHC665) έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου SOX2 (GenomeMe, Richmond, BC, Canada) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:100 για 20 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκίνου μαστού, στο οποίο αξιολογήθηκε ως θετική η πυρηνική έκφραση της SOX2 (Εικ. 4.7). Ως αρνητικός μάρτυρας αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με ισοτυπικό ίδιας τάξης (mouse IgG1, sc-3877, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) στην ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5). Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν την πυρηνική έκφραση της SOX2 στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής και των ενδιάμεσων στιβάδων της ΟΚΚ, έχοντας χρησιμοποιήσει διαφορετικά αντισώματα (μονοκλωνικό ποντικού ή κουνελιού, ή πολυκλωνικό κουνελιού) σε αραιώσεις 1:40, 1:50 ή 1:100.^{85, 86, 124, 402-404} Ακόμα, SOX2 πυρηνική έκφραση έχει βρεθεί στα τμήματα οδοντογενούς επιθηλίου (DLRs) που παρατηρούνται στα OOF.^{77,404}



Εικ. 4.7 Καρκίνωμα μαστού στο οποίο αξιολογήθηκε ως θετική η πυρηνική έκφραση της SOX2 (κλίμακα: 50μm).

KLF4

Το γονίδιο KLF4 (Krüppel-like factor 4) αποτελεί μέλος της KLF οικογένειας που έλαβε το όνομά της λόγω μιας περιοχής δέσμευσης του DNA με την επονομαζόμενη δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zing finger), η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία με την Krüppel πρωτεΐνη της Drosophila.⁴⁰⁵ Όπως το SOX2, και το KLF4 ανήκει στους 4 κύριους μεταγραφικούς παράγοντες, μαζί με το POU5F1/OCT4 και το c-MYC, που συμμετέχουν στη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων προς iPSCs.⁴⁰⁰ To KLF4 εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμός, ŋ απόπτωση και ŋ ενώ συγκεκριμένα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τελική επιδερμική διαφοροποίηση, επάγοντας την έκφραση επιθηλιακών μορίων και καταστέλλοντας την έκφραση μεσεγχυματικών μορίων.⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸ Έχει περιγραφεί η έκφραση της KLF4 σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς και όργανα, όπως το δέρμα, ο πνεύμονας και ο κερατοειδής χιτώνας του οφθαλμού, ενώ πιστεύεται πως μπορεί να ασκεί διττό ρόλο στη νεοπλασία, άλλοτε προάγοντας την ογκογένεση και άλλοτε λειτουργώντας ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.^{405, 406} Η έκφραση της KLF4 δεν είχε αναφερθεί στην ΟΚΚ πριν την παρούσα μελέτη.

Για τη διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής της έκφρασης επιλέχθηκε ένα μονοκλωνικό IgG αντίσωμα κουνελιού (κλώνος EPR19590) έναντι του

ανθρώπινου αντιγόνου KLF4 (Abcam, Cambridge, UK, ab215036) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:60 για 20 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκίνου μαστού (Εικ. 4.8). Με βάση τη βιβλιογραφία, η έκφραση της πρωτεΐνης KLF4 μπορεί να είναι πυρηνική ή κυτταροπλασματική.⁴⁰⁹ Ως αρνητικός μάρτυρας στην παρούσα μελέτη αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με το ισοτυπικό rabbit IgG (*Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #3900*) στην ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5).



Εικ. 4.8 Ισχυρή πυρηνική έκφραση της KLF4 σε καρκίνωμα μαστού (κλίμακα: 50μm).

OVOL1

Η πρωτεΐνη OVOL1 κωδικοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα OVOL1 (OVO homologue-like 1) που διαθέτει δομή δακτύλων ψευδαργύρου (zing finger) και ονομάστηκε με βάση την ομολογία της με τη OVO πρωτεΐνη της Drosophila melanogaster.⁴¹⁰ Διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην επιδερμική διαφοροποίηση, καταστέλλοντας το φαινόμενο της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής και επάγοντας την έκφραση μορίων που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων (cell-cell adhesion).⁴¹⁰ Επίσης, το OVOL1 συμμετέχει σε ένα ρυθμιστικό δίκτυο γονιδίων, τα οποία έχει βρεθεί πως μπορούν να επαναπρογραμματίζουν ινοβλάστες και ηπατοκύτταρα ποντικών σε iPSCs,⁴¹¹ ενώ ο ρόλος του OVOL1 είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επικράτηση και επέκταση ενός πληθυσμού κυττάρων που βρίσκονται σε ενδιάμεσα στάδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (reprogramming intermediates).⁴¹² Έκφραση της OVOL1 έχει αναφερθεί στη φυσιολογική επιδερμίδα, το δέρμα, το τριχοθυλάκιο, καθώς και σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους του δέρματος.⁴¹³ Η υπερέκφραση της OVOL1 σε κακοήθη νεοπλάσματα, όπως στοματικής κοιλότητας, μαστού ή προστάτη, έχει συσχετιστεί με μειωμένη ικανότητα διήθησης και μετάστασης.^{414, 415} Μέχρι τη στιγμή συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν έχει αναφερθεί η έκφραση της OVOL1 στην OKK.

Για τη διερεύνηση της έκφρασης της OVOL1 επιλέχθηκε ένα πολυκλωνικό IgG αντίσωμα κουνελιού έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου OVOL1 (Abcam, Cambridge, UK, ab246873) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:100 για 20 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το καλυπτικό επιθήλιο στοματικού βλεννογόνου (Εικ. 4.9). Με βάση τη βιβλιογραφία, η έκφραση της OVOL1 μπορεί να είναι είτε πυρηνική είτε κυτταροπλασματική.⁴¹⁶ Ως αρνητικός μάρτυρας στην παρούσα μελέτη αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με το ισοτυπικό rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #3900) στην ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5).



Εικ. 4.9 Ισχυρή πυρηνική έκφραση της ΟVOL1 στο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο του στοματικού βλεννογόνου (κλίμακα: 50μm).

IRF6

Η πρωτεΐνη IRF6 κωδικοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα IRF6 (Interferon Regulatory Factor 6) που, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της IRF οικογένειας, δε συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των ιντερφερονών και στην ανοσιακή απάντηση, αλλά ελέγχει την ανάπτυξη του δέρματος και της κρανιοπροσωπικής χώρας, μέσω της ρύθμισης πολλαπλασιασμού του και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων.417, 418 Μεταλλάξεις στο γονίδιο IRF6 έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση συνδρόμων που εκδηλώνονται με στοματοπροσωπικές σχιστίες, όπως το σύνδρομο Van der Woude (OMIM 119300) και το σύνδρομο ιγνυακού πτερυγίου (popliteal pterygium syndrome, OMIM 119500).⁴¹⁹ Επίσης, το IRF6 αποτελεί, όπως και το OVOL1, μέλος του ρυθμιστικού δικτύου γονιδίων που μπορούν να επαναπρογραμματίζουν ινοβλάστες και ηπατοκύτταρα ποντικών σε iPSCs.⁴¹¹ Έκφραση της IRF6 έχει αναφερθεί στην επιδερμίδα, στο στοματικό επιθήλιο, στο γαστρικό επιθήλιο και το επιθήλιο του μαστού, καθώς και σε καρκινώματα μαστού, στομάχου, δέρματος και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου.418, 420-423 Μέχρι το χρόνο συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δεν έχει αναφερθεί η έκφραση του γονιδίου ή της πρωτεΐνης IRF6 στην ΟΚΚ.

Η διερεύνηση της έκφρασης της IRF6 έγινε με τη χρήση ενός μονοκλωνικού IgG2b αντισώματος ποντικού (κλώνος OTI2A12) έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου IRF6 (Abcam, Cambridge, UK, ab123880) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:70 για 15 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκινώματος μαστού (Εικ. 4.10). Με βάση τη βιβλιογραφία, η IRF6 μπορεί να ανιχνευθεί με πυρηνική ή κυτταροπλασματική έκφραση.⁴²¹ Ως αρνητικός μάρτυρας για το IRF6 στην παρούσα μελέτη έγινε αντικατάσταση του πρωτογενούς αντισώματος με ισοτυπικό ίδιας τάξης (mouse IgG2b, sc-3879, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) στην ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης (Πίνακας 4.5).



Εικ. 4.10 Ισχυρή πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της IRF6 σε καρκίνωμα μαστού (κλίμακα: 25μm).

TROP2

Η πρωτεΐνη TROP2 (Trophoblast cell surface antigen 2) κωδικοποιείται από το γονίδιο TACSTD2 (Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2) που μαζί με το γονίδιο EPCAM αποτελούν τα δύο μέλη της TACSTD οικογένειας.^{424, 425} Το όνομα της TROP2 έχει βασιστεί στην έκφρασή της στα κύτταρα της τροφοβλάστης, τα οποία έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στη μήτρα κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης του πλακούντα.⁴²⁵ Η TROP2 συμμετέχει στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, για παράδειγμα επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό για το σχηματισμό του εμβρυϊκού πνεύμονα, καθώς και στην ομοιόσταση του πλακώδους επιθηλίου.^{425, 426} Επίσης, πρόσφατα έχει περιγραφεί ως δείκτης που χαρακτηρίζει έναν πληθυσμό κυττάρων ενδιάμεσων (reprogramming intermediates) των πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων και αυτών που έχουν επαναπρογραμματιστεί σε iPSCs.⁴¹² Εκφράζεται σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, όπως η επιδερμίδα, οι σιελογόνοι αδένες, ο οισοφάγος, ο μαστός και ο προστάτης αδένας, καθώς και σε κακοήθη νεοπλάσματα, όπως καρκινώματα σιελογόνων αδένων, μαστού, τραχήλου μήτρας. προστάτη και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στόματος. 385, 425, 426 Μέχρι και το χρόνο συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δεν έχει αναφερθεί έκφραση της TROP2 στην ΟΚΚ.

Για τη διερεύνηση της έκφρασης της TROP2 στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ένα μονοκλωνικό IgG αντίσωμα κουνελιού (κλώνος EPR20043) έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου TROP2 (Abcam, Cambridge, UK, ab214488) το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:100 για 20 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκίνου μαστού (Εικ. 4.11). Με βάση τη βιβλιογραφία, το κύριο πρότυπο έκφρασης της TROP2 είναι μεμβρανικό.³⁸⁵ Ως αρνητικός μάρτυρας στην παρούσα μελέτη αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με το ισοτυπικό rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #3900 στην ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5).



Εικ. 4.11 Ισχυρή μεμβρανική έκφραση της TROP2 σε καρκίνωμα μαστού (κλίμακα: 50μm).

E-cadherin

Η πρωτεΐνη Ε-συγκολλητίνη (E-cadherin) κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1 (cadherin 1) και συμμετέχει στην προσκόλληση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου.⁴²⁷ Εκφράζεται στους περισσότερους επιθηλιακούς ιστούς, όπως στο δέρμα και το επιθήλιο του φυσιολογικού μαστού, καθώς και σε κακοήθη νεοπλάσματα, όπως καρκίνο μαστού και προστάτη.^{428, 429} Η υπερέκφραση της E-cadherin ασκεί ανασταλτικό ρόλο στην επιθηλιο-
μεσεγχυματική μετατροπή και θεωρείται πως λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων σε iPSCs.⁴³⁰ Η E-cadherin έχει, επίσης, θεωρηθεί ως δείκτης κυτταρικής επιφάνειας των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων.⁴³¹

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ένα μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα ποντικού (κλώνος NCH-38) έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου Ecadherin (DAKO, Denmark, M3612), το οποίο εφαρμόστηκε σε αραίωση 1:100 για 30 λεπτά σε RT (Πίνακας 4.4). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα ιστοτεμάχιο καρκίνου μαστού (Εικ. 4.12). Ως αρνητικός μάρτυρας αντικαταστάθηκε το πρωτογενές αντίσωμα με ισοτυπικό ίδιας τάξης (mouse IgG1, sc-3877, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) σε ίδια αραίωση και χρόνο/θερμοκρασία επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4.5). Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν τη μεμβρανική έκφραση της E-cadherin στα επιθηλιακά κύτταρα, κυρίως των ενδιάμεσων στιβάδων της OKK, έχοντας χρησιμοποιήσει το ίδιο αντίσωμα με την παρούσα μελέτη^{322, 427} ή άλλα μονοκλωνικά IgG1 αντισώματα ποντικού^{132, 432} σε αραιώσεις 1:50, 1:75 ή 1:100. Ακόμα έκφραση της E-cadherin έχει παρατηρηθεί στα τμήματα οδοντογενούς επιθηλίου σε ΟΘΕ.⁴³³



Εικ. 4.12 Ισχυρή μεμβρανική έκφραση της E-cadherin σε καρκίνωμα μαστού (κλίμακα: 50μm).

	Πίνακας 4	ι.4 Χα	ρακτηρια	στικά π	ρωτογενώ	υν αντισω	υμάτων
--	-----------	---------------	----------	---------	----------	-----------	--------

Αντίσωμα	Εταιρεία (αριθμός καταλόγου)	Ξενιστής	Κλωνικότητα (τάξη)	Κλώνος	Αραίωση	Χρόνος/ θερμοκρασία	Θετικός μάρτυρας
						επωασης	
p63	Biocare Medical,	ποντίκι	μονοκλωνικό	4A4	1:100	20 min/ RT	προστάτης
	Concord, CA (SKU: 163)		(IgG2a)				
SOX2	GenomeMe, Richmond,	ποντίκι	μονοκλωνικό	IHC665	1:100	20 min/ RT	καρκίνος
	BC, Canada (IHC665-100)		(lgG1)				μαστού
KLF4	Abcam, Cambridge, UK	κουνέλι	μονοκλωνικό	EPR19590	1:60	20 min/ RT	καρκίνος
	(ab215036)		(IgG)				μαστού
OVOL1	Abcam, Cambridge, UK	κουνέλι	πολυκλωνικό	-	1:100	20 min/ RT	στοματικός
	(ab246873)		(IgG)				βλεννογόνος
IRF6	Abcam, Cambridge, UK	ποντίκι	μονοκλωνικό	OTI2A12	1:70	15 min/ RT	καρκίνος
	(ab123880)		(IgG2b)				μαστού
TROP2	Abcam, Cambridge, UK	κουνέλι	μονοκλωνικό	EPR20043	1:100	20 min/ RT	καρκίνος
	(ab214488)		(IgG)				μαστού
E-cadherin	DAKO, Denmark	ποντίκι	μονοκλωνικό	NCH-38	1:100	30 min/ RT	καρκίνος
	(M3612)		(lgG1)				μαστού

Ξενιστής, τάξη	Εταιρεία (αριθμός καταλόγου)	Αραίωση	Χρόνος/ Θερμοκρασία επώασης	Αντικατάσταση πρωτογενούς αντισώματος
κουνέλι,	Cell Signaling Technology,	1:60	20 min/ RT	KLF4
lgG	Danvers, MA, USA (#3900)	1:100	20 min/ RT	OVOL1, TROP2
ποντίκι,	Santa Cruz Biotechnology,	1:100	20 min/ RT	SOX2
lgG1	Santa Cruz, CA (sc-3877)	1:100	30 min/ RT	E-cadherin
ποντίκι, IgG2a	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (sc-3878)	1:100	20 min/ RT	p63
ποντίκι, IgG2b	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (sc-3879)	1:70	15 min/ RT	IRF6

Πίνακας 4.5 Χαρακτηριστικά ισοτυπικών αντισωμάτων.

4.3.9.3. Ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε από δύο παρατηρητές ανεξάρτητα και οι περιπτώσεις στις οποίες υπήρχε διαφωνία για το τελικό σκορ χρώσης εξετάσθηκαν από κοινού σε μικροσκόπιο διπλής παρατήρησης OLYMPUS BH-2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Στις ΟΚΚ αξιολογήθηκε η χρώση στο κυστικό επιθήλιο, για το χαρακτηρισμό του τελικού σκορ ανά περίπτωση. ενώ επί παρουσίας δορυφόρων κύστεων ή/και επιθηλιακών νησιδίων εντός του κυστικού τοιχώματος, σημειώθηκε η ύπαρξη χρώσης και σε αυτές τις επιθηλιακές δομές. Επίσης, καταγράφηκε η εντόπιση της χρώσης στις επιμέρους επιθηλιακές στιβάδες. Στα ΟΘΕ ελέγχθηκε η ανοσοϊστοχημική χρώση στα επιθηλιακά υπολείμματα (DLRs).

Ως θετική έκφραση θεωρήθηκε:

- η πυρηνική χρώση για τα αντισώματα p63³⁹⁵ και SOX2,⁸⁵
- η πυρηνική ή η κυτταροπλασματική χρώση για τα αντισώματα KLF4,⁴⁰⁹ OVOL1⁴¹⁶ και IRF6,⁴²¹
- η μεμβρανική χρώση για τα αντισώματα TROP2³⁸⁵ και E-Cadherin.³²²

Η αξιολόγηση έγινε σε όλη την έκταση του ιστού, στο οπτικό μικροσκόπιο Microscope Olympus CX-31, σε μεγέθυνση x10. Από την αξιολόγηση αποκλείστηκαν περιοχές της τομής που εμφάνιζαν ιστοτεχνικά σφάλματα, τμήματα όπου παρατηρήθηκε αναδίπλωση του ιστού, καθώς και τα ακραία τμήματα των τομών που σε ορισμένες

περιπτώσεις εμφάνιζαν ασθενέστερη ή ισχυρότερη πρόσληψη χρωμογόνου συγκριτικά με την υπόλοιπη τομή, που εμφάνιζε ομοιογενή χρώση. Για όλα τα αντισώματα εφαρμόστηκε το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Ibrahim et al,⁴³⁴ σύμφωνα με το οποίο η ανοσοϊστοχημική χρώση προσδιορίστηκε ημιποσοτικά ως γινόμενο της έκτασης και της έντασης της χρώσης. Η έκταση της χρώσης έλαβε τις τιμές 0-2, η ένταση της χρώσης τις τιμές 0-3, και το τελικό σκορ τις τιμές 0-6 (Πίνακας 4.6).

Έγινε σάρωση όλης της έκτασης των τομών σε μεγέθυνση x20 και αποθήκευσή τους ως ψηφιακές εικόνες με τη χρήση ψηφιακής κάμερας OLYMPUS U-CMAD3 T7, U-TV1X-2 T7 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), οπτικού μικροσκοπίου OLYMPUS CX 23LEDRFS2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) και λογισμικού Windows 10 (Microsoft Corporation, NY, USA). Τέλος, μέσω του λογισμικού προβολής ψηφιοποιημένων ιστοπαθολογικών εικόνων ObjectiveView[™] λήφθηκαν φωτογραφίες από τις περιοχές ενδιαφέροντος κάθε τομής.

Πίνακας	4.6	Σύστημα	αξιολόγησης	ανοσοϊστοχημικής	χρώσης
(τροποποι	ημένο α	σύστημα Ibra	him et al ⁴³⁴).		

Έκταση χρώσης	Ένταση χρώσης	Τελικό σκορ=έκταση*ένταση
0=χρώση σε 0-10% κυττάρων	0=απουσία χρώσης	0=πλήρης απουσία χρώσης ή χρώση σε έως 10% των κυττάρων ανεξαρτήτου έντασης
1=χρώση σε 11-50% κυττάρων	1=ασθενής (κίτρινη) χρώση	1=ασθενής χρώση σε 11-50% κυττάρων
2=χρώση σε >50% κυττάρων	2=μέτριας έντασης (ανοιχτή καφέ) χρώση	2=ασθενής χρώση σε >50% κυττάρων ή μέτριας έντασης χρώση σε 11-50% κυττάρων
	3=έντονη (σκούρα καφέ) χρώση	3=έντονη χρώση σε 11-50% κυττάρων
		4=μέτριας έντασης χρώση σε >50% κυττάρων
		6=έντονη χρώση σε >50% κυττάρων

4.3.10. Στατιστική ανάλυση

Με τη χρήση του **GraphPad PRISM** version 9.0.1 για Windows (GraphPad Software, San Diego, California)⁴³⁵ έγιναν οι ακόλουθοι έλεγχοι, με όριο στατιστικής σημαντικότητας το p-value<0,05:

- Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των παραμέτρων που περιλαμβάνονται στους πίνακες 4.2, 4.9-4.12 με το Shapiro-Wilk test. Η μηδενική υπόθεση του test είναι πως τα δεδομένα είναι κανονικά κατανεμημένα, γι' αυτό όταν έλαβε τιμές p-value<0,05, απορρίφθηκε η μηδενική υπόθεση και τα υπό εξέταση δεδομένα θεωρήθηκαν μη κανονικά κατανεμημένα.
- Έλεγχος της ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς στη μέση τιμή των παραμέτρων ακεραιότητας (RIN/RIN', DV200, DV100, DV50) του RNA και των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης (TIN, total reads, mapped reads, uniquely mapped reads) μεταξύ των πρόσφατων (≤36 μήνες) και των παλαιών (≥82 μήνες) δειγμάτων με το unpaired Student's t-test (για τις κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους) και το two-tailed Mann Whitney U test (για τις μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους).
- 3. Έλεγχος της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων ακεραιότητας (RIN/RIN', DV200, DV100, DV50) του RNA και των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης (TIN, total reads, mapped reads, uniquely mapped reads), καθώς και μεταξύ όλων των προαναφερθέντων παραμέτρων και του χρόνου αποθήκευσης των δειγμάτων με το συντελεστή συσχέτισης Pearson.
- 4. Έλεγχος της ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς στη μέση τιμή των total reads, mapped reads, uniquely mapped reads, και των ποσοστών των reads που αντιστοιχούσαν στα επιμέρους στοιχεία του γονιδιώματος π.χ. εξώνια, ιντρόνια κλπ. μεταξύ του 1^{ου} και του 2^{ου} κύκλου αλληλούχησης των 7 δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν δύο φορές με το *paired Student's t-test*.
- 5. Έλεγχος της συσχέτισης της τιμής του log₂FC μεταξύ των κοινών επαγόμενων ή κατεσταλμένων γονιδίων στην παρούσα μελέτη και στη μελέτη μικροσυστοιχιών το συντελεστή συσχέτισης Spearman.
- Έλεγχος διαφορών στον τελικό σκορ ανοσοϊστοχημείας μεταξύ των περιπτώσεων ΟΚΚ (σποραδικών/συνδρομικών) και των ΟΘΕ με το Fisher exact test.

4.3.11. Οπτικοποίηση

Στον Πίνακα 4.7 συνοψίζονται τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων Σε κάποιες περιπτώσεις, το κείμενο που συμπεριλαμβανόταν στις εικόνες πληκτρολογήθηκε εκ νέου για λόγους ευκρίνειας.

Πίνακας 4.7 Προγράμματα/μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και τη δημιουργία εικόνων.

Διάγραμμα/εικόνα	Πρόγραμμα/μηχάνημα
Bubble plot (επικάλυψη με μελέτη microarrays)	GraphPad ⁴³⁵
Cnetplot (ORA)	NASQAR ³⁶⁰
Dotplot (ORA, GSEA)	ggplot2 ⁴³⁶
Ευκλείδιας απόστασης δενδρόγραμμα	PCAGO, ³⁵⁹ DESeq2 ³⁵⁷
Enrichment map plot	NASQAR ³⁶⁰
Heatmap (normalized counts)	MORPHEUS ⁴³⁷
Heatmap (Pearson ή Spearman correlation)	GraphPad ⁴³⁵
Medical icons για τις εικόνες 2.1-2.4, 2.6-2.8, 2.10,	Biorender ⁴³⁸
4.4, 4.5, 6	
PCA plot	PCAGO, ³⁵⁹ DESeq2 ³⁵⁷
Scatter plot	GraphPad, ⁴³⁵ Microsoft Excel
	365
Two-way evidence plot (SPIA)	GraphPad ⁴³⁵
Upset plot (επικάλυψη με μελέτη microarrays)	Intervene ⁴³⁹
Volcano plot	GraphPad ⁴³⁵
Αντιστοίχιση γονιδίων στο γονιδίωμα αναφοράς	Integrative Genomics Viewer ^{236, 237}
Δίκτυο γονιδίων-στόχων μεταγραφικού παράγοντα	STRING ⁴⁴⁰
Δίκτυο μεταγραφικής ρύθμισης	ISMARA ³⁶⁴
Κατευθυνόμενο ακυκλικό γράφημα	NASQAR ³⁶⁰
Καμπύλες ενίσχυσης qPCR	Bio-Rad CFX Manager
	Software
Λογότυπο μοτίβου μεταγραφικού παράγοντα	ISMARA ³⁶⁴
Ομάδες ιστολογικών, ανοσοϊστοχημικών εικόνων	ObjectiveView [™] , ³³⁵
	Adobe Photoshop 2020
Πήκτωμα αγαρόζης (εικόνες)	Dolphin UV Laser Machine
Ραβδογράμματα (γονιδιακών οντολογιών)	NASQAR ³⁶⁰
Ραβδογράμματα (υπόλοιπα)	Microsoft Excel 365, Microsoft
	PowerPoint 365, GraphPad ⁴³⁵
Σχήματα (για τις υπόλοιπες εικόνες)	Microsoft PowerPoint 365

4.4. Αποτελέσματα

Συνολικά, έγινε RNA-seq σε 27 δείγματα, 21 OKK και 6 OOE. Oι 21 OKK προήλθαν από 11 άνδρες και 7 γυναίκες, ηλικίας 13-74 ετών (διάμεση ηλικία: 33 έτη), και στη συντριπτική πλειοψηφία (19/21) εντοπίζονταν στην κάτω γνάθο. Σε 4/21 περιπτώσεις η OKK σχετίζονταν με έγκλειστο δόντι. Τα 6 OOE προήλθαν από 5 άρρενες ασθενείς και 1 θήλυ, ηλικίας 9-17 ετών (διάμεση ηλικία: 14,5 έτη). Τα 4/6 αυτών σχετίζονταν με έγκλειστο τρίτο γομφίο της κάτω γνάθου, 1 με άνω τρίτο γομφίο και 1 με άνω έγκλειστο μεσόδοντα (Πίνακας 4.1). Τα 27 δείγματα ήταν εγκιβωτισμένα σε κύβους παραφίνης για 16-229 μήνες (διάμεση τιμή: 86 μήνες). Το εμβαδόν ιστού/τομή 5μm κυμαινόταν μεταξύ 7,3 και 63mm² (διάμεση τιμή: 20,6mm²) για τα 27 δείγματα, από τα οποία προετοιμάστηκαν 5-36 (διάμεση τιμή: 13) τομές πάχους 10μm ανά δείγμα συνολικού βάρους 0,0063-0,0504gr (διάμεση τιμή: 0,0168gr), οδηγώντας σε συνολικό εμβαδόν ιστικής επιφάνειας 259,6-378mm² (διάμεση τιμή: 288mm²) ανά δείγμα (Πίνακας 4.2).

4.4.1. Έλεγχος RNA και γενωμικής βιβλιοθήκης

Στους Πίνακες 4.8 και 4.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου μετά την απομόνωση του RNA και την κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης. Με βάση τις ενδείξεις του Nanodrop, από τα 27 δείγματα απομονώθηκε RNA συγκέντρωσης 47,71-782,1ng/μl (διάμεση τιμή: 296,7ng/μl) με λόγους καθαρότητας Α280/260 1,7-2,03 (διάμεση τιμή: 1,92) και Α260/230 0,33-1,96 (διάμεση τιμή: 1,37). Η συγκέντρωση του RNA δε σχετιζόταν με το χρόνο αποθήκευσης του δείγματος (r=-0,02, p=0,9). Οι δείκτες ακεραιότητας του RNA έλαβαν, σύμφωνα με το Agilent 2100 Bioanalyzer και Agilent 4200 TapeStation τις ακόλουθες τιμές: RIN/ RIN' 1,2-2,5 (διάμεση τιμή: 2), DV200 1-63,97% (διάμεση τιμή: 30,04%), DV100 22,35-87,24% (διάμεση τιμή: 61,27%) και DV50 65,75-99% (διάμεση τιμή: 91,5%). Στην ΟΚΚ-11, λόγω σημαντικής αποδόμησης του RNA με συνέπεια την εξαφάνιση των κορυφών που αντιστοιχούν στις 18S και 28S ριβοσωμικές υπομονάδες στο ηλεκτροδιάγραμμα δεν κατέστη δυνατός 0 υπολογισμός του RIN. Η συγκέντρωση των 27 γενωμικών βιβλιοθηκών κυμαινόταν μεταξύ 0,305ng/μl και 33,2ng/μl (διάμεση τιμή: 1,98ng/μl) και το μέγεθος των βιβλιοθηκών ήταν 270-574bp (διάμεση τιμή: 307bp). Παραδείγματα ελέγχου του RNA με το Agilent 2100 Bioanalyzer και της cDNA βιβλιοθήκης με το Agilent 2100

Bioanalyzer και το Agilent 4200 TapeStation απεικονίζονται στις Εικ. 4.13 και 4.14, αντίστοιχα.

Περίπτωση	Conc.	A _{260/280}	A _{260/230}	RIN/RIN'	DV200	DV100	DV50
	(ng/ul)				(%)	(%)	(%)
OKK-1	562,7	1,84	1,42	1,8	26,96	54,87	86
OKK-2 ^{*1}	454,2	1,85	1,85	1,2	35,52	68,09	92,75
OKK-3	226,1	1,87	0,92	1,7	42,79	65,73	90,19
OKK-4	115,8	1,88	1,31	2,4	13	49	88
OKK-5 ^{*2}	558 <i>,</i> 5	1,93	1,71	1,8	30,04	60 <i>,</i> 93	90,52
OKK-6	296,7	1,94	1,37	2,1	63,97	82,58	95,46
OKK-7 ^{*1}	495,4	1,89	0,85	1,4	44,7	72,7	93,74
OKK-8	238,4	1,7	1,38	2,5	1	41	94
ОКК-9	88,62	1,87	1,2	2,2	3	44	99
OKK-10	782,1	1,93	1,47	2,4	14,38	32 <i>,</i> 97	71,84
OKK-11 ^{*2}	670,2	1,96	1,96	ΔΥ	44,15	87,24	87,24
OKK-12	587,3	1,92	1,7	2,5	7,21	22,35	65,75
OKK-13	522,4	1,87	1,77	2,3	16,15	43,43	80,41
σΟΚΚ-1	267,8	1,9	1,29	1,9	53,77	76,83	94,65
σΟΚΚ-2	280,8	1,93	1,67	2	53,57	78,27	95,46
σΟΚΚ-3	322	2,03	1,11	1,4	46,23	78,16	95 <i>,</i> 85
σΟΚΚ-4	281,6	2,01	1,05	2,5	10,53	37 <i>,</i> 65	80,65
σΟΚΚ-5 ^{*3}	346,9	1,97	1,84	1,6	33,78	66,03	91 <i>,</i> 5
σΟΚΚ-6	181,7	1,89	1,21	1,5	57,82	79,48	94,98
σΟΚΚ-7	188,7	1,86	1,52	2	49,69	73,04	93,3
σΟΚΚ-8 ^{*3}	332,1	1,96	1,39	1,7	62,41	85,33	96,88
OΘE-1	83,72	1,97	1,53	2,4	4	51	92
OΘE-2	47,71	1,88	1,29	2,2	13	48	91
OΘE-3	62,21	1,74	0,33	1,6	12	64	94
ΟΘΕ-4	365,5	1,97	0,91	2,1	28,13	61,27	89,7
OØE-5	319,5	1,98	1,33	2,4	23,01	59,68	89,67
OΘE-6	169,1	1,96	0,52	1,9	31,55	61,13	89,81

Πίνακας 4.8 Αποτελέσματα ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου RNA.

Συντομογραφίες: ΔΥ: δεν υπολογίστηκε, ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ, Conc.: συγκέντρωση. *1,2,3 Τα δείγματα με ίδια ένδειξη εκθέτη προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή.

Περίπτωση	Conc. (ng/ul)	Μέγεθος (bp)	Conc. (nMol)
OKK-1	1,1	298	5,59
OKK-2 ^{*1}	8,42	294	43,39
OKK-3	3,57	303	17,85
ОКК-4	0,752	350	3,26
OKK-5 ^{*2}	7,62	287	40,23
OKK-6	10,6	309	51,98
OKK-7 ^{*1}	9,3	275	51,24
OKK-8	1,36	301	6,85
ОКК-9	3,26	303	16,30
OKK-10	1,51	506	4,52
OKK-11 ^{*2}	0,305	574	0,81
OKK-12	1,05	536	2,97
OKK-13	1,88	539	5,28
σΟΚΚ-1	2,74	280	14,83
σΟΚΚ-2	6,88	270	38,61
σΟΚΚ-3	33,2	346	145,38
σΟΚΚ-4	1,98	338	8,88
σΟΚΚ-5 ^{*3}	1,5	287	7,92
σΟΚΚ-6	3,54	296	18,12
σΟΚΚ-7	0,833	391	3,23
σΟΚΚ-8 ^{*3}	8,4	289	44,04
00E-1	3,68	337	16,55
OΘE-2	1,32	288	6,94
OØE-3	1,63	307	8,04
ΟΘΕ-4	1,55	316	7,43
OØE-5	1,19	317	5,69
OOE-6	3,64	314	17,56

Πίνακας 4.9 Αποτελέσματα ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου γενωμικής βιβλιοθήκης.

Συντομογραφίες: ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ, Conc.: συγκέντρωση. *1,2,3 Τα δείγματα με ίδια ένδειξη εκθέτη προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή.



Εικ. 4.13 Έλεγχος της ακεραιότητας του απομονωμένου RNA με τη συσκευή Agilent 2100 Bioanalyzer σε μία περίπτωση (A) OKK και μία περίπτωση (B) OOE. Παρατηρείται εικόνα συμβατή με degraded RNA που έχει απομονωθεί από FFPE,^{441, 442} καθώς στο ηλεκτροδιάγραμμα (αριστερά) έχει σχηματιστεί μόνο μία κορυφή (βέλος) που αντιστοιχεί στο 5S rRNA στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, ενώ απουσιάζουν οι κορυφές των 18S και 28S. Επίσης, η εικόνα που προσομοιάζει πήκτωμα (δεξιά) είναι χαρακτηριστική του degraded RNA,^{441, 442} καθώς απουσιάζουν οι οριζόντιες γραμμές των 18S και 28S και στο κατώτερο τμήμα φαίνεται μία πιο θολή ("smear") περιοχή (*), που υποδηλώνει τη συσσώρευση συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους. Από το ίδιο διάγραμμα υπολογίζονται τα ποσοστά DV200, DV100 και DV50 με βάση το εμβαδόν της επιφάνειας που ορίζεται από τη γραμμή του ηλεκτροδιαγράμματος (πάνω), την οριζόντια γραμμή που τέμνει τον γ άξονα στο μηδέν (κάτω), την κατακόρυφη γραμμή στο DV200, κίτρινη για το DV100 και πράσινη για το DV50.



Εικ. 4.14 Έλεγχος της cDNA βιβλιοθήκης μίας (A, B) ΟΚΚ (μέσου μεγέθους: 287bp) και (Γ, Δ) ενός ΟΘΕ (μέσου μεγέθους: 316bp). Τα (A) και (Γ) είναι εικόνες από το Agilent 2100 Bioanalyzer και (B) και (Δ) από το Agilent 4200 Tapestation.

4.4.2. Ποιοτικός έλεγχος δεδομένων αλληλούχησης

Το μέσο %Q30 Phred score για τα 27 δείγματα ήταν 72,91-91,19 (διάμεση τιμή: 88,52), ενώ για 3 δείγματα (ΟΚΚ-10, -11, -12) ήταν <80% (Εικ. 4.15). Το %Q30 Phred score ισοδυναμεί με πιθανότητα λανθασμένης αντιστοίχισης βάσης (base calling) 1 στις 1000 φορές, άρα 99,9% ακρίβεια. Παραδείγματα της μέση τιμής ποιότητας αντιστοίχισης των βάσεων από το FastQC²²⁸ απεικονίζονται στην Εικ. 4.16. Επίσης, σε αυτά τα 3 δείγματα, καθώς και στο ΟΚΚ-13, >1% των reads αντιστοιχούσαν σε ριβοσωμικό RNA (ribosome reads), ενώ σε 6 δείγματα (ΟΚΚ-8-13) το ποσοστό των συνολικών reads που αντιστοιχούσαν σε αλληλουχίες RNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (coding reads) και στις 5' ή 3' αμετάφραστες περιοχές (UTR reads) ήταν <20% (Εικ. 4.15). Αυτά τα 6 δείγματα αποκλείστηκαν από περαιτέρω ανάλυση. Με βάση την κατανομή των reads στο γονιδίωμα (Εικ. 4.15), μεταξύ των δύο συνδρομικών ΟΚΚ (σΟΚΚ) από διαφορετικές θέσεις στον ίδιο ασθενή (σΟΚΚ-5 και σΟΚΚ-8) προτιμήθηκε η σΟΚΚ-5 και αποκλείστηκε η σΟΚΚ-8.

Στη συνέχεια, έγινε ΡCA για τις 7 συνδρομικές ΟΚΚ και τα 6 ΟΘΕ και παρατηρήθηκε ότι η περίπτωση σΟΚΚ-7 εμφάνιζε απόκλιση από τις υπόλοιπες σΟΚΚ στον ΡC1 άξονα (Εικ. 4.17), γι' αυτό και η σΟΚΚ-7 αποκλείστηκε ως outlier. Κατά συνέπεια, αποφασίστηκε η ανάλυση διαφορικής έκφρασης και η λειτουργική ανάλυση να βασιστεί στη βιολογικών επαναλήψεων σύγκριση 6 (δηλαδή δειγμάτων προερχόμενων από διαφορετικούς ασθενείς) από κάθε κατάσταση (δηλαδή υποομάδα μελέτης). Μεταξύ των δύο δειγμάτων ΟΚΚ-2 (υποτροπή ΟΚΚ) και ΟΚΚ-7 (πρωτοπαθής ΟΚΚ) που προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή, επιλέχθηκε να συμπεριληφθεί το ΟΚΚ-2, ώστε στην υποομάδα των σποραδικών ΟΚΚ να συμπεριλαμβάνονταν 3 πρωτοπαθείς βλάβες και 3 υποτροπές και κάθε μία ΟΚΚ να ανήκει σε διαφορετικό ασθενή. Έτσι, η ΟΚΚ-7 αποκλείστηκε.

Τα αναλυτικά στοιχεία των συνολικών reads που προέκυψαν (total reads) και που αντιστοιχήθηκαν (mapped reads) στο γονιδίωμα αναφοράς για τις 18 περιπτώσεις (6 σποραδικές ΟΚΚ, 6 συνδρομικές ΟΚΚ, 6 ΟΘΕ) που συμπεριλήφθηκαν τελικώς στην ανάλυση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.10, ενώ στον Πίνακα 4.11 αναφέρεται η κατανομή των reads στις επιμέρους περιοχές του γονιδιώματος. Από το RNA-seq των 18 δειγμάτων προέκυψαν κατά μέσο όρο 19,3

εκατομμύρια paired-end reads ανά δείγμα, εκ των οποίων 73,5% (διάμεση τιμή) reads/δείγμα αντιστοιχήθηκαν μοναδικά (uniquely mapped reads) στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Πίνακα 4.10). Ένα σημαντικό ποσοστό των αλληλουχιών (μέση τιμή: 59,32%) αντιστοιχήθηκαν σε ιντρόνια, ενώ κατά μέσο όρο 36,6% των αλληλουχιών αντιστοιχούσαν σε περιοχές εξωνίων και 5' ή 3' αμετάφραστες περιοχές (Πίνακα 4.11). Ο συνολικός αριθμός των total assigned tags (Πίνακα 4.11), δηλαδή των αλληλουχιών που αντιστοιχήθηκαν σε επιμέρους περιοχές του γονιδιώματος υπερβαίνει ανά περίπτωση τον συνολικό αριθμό των total reads (Πίνακα 4.10) της ίδιας περίπτωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί σε περίπτωση που κάποιο read αντιστοιχεί σε περιοχή που περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα εξώνια και τα ενδιάμεσα αυτών ιντρόνια (spliced read), θα μετρηθεί από το πρόγραμμα RSeQC ως δύο ή αντίστοιχα περισσότερα tags.²³⁵



Εικ. 4.15 Κατανομή των reads σε περιοχές του γονιδιώματος και %Q30 Phred score. Εντός του κόκκινου πλαισίου είναι οι 6 περιπτώσεις που αποκλείστηκαν λόγω μικρού ποσοστού reads που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (coding reads) ή αντιστοιχούν σε 5' ή 3' αμετάφραστες περιοχές (UTR reads) των γονιδίων. Εντός των μπλε πλαισίων είναι δύο περιπτώσεις από τον ίδιο ασθενή, εκ των οποίων συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση η σΟΚΚ-5 λόγω μεγαλύτερου ποσοστού coding reads και UTR reads.



Εικ. 4.16 Εικόνες από το πρόγραμμα FastQC²²⁸ (μετά την αποκοπή των adapters) των περιπτώσεων (A) σΟΚΚ-2 και (B) ΟΘΕ-6, αντίστοιχα, που είχαν βέλτιστη ποιότητα base calling. Για κάθε δείγμα το FastQC δημιουργεί ένα διάγραμμα (BoxWhisker type plot) στο οποίο απεικονίζονται στο χ-άξονα με αύξοντα αριθμό η θέση των βάσεων στα reads και στο y-άξονα το σκορ ποιότητας base calling. Στο διάγραμμα υπάρχουν 3 περιοχές που αντιστοιχούν στην κακή (κόκκινη περιοχή), αποδεκτή (πορτοκαλί περιοχή) και καλή (πράσινη περιοχή) ποιότητα. Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή ποιότητας σε κάθε θέση.



Εικ. 4.17 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis) στο οποίο τα ΟΘΕ (dental follicles, DF) αποκλίνουν σημαντικά από τις 7 περιπτώσεις συνδρομικής ΟΚΚ (syndromic odontogenic keratocyst, sOKC) στον PC1 άξονα. Επιπλέον φαίνεται η απόσταση της sOKC-7 (βέλος) είναι μεγαλύτερη από την απόσταση μεταξύ των υπολοίπων sOKC στον PC1 άξονα. Γι' αυτό η sOKC-7 θεωρήθηκε ως ακραίο δείγμα (outlier) και αποκλείστηκε από την ανάλυση.

Περίπτωση	TIN	Total	Mapped	Uniquely mapped
		reads	reads	reads
OKK-1	32,12	21.841.279	15.980.723 (73,17%)	14.974.622 (68,56%)
OKK-2	51,80	26.254.448	21.642.369 (82,43%)	20.239.055 (77,09%)
OKK-3	41,07	18.179.268	11.220.015 (61,72%)	10.656.106 (58,62%)
OKK-4	32,72	7.313.250	5.602.821 (76,61%)	5.364.882 (73,36%)
OKK-5	54,60	23.131.371	18.932.785 (81,85%)	17.627.232 (76,20%)
OKK-6	59 <i>,</i> 95	25.750.073	21.937.296 (85,19%)	20.871.933 (81,06%)
σΟΚΚ-1	44,74	21.841.279	15.980.723 (73 <i>,</i> 17%)	14.974.622 (68,56%)
σΟΚΚ-2	52,41	25.192.933	19.649.347 (78%)	18.552.278 (73,64%)
σΟΚΚ-3	64,53	26.960.638	23.546.513 (87,34%)	22.415.612 (83,14%)
σΟΚΚ-4	24,58	16.996.669	9.963.868 (56,62%)	8.624.430 (50,74%)
σΟΚΚ-5	40,85	19.057.586	15.250.083 (80,02%)	14.322.053 (75,15%)
σΟΚΚ-6	53,37	22.425.002	18.461.448 (82,33%)	17.556.684 (78,29%)
OOE-1	52,50	19.819.081	11.234.446 (56,68%)	10.644.670 (53,71%)
OΘE-2	41,75	13.573.088	10.351.074 (76,26%)	9.883.002 (72,81%)
OOE-3	47,19	11.980.832	10.028.539 (83,7%)	9.464.987 (79,00%)
OOE-4	39,43	16.591.294	13.004.009 (78,38%)	12.114.576 (73,02%)
OΘE-5	31,44	12.463.426	9.014.967 (72,33%)	7.959.439 (63,86%)
OOE-6	49,63	18.074.372	15.150.098 (83,82%)	14.301.986 (79,13%)

Πίνακας 4.10 Transcript integrity number, total, mapped και uniquely mapped reads των 18 περιπτώσεων που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

Συντομογραφίες: ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ, TIN: transcript integrity number

Περίπτωση	Total Assigned	CDS	5'UTR	3'UTR	Introns	TSS	TES
	Tags	exons	exons	exons		up 10kb	down 10kb
OKK-1	23.027.323	4.146.563	581.327	2.365.674	14.919.715	310.252	703.792
	(100%)	(18,01%)	(2,52%)	(10,27%)	(64,79%)	(1,35%)	(3,06%)
OKK-2	46.192.884	8.971.214	1.503.916	5.480.094	28.486.975	521.510	1.229.175
	(100%)	(19,42%)	(3,26%)	(11,86%)	(61,67%)	(1,13%)	(2,66%)
OKK-3	24.906.472	3.935.300	505.572	2.705.193	16.736.359	307.876	716.172
	(100%)	(15,18%)	(2,03%)	(10,86%)	(67,20%)	(1,24%)	(2,88%)
OKK-4	11.929.050	2.423.404	258.958	1.336.604	7.465.774	131.691	312.619
	(100%)	(20,32%)	(2,17%)	(11,20%)	(62,58%)	(1,10%)	(2,62%)
OKK-5	40.715.483	8.430.565	1.425.504	4.636.222	24.417.540	471.669	1.333.983
	(100%)	(20,71%)	(3,50%)	(11,39%)	(59,97%)	(1,16%)	(3,28%)
OKK-6	47.128.979	10.677.283	1.087.368	5.757.606	27.941.547	492.834	1.172.341
	(100%)	(22,66%)	(2,31%)	(12,22%)	(59,29%)	(1,05%)	(2,49%)
σΟΚΚ-1	34.535.271	6.659.569	1.142.893	3.906.790	21.424.024	410.982	991.013
	(100%)	(19,28%)	(3,31%)	(11,31%)	(62,04%)	(1,19%)	(2,87%)
σΟΚΚ-2	42.900.573	8.531.125	1.285.374	4.887.234	26.523.246	490.526	1.183.068
	(100%)	(19,89%)	(3,00%)	(11,39%)	(61,82%)	(1,14%)	(2,76%)
σΟΚΚ-3	50.524.152	10.601.420	1.239.412	6.490.927	30.526.713	479.699	1.185.981
	(100%)	(20,98%)	(2,45%)	(12,85%)	(60,42%)	(0,95%)	(2,35%)
σΟΚΚ-4	22.548.521	3.971.632	870.873	3.218.854	13.066.886	268.109	1.152.167
	(100%)	(17,61%)	(3,86%)	(14,28%)	(57 <i>,</i> 95%)	(1,19%)	(5,11%)

Πίνακας 4.11 Κατανομή των reads σε περιοχές του γονιδιώματος στις 18 περιπτώσεις που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

Περίπτωση	Total Assigned	CDS	5'UTR	3'UTR	Introns	TSS	TES
	Tags	exons	exons	exons		up 10kb	down 10kb
σΟΚΚ-5	32.557.228	7.312.035	942.739	3.340.820	19.608.426	394.532	958.676
	(100%)	(22 <i>,</i> 46%)	(2,90%)	(10,26%)	(60,23%)	(1,21%)	(2,94%)
σΟΚΚ-6	39.928.255	9.526.037	1.073.453	4.696.089	23.238.633	432.760	961.283
	(100%)	(23,86%)	(2,69%)	(11,76%)	(58,20%)	(1,08%)	(2,41%)
ΟΘΕ-1	24.269.289	6.838.298	734.923	3.208.183	12.640.704	274.590	572.591
	(100%)	(28,18%)	(3,03%)	(13,22%)	(52 <i>,</i> 09%)	(1,13%)	(2,36%)
ΟΘΕ-2	22.143.243	5.277.084	532.980	2.844.981	12.689.093	275.846	523.259
	(100%)	(23 <i>,</i> 83%)	(2,41%)	(12,85%)	(57,30%)	(1,25%)	(2,36%)
OOE-3	21.710.791	6.592.286	664.890	3.137.241	10.545.605	234.645	536.124
	(100%)	(30 <i>,</i> 36%)	(3,06%)	(14,45%)	(48,57%)	(1,08%)	(2,47%)
ΟΘΕ-4	27.553.079	5.799.107	820.405	2.942.277	16.785.847	352.023	853.420
	(100%)	(21,05%)	(2,98%)	(10,68%)	(60,92%)	(1,28%)	(3,10%)
ΟΘΕ-5	19.881.673	5.125.416	948.736	2.451.542	10.362.754	256.970	736.255
	(100%)	(25,78%)	(4,77%)	(12,33%)	(52,12%)	(1,29%)	(3,70%)
ΟΘΕ-6	32.294.879	7.239.659	750.590	3.381.990	19.585.578	407.176	929.86
	(100%)	(22,42%)	(2,32%)	(10,47%)	(60,65%)	(1,26%)	(2,88%)

Συντομογραφίες: ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ, CDS Exons: κωδικές αλληλουχίες εξωνίων (coding sequence exons), 5'UTR: 5' αμετάφραστες περιοχές (5' untranslated regions), 3'UTR: 3' αμετάφραστες περιοχές (3' untranslated regions), 3'UTR: 3' αμετάφραστες περιοχές (3' untranslated regions), TSS up 10kb: η περιοχή 10kb πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής (transcription start site); TES down 10kb: η περιοχή 10kb μετά το σημείο λήξης της μεταγραφής (transcription end site)

4.4.3. Σύγκριση νεότερων και παλαιότερων δειγμάτων

Αποσκοπώντας να ελεγχθεί αν οι ποιοτικές παράμετροι που αξιολογήθηκαν μετά την απομόνωση του RNA (A_{260/280}, A_{260/230}, RIN/RIN', DV200, DV100, DV50), καθώς και τα δεδομένα αλληλούχησης (TIN, total reads, mapped reads, uniquely mapped reads, MRR, UMRR) διέφεραν σημαντικά ανάλογα με το χρόνο που τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε κύβους παραφίνης, σχεδιάστηκε αρχικά ένα διάγραμμα στο οποίο ο χρόνος αποθήκευσης (σε μήνες) τοποθετήθηκε στον γ άξονα και τα δείγματα σημειώθηκαν στον x άξονα κατά αύξοντα χρόνο αποθήκευσης (Εικ. 4.18).

Ο μέσος χρόνος αποθήκευσης των 18 περιπτώσεων ήταν 78,67 μήνες και τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε 2 κατηγορίες:

(N) 10 δείγματα αποθηκευμένα ≤36 μήνες

(Π) 8 δείγματα αποθηκευμένα ≥82 μήνες,

όπου (Ν) η κατηγορία των "νεότερων" δειγμάτων και (Π) αυτή των "παλαιότερων". Για την ομαδοποίηση αυτήν δε λήφθηκε υπόψη η υποομάδα μελέτης, δηλαδή αν ένα δείγμα ήταν ΟΚΚ, σποραδική ή συνδρομική, ή ΟΘΕ.



Εικ. 4.18 Διάγραμμα χρόνου αποθήκευσης των κύβων παραφίνης ανά περίπτωση μελέτης και διαχωρισμός των περιπτώσεων σε 2 ομάδες: Ν-ομάδα, με τα νεότερα (≤36 μήνες) δείγματα, και Π-ομάδα, με τα παλαιότερα (≥82 μήνες) δείγματα. ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ.

Με τη στατιστική δοκιμασία Shapiro-Wilk test αποδείχθηκε πως οι παράμετροι A_{260/280}, A_{260/230}, RIN/RIN', DV200, DV100, DV50, TIN, total reads, mapped reads και uniquely mapped reads ήταν κανονικά κατανεμημένες (p>0,05), ενώ τα ποσοστά των mapped reads/total reads (mapped reads ratio, MRR) και των uniquely mapped reads/total reads (uniquely mapped reads ratio, UMRR) ήταν μη κανονικά κατανεμημένα (p=0,02 και p=0,04, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, με το unpaired Student's t-test και το two-tailed Mann Whitney U test για τις κανονικά και μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους, αντίστοιχα, διαπιστώθηκε πως δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κατηγοριών (N) και (Π) για καμία από τις εξεταζόμενες παραμέτρους (Εικ. 4.19).



Εικ. 4.19 Οι ποιοτικές παράμετροι του απομονωμένου RNA και τα reads που προέκυψαν από το RNA-seq δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των παλαιότερων (Π) και των νεότερων (Ν) δειγμάτων. Η τιμή σε κάθε διάγραμμα αντιστοιχεί στο p-value από το unpaired Student's t-test και το two-tailed Mann Whitney U test.

Επίσης, ελέγχθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων ακεραιότητας (RIN/RIN', DV200, DV100, DV50) του RNA και των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης (TIN, total reads, mapped reads, uniquely mapped reads) για το σύνολο των 18 δειγμάτων (Εικ. 4.20), καθώς και για εντός των δύο κατηγοριών νεότερων (Ν) και παλαιότερων (Π) δειγμάτων (Εικ. 4.21) με υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων δε συσχετιζόταν με τις τιμές των δεικτών ακεραιότητας του RNA ούτε με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης (p>0,05) (Εικ. 4.20). Επίσης, απουσία συσχέτισης φάνηκε μεταξύ της τιμής του RIN (ή RIN') και των υπόλοιπων δεικτών (p>0,05) (Εικ. 4.20). Αντίθετα, οι δείκτες ακεραιότητας που αντιστοιχούσαν στα μήκη των θραυσμάτων του RNA (DV200, DV100) και ο δείκτης ακεραιότητας μεταγράφων (TIN) εμφάνιζαν μέτρια θετική συσχέτιση (p<0,05) με τα συνολικά reads που προέκυψαν από το RNA-seq και ισχυρή θετική συσχέτιση (p<0,05) με αυτά που αντιστοιχήθηκαν (ολικά ή μοναδικά) στο γονιδίωμα αναφοράς (Εικ. 4.20).



Εικ. 4.20 Θερμικός χάρτης (heatmap) που απεικονίζει σε κάθε κελί την τιμή r του Pearson Correlation Coefficient ανάμεσα στην παράμετρο της κάθετης στήλης και της οριζόντιας γραμμής που συνδέονται στο κελί αυτό για τις 18 περιπτώσεις. Το r μεταξύ χρόνου αποθήκευσης (σε μήνες) και mapped reads το r ήταν <0,001, γι' αυτό δεν απεικονίζεται η τιμή. RIN: RNA Integrity Number, TIN: Transcript Integrity Number

Η επιμέρους εκτίμηση της συσχέτισης στις ομάδες των νεότερων (Ν) και παλαιότερων (Π) δειγμάτων έδειξε ότι οι δείκτες DV200 και DV100 είχαν ισχυρή θετική συσχέτιση (p<0,05) με τα reads στα νεότερα δείγματα, ενώ στα παλαιότερα οι αντίστοιχες τιμές του r (κίτρινα πλαίσια) ήταν χαμηλότερες και μη στατιστικά σημαντικές (p>0,05) (Εικ. 4.21). Επίσης, ο δείκτης TIN εμφάνιζε σημαντικά ισχυρή θετική συσχέτιση (p<0,05) με τα total reads μόνο στα νεότερα δείγματα, ενώ το r της συσχέτισης του TIN με τα mapped και uniquely mapped reads ήταν μεγαλύτερο στη N-ομάδα συγκριτικά με την Π-ομάδα (πράσινα πλαίσια), και στατιστικά σημαντικό (p<0,05) και στις δύο ομάδες (Εικ. 4.21).



Εικ. 4.21 Θερμικοί χάρτες (heatmaps) που απεικονίζουν σε κάθε κελί την τιμή r του Pearson Correlation Coefficient ανάμεσα στην παράμετρο της κάθετης στήλης και της οριζόντιας γραμμής που συνδέονται στο κελί αυτό για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα ≤ 36 μήνες (N-ομάδα) ή ≥ 82 μήνες (Π-ομάδα). RIN: RNA Integrity Number, TIN: Transcript Integrity Number, * p<0,05

4.4.4. Σύγκριση δύο κύκλων αλληλούχησης

Επιδιώκοντας να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης, οι γενωμικές βιβλιοθήκες 7 δειγμάτων (OKK-1, -3, -5, -6, OOE-4, -5, -6) υποβλήθηκαν σε 2° κύκλο αλληλούχησης και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των 2 κύκλων (R1, R2). Αρχικά, με το Shapiro-Wilk test επιβεβαιώθηκε πως οι τιμές των total reads, mapped reads, uniquely mapped reads, και των ποσοστών των reads που αντιστοιχούσαν στα επιμέρους στοιχεία του γονιδιώματος π.χ. εξώνια, ιντρόνια κλπ., για τα 7 δείγματα σε κάθε κύκλο ήταν κανονικά κατανεμημένες (p<0,05). Επειδή οι δύο κύκλοι αλληλούχησης του ίδιου δείγματος θεωρήθηκαν ως τεχνικές επαναλήψεις, εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος paired t-test, με τον οποίο αποδείχθηκε πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0,05) σε καμία εξεταζόμενη παράμετρο μεταξύ των 2 κύκλων αλληλούχησης (Εικ. 4.22).



Εικ. 4.22 Σύγκριση των reads που προέκυψαν από τα 2 RNA-seq των 7 δειγμάτων με τη δοκιμασία paired t-test. Η τιμή σε κάθε Scatter plot αντιστοιχεί στο p-value από το Paired Student's t-test. CDS exons: κωδικές αλληλουχίες εξωνίων (coding sequence exons), 5'UTR: 5' αμετάφραστες περιοχές (5' untranslated regions), 3'UTR: 3' αμετάφραστες περιοχές (3' untranslated regions), TSS up 10kb: η περιοχή 10kb πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής (transcription start site); TES down 10kb: η περιοχή 10kb μετά το σημείο λήξης της μεταγραφής (transcription end site)

Με ιεραρχική συσταδοποίηση με την Ευκλείδεια απόσταση, χρησιμοποιώντας τις τιμές των DESeq2 normalized counts (μετά από rlog transformation) που προέκυψαν από τους 2 κύκλους αλληλούχησης, παρατηρήθηκε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ των δύο τεχνικών επαναλήψεων κάθε δείγματος και σαφής διαχωρισμός των περιπτώσεων ΟΚΚ από αυτές των ΟΘΕ και των 2 κύκλων στα δύο αρχικά σκέλη του δενδρογράμματος (Εικ. 4.23).



Εικ. 4.23 Ιεραρχική συσταδοποίηση με Ευκλείδεια απόσταση των 7 δειγμάτων στους 2 κύκλους αλληλούχησης. ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου

Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν τα ΔΕΓ που προέκυψαν μεταξύ των 4 ΟΚΚ (ΟΚΚ-1, -3, -5, -6) και των 3 ΟΘΕ (ΟΘΕ-4, -5, -6) στο R1 και στο R2. Στο R1 υπολογίστηκαν 2830 ΔΕΓ (1514 επαγόμενα και 1316 κατεσταλμένα) και στο R2 2952 ΔΕΓ (1610 επαγόμενα και 1342 κατεσταλμένα). Στο διάγραμμα Venn απεικονίζεται η επικάλυψη των ΔΕΓ των δύο κύκλων αλληλούχησης, η οποία υπερβαίνει το 80% και 85% στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια, αντίστοιχα (Εικ. 4.24). Η υπερεκπροσώπηση της λίστας των ΔΕΓ (σύνολο επαγόμενων και κατεσταλμένων γονιδίων) τους ενός κύκλου στη λίστα ΔΕΓ του δεύτερου κύκλου ήταν στατιστικά σημαντική (RF=7, p<0.000e+00). Επίσης, 8 ή 9 στα 10 ΔΕΓ που ανιχνεύτηκαν μόνο σε έναν κύκλο αλληλούχησης είχαν χαμηλά επίπεδα επαγωγής/καταστολής, δηλαδή |log₂FC|<2. Κανένα ΔΕΓ που να επαγόταν στον ένα κύκλο δεν καταστελλόταν στον άλλο κύκλο, και αντίστροφα.



Εικ. 4.24 Venn διάγραμμα που δείχνει την επικάλυψη των επαγόμενων και κατεσταλμένων γονιδίων μεταξύ των 4 ΟΚΚ και 3 ΟΘΕ που αλληλουχήθηκαν 2 φορές.

4.4.6. Το μεταγράφωμα της σποραδικής ΟΚΚ

Η ανάλυση του μεταγραφώματος της σποραδικής ΟΚΚ έγινε συγκρίνοντας 6 περιπτώσεις σποραδικής ΟΚΚ (ΟΚΚ-1, -2, -3, -4, -5, -6) με 6 ΟΘΕ (ΟΘΕ-1, -2, -3, -4, -5, -6).

4.4.6.1. Διαφορική έκφραση

Tα ΔΕΓ ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας ως κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας το $|\log_2 FC| > 1$ και το p-adjusted<0,05. Προέκυψαν συνολικά 2654 ΔΕΓ, 1409 επαγόμενα και 1245 κατεσταλμένα γονίδια στην ΟΚΚ (Εικ. 4.25). Μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων, 230 (16,3%) είχαν επαγωγή ≥16 φορές ($\log_2 FC \ge 4$), 447 (31,7%) είχαν επαγωγή ≥4 και <16 φορές ($2 \le \log_2 FC < 4$) και 732 (52%) είχαν επαγωγή ≥2 και <4 φορές ($1 \le \log_2 FC < 2$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ανάμεσα στα κατεσταλμένα γονίδια, 16 (1,3%) είχαν καταστολή ≥16 φορές ($\log_2 FC \le -4$), 244 (19,6%) είχαν καταστολή ≥4 και <16 φορές ($-4 < \log_2 FC \le -2$) και 985 (79,1%) είχαν καταστολή ≥2 και <4 φορές ($-2 < \log_2 FC \le -2$) (Εικ. 4.25). Στον Πίνακα 4.12 παρουσιάζονται τα πρώτα (top) 50 (με βάση το $|\log_2 FC|$) επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια. Το σύνολο των ΔΕΓ είναι διαθέσιμο στη GEO database του NCBI με accession number GSE180706.



Εικ. 4.25 Volcano plot που αναπαριστά ως κουκκίδες τα γονίδια και με διαφορετικά χρώματα τα επίπεδα επαγωγής/καταστολής τους στη σποραδική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ.

Επαγ	όμενα γον	ίδια	Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	
CYP4F11	10,18	5,57E-67	ARPP21	-6,59	5,10E-19	
ATP12A	9,81	5,36E-61	SYT2	-6,01	6,86E-24	
SERPINB3	9,56	1,17E-41	GRIK1	-5,26	8,94E-17	
MUC4	9,10	5,69E-90	LRRTM3	-5,17	4,15E-15	
CALML5	8,79	2,02E-32	FRMD1	-5,16	1,05E-12	
FETUB	8,75	4,97E-32	PCDH8	-5,13	1,12E-19	
ATP6V1C2	8,59	1,11E-57	GALNTL6	-4,95	2,31E-18	
PI3	8,50	1,88E-28	PCOLCE2	-4,72	2,13E-15	
ADH7	8,48	8,41E-38	<i>DOCK3</i>	-4,69	5,49E-24	
NCCRP1	8,46	5,47E-67	FAM179A	-4,65	7,68E-17	
LOC344887	8,39	5,1E-33	SEMA3A	-4,58	1,28E-22	
PAPL	8,38	3,25E-33	SGCZ	-4,44	3,21E-11	
CYP4F22	8,17	8,77E-29	DRP2	-4,41	2,36E-25	
GSTA1	8,17	6,24E-36	CYTL1	-4,38	2,71E-13	
TMPRSS11B	8,13	1,59E-36	STAC	-4,35	1,45E-16	
KLK13	7,93	1,5E-99	BMP3	-4,05	1,12E-11	
RNASE7	7,86	9,56E-33	SLC24A4	-3,98	4,30E-07	
KLK5	7,85	1,51E-26	KCNJ6	-3,91	5,48E-12	
FLG2	7,85	8,09E-21	PPP1R9A	-3,88	4,42E-12	
RPTN	7,82	1,78E-32	ELOVL2	-3,83	2,58E-16	

Πίνακας 4.12 Τορ 50 επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στη σποραδική OKK vs OΘE, με βάση το $|log_2FC|$.

Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια		
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted
RDH12	7,81	1,17E-25	FLJ16779	-3,77	3,92E-09
SERPINB2	7,81	1,05E-27	ANGPTL7	-3,76	7,39E-06
LIPH	7,80	1,91E-25	ADAMTS3	-3,75	7,55E-17
ELF5	7,78	1,25E-24	KCNK10	-3,73	1,20E-11
SCEL	7,74	1,61E-61	SULT4A1	-3,68	1,49E-11
ALOX12B	7,71	1,58E-31	JPH4	-3,60	4,88E-11
WFDC5	7,71	8,07E-42	IGLON5	-3,56	4,22E-07
PLA2G4E	7,70	1,57E-45	ODZ1	-3,50	1,85E-16
SERPINB11	7,70	5,06E-27	KANK4	-3,49	2,25E-11
KLK10	7,69	1,45E-39	SNCAIP	-3,49	5,24E-26
BARX2	7,66	3,22E-27	SLC4A4	-3,48	9,52E-26
GRHL3	7,60	1,25E-69	SFRP1	-3,43	1,00E-16
GPX2	7,55	4,04E-44	COL9A2	-3,40	2,13E-23
UGT1A6	7,50	1,23E-24	LRRC4B	-3,39	6,68E-14
KRT42P	7,49	1,23E-45	ADRA1A	-3,39	0,0008303
IL36RN	7,37	6,02E-21	TMEM132C	-3,36	2,30E-07
LOR	7,31	1,12E-15	SLC14A1	-3,34	2,04E-07
TGM5	7,30	2,7E-25	VAT1L	-3,32	4,72E-06
TMPRSS11F	7,21	1,38E-22	THBS4	-3,32	1,31E-13
SYTL5	7,20	4,34E-28	LRFN5	-3,30	1,99E-12
PRSS3	7,15	1,48E-20	COL23A1	-3,30	6,42E-21
AKR1B10	7,15	3,07E-22	BEGAIN	-3,29	1,18E-12
			1		

Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια		
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted
CLDN4	7,15	4,33E-57	FAM198A	-3,28	6,27E-24
CRCT1	7,09	1,97E-31	LOC386597	-3,27	1,34E-12
ALDH3A1	7,09	5,49E-22	IGFN1	-3,27	1,49E-10
UGT1A4	7,02	1,5E-19	SLC22A3	-3,24	8,62E-09
ABCA12	6,98	9,7E-51	ADAMTSL3	-3,21	1,17E-14
GGT6	6,92	1,63E-29	LOC400550	-3,20	2,42E-15
TMEM45B	6,91	1,91E-50	EYA4	-3,20	2,79E-18
UGT1A7	6,79	2,9E-21	POSTN	-3,19	1,32E-07

Συντομογραφίες: ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, log₂FC: log₂(Fold-Change)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών έδειξε σαφή διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση την ομάδα (πειραματική ή ελέγχου) στην οποία ανήκαν και η ιεραρχική συσταδοποίηση με την Ευκλείδεια απόσταση αποκάλυψε δύο ξεχωριστές συστάδες (clusters), που ξεκινούσαν από διαφορετικό αρχικό σκέλος του δενδρογράμματος και η κάθε μία αποτελείτο αποκλειστικά από ΟΚΚ ή ΟΘΕ (Εικ. 4.26).



Εικ. 4.26 ΡCΑ διάγραμμα (αριστερά) και δενδρόγραμμα ιεραρχικής συσταδοποίησης με τη μέθοδο της Ευκλείδειας απόστασης (δεξιά) στα οποία φαίνεται σαφής διαχωρισμός των περιπτώσεων σποραδικής [(π), πρωτοπαθής, (υ) υποτροπή)] ΟΚΚ και των ΟΘΕ.

Μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων της ΟΚΚ ήταν γονίδια, η υπερέκφραση των οποίων θεωρείται χαρακτηριστικό εύρημα στην ΟΚΚ (marker genes),⁴⁴³ όπως γονίδια-μέλη της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog (*PTCH1, GLI1*), δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (*MKI67*), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (*CCND1*) και γονίδια που κωδικοποιούν κυττοκερατίνες (*KRT10, KRT16*) (Εικ. 4.27).



Εικ. 4.27 Heatmap (A) και Scatter plot (B) που δείχνουν επαγόμενα marker genes στη σποραδική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ. Οι τιμές στο (B) αντιστοιχούν στα p-adjusted που προέκυψαν από το DESeq2 για κάθε γονίδιο.

Επίσης, 26 γονίδια επάγονταν στη σποραδική ΟΚΚ 8,7 έως 755 φορές, ενώ είχαν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στα ΟΘΕ (Εικ. 4.28). Σε αυτά ανήκαν γονίδια που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της επιδερμίδας και την ακεραιότητα του επιδερμικού φραγμού, π.χ., CALML5, CASP14, CST6, CYP4F22 και SERPINB3,444 μέλη του συμπλέγματος επιδερμικής διαφοροποίησης (epidermal differentiation complex) LCE1B, LCE1F, LCE2A, LCE2B, LCE2C, LCE6A και LOR, που επάγουν την τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων,⁴⁴⁵ και γονίδια η έκφραση των θεωρείται χαρακτηριστική του δέρματος ("skin-specific οποίων genes"),446, 447 όπως τα BPIFC, C5orf46, LY6G6C και RDH12. Επίσης, μεταξύ των 26 γονιδίων περιλαμβάνονταν γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό λιπιδίων,^{448, 449} π.χ., PSAPL1, UGT1A3, στην αναγνώριση και δέσμευση υδατανθράκων,450 π.χ., KLRG2, ή στην ανοσολογική απόκριση,⁴⁵¹ όπως το IL36RN, γονίδια που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό,⁴⁵² π.χ., LIPH, ή σχετίζονται με την οστεογένεση και οστική απορρόφηση,⁴⁵³ π.χ., FETUB. Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας ELF5, ο οποίος αναστέλλοντας την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή συμβάλλει στη διατήρηση του

επιθηλιακού φαινότυπου,⁴⁵⁴ είχε σημαντική επαγωγή στη σποραδική ΟΚΚ, ενώ δεν εκφραζόταν στα ΟΘΕ. Δεν υπήρχαν ΔΕΓ με μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη σποραδική ΟΚΚ.



Εικ. 4.28 Heatmap και scatter plots που δείχνουν τα 26 γονίδια με μηδενική έκφραση στο ΟΘΕ. Οι τιμές στο heatmap αντιστοιχούν στο log₂FC και αυτές στα scatter plots στα p-adjusted που προέκυψαν από το DESeq2 για κάθε γονίδιο.

4.4.6.2. Υποτροπές vs πρωτοπαθείς ΟΚΚ

Μεταξύ των 6 περιπτώσεων σποραδικής ΟΚΚ που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, οι 3 ήταν πρωτοπαθείς βλάβες (ΟΚΚ-1, -3, -4) και οι άλλες 3 υποτροπές (ΟΚΚ-2, -5, -6), κάθε μία εκ των οποίων προερχόταν από διαφορετικό ασθενή. Η ανάλυση της υποομάδας των 3 πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ vs 6 ΟΘΕ και της υποομάδας των 3 υποτροπών vs 6 ΟΘΕ, χρησιμοποιώντας ως όρια στατιστικής σημαντικότητας το $|\log_2 FC| > 1$ και το p-adjusted<0,05, ανέδειξε 2191 (1059 επαγόμενα και 1132 κατεσταλμένα) και 2653 (1371 επαγόμενα και 1282 κατεσταλμένα) ΔΕΓ, αντίστοιχα. Το 80,5% των ΔΕΓ στις πρωτοπαθείς σποραδικές ΟΚΚ, ανιχνεύθηκαν ως ΔΕΓ και στις υποτροπές (Εικ. 4.29), αναδεικνύοντας τη μεγάλη επικάλυψη του μεταγραφώματος μεταξύ των περιπτώσεων των δύο υποομάδων σποραδικής ΟΚΚ (RF=7,1 p<0.000e+00). Το παραπάνω εύρημα σημαντικής επικάλυψης ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών και της ιεραρχικής συσταδοποίησης, στις οποίες πρωτοπαθείς περιπτώσεις και υποτροπές δε διαχωρίζονταν (Εικ. 4.26). Στους Πίνακες 4.13 και 4.14 παρουσιάζονται τα πρώτα (top) 50 (με βάση το |log₂FC|) επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στις πρωτοπαθείς και στις υποτροπές, αντίστοιχα. Το σύνολο των ΔΕΓ είναι διαθέσιμο στη NCBI GEO database του με accession number GSE180706.



Εικ. 4.29 (Α) Venn διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επαγόμενα (↑) και κατεσταλμένα (↓) γονίδια των υποτροπών σποραδικών ΟΚΚ (υποτροπές ΟΚΚ vs OΘΕ) και των πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ (πρωτοπαθείς ΟΚΚ vs OΘΕ). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια κάθε σύγκρισης. (Β) Volcano plot που αναπαριστά τα ΔΕΓ των πρωτοπαθών ΟΚΚ vs OΘΕ. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο. Οι μωβ και καφέ κουκκίδες αντιστοιχούν στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που στις πρωτοπαθές ΟΚΚ, ενώ τα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που ανιχνεύθηκαν μόνο στις πρωτοπαθείς ΟΚΚ είναι με πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα. Εντός του πλαισίου απεικονίζονται σε μεγέθυνση τα επαγόμενα γονίδια με το μεγαλύτερο log₂FC και το μικρότερο p-adjusted, που ήταν όλα κοινά και στις 2 υποομάδες σποραδικής ΟΚΚ.

Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια		
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted
CYP4F11	10,38	2,70E-68	ARPP21	-5,53	3,31E-10
ATP12A	9,54	2,91E-55	GRIK1	-5,44	2,92E-11
SERPINB3	9,39	5,37E-40	SYT2	-5,44	6,95E-12
ATP6V1C2	8,88	2,70E-68	CYTL1	-5,33	2,29E-09
CALML5	8,52	4,91E-29	KCNK10	-5,24	1,26E-14
LOC344887	8,30	3,93E-30	PCDH8	-5,21	8,01E-13
FETUB	8,22	4,56E-27	PCOLCE2	-5,02	2,88E-08
PAPL	8,21	5,09E-32	CACNG7	-4,56	2,13E-06
KLK5	8,12	3,33E-29	SEMA3A	-4,42	1,36E-12
GSTA1	8,11	5,09E-32	<i>DOCK3</i>	-4,37	2,85E-20
KLK13	7,91	1,35E-71	NELL1	-4,35	1,24E-08
CYP4F22	7,87	3,94E-25	FAM179A	-4,20	1,31E-08
ALOX12B	7,71	1,68E-30	STAC	-4,11	5,07E-10

Πίνακας 4.13 Τορ 50 επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στην πρωτοπαθή σποραδική ΟΚΚ vs OΘE, με βάση το |log₂FC|.

Επαγόμενα γονίδια		Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted
PLA2G4E	7,65	6,38E-39	DRP2	-4,10	4,33E-12
RDH12	7,54	3,12E-22	GALNTL6	-4,09	4,41E-09
LIPH	7,52	3,33E-22	UNC80	-3,98	5,06E-08
WFDC5	7,49	5,48E-34	LRRTM3	-3,97	2,63E-07
BARX2	7,45	9,63E-24	SEZ6L2	-3,91	1,87E-07
MUC4	7,43	3,63E-18	MMRN1	-3,90	3,05E-08
SERPINB2	7,40	9,78E-23	FRMD1	-3,77	4,65E-06
ELF5	7,40	6,33E-21	SNCAIP	-3,66	9,12E-29
SCEL	7,39	1,78E-42	NPAS3	-3,60	2,66E-06
GPX2	7,31	2,35E-34	ELOVL2	-3,57	3,22E-08
ADH7	7,30	2,59E-17	FBN2	-3,57	4,77E-19
KRT42P	7,28	4,14E-39	DIO3	-3,55	2,66E-07
ABCA12	7,24	5,72E-51	PCDH11X	-3,55	0,00014
UGT1A6	7,21	7,12E-20	STK32B	-3,47	4,07E-10
RPTN	7,20	1,36E-24	THBS4	-3,47	2,09E-12
RNASE7	7,16	1,09E-23	KANK4	-3,46	2,81E-09
SERPINB11	7,12	5,52E-21	POSTN	-3,46	1,41E-06
LCE2C	7,01	8,45E-17	ADAMTS3	-3,44	1,43E-08
TGM5	6,93	2,20E-20	COL23A1	-3,42	1,14E-14
FAM83C	6,86	1,01E-21	BMP3	-3,41	2,48E-07
PLA2G4D	6,82	2,44E-21	KCNJ6	-3,40	1,20E-05

Επαγόμενα γονίδια		Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted
TMEM45B	6,82	1,57E-39	LOC386597	-3,39	1,15E-09
CLDN4	6,76	1,52E-38	SGCZ	-3,38	1,81E-05
KLK10	6,72	3,77E-15	SLC24A4	-3,37	0,0007
TMPRSS11F	6,72	1,03E-16	COL9A2	-3,32	6,21E-13
LOR	6,69	2,04E-11	ANGPTL7	-3,32	0,00085
SYTL5	6,68	2,02E-22	LRFN5	-3,30	2,35E-06
TMPRSS11B	6,67	2,37E-14	ATP8A2	-3,30	1,80E-06
KRT10	6,65	2,47E-49	ODZ1	-3,27	8,98E-09
NIPAL4	6,65	3,74E-26	WNT2	-3,19	0,0003
LOC158434	6,61	2,95E-22	LRRC4B	-3,16	3,50E-10
GGT6	6,48	8,11E-21	EYA4	-3,15	4,30E-10
POF1B	6,43	1,47E-42	FAM198A	-3,14	2,39E-12
GJB4	6,41	7,25E-17	ADRA1A	-3,13	0,0001
FLG	6,31	2,25E-10	UNC13C	-3,13	6,08E-06
LCE3E	6,27	8,95E-15	ADAMTSL3	-3,12	6,36E-09
UGT1A7	6,27	3,23E-16	SLC14A1	-3,12	0,0002

Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted	
NEAT1	1,46	0,0015	ARPP21	-6,03	1,37E-14	
ATP12A	9,86	2,49E-57	C9ORF4	-5,81	1,32E-10	
CYP4F11	9,82	3,38E-63	FRMD1	-5,76	4,22E-12	
SERPINB3	9,45	1,69E-37	ADRA1A	-5,75	2,18E-13	
FETUB	8,94	1,77E-31	CACNG7	-5,69	8,10E-10	
CALML5	8,74	3,93E-30	LRRTM3	-5,68	1,33E-13	
ADH7	8,55	4,79E-37	SYT2	-5,64	2,18E-18	
TMPRSS11B	8,51	5,19E-41	CHRM2	-5,47	5,31E-09	
RNASE7	8,27	1,76E-36	DLK1	-5,36	2,12E-08	
PAPL	8,26	6,60E-28	IGLON5	-5,31	1,70E-12	
LOC344887	8,24	4,32E-31	GALNTL6	-5,13	3,14E-15	
ATP6V1C2	8,15	9,11E-42	SGCZ	-5,10	1,60E-12	
RPTN	8,14	7,13E-34	PPP1R9A	-5,00	7,89E-15	
CYP4F22	8,11	3,65E-26	VAT1L	-4,86	7,72E-18	
GSTA1	8,00	7,02E-34	<i>DOCK</i> 3	-4,81	7,66E-17	
MUC4	7,93	1,82E-21	PEG10	-4,74	1,17E-14	
SERPINB11	7,91	1,23E-26	PCDH8	-4,74	1,00E-14	
SCEL	7,89	3,79E-59	GRIK5	-4,74	1,41E-17	
SERPINB2	7,87	9,92E-26	MDGA2	-4,71	3,53E-10	
GABRP	7,77	2,05E-44	GRIK1	-4,64	2,69E-11	

Πίνακας 4.14 Τορ 50 επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στην υποτροπή σποραδικής ΟΚΚ vs OΘE, με βάση το $|log_2FC|$.

Επαγόμενα γονίδια		Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted
ELF5	7,74	7,98E-22	NCAM2	-4,62	1,01E-11
KLK13	7,74	2,93E-69	FAM179A	-4,48	5,58E-12
RDH12	7,67	1,37E-22	SEMA3A	-4,43	1,55E-18
LIPH	7,67	4,71E-22	BMP3	-4,40	1,32E-09
WFDC5	7,67	1,54E-36	KCNH5	-4,35	4,80E-06
GPX2	7,54	2,16E-37	DRP2	-4,34	4,08E-18
BARX2	7,53	9,59E-24	STAC	-4,23	3,60E-13
IL36RN	7,50	1,93E-19	SLC22A3	-4,20	1,36E-11
UGT1A6	7,49	2,92E-24	PCOLCE2	-4,15	1,21E-11
PLA2G4E	7,48	3,86E-37	JPH4	-4,09	6,60E-13
AKR1B10	7,48	1,05E-33	NKAIN4	-4,07	7,59E-08
KRT42P	7,46	4,21E-36	SOX10	-4,06	1,34E-15
ALOX12B	7,42	6,57E-25	SLC6A2	-4,01	5,50E-15
SYTL5	7,38	1,89E-25	ANGPTL7	-3,95	1,17E-10
TMPRSS11F	7,33	9,91E-23	KCNJ6	-3,92	3,20E-10
LOR	7,30	1,93E-17	NCAM1	-3,91	5,92E-45
CLDN4	7,26	6,33E-48	IGSF10	-3,88	1,85E-22
TGM5	7,26	1,40E-22	GAD1	-3,85	9,86E-12
PRSS3	7,25	1,72E-19	DSCAML1	-3,85	4,41E-06
KLK5	7,24	8,50E-20	FLJ16779	-3,81	2,23E-07
UGT1A4	7,01	9,70E-18	SLC4A4	-3,81	2,18E-30
Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια		
-------------------	--------	------------	----------------------	---------------------	------------
Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted
GGT6	6,99	1,76E-26	SULT4A1	-3,79	1,18E-10
PLAC8	6,89	3,90E-37	ADAMTS3	-3,78	1,59E-15
UGT1A7	6,87	1,40E-18	SFRP1	-3,76	3,66E-13
TMEM45B	6,78	4,91E-38	ELOVL2	-3,76	9,65E-13
FUT3	6,78	9,35E-26	P4HA3	-3,76	1,26E-46
KLK10	6,77	6,57E-15	FOXF2	-3,73	1,37E-23
NTS	6,73	1,34E-20	CYTL1	-3,71	1,91E-09
SLC9A2	6,72	1,01E-21	TMEM132C	-3,65	4,38E-07
LCN2	6,70	1,37E-27	PENK	-3,64	0,001102

Επίσης, έγινε απευθείας σύγκριση των 3 υποτροπών vs 3 πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ και αναγνωρίστηκαν 7 ΔΕΓ, συγκεκριμένα 4 επαγόμενα (EGFL6, GPRC5A, PAPPA, RMRP) και 3 κατεσταλμένα (KRT1, PEG10, PTGER3) γονίδια στις υποτροπές συγκριτικά με τις πρωτοπαθείς βλάβες (Εικ. 4.30).



Εικ. 4.30 Scatter plots που δείχνουν τα (Α) επαγόμενα και (Β) κατεσταλμένα γονίδια στις υποτροπές (υ) σποραδικής ΟΚΚ νς πρωτοπαθείς (π) σποραδικής ΟΚΚ . Οι τιμές αντιστοιχούν στα p-adjusted που προέκυψαν από το DESeq2 για κάθε γονίδιο.

4.4.6.3. Ανάλυση εμπλουτισμού

Η ανάλυση εμπλουτισμού των δεδομένων που προέκυψαν από το RNA-seq αποσκοπούσε να αναδειχθούν οι γονιδιακές οντολογίες (GOs) και τα μονοπάτια γονιδίων (KEGG pathways) στα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν τα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στη σποραδική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαδικτυακά προγράμματα τριών γενιών²⁶² βιοπληροφορικής ανάλυσης.

1η γενιά - Ανάλυση υπερεκπροσώπησης

Σύμφωνα με την ανάλυση εμπλουτισμού για γονιδιακές οντολογίες που αντιστοιχούσαν σε βιολογικές διεργασίες (biological processes), τα επαγόμενα γονίδια στη σποραδική ΟΚΚ σχετίζονταν κυρίως με την ανάπτυξη της επιδερμίδας (epidermis development, GO:0008544) και του δέρματος (skin development, GO:0043588), τη διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων (epidermal cell differentiation, GO:0009913) ή κερατινοκυττάρων (keratinocyte differentiation, GO:0030216), και τη διαδικασία της κερατινοποίησης (cornification, GO:0070268, και keratinization, GO:0031424) (Εικ. 4.31). Άλλες οντολογίες που εκπροσωπούνταν σε σημαντικό βαθμό μεταξύ των επανόμενων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ και σχετίζονταν με τα επιθηλιακά κύτταρα αφορούσαν σε διασυνδέσεις πεπτιδίων (peptide cross-linking, GO:0018149), στην ομοιοστασία του ύδατος (water homeostasis, GO:0030104, regulation of water loss via skin, GO:0033561, και multicellular organismal water homeostasis, GO:0050891) και στο σχηματισμό του δερματικού φραγμού (establishment of skin barrier, GO:0061436) (Εικ. 4.31). Επίσης, όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα (barplot) της Εικ. 4.31, στις top 15 γονιδιακές οντολογίες για τα επαγόμενα γονίδια της σποραδικής ΟΚΚ περιλαμβάνονταν και βιολογικές διεργασίες σχετιζόμενες με το μεταβολισμό, για παράδειγμα λιπιδίων και εικοσανοειδών (fatty acid derivative metabolic process, GO:1901568, unsaturated fatty acid metabolic process, GO:0033559, icosanoid metabolic process, GO:0006690, και fatty acid metabolic process, GO:0006631). Στην Εικ. 4.32, οι 15 εμπλουτισμένες οντολογίες οργανώθηκαν σε δίκτυα (networks), οι άκρες των οποίων αντιστοιχούσαν στα επικαλυπτόμενα μεταξύ των οντολογιών γονίδια που επάγονταν στη σποραδική ΟΚΚ. Έτσι σχηματίστηκε ένα χάρτης εμπλουτισμού (enrichment map), ο οποίος συγκέντρωσε κοντά τις οντολογίες με κοινά γονίδια, αναδεικνύοντας τις δύο κύριες λειτουργίες που είναι εμπλουτισμένες στη σποραδική ΟΚΚ, δηλαδή την ανάπτυξη/διαφοροποίηση της επιδερμίδας και το μεταβολισμό.



Εικ. 4.31 Ραβδόγραμμα με τις πρώτες 15 γονιδιακές οντολογίες που ήταν εμπλουτισμένες στα επαγόμενα γονίδια της σποραδικής ΟΚΚ. Το μέγεθος της ράβδου αντιστοιχεί στο σύνολο των επαγόμενων γονιδίων που περιλαμβάνει η οντολογία και το χρώμα της στο p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.



Εικ. 4.32 Enrichment map plot που συνδέει τις γονιδιακές οντολογίες με κοινά επαγόμενα γονίδια στη σποραδική ΟΚΚ. Το μέγεθος του κύκλου αναπαριστά το σύνολο των επαγόμενων γονιδίων που περιλαμβάνει η οντολογία και το χρώμα του το p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.

Ο μεγάλος αριθμός επικαλυπτόμενων γονιδίων μεταξύ των πρώτων 6 γονιδιακών οντολογιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της επιδερμίδας και του δέρματος, την κερατινοποίηση και τn διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων/επιδερμικών κυττάρων μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι αυτές οι οντολογίες είναι θυγατρικές κοινών μητρικών οντολογιών, όπως αναπαρίσταται από το κατευθυνόμενο ακυκλικό γράφημα (directed acyclic graph) στην Εικ. 4.33. Σε αυτό η ενιαία γραμμή συμβολίζει την ιεραρχική σχέση "είναι" (is), δηλαδή το "epidermis development" είναι θυγατρικός του "epithelium development", το οποίο είναι θυγατρικός όρος του "tissue development" κ.ο.κ., ενώ η διακεκομμένη ευθεία δηλώνει πως η διεργασία της οντολογίας στην οποία καταλήγει "αποτελεί μέρος" (is part of) αυτής από την οποία ξεκινά, για παράδειγμα το "cornification", που συμβαίνει στις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες, είναι μέρος του "keratinization", που αφορά σε όλη την έκταση του επιθηλίου.⁴⁵⁵



Εικ. 4.33 Κατευθυνόμενο ακυκλικό γράφημα που αναπαριστά την ιεραρχική σχέση των γονιδιακών οντολογιών. Η ευθεία γραμμή δηλώνει πως η οντολογία στην οποία καταλήγει είναι θυγατρικός όρος αυτής απ' την οποία ξεκινά, ενώ η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζει πως η διεργασία της οντολογίας στην οποία καταλήγει αποτελεί μέρος αποκλειστικά και μόνο αυτής από την οποία ξεκινά. Οι οντολογίες ενδιαφέροντος συμβολίζονται με χρωματική κλίμακα που αντιστοιχεί στο p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού και οι μητρικές οντολογίες αναπαρίστανται με γκρι χρώμα.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα των επαγόμενων γονιδίων που σχετίζονταν με την ανάπτυξη της επιδερμίδας ήταν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αποτελούν δομικά συστατικά των δεσμοσωμάτων,⁴⁵⁶ δηλαδή τις δεσμογλεΐνες (DSG1, DSG2, DSG3), δεσμοκολλίνες (DSC2, DSC3), πλακοφιλίνες (PKP1, PKP2, PKP3), την πλακοσφαιρίνη (JUP) και τη δεσμοπλακίνη (DSP), διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη διακυτταρική σύνδεση των επιθηλιακών κυττάρων, όπως η οκλουδίνη (OCLN) και οι κλαουδίνες (CLDN4, CLDN7), και μόρια προσκόλλησης, όπως οι συγκολλητίνες, π.χ., η E-cadherin (Εικ. 4.34). Επίσης, επάγονταν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού,457 όπως διαμεμβρανικές πρωτεάσες σερινών (TMPRSS2, TMPRSS11A, TMPRSS13), στο σχηματισμό του αδιάλυτου πρωτεϊνικού στρώματος των κερατινοκυττάρων κατά την τελική τους διαφοροποίηση, που αναφέρεται ως «κεράτινος φάκελος» (cornified cell envelope),458 όπως οι τρανσγλουταμινάσες (TGM1, TGM3, TGM5, TGM6), στην απολέπιση του δέρματος,⁴⁵⁹ όπως οι καλλικρεΐνες (KLK5, KLK6, KLK7), καθώς και αναστολείς πρωτεασών,⁴⁶⁰ όπως τα SPINK5 και CSTA (Εικ. 4.34).

Μεταξύ των κορυφαίων επαγόμενων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ ήταν τα KRT17 και KRT23, ενώ άλλα επαγόμενα γονίδια που κωδικοποιούν κυττοκερατίνες ήταν τα KRT1, KRT4, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT8, KRT10, KRT16, KRT18, KRT19, KRT77, KRT78 kal KRT80. Επίσης, σημαντική επαγωγή παρατηρήθηκε στο ψευδογονίδιο KRT42P (Εικ. 4.34). Επίσης, ανάμεσα στα κορυφαία επαγόμενα γονίδια περιλαμβάνονταν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με γνωστή έκφραση στην ΟΚΚ, όπως το ΡΙ3 που κωδικοποιεί την elafin,⁴⁶¹ καθώς και μη συνδεδεμένα με την ΟΚΚ γονίδια του φυσιολογικού ή νεοπλασματικού καλυπτικού επιθηλίου,^{462, 463} όπως τα NCCRP1 και PNPLA1, (Εικ. 4.34). Ακόμα, ως επαγόμενα γονίδια στη σποραδική ΟΚΚ αναγνωρίστηκαν δείκτες του επιφανειακού εξωδέρματος (surface ectoderm),⁴⁶⁴ π.χ., *KRT8, KRT18, TFAP2A, ALDH1A3,* και του περιδέρματος που καλύπτει την αναπτυσσόμενη επιδερμίδα,465 π.χ., IRF6, SFN, GRHL3, καθώς και δείκτες της πρώιμης, 389, 466 π.χ., KRT1, αλλά τελικής KRT10, IVL, και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Επαγόμενα γονίδια που



Εικ. 4.34 Cnetplot που απεικονίζει τα γονίδια μέλη των οντολογιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της επιδερμίδας και του δέρματος, τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και τη διαδικασία της κερατινοποίησης. Το χρώμα του κύκλου κάθε γονιδίου αντιστοιχεί στο επίπεδο της επαγωγής του. Το μέγεθος των μπεζ κύκλων κάθε οντολογίας αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που περιλαμβάνει.

συμμετέχουν στην τελική επιδερμική διαφοροποίηση ήταν πολλά μέλη των διαφορετικών οικογενειών του συμπλέγματος επιδερμικής διαφοροποίησης,⁴⁴⁵ όπως της S100 calcium binding protein family (S100P, S100A2, S100A3, S100A7, S100A8, S100A9, S100A11, S100A14, S100A16), της S100 fused type protein family (FLG, FLG2, RPTN, CRNN), της cornified envelope precursor family (LOR), της late cornified envelope family (LCE1B, LCE1C, LCE1F, LCE2A, LCE2B, LCE2C, LCE3D, LCE3E, LCE6A) και της small proline rich protein family (SPRR1A, SPRR1B, SPRR3) (Εικ. 4.34).

Αντίθετα, οι κύριες γονιδιακές οντολογίες που αφορούσαν σε βιολογικές διεργασίες εμπλουτισμένες μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ σχετίζονταν με την οργάνωση της ΕΘΟ (extracellular matrix organization, GO:0030198, extracellular structure organization, GO:0043062) ή την οργάνωση και το μεταβολισμό του κολλαγόνου, που αποτελεί κύριο συστατικό της ΕΘΟ (collagen fibril organization, GO:0030199, collagen metabolic process, GO:0032963), καθώς και με την προσκόλληση κυττάρων-ΕΘΟ (cell-substrate adhesion, GO:0031589, cell-matrix adhesion, GO:0007160) (Eik. 4.35). Επίσης, άλλες γονιδιακές οντολογίες στις οποίες ομαδοποιείτο ένας σημαντικά μεγάλος αριθμός κατεσταλμένων γονιδίων της σποραδικής OKK αφορούσαν στην οστική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (ossification, GO:0001503, bone development, GO:0060348, bone morphogenesis, GO:0060349, osteoblast differentiation, GO:0001649), ενώ και η οντολογία της οδοντογένεσης (odontogenesis, GO:0042476) περιλάμβανε μία σημαντική ομάδα κατεσταλμένων γονιδίων (Εικ. 4.35). Οι οντολογίες που σχετίζονταν με την ΕΘΟ, το κολλαγόνο και την προσκόλληση των κυττάρων με την ΕΘΟ ανήκαν σε ένα κοινό δίκτυο, ενώ ένα ξεχωριστό δίκτυο σχημάτιζαν οι οντολογίες της οστεογένεσης (Εικ. 4.36). Η οντολογία της οργάνωσης του κολλαγόνου ήταν θυγατρική της οργάνωσης της ΕΘΟ, ενώ η προσκόλληση κυττάρων-ΕΘΟ είχε διαφορετική μητρική οντολογία (Εικ. 4.37).



Εικ. 4.35 Ραβδόγραμμα με 15 από τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες που ήταν εμπλουτισμένες στα κατεσταλμένα γονίδια της σποραδικής ΟΚΚ. Το μέγεθος της ράβδου αντιστοιχεί στο σύνολο των επαγόμενων γονιδίων που περιλαμβάνει η οντολογία και το χρώμα της στο p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.



Εικ. 4.36 Enrichment map plot που συνδέει τις γονιδιακές οντολογίες με κοινά κατεσταλμένα γονίδια στη σποραδική ΟΚΚ. Το μέγεθος του κύκλου αναπαριστά το σύνολο των επαγόμενων γονιδίων που περιλαμβάνει η οντολογία και το χρώμα του το p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.



Εικ. 4.37 Κατευθυνόμενο ακυκλικό γράφημα που αναπαριστά την ιεραρχική σχέση των κορυφαίων γονιδιακών οντολογιών που ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ. Η ευθεία γραμμή δηλώνει πως η οντολογία στην οποία καταλήγει είναι θυγατρικός όρος αυτής απ' όπου ξεκινά. Οι οντολογίες ενδιαφέροντος συμβολίζονται με χρωματική κλίμακα που αντιστοιχεί στο p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού και οι μητρικές οντολογίες με γκρι χρώμα.

Επειδή οι γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονταν με την ΕΘΟ ήταν οι κορυφαίες εμπλουτισμένες μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων, έγινε μία επιπλέον διερεύνηση των γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά της ΕΘΟ, όπως γλυκοπρωτεΐνες, κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, μέσω μίας δημοσιευμένης λίστας γονιδίων της ΕΘΟ (matrisome gene list).³⁷⁰ Με έλεγχο επικάλυψης της λίστας των κατεσταλμένων γονιδίων της σποραδικής ΟΚΚ με τη matrisome gene list με το εργαλείο Venny 2.1,²⁰⁰ βρέθηκε πως καταστέλλονταν 54 γονίδια γλυκοπρωτεϊνών (π.χ., NELL1, PCOLCE2, POSTN, THBS4, TNN), 17 γονίδια κολλαγόνων (π.χ., COL1A1, COL3A1, COL6A6, COL9A2, COL23A1) και 6 γονίδια πρωτεογλυκανών (ACAN, FMOD, HSPG2, OGN, PODNL1, VCAN) (Εικ. 4.38). Άλλα κατεσταλμένα γονίδια που εμπλέκονται στην οργάνωση της ΕΘΟ ή/και την προσκόλληση κυττάρων-ΕΘΟ ήταν γονίδια μεταλλοπρωτεϊνασών (MMP14, MMP17, MMP19) και ο αναστολέας τους TIMP2, γονίδια ιντεγκρινών (ITGA1, ITGA5) και μόρια προσκόλλησης (PECAM1, VCAM1).



Εικ. 4.38 Διάγραμμα dotplot με τα κατεσταλμένα γονίδια της σποραδικής ΟΚΚ που κωδικοποιούν συστατικά της ΕΘΟ. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στο log₂FC και το χρώμα του στο -log₁₀p-adjusted κάθε γονιδίου. Οι μικρότεροι κύκλοι αντιστοιχούν στα γονίδια με τη μεγαλύτερη καταστολή.

Τέλος, όταν τα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια χωρίστηκαν σε 3 υποκατηγορίες με βάση τα επίπεδα επαγωγής/καταστολής, παρατηρήθηκε πως οι ίδιες γονιδιακές οντολογίες ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ γονιδίων διαφορετικών επιπέδων επαγωγής (Εικ. 4.39). Στην τελευταία εικόνα φαίνεται επίσης, πως οι οντολογίες της οργάνωσης της ΕΘΟ (extracellular matrix organization, GO:0030198, extracellular structure organization, GO:0043062) και της προσκόλλησης κυττάρων-ΕΘΟ (cell-matrix adhesion, GO:0007160) ήταν υπερεκπροσωπημένες και μεταξύ μίας υποομάδας των επαγόμενων γονιδίων της σποραδικής ΟΚΚ.



Εικ. 4.39 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει 10 από τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο gene ratio, δηλαδή ένα κλάσμα k/n, όπου k είναι ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάχθηκαν έστω σε μία οντολογία (η τιμή του n για κάθε υποκατηγορία αναγράφεται στην παρένθεση στο κάτω μέρος της εικόνας και επισημαίνεται ότι το μέγιστο n<συνολικών επαγόμενων ή κατεσταλμένων γονιδίων). Το χρώμα της κουκίδας αντιστοιχεί στο -log₁₀p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού. Λόγω του μικρού αριθμού κατεσταλμένων γονιδίων με |log₂FC|>4, αυτά δεν ομαδοποιήθηκαν σε καμία οντολογία.

Με έλεγχο επικάλυψης της λίστας των επαγόμενων γονιδίων με τη matrisome gene list με το εργαλείο Venny 2.1,²⁰⁰ βρέθηκε ότι στην σποραδική ΟΚΚ επάγονταν 9 γονίδια γλυκοπρωτεϊνών (COMP, ECM1, EFEMP1, FN1, LGI3, LTBP2, MFAP5, NPNT, SPP1) και 2 γονίδια κολλαγόνου (COL10A1, COL4A5), αλλά κανένα γονίδιο πρωτεογλυκανών (Εικ. 4.40). Επίσης, άλλα γονίδια που σχετίζονται με την οργάνωση της ΕΘΟ ή/και την προσκόλληση κυττάρων-ΕΘΟ και επάγονταν στην ΟΚΚ ήταν το γονίδιο της μεταλλοπρωτεΐνάσης 12 (MMP12), γονίδια ιντεγκρινών (ITGA2, ITGB2, ITGB8), γονίδια που σχετίζονταν με το υαλουρονικό οξύ⁴⁶⁷ (CD44, HAS3, HYAL1), μόρια προσκόλλησης (CEACAM1, CEACAM5), καθώς και το LOXL4, το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που καταλύει τον αρχικό σχηματισμό διασταυρούμενων συνδέσεων μεταξύ κολλαγόνου και ελαστίνης για τη διαμόρφωση του συνδετικού ιστού και το οποίο είχε βρεθεί υπερεκφρασμένο σε ινοβλάστες που είχαν απομονωθεί από το τοίχωμα δύο περιπτώσεων ΟΚΚ συγκριτικά με ινοβλάστες ούλων.³²⁷



Εικ. 4.40 Διάγραμμα dotplot με τα επαγόμενα γονίδια της σποραδικής ΟΚΚ που κωδικοποιούν συστατικά της ΕΘΟ. Το μέγεθος του κύκλου αντιστοιχεί στο log₂FC και το χρώμα του στο -log₁₀p-adjusted κάθε γονιδίου. Οι μεγαλύτεροι κύκλοι αντιστοιχούν στα γονίδια με τη μεγαλύτερη επαγωγή.

Σε συμφωνία με την ανάλυση γονιδιακών οντολογιών, τα κυριότερα KEGG pathways που ήταν εμπλουτισμένα μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων αφορούσαν στο μεταβολισμό (π.χ., Arachidonic acid metabolism, hsa00590, Glutathione metabolism, hsa00480) και στις συνάψεις των επιθηλιακών κυττάρων (Tight junction, hsa04530) και στη οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation, hsa00190), ενώ μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων σχετίζονταν με την ΕΘΟ (ECMreceptor interaction, hsa04512) και την προσκόλληση των κυττάρων (Focal adhesion, hsa04510, Cell adhesion molecules, hsa04514). Επίσης, ανάμεσα στα κατεσταλμένα γονίδια παρατηρήθηκε ένας σημαντικός αριθμός μελών σηματοδοτικών οδών (cGMP-PKG signaling pathway, hsa04022, Relaxin signaling pathway, hsa04926, Oxytocin signaling pathway, hsa04921, Rap1 signaling pathway, hsa04015) (Εικ. 4.41).



Εικ. 4.41 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει 8 από τα κορυφαία KEGG pathways μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική OKK. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο gene ratio, δηλαδή ένα κλάσμα k/n, όπου k είναι ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στο συγκεκριμένοο KEGG pathway και n ο αριθμός των γονιδίων που εντάχθηκαν έστω σε ένα KEGG pathway (η τιμή του n αναγράφεται στην παρένθεση στο κάτω μέρος της εικόνας και επισημαίνεται ότι το n<συνολικών επαγόμενων ή κατεσταλμένων γονιδίων). Το χρώμα της κουκίδας αντιστοιχεί στο -log10p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.

2η γενιά - Ανάλυση λειτουργικής κατηγορίας

Η μέθοδος GSEA της 2^{ης} γενιάς βιοπληροφορικής ανάλυσης επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της 1^η γενιάς, όσον αφορά στις γονιδιακές οντολογίες και τα KEGG pathways. Οι 4 κυριότερες γονιδιακές οντολογίες που ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων της σποραδικής ΟΚΚ σχετίζονταν με την ανάπτυξη και την ομοιοστασία της επιδερμίδας και του δέρματος (epidermis development, GO:0008544, skin development, GO:0043588, peptide cross-linking, GO:0018149, water homeostasis, GO:0030104), ενώ εμπλουτισμένες ήταν επίσης οντολογίες που αφορούσαν στην ανοσιακή απάντηση (humoral immune response, GO:0006959, granulocyte activation, GO:0036230, lymphocyte mediated immunity, GO:0002449) και στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (fatty acid derivative metabolic process, GO:1901568) (Εικ. 4.42). Αντίθετα, η GSEA έδειξε μόνο 2 οντολογίες να εκπροσωπούνται σημαντικά μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων της σποραδικής ΟΚΚ (cyclic nucleotide metabolic process, GO:0009187, roof of mouth development, GO:0060021) (Еік. 4.42).



Εικ. 4.42 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική ΟΚΚ σύμφωνα με τη GSEA. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο Normalized Enriched Score (NES) και το χρώμα της κουκίδας στο p-adjusted της GSEA.

Σημαντική συμφωνία με τα αποτελέσματα 1^{ης} γενιάς της βιοπληροφορικής ανάλυσης παρατηρήθηκε και αναφορικά με τα KEGG pathways. Μονοπάτια που σχετίζονταν με τις συνάψεις των επιθηλιακών κυττάρων (Tight junction, hsa04530), το μεταβολισμό (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, hsa00980) και τον κυτταρικό κύκλο (Cell cycle, hsa04110) ήταν εμπλουτισμένα μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων, ενώ μονοπάτια που σχετίζονταν με την ΕΘΟ (ECM-receptor interaction, hsa04512), την κυτταρική προσκόλληση adhesion, (Focal hsa04510) και τη γλουταμινεργική σύναψη (Glutamatergic synapse, hsa04724), καθώς και η σηματοδοτική οδός (Relaxin Relaxin signaling pathway, hsa04926) της υπερεκπροσωπούνταν μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων (Εικ. 4.43).



Εικ. 4.43 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει κάποια από τα KEGG pathways μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική OKK σύμφωνα με τη GSEA. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο Normalized Enriched Score (NES) και το χρώμα της κουκίδας στο p-adjusted της GSEA.

Τέλος, με τη GSEA υπολογίστηκε το Enrichment Score, που είναι ενδεικτικό για το κατά πόσο τα γονίδια-μέλη μίας γονιδιακής οντολογίας ή ενός KEGG μονοπατιού ανήκουν σε αυτά με την κορυφαία μεταβολή (leading-edge subset) στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο συγκρινόμενων ομάδων, δηλαδή αυτά με το μεγαλύτερο |log₂FC| (Εικ. 4.44).



Εικ. 4.44 Απεικόνιση του Enrichment Score σε δύο γονιδιακές οντολογίες (πάνω) και δύο KEGG μονοπάτια (κάτω) που ήταν εμπλουτισμένα στη σποραδική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στα γονίδια, ταξινομημένα από αριστερά προς τα δεξιά με φθίνουσα σειρά log₂FC. Τα κόκκινα πλαίσια συμβολίζουν κορυφαία επαγόμενα γονίδια και το μπλε πλαίσιο κορυφαία κατεσταλμένα γονίδια.

3η γενιά - Ανάλυση τοπολογίας μονοπατιού

Η 3^η γενιά βιοπληροφορικής ανάλυσης με το SPIA ανέδειξε KEGG pathways τα οποία ήταν ενεργοποιημένα ή ανεσταλμένα στη σποραδική ΟΚΚ (Εικ. 4.45). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς βιοπληροφορικής ανάλυσης, το κυριότερο μονοπάτι, το οποίο βρέθηκε απενεργοποιημένο αφορούσε στην ΕΘΟ (ECM-receptor interaction, hsa04512), ενώ ανεσταλμένο ήταν και αυτό που περιλάμβανε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (Cell adhesion molecules, hsa04514) (Εικ. 4.45). Σε αντίθεση με την ORA και την GSEA, το SPIA ανέδειξε το μονοπάτι της γλουταμινεργικής σύναψης (Glutamatergic synapse, hsa04724) ως ενεργοποιημένο και το μονοπάτι των κυτταρικών συνάψεων (Tight junction, hsa04530) ως απενεργοποιημένο (Εικ. 4.45).



Εικ. 4.45 Διάγραμμα αμφίδρομων στοιχείων (two-way evidence plot) των μονοπατιών που υπερεκπροσωπούνται σημαντικά μεταξύ των ΔΕΓ στη σποραδική ΟΚΚ και παράλληλα εμφανίζουν σημαντική διατάραξη στη γονιδιακή έκφραση σε όλη την τοπολογία τους, δηλαδή και σε ανώτερα (upstream) και σε κατώτερα (downstream) γονίδια του κάθε μονοπατιού. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα μονοπάτι. Ο χ-άξονας δείχνει τα στοιχεία υπερεκπροσώπησης και ο y-άξονας τα στοιχεία διατάραξης. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιστοιχούν σε μονοπάτια που είναι σημαντικά (p<0.05) υπερεκπροσωπημένα και διαταραγμένα μετά από 2 στατιστικές διορθώσεις (Bonferroni correction και FDR correction), ενώ τα μπλε μετά από μία (FDR correction). Οι κάθετες μπλε και κόκκινες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα όρια της μίας ή των δύο στατιστικών διορθώσεων μόνο για την υπερεκπροσώπηση ή τη διατάραξη, αντίστοιχα.

4.4.7. Το μεταγράφωμα της συνδρομικής ΟΚΚ

Η ανάλυση του μεταγραφώματος της συνδρομικής ΟΚΚ έγινε συγκρίνοντας 6 περιπτώσεις συνδρομικής ΟΚΚ (σΟΚΚ-1, -2, -3, -4, -5, -6) με τα 6 ΟΘΕ (ΟΘΕ-1, -2, -3, -4, -5, -6).

4.4.7.1. Διαφορική έκφραση

Με κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας το |log₂FC|>1 και το padi<0,05 ανιχνεύθηκαν 2427 ΔΕΓ, 1442 επανόμενα και 985 κατεσταλμένα γονίδια στη συνδρομική ΟΚΚ (Εικ. 4.46). Μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων, 235 (16,3%) είχαν επαγωγή≥16 φορές (log₂FC≥4), 462 (32%) είχαν επαγωγή≥4 και <16 φορές (2≤log₂FC<4) και 745 (51,7%) είχαν επαγωγή≥2 και <4 φορές (1≤log₂FC<2) στη συνδρομική ΟΚΚ συγκριτικά με τα ΟΘΕ. Ανάμεσα στα κατεσταλμένα γονίδια, 11 (1,1%) είχαν καταστολή≥16 φορές (log₂FC≤-4), 140 (14,2%) είχαν καταστολή≥4 και <16 φορές (-4<log₂FC≤-2) και 834 (84,7%) είχαν καταστολή≥2 και <4 φορές (-2<log₂FC≤-1) (Εικ. 4.46). Τα πρώτα (top) 50 (με βάση το |log₂FC|) επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια της συνδρομικής ΟΚΚ παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.15, ενώ τα συνολικά ΔΕΓ είναι διαθέσιμα στη GEO database του NCBI με accession number GSE180706.



Εικ. 4.46 Volcano plot που αναπαριστά ως κουκκίδες τα γονίδια και με διαφορετικά χρώματα τα επίπεδα επαγωγής/καταστολής τους στη συνδρομική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ.

Επαγόμενα γονίδια		Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted
ATP12A	9,83	1,72E-65	CACNG7	-6,18	1,79E-13
CYP4F11	9,81	5,17E-67	ARPP21	-5,40	3,74E-19
FETUB	8,82	1,18E-36	BMP3	-4,72	7,58E-14
TMPRSS11B	8,70	1,26E-46	FLJ16779	-4,71	8,40E-13
CALML5	8,66	1,25E-32	SYT2	-4,58	2,22E-21
MUC4	8,58	1,02E-40	LRRTM3	-4,47	2,12E-11
ATP6V1C2	8,42	1,48E-65	ΚϹΝΚ1Ο	-4,33	1,50E-18
PI3	8,31	2,53E-28	KANK4	-4,32	1,42E-27
NCCRP1	8,31	3,59E-59	DOCK3	-4,22	1,28E-15
KLK5	8,14	3,33E-34	SLC24A4	-4,04	5,66E-12
ADH7	8,11	1,12E-38	GRIK1	-4,03	2,93E-14
SERPINB2	8,08	3,64E-32	PDE1C	-3,94	7,77E-13
LIPH	7,97	4,08E-28	CYTL1	-3,66	3,35E-11
ALOX12B	7,86	2,96E-31	SEMA3A	-3,61	9,31E-18
CYP4F22	7,81	1,20E-26	KCNH1	-3,55	1,07E-13
RNASE7	7,79	2,22E-35	PPP1R9A	-3,51	1,44E-11
SERPINB11	7,75	1,63E-29	LOC100130417	-3,45	6,37E-11
WFDC5	7,73	5,06E-38	SLC22A3	-3,45	1,46E-14
KLK13	7,72	7,81E-60	SGCZ	-3,36	9,54E-12
PAPL	7,68	1,31E-22	PEG10	-3,31	8,92E-11

Πίνακας 4.15 Τορ 50 επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια στη συνδρομική OKK vs OΘE, με βάση το $|log_2FC|$.

Επαγόμενα γονίδια		Κατεσταλμένα γονίδια			
Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted	Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted
LOC344887	7,67	1,81E-28	LRRTM2	-3,30	2,09E-11
RPTN	7,63	6,11E-31	PCDH8	-3,22	1,63E-08
GRHL3	7,61	4,17E-59	ADAMTSL3	-3,20	4,10E-14
SCEL	7,57	2,56E-40	JPH4	-3,20	3,70E-09
KLK10	7,55	1,20E-33	SNCAIP	-3,12	1,58E-20
KRT42P	7,54	2,37E-40	PCDH11X	-3,05	0,000192
ELF5	7,51	8,74E-24	VAT1L	-3,04	2,87E-10
PLA2G4E	7,48	2,04E-36	ELOVL2	-3,04	3,61E-12
PRSS3	7,46	6,31E-24	ADAMTS3	-3,04	8,84E-10
CLDN4	7,46	5,61E-44	IGSF10	-3,03	4,05E-18
BARX2	7,46	4,38E-27	LOC386597	-3,00	3,59E-09
RDH12	7,38	4,76E-23	SEZ6L2	-2,99	2,12E-08
GPX2	7,30	1,98E-39	FAM18A	-2,97	5,92E-14
GABRP	7,30	2,32E-53	SLC19A3	-2,95	1,04E-07
FLG2	7,28	2,42E-22	SP7	-2,94	4,40E-11
KRT77	7,26	7,38E-39	ANGPTL7	-2,92	0,004808
IL36RN	7,23	8,06E-20	COL6A6	-2,90	2,86E-05
UPK1B	7,23	7,60E-31	FAM179A	-2,89	0,001898
CRCT1	7,17	1,07E-34	TMEM132C	-2,88	2,04E-06
AKR1B10	7,12	2,52E-40	CRABP1	-2,86	3,64E-06
UGT1A6	7,03	1,44E-21	VASH2	-2,80	1,87E-09
FUT3	6,99	3,42E-34	ODZ1	-2,79	1,09E-11

Επαγόμενα γονίδια			Κατεσταλμένα γονίδια		
Γονίδιο	log₂FC	p-adjusted	Γονίδιο	log ₂ FC	p-adjusted
KLK7	6,95	5,21E-30	KLK4	-2,79	0,009316
TMPRSS11F	6,91	8,37E-20	SULT4A1	-2,78	4,56E-07
PLAC8	6,88	6,33E-57	КСЛЈ6	-2,77	7,46E-06
GGT6	6,88	1,77E-28	DRP2	-2,77	3,60E-06
TGM5	6,88	3,57E-22	NCAM2	-2,76	1,33E-07
ALDH3A1	6,88	5,38E-20	PTHLH	-2,75	9,43E-11
TMEM45B	6,87	2,67E-47	CDH4	-2,74	2,99E-07
SYTL5	6,85	6,08E-27	COL23A1	-2,73	1,78E-08

Με την ανάλυση κυρίων συνιστωσών φάνηκε η σαφής απόκλιση των δειγμάτων της συνδρομικής ΟΚΚ από τα ΟΘΕ στον PC1 άξονα, ενώ και η ιεραρχική συσταδοποίηση με την Ευκλείδεια απόσταση ξεχώρισε τα δείγματα σε δύο *clusters*, που το ένα περιλάμβανε μόνο περιπτώσεις συνδρομικής ΟΚΚ και το άλλο μόνο ΟΘΕ και ξεκινούσαν από διαφορετικό αρχικό σκέλος του δενδρογράμματος (Εικ. 4.47).



Εικ. 4.47 ΡCΑ διάγραμμα (αριστερά) και δενδρόγραμμα ιεραρχικής συσταδοποίησης με τη μέθοδο της Ευκλείδειας απόστασης (δεξιά), στα οποία φαίνεται σαφής διαχωρισμός των περιπτώσεων συνδρομικής ΟΚΚ και των ΟΘΕ.

Επίσης, 23 γονίδια επάγονταν στη συνδρομική ΟΚΚ ενώ είχαν μηδενικά επίπεδα έκφρασης στα ΟΘΕ (Εικ. 4.48). Σε αυτά ανήκαν 16 γονίδια που επάγονταν και στη σποραδική ΟΚΚ ενώ δεν εκφράζονταν στα ΟΘΕ (Εικ. 4.48, bold γονίδια), και επιπλέον τα γονίδια *CLCA4* και *CLDN17*, που συμμετέχουν στη μεταφορά ανόργανων ανιόντων, τα γονίδια *LYPD2*, *WFDC12*, *SPINK7*, *SERPINB4* που διαμεσολαβούν τη σύνδεση πρωτεϊνών και την ενζυμική ρύθμιση και το γονίδιο *C6ORF15* που συμμετέχει στη μεταφορά ιόντων ασβεστίου, επαγόταν στα ΟΘΕ ενώ είχε μηδενικά επίπεδα έκφρασης στη συνδρομική ΟΚΚ (Εικ. 4.48).



Εικ. 4.48 Heatmap και scatter plots που δείχνουν τα 23 γονίδια με μηδενική έκφραση στο ΟΘΕ και 1 με απουσία έκφρασης στις συνδρομικές ΟΚΚ. Οι τιμές στο heatmap αντιστοιχούν στο log₂FC και αυτές στα scatter plots στα p-adjusted που προέκυψαν από το DESeq2 για κάθε γονίδιο. Με bold είναι σημειωμένα τα γονίδια που επάγονταν και στη σποραδική ΟΚΚ ενώ είχαν μηδενική έκφραση στα ΟΘΕ.

4.4.7.2. Συνδρομική vs σποραδική ΟΚΚ

Με το εργαλείο Venny 2.1²⁰⁰ ελέγχθηκε η επικάλυψη των ΔΕΓ που προέκυψαν από τη σύγκριση συνδρομικής ΟΚΚ vs ΟΘΕ και αυτών που ανιχνεύθηκαν από τη σύγκριση σποραδικής ΟΚΚ vs ΟΘΕ και βρέθηκε πως περίπου 85% των ΔΕΓ της συνδρομικής ΟΚΚ ανιχνεύονταν ως ΔΕΓ και στη σποραδική (Εικ. 4.49Α), γεγονός που υποδηλώνει ένα σχεδόν κοινό μεταγράφωμα για τους δύο υπότυπους της ΟΚΚ (RF=7,5, p<0.000e+00). Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν 1224 κοινά επαγόμενα γονίδια και 842 κοινά κατεσταλμένα γονίδια, ενώ μεγαλύτερος βαθμός επικάλυψης παρατηρήθηκε στα γονίδια που είχαν |log₂FC|>4 στις 2 συγκρίσεις, εκ των οποίων το 94% ήταν κοινά ΔΕΓ στη συνδρομική και στη σποραδική ΟΚΚ (Εικ. 4.49).



Εικ. 4.49 (A) Venn διάγραμμα που απεικονίζει τα ΔΕΓ της συνδρομικής ΟΚΚ (σΟΚΚ vs OΘΕ) και της σποραδικής ΟΚΚ (OKK vs OΘΕ). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια κάθε σύγκρισης. (B) Volcano plot που αναπαριστά τα ΔΕΓ της σΟΚΚ vs OΘΕ. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο. Οι πορτοκαλί και μπλε κουκκίδες αντιστοιχούν στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που ήταν κοινά και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ, ενώ τα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που ανιχνεύθηκαν μόνο στη σΟΚΚ είναι με πράσινο και καφέ χρώμα, αντίστοιχα. Εντός του πλαισίου απεικονίζονται σε μεγέθυνση τα επαγόμενα γονίδια με το μεγαλύτερο log₂FC και το μικρότερο padjusted, που ήταν όλα κοινά και στους 2 υπότυπους ΟΚΚ.

Μεταξύ των ΔΕΓ που αναγνωρίστηκαν μόνο στη συνδρομική αλλά όχι στη σποραδική OKK (vs OΘE), επάγονταν μέλη των σηματοδοτικών οδών IL-2/STAT5 (SPRED2, KLF6, SPRY4, SH3BGRL2, UMPS, IL18R1, TTC39B) και TNFa μέσω NF-kB (FOSL1, TGIF1, DUSP2, KLF6, TNIP1, MYC, SIK1, PHLDA2), και καταστέλλονταν μέλη του μονοπατιού της επιθηλιομεσεγχυματικής μετάβασης (epithelial-mesenchymal transition, EMT) (LRRC15, SGCB, ITGB3, CDH11, ENO2, FSTL1, DCN), σύμφωνα με τη Molecular Signatures Database³⁶³ μέσω του προγράμματος Enrichr.²⁷²

Το μεγάλο ποσοστό επικάλυψης των ΔΕΓ της συνδρομικής ΟΚΚ (vs OΘE) με αυτά της σποραδικής ΟΚΚ (vs OΘE) ήταν σε συμφωνία με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (Εικ. 4.50A) και την ιεραρχική συσταδοποίηση με Ευκλείδεια απόσταση (Εικ. 4.50B) με τις οποίες φάνηκε πως συνδρομικές και σποραδικές περιπτώσεις δε σχημάτιζαν ξεχωριστά clusters, σε αντίθεση με το OΘE, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του σε γενικές γραμμές κοινού τους μεταγραφικού προφίλ. Για τον περαιτέρω έλεγχο αυτής της παρατήρησης έγινε απευθείας σύγκριση μεταγραφώματος των συνδρομικών ΟΚΚ vs σποραδικών ΟΚΚ, η οποία ανέδειξε μόνο 2 ΔΕΓ, ένα επαγόμενο (*PIWIL2*) και ένα κατεσταλμένο (*PP7080*) (Εικ. 4.50Γ).



Εικ. 4.50 (Α) ΡCΑ διάγραμμα και (Β) ιεραρχική συσταδοποίηση με Ευκλείδεια απόσταση δείχνουν ότι συνδρομικές (σΟΚΚ) και σποραδικές ΟΚΚ δε σχηματίζουν διακριτά clusters σε αντίθεση με το ΟΘΕ. (Γ) Scatter plots με τα 2 ΔΕΓ που προέκυψαν από τη σύγκριση σΟΚΚ vs ΟΚΚ, όπου η τιμή πάνω από τη γραμμή αντιστοιχεί στο padjusted κάθε γονιδίου.

Οι Εικ. 4.51 και 4.52 παρουσιάζουν με τη μορφή heatmap και scatter plots παραδείγματα ΔΕΓ που ήταν κοινά ανάμεσα στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ. Μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων στους 2 υπότυπους ΟΚΚ αναγνωρίστηκε ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της επιδερμίδας και του δέρματος, όπως αυτά που θεωρούνται χαρακτηριστικά των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας (epidermal keratinocyte-specific genes),⁴⁴⁷ π.χ., τα WFDC5, GPR87 και GPR115. Επίσης, στη σποραδική και στη συνδρομική ΟΚΚ επάγονταν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη κερατινοκυττάρων, διαφοροποίηση των στους οποίους περιλαμβάνονταν ο TP63 και οι μεταγραφικοί παράγοντες-στόχοι του ZNF750 και KLF4,³⁸⁹ τα μέλη της οικογένειας grainyhead like transcription factor GRHL1, GRHL2, GRHL3, και της forkhead οικογένειας FOXE1 και FOXN1, οι μεταγραφικοί παράγοντες ELF3, GLI1, HES1, IRF6, MAFF, OVOL1,³⁶⁹ καθώς και ο SOX21, ο οποίος θεωρείται και ως δείκτης αδαμαντινοβλαστικής διαφοροποίησης.468 Αντίθετα, πολλά κρίσιμα γονίδια για την οδοντογένεση, κυρίως χαρακτηριστικά του οδοντικού μεσεγχύματος (dental mesenchyme-specific genes),⁴⁶⁹ όπως τα DLX2, LEF1, LHX6, LHX8, MSX1, καταστέλλονταν και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ. Πολλά από τα κοινά ΔΕΓ μεταξύ των δύο υποτύπων ΟΚΚ σχετίζονταν, επίσης, με την οργάνωση της ΕΘΟ και την προσκόλληση κυττάρων ή κυττάρων-ΕΘΟ, όπως ήταν τα επαγόμενα γονίδια CD44, COL10A1, HAS3, HYAL1, LGI3, MUC4, SDC1 και SDC4, και τα κατεσταλμένα γονίδια LOX, LOXL2, POSTN, RELN και TIMP2. Ακόμα, στα κοινά επαγόμενα γονίδια αναγνωρίστηκαν πολλά γονίδια που σχετίζονταν με μεταβολικά μονοπάτια, όπως τα ALOX12B, CYP2C19, GGT6, GPX2, PLA2G4D, PLA2G4E και RRM1. Γονίδια που προάγουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα, π.χ., ERBB2, PLXNB1, SEMA4D and SPP1, επάγονταν, ενώ γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην οστεογένεση και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, π.χ., IGF1, IGFBP3, IGFBP5, IRS1, PTH1R, PTHLH, SEMA3A, SFRP1 και SATB2, ήταν κατεσταλμένα και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ.

Ανάμεσα στα κορυφαία επαγόμενα γονίδια και των δύο υποτύπων ΟΚΚ, αναγνωρίστηκε ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 (Εικ. 4.49), που είναι ένας από τους κύριους δείκτες βλαστοκυττάρων και από τα 4 βασικά γονίδια (POUF51/OCT4, SOX2, KLF4, MYC) τα οποία έχουν προταθεί από τους Takahashi και Yamanaka⁴⁰⁰ πώς εμπλέκονται στη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, δηλαδή της αποδιαφοροποίησης των σωματικών κυττάρων και της επακόλουθης μετατροπής τους σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs).^{400, 430} Εκτός από το SOX2, και το KLF4 επάγονταν και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ (Εικ. 4.51, 4.52), το ΜΥC επαγόταν μόνο στη συνδρομική ΟΚΚ (Εικ. 4.52), ενώ αντίθετα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του POUF51/OCT4 παρατηρήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις ΟΚΚ, καθώς και στα ΟΘΕ (Εικ. 4.53). Άλλα ενδεικτικά πρώιμων σταδίων κυτταρικού ευρήματα επαναπρογραμματισμού, σύμφωνα иε πειράματα επαναπρογραμματισμού ινοβλαστών ποντικών προς iPSCs.430, 470, 471 που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη στους δύο υπότυπους ΟΚΚ ήταν η επαγωγή του γονιδίου CDH1, και η καταστολή δεικτών EMT, όπως τα SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2, ZEB2, μελών της σηματοδοτικής οδού του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor β, TGF-β), όπως τα TGFB2 και TGFB3, καθώς και του γονιδίου ΤΗΥ1, που θεωρείται δείκτης σχετιζόμενος με τις ινοβλάστες (Εικ. 4.51, 4.52). Επίσης, επάγονταν οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF6 και OVOL1, οι οποίοι πρόσφατα αποδείχθηκε πως αποτελούν μέλη ενός ρυθμιστικού δικτύου απαραίτητου για τον επαναπρογραμματισμό των ινοβλαστών και των ηπατοκυττάρων ποντικών σε iPSCs.⁴¹¹ Επιπλέον, μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων παρατηρήθηκαν και άλλα γονίδια που έχουν συσχετισθεί με διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, 470, 472 όπως τα CLDN4, EPCAM, ESRP1, EZH2, HOPX, MARVELD2 και OCLN, καθώς και το γονίδιο TACSTD2, που θεωρείται δείκτης ενός κυτταρικού πληθυσμού σε ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού προς iPSCs.⁴¹² Αντίθετα, κρίσιμα γονίδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, όπως τα NANOG και LIN28A,470 είχαν πολύ χαμηλή έκφραση στα περισσότερα δείγματα της μελέτης (Εικ. 4.53). Τέλος, στα κοινά επαγόμενα γονίδια και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ περιλαμβάνονταν και δείκτες των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (embryonic stem cells, ESCs),⁴³¹ όπως τα EPHA1, SCNN1A και CLDN7 (Εικ. 4.51, 4.52).



Εικ. 4.51 (A) Heatmap με ΔΕΓ στη σποραδική ΟΚΚ vs ΟΘΕ τα οποία σχετίζονται με διαφορετικές βιολογικές διεργασίες, κάθε μία εκ των οποίων συμβολίζεται με άλλο χρώμα. Γονίδια που σχετίζονται με >1 διεργασίες συνοδεύονται αστερίσκο/ους στο χρώμα των επιπλέον διεργασιών. Τα γονίδια που είναι με μπλε χρώμα ανιχνεύθηκαν ως ΔΕΓ μόνο στη σποραδική και όχι στη συνδρομική ΟΚΚ. Τα γονίδια που είναι bold απεικονίζονται ως Scatter plots στο (B), όπου η τιμή πάνω από τη γραμμή αντιστοιχεί στο p-adjusted κάθε γονιδίου.



Εικ. 4.52 Αντίστοιχη εικόνα με την Εικ. 4.51, με τα ίδια γονίδια που βρέθηκαν ως διαφορικώς εκφραζόμενα στη συνδρομική ΟΚΚ vs ΟΘΕ. (Α) Στο Heatmap κάθε βιολογική διεργασία συμβολίζεται με άλλο χρώμα και γονίδια που σχετίζονται με >1 διεργασίες συνοδεύονται από αστερίσκο/ους στο χρώμα των επιπλέον διεργασιών. Τα γονίδια που είναι με μπλέ χρώμα ανιχνεύθηκαν ως ΔΕΓ μόνο στη συνδρομική και όχι στη σποραδική ΟΚΚ. Τα γονίδια που είναι bold απεικονίζονται ως Scatter plots στο (B), όπου η τιμή πάνω από τη γραμμή αντιστοιχεί στο p-adjusted κάθε γονιδίου.



Εικ. 4.53 Scatter plots που απεικονίζουν τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων κρίσιμων για τη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, τα οποία δεν ήταν διαφορικώς εκφραζόμενα ούτε (Α) στη σποραδική ΟΚΚ, ούτε (Β) στη συνδρομική ΟΚΚ. Η τιμή πάνω από τη γραμμή αντιστοιχεί στο p-adjusted κάθε γονιδίου. Όπως φαίνεται στο (Α), το p-adjusted για το POU5F1 στη σποραδική ΟΚΚ ήταν <0,05. Ωστόσο, το log₂FC ήταν <1, γι' αυτό και το POU5F1 δεν ανήκε στα ΔΕΓ.

Επίσης, έγινε οπτικοποίηση της στοίχισης επιλεγμένων γονιδίων στην αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (hq19) μέσω της εφαρμογής Integrative Genomics Viewer (IGV), $^{236, 237}$ με την οποία τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων απεικονίζονται ως ραβδογράμματα που αντιστοιχίζονται σε συντεταγμένες χρωμοσωμάτων (Εικ. 4.54-4.56). Στην Εικ. 4.54 απεικονίζονται τα γονίδια GRHL3, IRF6, TFAP2A και TP63, που έχουν βρεθεί να εκφράζονται στο επιφανειακό εξώδερμα⁴⁶⁴ ή περίδερμα⁴⁶⁵ και να εμπλέκονται στην κρανιοπροσωπική ανάπτυξη,⁴⁷³ τα οποία επάγονταν στη σποραδική και στη συνδρομική ΟΚΚ, συγκριτικά με την ομάδα του ΟΘΕ. Στην Εικ. 4.55 αντιστοιχίζονται στο γονιδίωμα αναφοράς τα γονίδια CDH1, KLF4, OVOL1 και TACSTD2, τα οποία έχουν συσχετισθεί με τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό^{400,} 411, 412 και επάγονταν και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ. Τέλος, στην Εικ. 4.56 γίνεται οπτικοποίηση του γονιδίου SOX21, που εμπλέκεται στην επιδερμική διαφοροποίηση θεωρείται δείκτης και αδαμαντινοβλαστών,468 το οποίο επαγόταν στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ, καθώς και των κατεσταλμένων γονιδίων LEF1, LHX8 και MSX1 που είναι χαρακτηριστικά του οδοντικού μεσεγχύματος.469

	chr1:24,637,062-24,682,188	chr1:209,958,967-209,979,520	chr6:10,394,168-10,409,803	chr3:189,483,816-189,628,574
	chr1:24.645.846-24.690,972	chr1:209,958,967-209,979,520	chr6:10,396,909-10,420,293	chv3:189,314,534-189,615,068
OØE1	[p - 49	(p - 49)	(p - 4g	p- 49
OØE2	(2-39)	p-34	p-34	p-34
O@E3	p-53	p-53	p-53	p-53
OØE4	[P-37]	p-sn d d d d a sud	p-3ŋ	
OØE5	[P - 47]	p- 47	p- 47	p- 47
OØE6	p-sq	[p-39]	p-36	
OKK1	Part and the second sec	ARTHA . A shide the Mit and and I shall	P-29 AL AMA ANA ALLA ALLA ALLA ALLA	
OKK2	(P-67)	P-m	p-67j	
ОККЗ	P-39	William I what to so it it about at the she		
ОКК4	15-14 Carling Without Without Without a second s	THE R. LEWIS CO., LANSING MICH.		
OKK5	p-sq		p-59	P-59 Hits Hill Miller Hitself, or his set 1 hitse
OKK6	P-19 harderengter Historie ander	Mary Jack Hard Street	p-43	P-49
σΟΚΚ1	P-19 Buildeline of the build of the build	Party and a stand work of the lines	p-49	p-49
σΟΚΚ2	p-61 be rate that we have the stand of the stand		p-61	p-69
σΟΚΚ3	p-ss	Property and a second day of the second day of t	p-sq	
σΟΚΚ4	p-say	Reality of the second		
σΟΚΚ5	() () () () () () () () () () () () () (and the second second second second		
σΟΚΚ6	p-sq	Million and a second state and a finance to be	p-ss	P-39 Black Bills Bills and Bills and Bills
hg19	↓→ ↓ →→ ↓→ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ GRHL3	IRF6	TFAP2A	└────────────────────────────────────
1				

Εικ. 4.54 Οπτικοποίηση της στοίχισης των GRHL3 και IRF6 στο χρωμόσωμα 1, του TFAP2A στο χρωμόσωμα 10, και του TP63 στο χρωμόσωμα 3 με βάση την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (hg19) μέσω της εφαρμογής IGV (OΘE: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, OKK: οδοντογενής κερατινοκύστη, σOKK: συνδρομική OKK).

	chr16:68,766,872-68,850,066	chr9:110,245,528-110,253,653	chr11:65,551,840-65,567,378	chr1:59,040,222-59,043,807
	chr 16:68.771.194-68,869,440	chr9:110.247,132-110.252.050	chr11:65,554,533-65,564,685	chr1:59,041,104-59,042,924
00E1	p-49	p-49	p- 49	p- 49
OØE2	p-39	p-34	p-39	p-3g
O@E3	p-sa	p-53	p-53	p-53
O@E4	p-37)	[P-37]	p - 37]	p-37]
OBE5	p-t]	p-+7	p-47	p- 47]
OØE6	p-38	0-36	p-36	p-36
ОКК1			P-29 L., MARINE LEAST ALL AND A LARSE LA	p-23
OKK2	P-97	p-67	p-67]	p-67j
ОККЗ	P-39 to be the second state of the first state of the second state	p-34	p-34	p-39
ОКК4		p-19	P-19	(D- 16)
OKK5		P-59	p-ssj	p-ss
OKK6		p-49	p-43	p- 43
σΟΚΚ1	P-9 Index Constant of the second seco		p-19	p- 49
σΟΚΚ2		P-69	p-69	p-69
σΟΚΚ3	p-sa	p-sq	p-sa	p-39
σΟΚΚ4	10- 10 ما فراد به معرف المائين المائين المائين المائين المائين المائين (C-	p-33	p-32	p-32
σΟΚΚ5	0-29 Additional to the state of	p-29	p-23	p-29
σΟΚΚ6	P-39 minu bility of and the second se	p-39	p-33	p- 38j
hg19	$ \qquad $			TACSTD2

Εικ. 4.55 Οπτικοποίηση της στοίχισης του CDH1 στο χρωμόσωμα 16, του KLF4 στο χρωμόσωμα 9, του OVOL1 στο χρωμόσωμα 11, και του TACSTD2 στο χρωμόσωμα 1 με βάση την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (hg19) μέσω της εφαρμογής IGV (OΘE: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, OKK: οδοντογενής κερατινοκύστη, σOKK: συνδρομική OKK).



Εικ. 4.56 Οπτικοποίηση της στοίχισης του SOX21 στο χρωμόσωμα 13, των LEF1 και MSX1 στο χρωμόσωμα 4, και του LHX8 στο χρωμόσωμα 1 με βάση την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (hg19) μέσω της εφαρμογής IGV (ΟΘΕ: οδοντοθυλάκιο εγκλείστου, ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική ΟΚΚ).

4.4.7.3. Ανάλυση εμπλουτισμού

Όπως αναμενόταν με βάση το μεγάλο αριθμό κοινών ΔΕΓ μεταξύ της συνδρομικής ΟΚΚ (vs OΘE) και της σποραδικής ΟΚΚ (vs OΘE), η λειτουργική ανάλυση ανέδειξε πολλές γονιδιακές οντολογίες και KEGG pathways που ήταν εμπλουτισμένες και στους δύο υπότυπους της ΟΚΚ.

1η γενιά - Ανάλυση υπερεκπροσώπησης

Παρόμοια με τη σποραδική ΟΚΚ, τα επαγόμενα γονίδια της συνδρομικής ΟΚΚ ομαδοποιούνται κυρίως σε γονιδιακές οντολογίες που αφορούσαν στην ανάπτυξη της επιδερμίδας ή δέρματος (epidermis development, GO:0008544, skin development, GO:0043588), στη διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων (epidermal cell GO:0009913) ή κερατινοκυττάρων (keratinocyte differentiation, differentiation, GO:0030216), και τη διαδικασία της κερατινοποίησης (cornification, GO:0070268, και keratinization, GO:0031424), στις διασυνδέσεις πεπτιδίων (peptide cross-linking, GO:0018149), στην ομοιοστασία του ύδατος (water homeostasis, GO:0030104, regulation of water loss via skin, GO:0033561) και στο σχηματισμό του δερματικού φραγμού (establishment of skin barrier, GO:0061436) (Εικ. 4.57). Επίσης, και μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων της συνδρομικής ΟΚΚ παρατηρήθηκαν κοινές εμπλουτισμένες γονιδιακές οντολογίες με τη σποραδική ΟΚΚ, οι κυριότερες εκ των οποίων αναφέρονταν στην οργάνωση της ΕΘΟ (extracellular matrix organization, GO:0030198, extracellular structure organization, GO:0043062), στην προσκόλληση κυττάρων-EΘO (cell-substrate adhesion, GO:0031589, cell-matrix adhesion, GO:0007160), στην οργάνωση και το μεταβολισμό του κολλαγόνου (collagen fibril organization, GO:0030199, collagen metabolic process, GO:0032963), στην οστεοποίηση και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (ossification, GO:0001503, bone development, osteoblast differentiation, GO:0001649), καθώς και στην οδοντογένεση (odontogenesis, GO:0042476) (Εικ. 4.57). Σημαντικές ομοιότητες διαπιστώθηκαν και στα εμπλουτισμένα KEGG pathways, όπως ήταν οι συνάψεις των επιθηλιακών κυττάρων (Tight junction, hsa04530) και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation, hsa00190) μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων, και τα μονοπάτια που σχετίζονταν με την ΕΘΟ (ECM-receptor interaction, hsa04512) και την προσκόλληση των κυττάρων (Focal adhesion, hsa04510) μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων της συνδρομικής ΟΚΚ (Εικ. 4.58).



Εικ. 4.57 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει 10 από τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες που ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων και στη σποραδική ΟΚΚ (vs OΘE) και στη συνδρομική ΟΚΚ (vs OΘE). Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο gene ratio, δηλαδή ένα κλάσμα k/n, όπου k είναι ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στη συγκεκριμένη οντολογία και n τα γονίδια που εντάχθηκαν έστω σε μία οντολογία (η τιμή του n αναγράφεται στην παρένθεση στο κάτω μέρος της εικόνας και ισχύει ότι το n<συνολικών επαγόμενων ή κατεσταλμένων γονιδίων). Το χρώμα της κουκίδας αντιστοιχεί στο -log₁₀p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.



Εικ. 4.58 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει 7 από τα κορυφαία KEGG pathways που ήταν εμπλουτισμένα μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων και στη σποραδική OKK (vs OΘE) και στη συνδρομική OKK (vs OΘE). Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο gene ratio, δηλαδή ένα κλάσμα k/n, όπου k είναι ο αριθμός των γονιδίων που εντάσσονταν στο συγκεκριμένο pathway και n τα γονίδια που εντάχθηκαν έστω σε ένα KEGG pathway (η τιμή του n αναγράφεται στην παρένθεση στο κάτω μέρος της εικόνας και ισχύει ότι το n<συνολικών επαγόμενων ή κατεσταλμένων γονιδίων). Το χρώμα της κουκίδας αντιστοιχεί στο -log10p-adjusted της ανάλυσης εμπλουτισμού.

2η γενιά - Ανάλυση λειτουργικής κατηγορίας

Αντίστοιχα με τις ομοιότητες που παρατηρήθηκαν με την μεταξύ της συνδρομικής και της σποραδικής ΟΚΚ με την 1^η γενιά βιοπληροφορικής ανάλυσης, η μέθοδος GSEA επίσης έδειξε πως οι κύριες γονιδιακές οντολογίες και τα υπερεκπροσωπημένα μεταξύ των ΔΕΓ KEGG μονοπάτια εμφάνιζαν παρόμοια επίπεδα εμπλουτισμού στους 2 υπότυπους της ΟΚΚ. Συγκεκριμένα, 10 από τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες που ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων της σποραδικής ΟΚΚ βρέθηκαν σημαντικά εμπλουτισμένες και στη σποραδική ΟΚΚ. Αυτές αφορούσαν στην ανάπτυξη και την ομοιοστασία της επιδερμίδας και του δέρματος (epidermis development, GO:0008544, skin development, GO:0043588, peptide cross-linking, GO:0018149, water homeostasis, GO:0030104), στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων [fatty acid (derivative) metabolic process, GO:1901568 και GO:0006631] και σε διεργασίες της ανοσιακής απάντησης (humoral immune response, GO:0006959, granulocyte activation, GO:0036230, lymphocyte mediated immunity, GO:0002449) (Εικ. 4.59). Επίσης, όπως στη σποραδική ΟΚΚ, τα κατεσταλμένα γονίδια της συνδρομικής ΟΚΚ σχετίζονταν σε σημαντικό βαθμό με τις οντολογίες cyclic nucleotide metabolic process (GO:0009187) και roof of mouth development (GO:0060021) (Еік. 4.59).

Ομοιότητες μεταξύ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ παρατηρήθηκαν και στα εμπλουτισμένα KEGG pathways, τα οποία μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων σχετίζονταν κυρίως με το μεταβολισμό (π.χ., Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, hsa00980, Arachidonic acid metabolism, hsa00590), την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation, hsa00190), τις κυτταρικές συνάψεις (Tight junction, hsa04530) και τον κυτταρικό κύκλο (Cell cycle, hsa04110), ενώ ένα κοινό στη συνδρομική και σποραδική ΟΚΚ μονοπάτι υπερεκπροσωπημένο μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων αφορούσε στις χολινεργικές συνάψεις (Cholinergic synapse, hsa04725) (Εικ. 4.60).

Τέλος, στην Εικ. 4.61 παρουσιάζονται παραδείγματα του Enrichment Score για εμπλουτισμένες γονιδιακές οντολογίες και KEGG μονοπάτια στη συνδρομική ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ.


Εικ. 4.59 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει 10 από τις κορυφαίες γονιδιακές οντολογίες μεταξύ των επαγόμενων και 2 μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων που ήταν κοινές στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ σύμφωνα με τη GSEA. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο Normalized Enriched Score (NES) και το χρώμα της κουκίδας στο p-adjusted της GSEA.



Εικ. 4.60 Διάγραμμα dotplot που απεικονίζει τα κορυφαία 10 KEGG pathways μεταξύ των επαγόμενων και των κατεσταλμένων γονιδίων που ήταν κοινά στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ σύμφωνα με τη GSEA. Το μέγεθος της κουκκίδας αντιστοιχεί στο Normalized Enriched Score (NES) και το χρώμα της κουκίδας στο p-adjusted της GSEA.



Εικ. 4.61 Απεικόνιση του Enrichment Score σε δύο γονιδιακές οντολογίες (πάνω) και δύο KEGG μονοπάτια (κάτω) που ήταν εμπλουτισμένα στη συνδρομική ΟΚΚ σε σχέση με το ΟΘΕ. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στα γονίδια, ταξινομημένα από αριστερά προς τα δεξιά με φθίνουσα σειρά log₂FC. Τα κόκκινα πλαίσια συμβολίζουν κορυφαία επαγόμενα γονίδια και το μπλε πλαίσιο κορυφαία κατεσταλμένα γονίδια.

3η γενιά - Ανάλυση τοπολογίας μονοπατιού

Παρόμοια αποτελέσματα με τη σποραδική ΟΚΚ προέκυψαν και με την πρόγραμμα SPIA που ανέδειξε ανάλυση uε το ως κύριο υπερεκπροσωπημένο και σημαντικά διαταραγμένο μεταξύ των ΔΕΓ της συνδρομικής ΟΚΚ το μονοπάτι της αλληλεπίδρασης της ΕΘΟ με τον υποδοχέα της ECM-receptor interaction, hsa04512), το οποίο ήταν ανεσταλμένο (Εικ. 4.62). Επίσης απενεργοποιημένο ήταν το μονοπάτι των κυτταρικών συνάψεων (Tight junction, hsa04530), ενώ το μονοπάτι της γλουταμινεργικής σύναψης (Glutamatergic synapse, hsa04724) ήταν και στη συνδρομική ΟΚΚ ενεργοποιημένο (Εικ. 4.62).



Εικ. 4.62 Διάγραμμα αμφίδρομων στοιχείων (two-way evidence plot) των μονοπατιών που υπερεκπροσωπούνται σημαντικά μεταξύ των ΔΕΓ στη σποραδική ΟΚΚ και παράλληλα εμφανίζουν σημαντική διατάραξη στη γονιδιακή έκφραση σε όλη την τοπολογία τους, δηλαδή και σε ανώτερα (upstream) και σε κατώτερα (downstream) γονίδια του κάθε μονοπατιού. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα μονοπάτι. Ο χ-άξονας δείχνει τα στοιχεία υπερεκπροσώπησης και ο y-άξονας τα στοιχεία διατάραξης. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιστοιχούν σε μονοπάτια που είναι σημαντικά (p<0.05) υπερεκπροσωπημένα και διαταραγμένα μετά από 2 στατιστικές διορθώσεις (Bonferroni correction και FDR correction), ενώ τα μπλε μετά από μία (FDR correction). Οι κάθετες μπλε και κόκκινες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα όρια της μίας ή των δύο στατιστικών διορθώσεων μόνο για την υπερεκπροσώπηση ή τη διατάραξη, αντίστοιχα.

4.4.8. Ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων

Με σκοπό να προβλεφθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που επέδρασαν σημαντικά στο πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζει την ΟΚΚ, έγινε ανάλυση με το εργαλείο ISMARA το οποίο προβλέπει τα μοτίβα, δηλαδή τις αλληλουχίες βάσεων με υψηλή συγγένεια για πρόσδεση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων γύρω από τους υποκινητές των ΔΕΓ.^{163, 165} Δεδομένης της μεγάλης επικάλυψης των ΔΕΓ μεταξύ σποραδικών και συνδρομικών ΟΚΚ, τα περισσότερα μοτίβα που αναγνωρίστηκαν από το ISMARA ήταν κοινά στους δύο υπότυπους ΟΚΚ (Εικ. 4.63).

Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων που προβλέφθηκε πως ρύθμισαν την γονιδιακή έκφραση των επαγόμενων γονιδίων, μεγαλύτερη επίδραση βρέθηκε για το μοτίβο του ZEB1 (Εικ. 4.63), ο οποίος, όπως φαίνεται στο ρυθμιστικό δίκτυο της Εικ. 4.64, επηρεάζει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της επιδερμίδας και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, όπως οι *ELF3, FOXN1, IRF6* και *OVOL1,* και μεταξύ των πολυάριθμων γονιδίων στόχων του αναγνωρίζονται πολλά γονίδια σχετιζόμενα με την επιδερμική διαφοροποίηση, όπως τα *DSP, JUP, OCLN, S100A8, TGM1* κα. (Εικ. 4.65). Άλλα μοτίβα που προβλέφθηκε πως ρύθμισαν τα επαγόμενα γονίδια ανήκαν σε μεταγραφικούς παράγοντες με γνωστό ρόλο στην ανάπτυξη της επιδερμίδας, όπως του *GRHL1* και του κύριου επιδερμικού ρυθμιστή *TP63,* καθώς και σε μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονταν με την ΕΜΤ, όπως οι *SNAI1, SNAI2* και *TWIST1*.

Αντίθετα, τα μοτίβα με τη μεγαλύτερη επίδραση που προβλέφθηκε πως ρύθμισαν τα κατεσταλμένα γονίδια ήταν κοινά για τους μεταγραφικούς παράγοντες MAZ, ZNF281 και GTF2F1, ενώ αρκετά από τα μοτίβα που αναγνωρίστηκε από το ISMARA ότι συμμετείχαν στη ρύθμιση των κατεσταλμένων γονιδίων ανήκαν σε μέλη της οικογένειας των ρυθμιστικών παραγόντων της ιντερφερόνης (interferon regulatory factors, IRF), π.χ., IRF1, IRF2, IRF7, IRF8, και της οικογένειας του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription, STAT), π.χ., STAT1, STAT2, STAT3 (Εικ. 4.63).



Εικ. 4.63 Ραβδόγραμμα στο οποίο το μέγεθος της ράβδου αντιστοιχεί στην απόλυτη τιμή του z-score που υπολογίστηκε από το ISMARA και περιγράφει τη δραστικότητα του μοτίβου του αντίστοιχου μεταγραφικού παράγοντα στα ΔΕΓ. Τα μοτίβα με zscore>0 ή <0 ανήκαν σε μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετείχαν στη ρύθμιση των επαγόμενων ή των κατεσταλμένων γονιδίων, αντίστοιχα.



Εικ. 4.64 (Α) Δίκτυο μεταγραφικής ρύθμισης. Για κάθε κεντρικό μοτίβο (εν προκειμένου αυτό που αντιστοιχεί στον ZEB1 μεταγραφικό παράγοντα) ελέγχεται από το ISMARA η λίστα με τα προβλεπόμενα γονίδια στόχους τους για να ανιχνευτούν οι αλληλουχίες άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι σχηματίζεται ένα δίκτυο στο οποίο τα κόκκινα βέλη δηλώνουν πως ο μεταγραφικός παράγοντας στον οποίο αντιστοιχεί το κεντρικό μοτίβο ρυθμίζει το μεταγραφικό παράγοντα στο μοτίβο του οποίου καταλήγει το βέλος. Αντίστοιχα, τα μπλε βέλη δείχνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας στον οποίο αντιστοιχεί το κεντρικό μοτίβο ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα, από το μοτίβου του οποίου ξεκινά το βέλος. Όσο πιο έντονο είναι το χρώμα του βέλους τόσο πιο ισχυρός στόχος θεωρείται ο μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζεται. (Β) Λογότυπο αλληλουχίας του προτύπου σύνδεσης στο μοτίβο του μεταγραφικού παράγοντα ΖΕΒ1. Στις θέσεις 4-8 παρατηρούνται συντηρημένες περιοχές και στις θέσεις 1-3 μεταβλητές.



Εικ. 4.65 Δίκτυο συσχετίσεων μεταξύ των γονιδιακών στόχων του μεταγραφικού παράγοντα ZEB1 σύμφωνα με τη διαδικτυακή βάση STRING, που αναπαριστά πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Κάθε κόμβος αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο και οι ακμές που ενώνουν δύο γονίδια αντιστοιχούν σε μεταξύ τους γνωστές λειτουργικές σχέσεις ή αλληλεπιδράσεις. Όσο πιο πολλές ακμές ενώνουν δύο γονίδια τόσο περισσότερα δεδομένα τεκμηριώνουν τη μεταξύ τους σχέση. Για παράδειγμα, ανάμεσα στα γονίδια στόχους του ZEB1 αναγνωρίστηκαν πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην επιδερμική διαφοροποίηση, όπως τα DSP, JUP, OCLN, S100A8, TGM1 (υπογραμμισμένα γονίδια).

4.4.9. Έλεγχος επικάλυψης με microarray GSE38494

Αποσκοπώντας στο να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με το μεταγράφωμα της ΟΚΚ, έγινε έλεγχος της επικάλυψης των ΔΕΓ που προέκυψαν από το RNA-seq στη σποραδική ΟΚΚ vs ΟΘΕ και αυτών στη συνδρομική ΟΚΚ vs ΟΘΕ με τα ΔΕΓ που προήλθαν από τη μοναδική προηγούμενη μελέτη μικροσυστοιχιών⁸⁶ που χρησιμοποίησε ολικό ιστό ΟΚΚ και συνέκρινε το μεταγράφωμά της με αυτό του αδαμαντινοβλαστώματος (Εικ. 4.66).



Εικ. 4.66 Upset plot που απεικονίζει των αριθμό των επικαλυπτόμενων γονιδίων ανάμεσα στις λίστες με τα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που προέκυψαν από τη σύγκριση σποραδικής ΟΚΚ vs ΟΘΕ και συνδρομικής ΟΚΚ (σΟΚΚ) vs ΟΘΕ με την RNAseq ανάλυση της παρούσας μελέτης και από τη σύγκριση σποραδικής ΟΚΚ vs αδαμαντινοβλάστωμα (AM) με τη μέθοδο μικροσυστοιχιών προηγούμενης μελέτης⁸⁶. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι αριθμοί των γονιδίων που ανήκαν μόνο σε μία λίστα.

Από τα 1396 επαγόμενα γονίδια στην ΟΚΚ στη μελέτη μικροσυστοιχιών, τα 665 επάγονταν και στη σποραδική ΟΚΚ και συνδρομική ΟΚΚ (σΟΚΚ) σύμφωνα με την RNA-seq ανάλυση (Εικ. Μ1, κόκκινο), ενώ επιπλέον 98 επαγόμενα γονίδια της μελέτης μικροσυστοιχιών επάγονταν στην ΟΚΚ ή στη σΟΚΚ της παρούσας μελέτης (Εικ. 4.66, πορτοκαλί). Από τα 1605 κατεσταλμένα γονίδια στην ΟΚΚ στη μελέτη μικροσυστοιχιών, τα 235 καταστέλλονταν και στους δύο υπότυπους της ΟΚΚ αυτής της μελέτης (Εικ. 4.66, μπλε), ενώ 116 κατεσταλμένα γονίδια στην ΟΚΚ σύμφωνα με την εργασία με μικροσυστοιχίες βρέθηκαν κατεσταλμένα και σε έναν από τους δύο υπότυπους ΟΚΚ με την RNA-seq ανάλυση (Εικ. 4.66, γαλάζιο). Τέλος, μόνο 41 γονίδια επάγονταν στην ΟΚΚ σύμφωνα με τις μικροσυστοιχίες και καταστέλλονταν σύμφωνα με το RNA-seq, ή αντίστροφα (Εικ. 4.66, μαύρο).

Τα επίπεδα της επαγωγής των 665 κοινών επαγόμενων γονιδίων εμφάνιζαν ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών της σύγκρισης OKK vs OΘE και αυτών της σOKK vs OΘE (συντελεστής Spearman=0,98, p=0,000), μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών της σύγκρισης OKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,62, p=2,97E-72) και μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων της σύγκρισης σOKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,62, p=2,97E-72) και μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων της σύγκρισης σOKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,63, p=1,02E-75) (Εικ. 4.67). Μεταξύ των γονιδίων με μεγάλη επαγωγή (log₂FC>6) και στις 3 συγκρίσεις ήταν τα ADH7, ALDH3A1, CALM5, PI3, PLAC8 και TMPRSS11B (Εικ. 4.68). Επίσης, μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων στις 2 μελέτες ήταν τα ογκογονίδια MAP3K9, PRSS3, SAPCD2 και TMEM45B.

Ανάλογος έλεγχος για τα 235 κοινά κατεσταλμένα γονίδια έδειξε μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών της σύγκρισης OKK vs OΘE και της σOKK vs OΘE (συντελεστής Spearman=0,69, p=5E-35), μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ των κατεσταλμένων γονίδιων της σύγκρισης OKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,34, p=1,15E-07) και μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών της σύγκρισης σOKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,24, p=1,15E-07) και μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών της σύγκρισης σOKK vs OΘE και αυτών της OKK vs AM (συντελεστής Spearman=0,27, p=0,000) στα επίπεδα της καταστολής τους (Εικ. 4.67). Τα γονίδια ANGPTL7, LRRTM2, MYEF2, PCDH8, PCOLC2 και SFRP1 ήταν μεταξύ αυτών με μεγάλη καταστολή (log₂FC<-2,5) και στις 3 συγκρίσεις (Εικ. 4.69).



Εικ. 4.67 Heatmaps που απεικονίζουν το συντελεστή συσχέτισης Spearman ανάμεσα στις τιμές του log₂FC για τα κοινά επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια που προέκυψαν από το RNA-seq και τη μελέτη μικροσυστοιχιών.⁸⁶



Εικ. 4.68 Bubble plot με το log₂FC των κοινών επαγόμενων γονιδίων στη σποραδική OKK vs OOE (άξονας χ), συνδρομική OKK vs OOE (άξονας ψ) και σποραδική OKK vs AM⁸⁶(χρώμα κύκλου). Τα γονίδια με μεγάλη επαγωγή (log₂FC>6) και στις 3 συγκρίσεις εντοπίζονταν στο άνω δεξί τμήμα του διαγράμματος ως πιο ανοιχτόχρωμοι κύκλοι.



Εικ. 4.69 Bubble plot με το log₂FC των κοινών κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική OKK vs OΘE (άξονας χ), συνδρομική OKK vs OΘE (άξονας ψ) και σποραδική OKK vs AM⁸⁶ (χρώμα κύκλου). Τα γονίδια με μεγάλη καταστολή (log₂FC<-2,5) και στις 3 συγκρίσεις εντοπίζονταν στο κάτω αριστερό τμήμα του διαγράμματος ως πιο σκουρόχρωμοι κύκλοι.

Τέλος, με το πρόγραμμα Enrichr (version 2021),^{271, 272} έγινε ανάλυση υπερεκπροσώπησης για τα 763 επαγόμενα και 351 κατεσταλμένα γονίδια που ήταν διαφορικώς εκφραζόμενα με κοινή κατεύθυνση επαγωγής στην παρούσα μελέτη (σε μία ή και στις δύο συγκρίσεις OKK vs OΘE, σOKK vs OΘE) και στη μελέτη μικροσυστοιχιών.⁸⁶ Στην Εικ. 4.70 παρουσιάζονται οι 10 κορυφαίες (με βάση το combined score) γονιδιακές οντολογίες και τα 10 πρώτα KEGG μονοπάτια που ήταν εμπλουτισμένα μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων. Μεταξύ αυτών υπερίσχυαν οικογένειες γονιδίων που σχετίζονταν με την ανάπτυξη της επιδερμίδας και του δέρματος και με μεταβολικές οδούς (Εικ. 4.70). Μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων βρέθηκαν σημαντικά εμπλουτισμένες μόνο δύο γονιδιακές οντολογίες [negative regulation of morphogenesis of an epithelium (combined score: 518,26), regulation of extracellular matrix organization (combined score: 47,86)].



Εικ. 4.70 Υπερεκπροσωπημένες (Α) γονιδιακές οντολογίες και (Β) ΚΕGG μονοπάτια μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων στην ΟΚΚ της παρούσας μελέτης και της μελέτης μικροσυστοιχιών.⁸⁶

Retinol metabolism -

PPAR signaling pathway -

2,5

2.0

1,5

Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 -

Pentose phosphate pathway -

4.4.10. qPCR

Πραγματοποιήθηκε PCR σε πραγματικό χρόνο με κατάλληλους εκκινητές για 9 γονίδια-στόχους και το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) GAPDH, με στόχο να επιβεβαιωθεί το πρότυπο επαγωγής των γονιδίων στην ΟΚΚ, το οποίο είχε παρατηρηθεί με την RNA-seq μέθοδο. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την ομοιοστασία της επιδερμίδας, όπως τα ALDH3A1, GRHL3 και TP63, τα οποία εκφράζονται στο επιφανειακό εξώδερμα⁴⁶⁴ ή το περίδερμα που καλύπτει την αναπτυσσόμενη επιδερμίδα,465 και το SERPINB3, το οποίο εκφράζεται καλυπτικό επιθήλιο και συμμετέχει στην διατήρηση της στο επιθηλιακής ακεραιότητας μέσω της ανοσιακής απόκρισης.474 Επίσης, υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ATP12A, EPCAM, FETUB, OVOL1, και TACSTD2, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τις λειτουργίες των βλαστοκυττάρων και τη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. 411, 412, 475, 476

Τα επίπεδα επαγωγής (Fold Induction) των γονιδίων-στόχων στην ΟΚΚ συγκριτικά με το ΟΘΕ υπολογίστηκαν με βάση τον αριθμό των κύκλων της PCR που απαιτούνταν ώστε η συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου να φτάσει σε ανιχνεύσιμη ένταση φθορισμού, δηλαδή σε επίπεδα που το σήμα φθορισμού της να υπερβεί το σήμα από το «θόρυβο» της αντίδρασης (κατώφλι ή threshold). Στις Εικ. 4.71-4.74 παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης της αντίδρασης της PCR σε πραγματικό χρόνο, με τις οποίες επιβεβαιώθηκε το πρότυπο επαγωγής των 9 γονιδίων που είχε παρατηρηθεί με την τεχνική RNA-seq. Ο x-άξονας αντιστοιχεί στον των κύκλων της αντίδρασης και ο γ-άξονας αριθμό στο κανονικοποιημένο σήμα φθορισμού. Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στο κατώφλι, δηλαδή στο κατώτερο όριο που το σήμα φθορισμού γίνεται ανιχνεύσιμο. Όπως φαίνεται στις Εικ. 4.71-4.74, στους κύκλους 3-18 το προϊόν της αντίδρασης δεν έχει αυξηθεί επαρκώς και το σήμα φθορισμού είναι ελάχιστο, ισοδύναμο με το «θόρυβο» υποβάθρου της αντίδρασης, και θεωρείται ως επίπεδο αναφοράς (baseline). Στους αμέσως επόμενους κύκλους, η καμπύλη της αντίδρασης αυξάνεται εκθετικά (εκθετική φάση). Ο κύκλος στον οποίο η καμπύλη της αντίδρασης τέμνει το κατώφλι (Ct) εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του γονιδίου-στόχου στο δείγμα και αποτελεί τη βασική μονάδα ποσοτικοποίησης στην qPCR. Ακολουθεί η γραμμική φάση, κατά την οποία μειώνεται η κλίση της καμπύλης, καθώς αρχίζει η εξάντληση των αντιδραστηρίων και η συσσώρευση αναστολέων. Τέλος, επέρχεται η στατική φάση ή φάση plateu, στην οποία δεν παρατηρείται μεταβολή του αριθμού των μορίων του προϊόντος (Εικ. 4.71-4.74).



Εικ. 4.71 Καμπύλη ενίσχυσης για τα ALDH3A1, ATP12A και το housekeeping gene GAPDH. Οι κόκκινες ενδείξεις αντιστοιχούν στην ΟΚΚ, οι μπλε στο ΟΘΕ και οι μαύρες στο ddH₂O. Το Fold Induction = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για τα ALDH3A1 και ATP12A ήταν 125,37 και 7,94, αντίστοιχα. Στο ddH₂O το σήμα φθορισμού ήταν ανιχνεύσιμο μετά τους 28 κύκλους.



Εικ. 4.72 Καμπύλη ενίσχυσης για τα SERPINB3, OVOL1 και το housekeeping gene GAPDH. Οι κόκκινες ενδείξεις αντιστοιχούν στην ΟΚΚ, οι μπλε στο ΟΘΕ και οι μαύρες στο ddH₂O. Το Fold Induction = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για τα SERPINB3 και OVOL1 ήταν 1,26 και 9,13, αντίστοιχα. Στο ddH₂O το σήμα φθορισμού ήταν ανιχνεύσιμο μετά τους 28 κύκλους.



Εικ. 4.73 Καμπύλη ενίσχυσης για τα GRHL3, FETUB και το housekeeping gene GAPDH. Οι κόκκινες ενδείξεις αντιστοιχούν στην ΟΚΚ, οι μπλε στο ΟΘΕ και οι μαύρες στο ddH₂O. Το Fold Induction = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για τα GRHL3 και FETUB ήταν 14,83 και 1,48, αντίστοιχα. Στο ddH₂O το σήμα φθορισμού ήταν ανιχνεύσιμο μετά τους 28 κύκλους.



Εικ. 4.74 Καμπύλη ενίσχυσης για τα TACSTD2, EPCAM, TP63 και το housekeeping gene GAPDH. Οι κόκκινες ενδείξεις αντιστοιχούν στην OKK, οι μπλε στο OOE και οι μαύρες στο ddH₂O. To Fold Induction = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για τα TACSTD2, EPCAM, και TP63 ήταν 1160,07, 7,06, και 2,01, αντίστοιχα. Στο ddH₂O το σήμα φθορισμού ήταν ανιχνεύσιμο μετά τους 28 κύκλους.

Επίσης, έγινε ποιοτικός έλεγχος των τελικών προϊόντων της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων με βάση τον κλιμακωτό δείκτη μοριακών βαρών (Ladder) (Εικ. 4.75-4.78).



Εικ. 4.75 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα ALDH3A1, ATP12A και το housekeeping gene GAPDH.



Εικ. 4.76 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα SERPINB3, OVOL1 και το housekeeping gene GAPDH.



Εικ. 4.77 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα FETUB, GRHL3 και το housekeeping gene GAPDH.



Εικ. 4.78 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα TACSTD2, EPCAM, TP63 και το housekeeping gene GAPDH.

4.4.11. Ανοσοϊστοχημεία

Προκειμένου να επαληθευτούν τα αποτελέσματα της RNA-seq μεθόδου σε επίπεδο πρωτεΐνης και να χαρτογραφηθεί η έκφραση των επιλεγμένων μορίων, έγινε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τα ακόλουθα 7 μόρια που συμμετέχουν στην επιδερμική διαφοροποίηση ή/και έχουν συσχετισθεί με τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό:^{389, 400, 411, 412, 430} p63, SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TROP2 και E-cadherin. Η έκφραση των μορίων αξιολογήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα του κυστικού επιθηλίου των σποραδικών και συνδρομικών OKK και στα νησίδια οδοντογενούς επιθηλίου στα OΘE, εφαρμόζοντας μία ημιποσοτική μέθοδο⁴³⁴ με βάση το γινόμενο της έκτασης και της έντασης χρώσης.

Στην Εικ. 4.79 φαίνεται η κοινή εντόπιση της έκφρασης όλων των μορίων στο επιθήλιο της ίδιας περίπτωσης σποραδικής ΟΚΚ. Ίδιο πρότυπο χρώσης με το κυστικό επιθήλιο παρατηρήθηκε στις δορυφόρες κύστεις και τα επιθηλιακά νησίδια εντός του κυστικού τοιχώματος για όλα τα μόρια (Εικ. 4.80-4.86). Το πρότυπο έκφρασης όλων των μορίων ήταν όμοιο στη σποραδική και στη συνδρομική ΟΚΚ και είχε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Η πρωτεΐνη p63 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε >50% των κυττάρων (score 6) της βασικής στιβάδας και των ενδιάμεσων στιβάδων της ΟΚΚ, ενώ σπάνια παρατηρήθηκε έκφραση σε κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας (Εικ. 4.80).
- Η πρωτεΐνη SOX2 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε >50% των κυττάρων (score 6) της βασικής στιβάδας και των ενδιάμεσων στιβάδων της ΟΚΚ, η οποία απουσίαζε από τα κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας. Επίσης, σε ινοβλάστες του τοιχώματος παρατηρήθηκε έκφραση της SOX2 που δεν αξιολογήθηκε λόγω κυτταροπλασματικής εντόπισης (Εικ. 4.81).
- Η πρωτεΐνη KLF4 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε >50% των κυττάρων (score 6) του κυστικού επιθηλίου της ΟΚΚ, κυρίως στις ενδιάμεσες στιβάδες, αλλά σπάνια στην επιφανειακή στιβάδα. Αντίθετα, ασθενής έκφραση σημειώθηκε σε μεμονωμένα κύτταρα της βασικής στιβάδας (Εικ. 4.82).
- Η πρωτεΐνη OVOL1 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε >50% των κυττάρων (score 6) ή μέτριας έντασης έκφραση σε <50% των κυττάρων (score 2) της βασικής στιβάδας και των ενδιάμεσων

στιβάδων της ΟΚΚ, ενώ σπάνια παρατηρήθηκε έκφραση σε κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας (Εικ. 4.83).

- Η πρωτεΐνη IRF6 εμφάνιζε μέτριας έντασης (score 4) ή ισχυρή (score 6) κυτταροπλασματική έκφραση σε >50% των κυττάρων της βασικής στιβάδας και των ενδιάμεσων στιβάδων της ΟΚΚ, αλλά όχι στην επιφανειακή στιβάδα, ενώ σε μεμονωμένα κύτταρα παρατηρήθηκε και πυρηνική έκφραση (Εικ. 4.84).
- Η πρωτεΐνη TROP2 εμφάνιζε ισχυρή μεμβρανική έκφραση σε >50% των κυττάρων (score 6) του κυστικού επιθηλίου της OKK, η οποία παρατηρήθηκε κυρίως στις ενδιάμεσες στιβάδες, αλλά απουσίαζε από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας, ενώ στα κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας η χρώση ήταν κυτταροπλασματική και δεν αξιολογήθηκε (Εικ. 4.85).
- Η πρωτεΐνη E-cadherin εμφάνιζε ισχυρή μεμβρανική έκφραση σε
 >50% των κυττάρων (score 6) στα κύτταρα της βασικής στιβάδας και κυρίως των ενδιάμεσων επιθηλιακών στιβάδων της ΟΚΚ, ενώ σπάνια παρατηρήθηκε μεμβρανική έκφραση σε κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας (Εικ. 4.86).

Η έκφραση των 7 μορίων στα ΟΘΕ είχε τα εξής χαρακτηριστικά (Εικ. 4.87):

- Η πρωτεΐνη p63 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε >50% των επιθηλιακών κυττάρων (score 6) στα οδοντογενή νησίδια.
- Η πρωτεϊνη SOX2 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση κατά κανόνα σε <50% (score 3) και σε μία περίπτωση σε >50% (score 6) των επιθηλιακών κυττάρων στα οδοντογενή νησίδια. SOX2 έκφραση παρατηρήθηκε κυρίως στα περιφερικά κύτταρα των νησιδίων και λιγότερο στα κεντρικά κύτταρα. Επιθηλιακά κύτταρα με κυτταροπλασματική SOX2 έκφραση δεν αξιολογήθηκαν ως θετικά.
- Η πρωτεΐνη KLF4 εμφάνιζε ασθενή έως ισχυρή πυρηνική έκφραση σε <50% των επιθηλιακών κυττάρων (score 1-3) στα οδοντογενή νησίδια.
- Η πρωτεΐνη OVOL1 εμφάνιζε ισχυρή πυρηνική έκφραση σε <50% (score 3) ή >50% (score 6) των επιθηλιακών κυττάρων στα οδοντογενή νησίδια.
- Η πρωτεΐνη IRF6 εμφάνιζε κατά κανόνα μέτριας έντασης κυτταροπλασματική έκφραση σε <50% (score 2) ή >50% (score 4) των επιθηλιακών κυττάρων στα οδοντογενή νησίδια, ενώ σε

μεμονωμένα κύτταρα η έκφραση ήταν πυρηνική. Σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε ισχυρή κυτταροπλασματική έκφραση σε >50% (score 6) των επιθηλιακών κυττάρων.

- Η πρωτεΐνη TROP2 εμφάνιζε ισχυρή μεμβρανική έκφραση σε >50%
 των επιθηλιακών κυττάρων (score 6) στα οδοντογενή νησίδια.
- Η πρωτεΐνη E-cadherin εμφάνιζε ισχυρή μεμβρανική έκφραση σε
 >50% των επιθηλιακών κυττάρων (score 6) στα οδοντογενή νησίδια.

Στην Εικ. 4.88 απεικονίζεται συγκριτικά η έκφραση όλων των μορίων στη σποραδική ΟΚΚ, τη συνδρομική ΟΚΚ και το ΟΘΕ. Επίσης, στην Εικ. 4.89 παρουσιάζονται οι αρνητικοί μάρτυρες της μελέτης, με τη χρήση ισοτυπικών ίδιας τάξης με τα πρωτογενή αντισώματα. Σημαντική διαφορά στην ανοσοϊστοχημική έκφραση μεταξύ των περιπτώσεων ΟΚΚ (σποραδικών ή συνδρομικών) και των ΟΘΕ παρατηρήθηκε στα μόρια SOX2 και KLF4, τα οποία εκφράζονταν με ισχυρή ένταση στο μεγαλύτερο μέρος των επιθηλιακών κυττάρων στην ΟΚΚ (score 6 σε όλες τις περιπτώσεις), ενώ σε μικρότερο ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων ή/και με ασθενέστερη ένταση στα ΟΘΕ (score<6 στην πλειοψηφία των περιπτώσεων). Η διαφορά αυτή ανιχνεύθηκε με τη στατιστική δοκιμασία Fisher exact test, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το p<0,05. Στον Πίνακα 4.16 και στην Εικ. 4.90 παρουσιάζεται το τελικό score με βάση το γινόμενο έντασης και έκτασης χρώσης που έλαβε κάθε περίπτωση, και στον Πίνακα 4.17 παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των περιπτώσεων με βάση το αν έλαβαν ή όχι το μέγιστο score έκφρασης (δηλαδή 1^η κατηγορία: περιπτώσεις με score 6, 2^η κατηγορία: περιπτώσεις με score 1-5), η οποία χρησιμοποιήθηκε στη στατιστική δοκιμασία Fisher exact test.



Εικ. 4.79 Κοινή εντόπιση της έκφρασης όλων των μορίων στο επιθήλιο της ίδιας περίπτωσης σποραδικής ΟΚΚ, που απεικονίζεται στην 1^η εικόνα σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E). Κλίμακα: 500μm.



Εικ. 4.80 p63 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Ισχυρή πυρηνική έκφραση στο κυστικό επιθήλιο, τις (Α) δορυφόρες κύστεις, τα επιθηλιακά νησίδια και (Β) τις θέσεις με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding). Κλίμακα: 100μm.



Εικ. 4.81 SOX2 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Όμοιο πρότυπο ισχυρής πυρηνικής έκφρασης με το κυστικό επιθήλιο και στις (Α) δορυφόρες κύστεις, (Α, Β) τα επιθηλιακά νησίδια και (Β) τις θέσεις με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding). Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.



Εικ. 4.82 ΚLF4 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Ισχυρή πυρηνική έκφραση σε όλη την έκταση των ενδιάμεσων στιβάδων και ασθενής εστιακή έκφραση στη βασική στιβάδα. Όμοιο πρότυπο έκφρασης στο κυστικό επιθήλιο, (A) τα επιθηλιακά νησίδια και τις (B) θέσεις με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding). Κλίμακα: 50μm.



Εικ. 4.83 OVOL1 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Όμοιο πρότυπο ισχυρής πυρηνικής έκφρασης στο κυστικό επιθήλιο και στις (Α) δορυφόρες κύστεις, τα επιθηλιακά νησίδια και (Β) τις θέσεις με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding). Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.



Εικ. 4.84 IRF6 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Διάχυτη κυτταροπλασματική και εστιακά πυρηνική έκφραση, με όμοιο πρότυπο έκφρασης στο κυστικό επιθήλιο και στα (Α) επιθηλιακά νησίδια εντός του κυστικού τοιχώματος. (Β) Η IRF6 έκφραση ήταν ισχυρή στη βασική και τις ενδιάμεσες στιβάδες, αλλά απουσίαζε από την επιφανειακή στιβάδα με την κυματοειδή επιφάνεια. Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.



Εικ. 4.85 TROP2 ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Ισχυρή μεμβρανική έκφραση στις ενδιάμεσες στιβάδες στο κυστικό επιθήλιο, τις δορυφόρες κύστεις και τα επιθηλιακά νησίδια. Τα βέλη δείχνουν την απουσία έκφρασης στη βασική στιβάδα σε (Α) θέσεις υπερπλαστικού επιθηλίου και (Β) στα επιθηλιακά νησίδια. Κλίμακα: 100μm.



Εικ. 4.86 E-cadherin ανοσοϊστοχημική έκφραση στην ΟΚΚ. Ισχυρή μεμβρανική έκφραση στο κυστικό επιθήλιο, (Α) τα επιθηλιακά νησίδια και (Β) τις θέσεις με επιθηλιακές εκβλαστήσεις (budding). Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 50μm.



Εικ. 4.87 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των 7 μορίων στα νησίδια οδοντογενούς επιθηλίου στα ΟΘΕ, που απεικονίζονται στην 1^η εικόνα σε χρώση αιματοξυλίνηςηωσίνης (H&E). Κλίμακα: 25μm.



Εικ. 4.88 Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των 7 μορίων στο επιθήλιο σποραδικών και συνδρομικών ΟΚΚ και τα νησίδια οδοντογενούς επιθηλίου στα ΟΘΕ. Μαύρη κλίμακα: 100μm, κόκκινη κλίμακα: 25μm.



Εικ. 4.89 Εικόνες των ισοτυπικών που αντικατέστησαν τα πρωτογενή αντισώματα ως αρνητικοί μάρτυρες σε περιπτώσεις ΟΚΚ. Κλίμακα: 500μm.

	p63	SOX2	KLF4	OVOL1	IRF6	TROP2	E-cadherin
OKK-1	6	6	6	6	4	6	6
OKK-2	6	6	6	2	4	6	6
OKK-3	6	6	6	2	6	6	6
OKK-4	6	6	6	6	6	6	6
OKK-5	6	6	6	2	4	6	6
OKK-6	6	6	6	2	6	6	6
σΟΚΚ-1	6	6	6	2	6	6	6
σΟΚΚ-2	6	6	6	2	6	6	6
σΟΚΚ-3	6	6	6	6	4	6	6
σΟΚΚ-4	6	6	6	6	6	6	6
σΟΚΚ-5	6	6	6	2	4	6	6
σΟΚΚ-6	6	6	6	6	6	6	6
00E-1	6	3	1	3	2	6	6
OΘE-2	6	3	1	3	4	6	6
OOE-3	6	3	2	6	6	6	6
00E-4	6	6	3	6	4	6	6
00E-5	6	3	1	3	6	6	6
OΘE-6	6	3	2	3	2	6	6

Πίνακας 4.16 Τελικό score* ανά περίπτωση μελέτης.

*Επεξήγηση τιμής τελικού score:

- score 1: ασθενής ένταση σε <50% των επιθηλιακών κυττάρων
- score 2: μέτρια ένταση σε <50% των επιθηλιακών κυττάρων**
- score 3: ισχυρή ένταση σε <50% των επιθηλιακών κυττάρων
- score 4: μέτρια ένταση σε>50% των επιθηλιακών κυττάρων
- score 6: ισχυρή ένταση σε >50% των επιθηλιακών κυττάρων

**Όλες οι περιπτώσεις που έλαβαν score 2 είχαν μέτρια ένταση σε <50% των κυττάρων. Δεν υπήρχε περίπτωση με ασθενή ένταση σε >50% των κυττάρων, που επίσης θα αντιστοιχούσε σε score 2.



Εικ. 4.90 Σύγκριση των τιμών τελικού score μεταξύ των ΟΚΚ, σποραδικών ή συνδρομικών (σΟΚΚ) και των ΟΘΕ με τη στατιστική δοκιμασία Fisher exact test. ns=not significant (p>0,05), *p=0,0007, **p=0,0001

Πίνακας 4.17	Κατηγοριοποίηση	των	περιπτώσεων	μελέτης	με	βάση	την	τιμή
του τελικού sc	ore.							

	Τελικό	p63	SOX2	KLF4	OVOL1	IRF6	TROP2	E-cadherin
	σκορ							
ОКК/	0-5	0	0	0	7	5	0	0
σΟΚΚ					(58 <i>,</i> 3%)	(41,7%)		
	6	12	12	12	5	7	12	12
		(100%)	(100%)	(100%)	(41,7%)	(58,3%)	(100%)	(100%)
ΟΘΕ	0-5	0	5	6	4	4	0	0
			(83 <i>,</i> 3%)	(100%)	(66 <i>,</i> 7%)	(66,7%)		
	6	6	1	0	2	2	6	6
		(100%)	(16,7%)		(33,3%)	(33,3%)	(100%)	(100%)

4.5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε για πρώτη φορά το ολικό μεταγράφωμα της ΟΚΚ εφαρμόζοντας την τεχνική της RNA-seq, η οποία αποτελεί τη μόνη από τις μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους που παρέχει σφαιρική εικόνα του είδους και της ποσότητας των μεταγράφων σε επίπεδο κυττάρων ή ιστών. Η RNA-seq μπορεί να ανιχνεύσει νέα γονίδια, υπερτερώντας συγκριτικά με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, η οποία εντοπίζει προκαθορισμένα γονίδια με βάση τις αλληλουχίες των εκκινητών που εφαρμόζονται. Επίσης, τα δεδομένα που προκύπτουν από την RNA-seg μπορεί να αξιοποιηθούν για την ανάλυση των γονιδιακών οντολογιών και των σηματοδοτικών οδών, η ενεργοποίηση των οποίων συμβάλλει στη διαμόρφωση ενός συγκεκριμένου αναπτυξιακού σταδίου ń μίας παθολογικής κατάστασης.^{173, 175, 189}

Ολικός ιστός της ΟΚΚ ως πειραματική ομάδα

Επιλέχθηκε να αναλυθεί το μεταγράφωμα του ολικού ιστού της ΟΚΚ, λαμβάνοντας υπόψη τις επικρατούσες θεωρίες, σύμφωνα με τις οποίες και το επενδυτικό επιθήλιο και το κυστικό τοίχωμα συμμετέχουν στην παθογένεια και τη βιολογική της συμπεριφορά.^{63, 95} Το επιθήλιο της ΟΚΚ παρουσιάζει τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που ταυτοποιούν την οντότητα, η διαμόρφωση των οποίων, ωστόσο, εξαρτάται από την παρουσία του κυστικού τοιχώματος.63, 101 Το επενδυτικό επιθήλιο υπερεκφράζει δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁴⁷⁷ και ένζυμα που συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό, με τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα να παρατηρείται στα επιθηλιακά κύτταρα που γειτνιάζουν με τις ινοβλάστες του τοιχώματος,^{67, 109} οι οποίες μετά από ειδική χρώση στο πολωμένο φως εμφανίζουν ένα πρότυπο οργάνωσης ανάλογο των οδοντογενών όγκων. Επίσης, προφλεγμονώδεις ουσίες που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα διεγείρουν τον καταρράκτη της φλεγμονής στο κυστικό τοίχωμα, που επάγει την οστεοκλαστογένεση στην ΟΚΚ.⁹⁷

ΟΘΕ ως κατάλληλη ομάδα ελέγχου

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της RNA-seq αποσκοπεί πρωτίστως στον προσδιορισμό των γονιδίων με διαφορική έκφραση μεταξύ ομάδων δειγμάτων με διακριτά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα

φυσιολογικό και παθολογικό φαινότυπος.^{175, 234} Η συγκριτική φύση της ανάλυσης επισημαίνει τη σημασία που έχει η επιλογή της κατάλληλης ομάδας ελέγχου, η οποία θα παρέχει τα βασικά επίπεδα έκφρασης για τον υπολογισμό των ΔΕΓ. Στην παρούσα μελέτη, ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκε το ΟΘΕ, το οποίο συνδυάζει πολλαπλά στοιχεία που το καθιστούν κατάλληλο, φυσιολογικό μάρτυρα για την ΟΚΚ: α) είναι ιστός, που αποτελείται από οδοντογενής επιθηλιακά και μεσεγχυματικά στοιχεία, όπως η ΟΚΚ, β) εντοπίζεται περιμυλικά εγκλείστων δοντιών, σε μία θέση στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί και η ΟΚΚ, και κυρίως γ) θεωρείται ως πηγή υπολειμμάτων της οδοντικής ταινίας (DLRs), από τα οποία, σύμφωνα με τις επικρατέστερες τρέχουσες απόψεις, προέρχεται η ΟΚΚ.^{11, 40, 77} Το ΟΘΕ έχει χρησιμοποιηθεί ως ομάδα ελέγχου της ΟΚΚ σε πολλές έρευνες, κυρίως με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.^{144, 320-323} Οι προηγούμενες μελέτες μεταγραφώματος της ΟΚΚ χρησιμοποίησαν διαφορετικές ομάδες ελέγχου, συγκεκριμένα το αδαμαντινοβλάστωμα,⁸⁶ επιθηλιακούς ή μεσεγχυματικούς πληθυσμούς που διαφοροποιούνται κατά την οδοντογένεση στάδιο του κώδωνα (αδαμαντινοβλάστες, στο οδοντινοβλάστες),¹¹⁹ ή ινοβλάστες ούλων.³²⁷ Αυτές οι ομάδες μαρτύρων ανέδειξαν τους μοριακούς μηχανισμούς που διαφοροποιούν την ΟΚΚ από ένα οδοντογενές νεόπλασμα, ή που χαρακτηρίζουν κάποια επιμέρους επιθηλιακά ή μεσεγχυματικά της διαμερίσματα, αλλά δεν παρείχαν τη συνολική εικόνα του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης που διέπει την ανάπτυξη του κλινικοπαθολογικού φαινότυπου της ΟΚΚ.

Κατάλληλη επιλογή FFPE δειγμάτων

Το υλικό της μελέτης αποτελείτο από FFPE δείγματα, τα οποία ήταν αποθηκευμένα για έως 20 έτη. Σημαντικά πλεονεκτήματα των FFPE δειγμάτων είναι η δυνατότητα γνώσης των ιστοπαθολογικών στοιχείων των υπό μελέτη ιστών, η δυνατότητα συλλογής πληροφοριών από τη μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών από τους οποίους προήλθαν, και η ευκολία φύλαξή τους, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις θερμοκρασίας.^{288, 306} Η χρήση FFPE δειγμάτων ήταν επιβεβλημένη στην παρούσα μελέτη, καθώς η διάγνωση της ΟΚΚ τίθεται μετά από ιστοπαθολογική εξέταση και δεν μπορεί να προβλεφθεί κατά τη λήψη της βιοψίας, με εξαίρεση τις υποτροπιάζουσες περιπτώσεις και αυτές σε ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΣΒΚ. Οι τελευταίες, ωστόσο, αντιστοιχούν σε λιγότερο από το 10% των συνολικών ΟΚΚ³⁷ και
σύμφωνα με την αναδρομική μελέτη του αρχείου του Ιστοπαθολογικού Εργαστηρίου της Κλινικής Στοματολογίας και Νοσοκομειακής Οδοντιατρικής, Ε.Κ.Π.Α., αφορούσαν σε έως 2-3 περιπτώσεις από διαφορετικούς ασθενείς κάθε 3-5 χρόνια, γεγονός που θα καθιστούσε δυσχερή την προοπτική συλλογή του υλικού. Για την επιλογή των περιπτώσεων που μελετήθηκαν λήφθηκε υπόψη το χρονικό διάστημα μονιμοποίησης στη φορμόλη και εγκιβωτισμού στην παραφίνη, καθώς κατά τη διάρκειά τους συμβαίνουν μοριακές μεταβολές που οδηνούν σταδιακά στην αποδόμηση και τον κατακερματισμό του RNA σε μικρότερου μήκους θραύσματα. Κατά το χρόνο σχεδιασμού της παρούσας μελέτης (2018), το ανώτατο χρονικό διάστημα αποθήκευσης FFPE ιστών σε έρευνες που εφάρμοσαν τη μέθοδο RNA-seq σε >10 δείγματα ήταν τα 20 έτη,²⁹³ τα οποία ορίστηκαν ως το μέγιστο αποδεκτό χρονικό όριο αποθήκευσης των περιπτώσεων που επιλέχθηκαν. Τα τελευταία 4 χρόνια, ωστόσο, έχει αναφερθεί επιτυχής αλληλούχηση μεγάλου αριθμού FFPE δειγμάτων που διατηρήθηκαν για έως 23³⁰⁶ ή 32³⁰⁷ έτη, γεγονός που διευρύνει τις δυνατότητες χρήσης του παλαιού αρχειακού υλικού. Το χρονικό διάστημα μονιμοποίησης στη φορμόλη είναι διαθέσιμο σε ελάχιστες μελέτες με RNA-seq σε FFPE δείγματα, στις οποίες κυμαίνεται μεταξύ 1-3 ημερών.²⁹⁴ Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν ως ανώτατο όριο μονιμοποίησης οι 2 ημέρες, καθώς η παραμονή στη φορμόλη για ≥3 ημέρες έχει βρεθεί να αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο αποδόμησης του RNA.^{331, 332}

Επιτυχής εφαρμογή της RNA-seq σε FFPE δείγματα

Το πρώτο κρίσιμο στάδιο για την επιτυχή εφαρμογή της RNA-seq μεθόδου ήταν η απομόνωση του RNA, για την οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Valenica, California, USA) που θεωρείται αξιόπιστο για εφαρμογή στα FFPE δείγματα^{288, 307, 478} και έχει βρεθεί να υπερτερεί συγκριτικά με άλλα πρωτόκολλα συλλογής του RNA με τη μέθοδο της στήλης (columnbased protocols).³⁰³ Σημαντικό πειραματικό στάδιο του πρωτοκόλλου είναι η επώαση με πρωτεϊνάση Κ, η οποία συμβάλλει στην αντιστροφή των διασταυρούμενων δεσμών (cross-links) μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων που δημιουργούνται κατά τη μονιμοποίηση στη φορμόλη.²⁸⁴ Επίσης, η αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας παραφίνης περιφερικά του ιστού στον κύβο παραφίνης πριν τη λήψη των τομών, πιθανώς διευκόλυνε το αρχικό στάδιο της απομόνωσης του

RNA, που περιλάμβανε την πλήρη απομάκρυνση της παραφίνης με επώαση σε ειδικό διάλυμα.⁴⁷⁹

Από όλα τα δείγματα απομονώθηκε επαρκής ποσότητα RNA για την κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης, η συγκέντρωση του οποίου δε βρέθηκε να σχετίζεται με το χρόνο αποθήκευσης του δείγματος, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.^{293, 478} Στην επάρκεια του RNA που συλλέχθηκε πιθανώς συνέβαλε ο αριθμός των τομών που λήφθηκαν ανά περίπτωση, και αποφασίστηκε με βάση το εμβαδόν του ιστού.^{297, 480} Λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων της παρούσας μελέτης, λήφθηκαν 6-36 τομές ανά δείγμα, έτσι ώστε το συνολικό εμβαδόν επιφάνειας να είναι >250mm² ιστού. Οι περισσότερες μελέτες με RNA-seq σε FFPE δείγματα αφορούν κακοήθεις όγκους (Πίνακας 2.2) με μεγάλο κατά κανόνα μέγεθος, όπου 1 έως 7 τομές επαρκούν για την απομόνωση RNA.^{291, 295, 297, 303, 306} Το πάχος των τομών που λήφθηκαν ήταν 10μm, σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες.^{295, 297, 303, 306}

Η ποιοτική αξιολόγηση του RNA έγινε με βάση το βαθμό ακεραιότητάς του.^{290, 291, 306, 307} Πρωτίστως λήφθηκε υπόψη ο δείκτης DV100, ο οποίος αντιπροσωπεύει το ποσοστό θραυσμάτων RNA που έχουν μήκος >100bp και έχει βρεθεί πως σχετίζεται θετικά με το ποσοστό των αναγνωσμάτων των FFPE δειγμάτων που αντιστοιχίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα (mapped reads).³⁰⁷ Σύμφωνα με μία μελέτη που εφάρμοσε τη μέθοδο της RNA-seq σε 67 FFPE δείγματα αποθηκευμένα για 7-32 έτη, οι περιπτώσεις με DV100<40 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για μη ικανοποιητικά αποτελέσματα αλληλούχησης, με ποσοστό mapped reads <50%.³⁰⁷ Στην παρούσα μελέτη 24 περιπτώσεις είχαν DV100>40, ενώ σε 3 δείγματα το DV100 ήταν 22,35, 32,97 και 37,65. Ωστόσο, το ποσοστό των mapped reads υπερέβη το 50% σε όλες τις περιπτώσεις. Άλλοι ποιοτικοί δείκτες που εξετάστηκαν ήταν το DV200 και το DV50, που αντιπροσωπεύουν το ποσοστό θραυσμάτων RNA που έχουν μήκος >200bp και >50bp, αντίστοιχα, και ο δείκτης RIN. Ο τελευταίος δείκτης έχει εύρος τιμών 0-10 και η εφαρμογή του είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε νωπούς ιστούς, αλλά δε θεωρείται αξιόπιστη ένδειξη της ποιότητας του RNA που απομονώνεται από τα FFPE δείγματα, στα οποία συνήθως λαμβάνει τιμές <3,^{290, 292, 294, 297, 300, 307, 480} όπως και στην παρούσα μελέτη που το RIN κυμαινόταν μεταξύ 1,2 και 2,5 (διάμεση τιμή: 2). Το DV200 έχει προταθεί από την εταιρεία Illumina ως ένδειξη καλής ποιότητας του RNA από FFPE δείγματα όταν υπερβαίνει το 30.³⁴⁷ DV200>30 αναμένεται σε πρόσφατα (<2 έτη) αποθηκευμένους FFPE ιστούς,^{292, 294} ενώ σε παλαιότερα δείγματα παρατηρούνται συχνά χαμηλότερες τιμές,^{307, 478} χωρίς να αποτρέπουν την επιτυχή αλληλούχηση, όπως και στην παρούσα μελέτη που οι μισές περιπτώσεις είχαν DV200<30. Επίσης, συμφωνία με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας για πολυετές αρχειακό υλικό παρατηρήθηκε στην τιμή του DV50,³⁰⁷ που στην παρούσα μελέτη κυμαινόταν μεταξύ 65,75-99 (διάμεση τιμή: 91,5). Μεταξύ όλων των δεικτών ακεραιότητας του RNA, τα DV200 και DV100 είχαν τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τα ολικά reads, καθώς και τα mapped και τα uniquely mapped reads, η οποία ήταν πιο ισχυρή για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα έως 3 έτη.

Σημαντική παράμετρος επιτυχίας του πειράματος με τη μέθοδο της RNA-seq ήταν η κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης με το πρωτόκολλο του KAPA Stranded RNA-Seq Kit with RiboErase (KAPA Biosystems, Wilmington, MA). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο συνδυάζει την απομάκρυνση του rRNA μέσω πέψης με το ένζυμο RNase H, που υπερτερεί έναντι άλλων μεθόδων εξάντλησης rRNA στα FFPE δείνματα, 294, 301, 307, 481 και τη χρήση τυχαίων εξαμερών ως εκκινητές για τη σύνθεση του 1^{ου} κλώνου DNA, η οποία ενδείκνυται για το RNA των FFPE δειγμάτων που είναι κατακερματισμένο σε μικρού μήκους θραύσματα.^{292, 294, 305, 307, 316} Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, με εξαίρεση ότι, όπως σε προηγούμενες μελέτες,^{293, 299, 307, 481} παραλήφθηκε το στάδιο της θραυσματοποίησης του RNA, καθώς αυτό ήταν ήδη ως επί το πλείστον Επίσης, ο κατακερματισμένο σε τμήματα μήκους 100-200bp. προσδιορισμός του προσανατολισμού (sense/antisense) των δύο νεοσυντιθέμενων κλώνων του DNA (strand specific sequencing) κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης, καθώς και η αλληλούχηση από τα δύο άκρα κάθε θραύσματος (paired-end sequencing), αύξησαν την ακρίβεια της μοναδικής αντιστοίχισης των reads στο γονιδίωμα αναφοράς, ιδίως σε περιοχές των χρωμοσωμάτων με επικαλύψεις μεταξύ γονιδίων των αντίθετων κλώνων.^{207, 482}

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων επιβεβαιώθηκε με τη διεξαγωγή δύο κύκλων αλληλούχησης για 7 δείγματα σε 2 διαφορετικά μηχανήματα, οι οποίοι κατέληξαν σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό κοινών διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων. Προέκυψαν κατά μέσο όρο 19,3 εκατομμύρια paired-end reads/δείγμα, από τα οποία 73,5% reads/δείγμα αντιστοιχήθηκαν σε μία μοναδική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης συμφωνούν με αυτά προηγούμενων ερευνών που έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των reads που προέρχονται από FFPE ιστούς αντιστοιχίζεται σε ιντρόνια (60%), ενώ μικρότερο ποσοστό των αλληλουχιών αφορά συνήθως σε εξώνια (30%).^{291, 303, 307} Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης έγινε με συγκρινόμενες ομάδες αποτελούμενες από τουλάχιστον 3 περιπτώσεις, καθώς με βάση τα δημοσιευμένα αποτελέσματα ανάλυσης ισχύος (power analysis) με το RNASegPower στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιεί το μοντέλο της αρνητικής διωνυμικής κατανομής,²⁵⁴ η σύγκριση δύο ομάδων, με 3 δείγματα από διαφορετικό ασθενή ανά ομάδα, έχει 87% στατιστική ισχύ να ανιχνεύσει γονίδια με επαγωγή/καταστολή τουλάχιστον 2 φορές μεταξύ των ομάδων, στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%.²⁵⁵ Στις συγκρίσεις που συμπεριλαμβάνονται 6 περιπτώσεις ανά ομάδα, η στατιστική ισχύ υπερβαίνει το 98%.²⁵⁵ Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης έγινε με τον αλγόριθμο DESeq2, που έχει βρεθεί πως υπερέχει ως προς το συνδυασμό αληθώς θετικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, όταν σε κάθε συγκρινόμενη ομάδα περιλαμβάνονται <12 περιπτώσεις.²⁵²

Επικάλυψη μεταγραφώματος σποραδικής-συνδρομικής ΟΚΚ

Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης αποκάλυψε σημαντικό βαθμό επικάλυψης μεταξύ των γονιδίων με κοινό πρότυπο ρύθμισης (επαγωγής ή καταστολής) μεταξύ της σποραδικής και της συνδρομικής ΟΚΚ, όταν η κάθε μία υποομάδα συγκρίθηκε με το ΟΘΕ. Το εύρημα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, στην οποία αναπτύχθηκαν δύο κυτταρικές σειρές με καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων από μία σποραδική και μία συνδρομική ΟΚΚ, και με τη μέθοδο της Western Blot βρέθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών στους δύο υπότυπους της ΟΚΚ.483 Επίσης, σε πρωτεομική μελέτη παρατηρήθηκε παρόμοιο πρωτεϊνικό προφίλ ανάμεσα σε 4 σποραδικές και 1 συνδρομική ΟΚΚ συγκριτικά με το στοματικό βλεννογόνο.¹⁰⁸ Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η απευθείας σύγκριση του μεταγραφώματος της συνδρομικής και σποραδικής ΟΚΚ στην παρούσα μελέτη ανέδειξε μόνο ένα επαγόμενο (PIWIL2) και ένα κατεσταλμένο (PP7080) γονίδιο στο συνδρομικό υπότυπο. Το PIWIL2 ανήκει στην Argonaute οικογένεια που συμβάλλει στη διατήρηση της γονιδιακής μέσω ακεραιότητας ανασταλτικής δράσης στα ρετρομεταθετά στοιχεία, και εκφράζεται στα κερατινοκύτταρα της φυσιολογικής επιδερμίδας και στα επιθηλιακά κύτταρα του βασικοκυτταρικού καρκινώματος δέρματος.⁴⁸⁴ Το *PP708* είναι ένα μακρύ μη-κωδικό RNA (long non-coding RNA, IncRNA), η λειτουργία του οποίου δεν έχει πλήρως μελετηθεί, ενώ έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη κακοηθειών, όπως ήπατος και παχέος εντέρου.⁴⁸⁵ Τα δύο αυτά γονίδια, παρότι ήταν διαφορικώς εκφραζόμενα, εκφράζονταν και στη σποραδική και στη συνδρομική ΟΚΚ, γι' αυτό, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δε φαίνεται να έχουν διαγνωστικό ρόλο για τη διάκρισή τους.

Επικάλυψη μεταγραφώματος πρωτοπαθών-υποτροπών ΟΚΚ

Σημαντικός βαθμός επικάλυψης παρατηρήθηκε, επίσης, στα ΔΕΓ που προέκυψαν από τη σύγκριση των υποτροπών της σποραδικής ΟΚΚ με τα ΟΘΕ, και των πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ με τα ΟΘΕ. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες μεταγραφώματος με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, στις οποίες οι πρωτοπαθείς ΟΚΚ και οι υποτροπές ομαδοποιούνταν ιεραρχικά σε κοινές συστάδες (clusters).^{86, 119} Επισημαίνεται, επίσης, πως και η ανοσοϊστοχημική έκφραση κάποιων από τους πιο συχνά μελετημένους πρωτεϊνικούς δείκτες στην ΟΚΚ, π.χ. Ki-67,486,487 bcl-2,488 p53486 και Cyclin D1,486 δεν εμφάνιζε σημαντικές διαφορές μεταξύ των πρωτοπαθών περιπτώσεων και των υποτροπών.

μελέτη, από την απευθείας σύγκριση Στην παρούσα του μεταγραφώματος των υποτροπών και των πρωτοπαθών σποραδικών ΟΚΚ προέκυψαν μόνο 7 ΔΕΓ, συγκεκριμένα 4 επαγόμενα (EGFL6, GPRC5A, PAPPA, RMRP) και 3 κατεσταλμένα (KRT1, PEG10, PTGER3) γονίδια. Το EGFL6 αποτελεί μέλος της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της ΕΘΟ με αγγειογενετικές ιδιότητες.489 Το GPRC5A ανήκει στην οικογένεια των G protein-coupled receptors και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων με συστατικά της ΕΘΟ, όπως η φιμπρονεκτίνη και τα κολλαγόνα τύπου Ι και IV.⁴⁹⁰ Το PAPPA κωδικοποιεί μία εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεϊνάση, η οποία διασπά τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον αυξητικό παράγοντα που προσομοιάζει με ινσουλίνη (insulin-like growth factor, IGF), με αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα του

IGF και την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού που αυτός διαμεσολαβεί (IGF signaling pathway), η οποία σχετίζεται με την οστεογένεση.⁴⁹¹ Το *RMRP* είναι ένα long non-coding RNA που σχετίζεται με τη χονδρογενή διαφοροποιήση⁴⁹² και μεταλλάξεις του ενοχοποιούνται για την εμφάνιση μίας σπάνιας γενετικής διαταραχής, υποπλασίας χόνδρου-τριχών (Cartilage-hair hypoplasia της ń McKusick-type metaphyseal chondrodysplasia, OMIM 250250).⁴⁹³ H KRT1 ανήκει στις τύπου ΙΙ επιθηλιακές κερατίνες, θεωρείται δείκτης πρώιμης διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και η έκφρασή της παρατηρείται στις υπερβασικές επιθηλιακές στιβάδες.⁴⁹⁴ Το PEG10 ανήκει στην κατηγορία των αποτυπωμένων γονιδίων (imprinted genes), δηλαδή αυτών που εκφράζονται από ένα αλληλόμορφο, είτε μητρικό είτε πατρικό, και θεωρείται ογκογονίδιο σε πολλούς καρκίνους, όπως στον καρκίνο ήπατος, μαστού, προστάτη, αλλά και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στόματος, μέσω της επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αναστολής της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων.449 Το PTGER3 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη EP3 που αποτελεί ένα από τους τέσσερις υποδοχείς (EP1-4) της προσταγλανδίνης E2 (prostaglandin E2, PGE2), εκφράζεται στις οστεοβλάστες και διαμεσολαβεί την επαγόμενη από την PGE2 οστική απορρόφηση.⁴⁹⁵ Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διαλευκανθεί ο πιθανός ρόλος αυτών των γονιδίων στην υποτροπή της ΟΚΚ. Σημειώνεται πως η εμφάνιση υποτροπών επηρεάζεται από πολλούς κλινικοπαθολογικούς παράγοντες, όπως η ακτινογραφική εικόνα και ο τρόπος αντιμετώπισης,³⁹ οι οποίοι δεν ήταν διαθέσιμοι στην παρούσα μελέτη, και θα πρέπει να συνεκτιμηθούν σε μελλοντική μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την υποτροπή της ΟΚΚ.

Επαγωγή δεικτών επιδερμικής διαφοροποίησης

Σύμφωνα με την πρώτη και δεύτερη γενιά βιοπληροφορικής ανάλυσης, κορυφαίες εμπλουτισμένες γονιδιακές οντολογίες μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων στη σποραδική και στη συνδρομική ΟΚΚ ήταν αυτές που σχετίζονταν με την ανάπτυξη της επιδερμίδας, τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και τη διαμόρφωση του επιδερμικού φραγμού. Αυτές οι γονιδιακές οντολογίες ήταν εμπλουτισμένες και μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων της παρούσας μελέτης και της εργασίας που εξέτασε το μεταγραφικό προφίλ της ΟΚΚ συγκριτικά με αυτό του αδαμαντινοβλαστώματος με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών.⁸⁶ Το εύρημα αυτό υποδεικνύει πως, ανεξάρτητα με τη μέθοδο μεταγραφώματος και την ομάδα ελέγχου, η επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την επιδερμική διαφοροποίηση έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΚΚ. Αντίστοιχα, με την δικτύων ανάλυση μεταγραφικών με το πρόγραμμα ISMARA παρατηρήθηκε πως τα μοτίβα με σημαντική επίδραση στα επαγόμενα γονίδια της ΟΚΚ ανήκαν σε μεταγραφικούς παράγοντες με προεξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη της επιδερμίδας, όπως οι ZEB1,496 GRHL1497 και ο κύριος επιδερμικός μεταγραφικός ρυθμιστής TP63.³⁸⁹ Ο TP63 βρέθηκε, επίσης, στα επαγόμενα γονίδια στην ΟΚΚ με την τεχνική της RNA-seq, εύρημα που επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο qPCR. Επιπροσθέτως, με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο παρατηρήθηκε ισχυρή πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης p63 στη βασική στιβάδα, καθώς και στις ενδιάμεσες στιβάδες της ΟΚΚ, στις οποίες η παρουσία της p63 έχει θεωρηθεί ενδεικτική ατελούς επιθηλιακής ωρίμανσης.³⁹⁵ Άλλα ευρήματα που συνάδουν με την ατελή επιδερμική διαφοροποίηση ήταν η επαγωγή γονιδίων που εκφράζονται σε πρόδρομους επιθηλιακούς ιστούς, όπως στο επιφανειακό εξώδερμα (ALDH1A3, KRT8, KRT18, TFAP2A)⁴⁶⁴ και το περίδερμα που καλύπτει στα αρχικά στάδια την επιδερμίδα (GRHL3, *IRF6*, *SFN*),⁴⁶⁵ καθώς και δεικτών πρώιμης επιδερμικής διαφοροποίησης (IVL, KRT1, KRT10).^{389, 466} Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ μίας ατελούς ή τροποποιημένης πλακώδους διαφοροποίησης στο επιθήλιο της ΟΚΚ, που αντανακλάται στον ιστοπαθολογικό της φαινότυπο και, συγκεκριμένα, επιφανειακή παρακερατινοποίηση, στην σε αντιδιαστολή με την πλήρως διαφοροποιημένη, ορθοκερατινοποιημένη επιδερμίδα.

Επαγωγή δεικτών αδαμαντινοβλαστικής διαφοροποίησης

Η διαμόρφωση ενός επιδερμικού προτύπου σε μία οδοντογενή βλάβη θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με βάση την κοινή εμβρυολογική προέλευση της επιδερμίδας και του οδοντογενούς επιθηλίου από το επιφανειακό εξώδερμα, και τη συμμετοχή κοινής προέλευσης βλαστοκυττάρων και μεταγραφικών ρυθμιστών στην τελική διαφοροποίησή τους.^{498, 499} Ένας κοινός μεταγραφικός παράγοντας του δέρματος και του οδοντογενούς επιθηλίου είναι ο *SOX21*, ^{468, 499} που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη πως επάγεται στην OKK. Το *SOX21* αποτελεί γονίδιο-στόχο της σηματοδοτική οδού του Sonic Hedgehog,⁴⁶⁸ η ενεργοποίηση της οποίας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παθογένεια της ΟΚΚ.^{93, 94, 115} Σύμφωνα με πειράματα σε ποντίκια, η έκφραση του SOX21 προάγει την τελική διαφοροποίηση του εξωδέρματος προς οδοντογενές επιθήλιο, συγκεκριμένα με αδαμαντινοβλαστική μορφολογία, ενώ η καταστολή του SOX21 κατευθύνει τη διαφοροποίηση του εξωδέρματος προς τριχοθυλάκιο.468 То SOX21 θεωρείται δείκτης ειδικός της αδαμαντινοβλαστικής διαφοροποίησης,468 καθώς σε πειράματα στα ποντίκια έχει βρεθεί να εκφράζεται στις προαδαμαντινοβλάστες και αδαμαντινοβλάστες, αλλά όχι στο πρόδρομο οδοντικό επιθήλιο, στην ενδιάμεση στιβάδα του οργάνου της αδαμαντίνης, και στις οδοντινοβλάστες.⁵⁰⁰ Γι' αυτό η επαγωγή του SOX21 στην ΟΚΚ μπορεί να συσχετισθεί με τη μορφολογία των κυττάρων της βασικής στιβάδας του επιθηλίου που έχει υποστηριχθεί πως προσομοιάζουν τις προαδαμαντινοβλάστες του οργάνου της αδαμαντίνης.⁶³ Εκτός από το SOX21, στην παρούσα μελέτη στην ΟΚΚ επαγόταν και το ACPP, που σύμφωνα με single cell RNA-seq ανάλυση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών σε γομφίους ποντικού, αποτελεί, επίσης, ειδικό δείκτη αδαμαντινοβλαστών.501

Επαγωγή δεικτών στοματικού και οδοντογενούς επιθηλίου

Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν την επαγωγή του SOX2 είχε βρεθεί και σε προηγούμενη ΟΚΚ που στην εργασία μεταγραφώματος.⁸⁶ Ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 εκφράζεται στην οδοντική ταινία και στα υπολείμματά της,^{76, 77} που θεωρούνται πηγή προέλευσης της ΟΚΚ.¹¹ Επίσης, παρατηρήσαμε για πρώτη φορά την επαγωγή του ΡΙΤΧ1 στην ΟΚΚ, που πιθανώς συνηγορεί υπέρ της προέλευσής της από την οδοντική ταινία. Το PITX1 είναι ένα ομοιοτικό γονίδιο (homeobox gene), το οποίο έχει αποδειχθεί σε πειράματα σε έμβρυα ποντικού και καρχαρία πως η έκφρασή του στην οδοντική ταινία προηγείται της έναρξης σχηματισμού των δοντιών και διατηρείται έως το τέλος του σταδίου του κώδωνα, συγκεκριμένα στα κύτταρα του έσω και έξω αδαμαντινικού επιθηλίου που τελούν υπό αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού.^{502, 503} Επιπλέον, για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη περιγράφεται η μεγάλη επαγωγή του BARX2 (>175 φορές) στην ΟΚΚ. Το BARX2 είναι ένα ομοιοτικό γονίδιο που συμμετέχει στην κρανιοπροσωπική ανάπτυξη και, σύμφωνα με πειράματα σε έμβρυα ποντικού, εκφράζεται στο στοματικό επιθήλιο που επενδύει τις φατνιακές ακρολοφίες, ενώ η έκφρασή του

οδοντογενές επιθήλιο στο απουσιάζει από το στάδιο των οδοντοβλαστημάτων.^{504, 505} Ακόμα έχει παρατηρηθεί έκφραση του BARX2 στην επιδερμίδα και το τριχοθυλάκιο, καθώς και στο πλακώδες επιθήλιο της γλώσσας και του οισοφάγου στα ποντίκια.^{506, 507} Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης, το οποίο συμφωνεί με την προηγούμενη ανάλυση μεταγραφώματός με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών,⁸⁶ ήταν η επαγωγή του WNT7B στην OKK. Το WNT7B είναι μέλος της σηματοδοτικής οδού Wnt/β-catenin και σε πειραματικά μοντέλα εμβρύων ποντικού έχει βρεθεί πως εκφράζεται στο εξώδερμα⁵⁰⁸ επιφανειακό και στο στοματικό επιθήλιο που παρεμβάλλεται μεταξύ των περιοχών οδοντογενούς επιθηλίου στις μελλοντικές θέσεις των δοντιών, από τις οποίες απουσιάζει κατά το αρχικό στάδιο της οδοντογένεσης.⁵⁰⁹ Αντίθετα, εκφράζεται σε όλη την έκταση της οδοντικής ταινίας κατά το στάδιο των οδοντοβλαστημάτων και του καπέλου,⁵¹⁰ ενώ στο αρχικό στάδιο του κώδωνα εκφράζεται ασθενώς στις αδαμαντινοβλάστες και έντονα στις οδοντινοβλάστες. 510, 511 Έκφραση του WNT7B έχει παρατηρηθεί στη φυσιολογική επιδερμίδα, δέρμα και το τριχοθυλάκιο, καθώς και σε το βασικοκυτταρικά καρκινώματα δέρματος. 512, 513 Τα τελευταία δύο ευρήματα σχετικά με την επαγωγή των BARX2 και WNT7B στην OKK συνάδουν με τις υπερεκπροσωπημένες γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με την επιδερμική διαφοροποίηση, καθώς και με την πλακώδη διαφοροποίηση που χαρακτηρίζει το μεγαλύτερο τμήμα του κυστικού επιθηλίου. Περαιτέρω διερεύνηση ενδείκνυται για τον προσδιορισμό της τοπογραφικής εντόπισής τους στην ΟΚΚ και για την κατανόηση των μηχανισμών που επάγουν την έκφρασή τους.

Καταστολή δεικτών οδοντογενούς μεσεγχύματος

Δεδομένου ότι η τελική διαφοροποίηση του επιθηλίου σε όλους τους ιστούς εξωδερμικής προέλευσης επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων με το μεσέγχυμα,⁴⁹⁸ ο επιδερμικός φαινότυπος στο μεγαλύτερο τμήμα του επιθηλίου της ΟΚΚ πιθανώς σχετίζεται με ένα ασθενές οδοντογενές μεσεγχυματικό σήμα. Με την υπόθεσή αυτή συνάδει η υπερεκπροσώπηση της γονιδιακής οντολογίας της οδοντογένεσης μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ. Σε αυτά περιλαμβάνονταν γονίδια χαρακτηριστικά του οδοντογενούς μεσεγχύματος, όπως τα DLX2, LEF1, LHX6, LHX8, MSX1, η καταστολή των οποίων, σύμφωνα με in vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές οδοντικών μεσεγχυματικών κυττάρων ποντικών, συνδυάζεται με την απώλεια του δυναμικού οδοντογενούς διαφοροποίησης.⁴⁶⁹

Επαγωγή και καταστολή ρυθμιστών της ΕΘΟ

Ένα άλλο εύρημα που αναδείχτηκε και από τις τρεις γενιές βιοπληροφορικής ανάλυσης, ήταν η διαταραχή στην οργάνωση της ΕΘΟ στην ΟΚΚ. Συγκεκριμένα, οι γονιδιακές οντολογίες και τα KEGG μονοπάτια που σχετίζονται με την ΕΘΟ και με την προσκόλληση κυττάρων-ΕΘΟ ήταν υπερεκπροσωπημένα μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων στην ΟΚΚ, στοιχείο το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την αποκόλληση του κυστικού επιθηλίου από το τοίχωμα της βλάβης, που αποτελεί συχνό ιστοπαθολογικό της χαρακτηριστικό.⁶³ Σε αντίθεση με πολλά γονίδια που κωδικοποιούν μόρια κολλαγόνου, όπως τα COL3A1, COL6A6, COL9A2 και COL27A1 που ήταν κατεσταλμένα στην ΟΚΚ, σημαντική επαγωγή παρατηρήθηκε στο COL10A1. Το COL10A1 αποτελεί ογκογονίδιο με αυξημένη έκφραση του σε διάφορους καρκίνους και μειωμένη έκφραση σε φυσιολογικούς ιστούς, κυρίως στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα, το οποίο έχει συσχετισθεί με τη διαμόρφωση ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί την επέκταση των όγκων.^{514, 515} Η λίστα με τα επαγόμενα γονίδια που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ περιλάμβανε, επίσης, το LOXL4, το οποίο είχε βρεθεί και σε προηγούμενη μελέτη υπερεκφρασμένο στις ινοβλάστες της ΟΚΚ συγκριτικά με τις ινοβλάστες ούλων και έχει συσχετισθεί με την τοπικά επιθετική συμπεριφορά της βλάβης.³²⁷ Ακόμα, το LGI3, το οποίο κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη που προάγει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων⁵¹⁶ επαγόταν στην ΟΚΚ σε σχέση με το ΟΘΕ στην παρούσα μελέτη, καθώς και συγκριτικά με το αδαμαντινοβλάστωμα σε προηγούμενη εργασία.⁸⁶ Επίσης, παρατηρήθηκε επαγωγή του SDC4 στην ΟΚΚ, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεογλυκάνη συνδεκάνη-4 που ελέγχει τις διασυνδέσεις των ινών κολλαγόνου σε απόκριση στο μηχανικό στρες.⁵¹⁷ Επιπλέον, βρέθηκαν επαγόμενα γονίδια που σχετίζονται με το υαλουρονικό οξύ, όπως τα HAS3, HYAL1 και CD44, η έκφραση των οποίων, σύμφωνα με in vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου κεφαλής τραχήλου, ρυθμίζεται από το TP63 και συμβάλλει στην οργάνωση ενός μικροπεριβάλλοντος, ευνοϊκού για τον πολλαπλασιασμό του όγκου και τη λειτουργία των βλαστοκυττάρων του.⁴⁶⁷ Από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτουν ενδείξεις σημαντικής αναδιαμόρφωσης της ΕΘΟ στην ΟΚΚ, η οποία μπορεί να προκληθεί από πολλά αίτια, όπως οι αυξημένες μηχανικές φορτίσεις,⁵¹⁸ που είναι συχνές στις γνάθους,⁵¹⁹ καθώς και από την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών, όπως το μονοπάτι του Sonic Hedgehog,⁵²⁰ που συμμετέχει στην παθογένεια της ΟΚΚ.^{93, 94, 115}

Επαγωγή μεταβολισμού και καταστολή οστεοποίησης

Ένα άλλο εύρημα που αναδείχθηκε από τις δύο πρώτες γενιές βιοπληροφορικής ανάλυσης ήταν ο εμπλουτισμός γονιδιακών οντολογιών και KEGG μονοπατιών που αφορούσαν στο μεταβολισμό, για παράδειγμα του αραχιδονικού οξέος (ALOX12B, PLA2G4E) ή της γλουταθειόνης (GGT6, RRM1), μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων στην ΟΚΚ. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηνούμενες μελέτες που υποστήριξαν την αυξημένη μεταβολική ενεργότητα του επιθηλίου της ΟΚΚ, που έχει συσχετισθεί με την τοπικά επιθετική συμπεριφορά της συγκριτικά με άλλες οδοντογενείς κύστεις.^{67, 95} Λόγω αυτής της συμπεριφοράς η ενδοοστική ανάπτυξη της ΟΚΚ μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένες οστεολυτικές βλάβες, πιθανώς ως απότοκο διαταραχής στην ισορροπία οστεοβλαστών-οστεοκλαστών. Αυτή η υπόθεση μπορεί να υποστηριχθεί από την υπερεκπροσώπηση γονιδιακών οντολογιών που αφορούν στον οστικό σχηματισμό μεταξύ των κατεσταλμένων γονίδιων στην ΟΚΚ, π.χ., IGF1, IGFBP3, IGFBP5, IRS1, SATB2, SEMA3A και SFRP1. Αντίθετα, το SEMA4D που εκφράζεται στις οστεοκλάστες και ο διαμεμβρανικός υποδοχέας του στις οστεοβλάστες PLXNB1 επάγονταν στην ΟΚΚ. Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού των πρωτεϊνών Sema4D-Plexin-B, που κωδικοποιούνται από τα SEMA4D και PLXNB1, αντίστοιχα, καταστέλλει το επαγόμενο από τον αυξητικό παράγοντα που μοιάζει ινσουλίνη (insulin like growth factor, IGF1) μονοπάτι με απότοκο την αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. 521

Επαγωγή δεικτών βλαστοκυττάρων

Πρωτότυπα αποτελέσματα της μελέτης ήταν τα ευρήματα που σχετίζονται με τη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, δηλαδή την αποδιαφοροποίηση των σωματικών κυττάρων και την επακόλουθη μετατροπή τους σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs), στην οποία εμπλέκονται τέσσερις κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες (*POUF51/OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*).^{400, 430, 471}

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε επαγωγή των SOX2 και KLF4, και των ρυθμιστών των ενδιάμεσων σταδίων του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού IRF6 και OVOL1,^{400, 411, 412} καθώς και ευρήματα που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της διαδικασίας, όπως η επαγωγή του CDH1, και η καταστολή δεικτών EMT και μελών της σηματοδοτικής οδού του TGF-β.430,470,471 Επιπλέον, η μέθοδος της RNA-seq ανέδειξε την επαγωγή του TACSTD2 στην ΟΚΚ, ενός γονιδίου που πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως δείκτης ενός κυτταρικού πληθυσμού σε ενδιάμεσα στάδια του επαναπρογραμματισμού προς iPSCs,⁴¹² καθώς και την επαγωγή γονιδίων που αποτελούν δείκτες εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, όπως των EPHA1, SCNN1A, CLDN7.431

γονιδίων σχετίζονται Н επαγωγή που με τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό στην ΟΚΚ επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο της gPCR, ενώ η ανοσοϊστοχημική μέθοδος αποκάλυψε έντονη έκφραση των πρωτεϊνών SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2/TROP2 και CDH1/Ecadherin κυρίως στις ενδιάμεσες στιβάδες του επιθηλίου της ΟΚΚ. Η έκφραση των πρωτεϊνών στο επιθηλιακό τμήμα της ΟΚΚ που διακρίνεται από πλακώδη διαφοροποίηση, πιθανώς να σχετίζεται με το ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες SOX2, KLF4, OVOL1 και IRF6 εμπλέκονται εκτός από τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό και στην επιδερμική διαφοροποίηση. Το KLF4 έχει βρεθεί πως επάγεται από το μεταγραφικό παράγοντα ZNF750, που αποτελεί γονίδιο-στόχο του TP63 με, επίσης, αυξημένη έκφραση στην ΟΚΚ, ώστε να διεγείρει την τελική διαφοροποίηση πρώιμων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων.³⁸⁹ Το IRF6 συμμετέχει, επίσης, στην επιδερμική διαφοροποίηση και τη δημιουργία του πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου στη στοματοπροσωπική περιοχή και το δέρμα, σχηματίζοντας ένα δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει τα TP63, GRHL3 και TFAP2A,473 που όλα επάγονταν στην ΟΚΚ. Το OVOL1 προάγει την επιδερμική διαφοροποίηση μέσω της καταστολής δεικτών EMT (SNA12, ZEB2) και της επαγωγής επιθηλιακών δεικτών (CDH1, ESRP1),⁴¹⁰ που βρέθηκαν με μειωμένη και αυξημένη έκφραση στην ΟΚΚ, αντίστοιχα. Το SOX2 αποτελεί δείκτη εξωδερμικής προέλευσης που πιστεύεται πως συμβάλλει στην καθιέρωση του πλακώδους προτύπου επιθηλιακής διαφοροποίησης της ΟΚΚ.⁵²² Τέλος, το TACSTD2/TROP2 συμμετέχει σε πολλές σηματοδοτικές οδούς που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, μέσω επαγωγής των MKI67/Ki-67 και CCND1/Cyclin

D1,⁴²⁵ τα οποία, επίσης, επάγονταν στην ΟΚΚ και, σύμφωνα με ανοσοϊστοχημικές μελέτες, υπερεκφράζονται κυρίως στις ενδιάμεσες επιθηλιακές στιβάδες,^{124, 132, 395, 523-526} δηλαδή στην ίδια θέση που παρατηρήσαμε έκφραση του *TACSTD2/TROP2*.

Επικάλυψη με μελέτη μικροσυστοιχιών

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντικός αριθμός επαγόμενων και κατεσταλμένων γονιδίων που είχαν ανιχνευθεί και σε προηγούμενη εργασία που εξέτασε το μεταγράφωμα του ολικού ιστού της ΟΚΚ με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, χρησιμοποιώντας το αδαμαντινοβλάστωμα ως ομάδα ελέγχου.⁸⁶ Οι δύο μελέτες συμφωνούν σχετικά με τον εμπλουτισμό των γονιδιακών οντολογιών που αφορούν στην επιδερμική διαφοροποίηση μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων. Επίσης, μεταξύ των κοινών υπερεκφρασμένων γονιδίων επισημαίνονται ογκογονίδια, όπως τα *MAP3K9*,⁵²⁷ *PRSS3*,⁵²⁸ *SAPCD2*⁵²⁹ και *TMEM45B*,⁵³⁰ η μεγάλη επαγωγή των οποίων, από 14 έως 176 φορές, στην ΟΚΚ θα μπορούσε να συσχετισθεί με την τοπικά επιθετική συμπεριφορά της.

Άλλο κοινό εύρημα των δύο μελετών είναι η επαγωγή των MUC4 και ERBB3 στην ΟΚΚ, που συμπληρώθηκε από την αποκάλυψη της επαγωγής των ERBB2 και NRG1 στην παρούσα μελέτη. Η επαγωγή των μελών του ογκογόνου συμπλέγματος MUC4-ErbB2/Her2-ErbB3/Her3τον πολλαπλασιασμό NRG, που προάγει κυτταρικό μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών οδών, όπως η PI3K/AKT και η MAPK, 531 πιθανώς σχετίζεται με τη βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ. Η τεκμηρίωση αυτής της συσχέτισης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, και δεδομένης της ύπαρξης μοριακών θεραπειών, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ErbB2/Her2 που χορηγούνται σε επιθηλιακούς συμπεριλαμβανομένου καρκίνους, του βασικοκυτταρικού καρκινώματος,⁵³² θα μπορούσε να αποτελεί ένα μελλοντικό στόχο αντιμετώπισης της ΟΚΚ. Σε παρόμοια κατεύθυνση, το κοινό εύρημα της παρούσας εργασίας και της μελέτης μικροσυστοιχιών σχετικά με την επαγωγή των LYPD3, TACSTD2, LY6D, που έχει βρεθεί σε ex vivo πειραματικά μοντέλα ότι αποτελούν στόχους των μικρομοριακών αναστολέων της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 [small molecule Activator Protein 1 (AP-1) inhibitors] για τη θεραπεία του ανθεκτικού βασικοκυτταρικού καρκινώματος, 533 διευρύνει το πεδίο μελέτης για στοχευμένες θεραπείες που μπορεί να έχουν μελλοντικά εφαρμογή στην ΟΚΚ.

Συνοπτικά, στη μελέτη μας παρατηρήθηκε σημαντικού βαθμού επικάλυψη στο μεταγράφωμα της σποραδικής (πρωτοπαθούς βλάβης ή υποτροπής) και της συνδρομικής ΟΚΚ. Το πρότυπο ανάπτυξης της ΟΚΚ διακρίνεται επικρατούσα επιδερμική διαφοροποίηση, από συνδυάζοντας στοιχεία στοματικού και οδοντογενούς επιθηλίου, και ενδείξεις ασθενούς συμμετοχής του οδοντογενούς μεσεγχύματος. Η ανάλυση μεταγραφώματος ανέδειξε, επίσης, σημαντική αναδιοργάνωση της ΕΘΟ και επαγωγή δεικτών βλαστοκυττάρων στην ΟΚΚ, που με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο αποδείχθηκε πως εκφράζονται στο μεγαλύτερο τμήμα του επιθηλίου της, κυρίως σε υπερβασική εντόπιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΣΠΟΡΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗΣ ΟΔΟΝΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΣΤΗΣ

5.1. Εισαγωγή

Η οδοντογενής κερατινοκύστη (ΟΚΚ) αποτελεί ένα από τα κύρια σημεία του Συνδρόμου Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (ΣΣΒΚ) και συχνά την 1^η εκδήλωση που οδηγεί στη διάγνωσή του σε ασθενείς στις πρώτες 2 δεκαετίες της ζωής.^{21, 534} Μεταξύ των ασθενών με ΣΣΒΚ παρατηρούνται συνήθως πολλαπλές ΟΚΚ, σε αντίθεση με τη σποραδική ΟΚΚ που κατά κανόνα εμφανίζεται ως μονήρης βλάβη.⁴⁸ Άλλες διαφορές μεταξύ του σποραδικού και του συνδρομικού υποτύπου περιλαμβάνουν το αυξημένο ποσοστό προσβολής της οπίσθιας άνω γνάθου, τα μεγαλύτερα ποσοστά υποτροπής και τη συχνότερη εμφάνιση ιστοπαθολογικών ευρημάτων, όπως οι δορυφόρες κύστεις, τα επιθηλιακά νησίδια και οι επιθηλιακές εκβλαστήσεις εντός του κυστικού τοιχώματος, στις συνδρομικές ΟΚΚ.^{48, 535} Οι παραπάνω κλινικές και ιστοπαθολογικές διαφορές, ωστόσο, δεν έχουν θεωρηθεί ως κριτήρια που μπορούν να διαφοροποιήσουν το σποραδικό και το συνδρομικό υπότυπο.

Αποσκοπώντας στην περαιτέρω διερεύνηση των διαφορών μεταξύ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ, πληθώρα ανοσοϊστοχημικών μελετών έχει επιχειρήσει τη συγκριτική μελέτη πολλών πρωτεϊνικών μορίων στη σποραδική και συνδρομική ΟΚΚ. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού^{525, 536} ή απόπτωσης,^{137, 537, 538} μόρια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου,^{537, 539, 540} καθώς και μέλη της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog, η ενεργοποίηση της οποίας αποτελεί κοινό παθογενετικό μηχανισμό και των δύο υποτύπων, καθώς και του ΣΣΒΚ.⁵⁴¹⁻⁵⁴³ Η ανοσοϊστοχημική τεχνική πλεονεκτεί ως προς το χαμηλό κόστος και τη δυνατότητα να εφαρμοστεί σε μονιμοποιημένους ιστούς που μπορούν να διατηρηθούν για πολλά χρόνια, και επιπλέον παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την τοπογραφική εντόπιση του υπό εξέταση μορίου στον ιστό που μπορεί να έχει διαγνωστική ή προγνωστική αξία.^{544, 545}

5.2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη συγκριτική έκφραση ανοσοϊστοχημικών δεικτών στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ. Η υπόθεση της μελέτης είναι ότι η έκφραση ενός ή περισσοτέρων ανοσοϊστοχημικών δεικτών διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των δύο υποτύπων. Η μηδενική υπόθεση της μελέτης είναι πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ.

Επιπλέον, ο σχεδιασμός της μελέτης αποσκοπεί στη λεπτομερή καταγραφή των χαρακτηριστικών των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, των μεθόδων αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης που εφαρμόστηκαν, καθώς και στην αναλυτική περιγραφή των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών, για παράδειγμα όσων αφορά στην ανίχνευση της χρώσης σε επιμέρους ιστικά διαμερίσματα (επιθήλιο/ κυστικό τοίχωμα) ή στην υποκυττάρια (πυρηνική/ κυτταροπλασματική/ μεμβρανική) εντόπισή της. Τα στοιχεία αυτά θα συμβάλλουν στη συγκριτική αξιολόγηση των μελετών που εξέτασαν το ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ, ενώ μπορεί να αξιοποιηθούν για το σχεδιασμό μελλοντικών μελετών με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Τέλος, δεδομένου ότι η ανοσοϊστοχημική τεχνική επιλέγεται συχνά ως μέθοδος επαλήθευσης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από πειράματα με τις τεχνολογίες της Next Generation Sequencing (NGS) όπως η RNA-seq,⁵⁴⁶ η συστηματική καταγραφή των ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ εξασφαλίζει μία βάση δεδομένων έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης για τους δύο υπότυπους της ΟΚΚ.

5.3. Υλικά & Μέθοδοι

Η μελέτη εκπονήθηκε σύμφωνα με τις δημοσιευμένες οδηγίες PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses),^{547, 548} σχετικά με τα στοιχεία που συστήνεται να συμπεριλαμβάνονται στις συστηματικές ανασκοπήσεις και μετααναλύσεις και το πρωτόκολλό της καταχωρήθηκε στη διεθνή βάση συστηματικών ανασκοπήσεων PROSPERO (Prospective International Registration of Systematic Reviews)⁵⁴⁹ υπό τον αριθμό **CRD42020166441**. Το επιστημονικό ερώτημα-στόχος προς απάντηση της συστηματικής ανασκόπησης ήταν «Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο έκφρασης ανοσοϊστοχημικών δεικτών μεταξύ των συνδρομικών ΟΚΚ και των σποραδικών ΟΚΚ;», το οποίο διαμορφώθηκε με βάση το μέθοδο **PICO** (**P**opulation, Intervention, **C**omparator, **O**utcome),⁵⁵⁰ ως εξής:

- πληθυσμός μελέτης (*Population*): συνδρομικές και σποραδικές ΟΚΚ
- παρέμβαση (Intervention): μη εφαρμόσιμο στοιχείο (δηλαδή χωρίς παρέμβαση)
- μέτρο σύγκρισης (Comparator): ανοσοϊστοχημικοί δείκτες
- έκβαση (Outcome): διαφορές στην ανοσοϊστοχημική έκφραση

5.3.1. Στρατηγική αναζήτησης

Η αναζήτηση της βιβλιογραφίας έγινε μέσω των βάσεων δεδομένων MEDLINE/Pubmed, Web of Science, και EMBASE μέσω της OVID και αφορούσε σε άρθρα δημοσιευμένα έως τις 28 Δεκεμβρίου 2019 τα οποία στον τίτλο ή την περίληψη περιλάμβαναν κάποιους από τους ακόλουθους όρους ευρετηριάσεως: keratocyst, primordial cyst, parakeratinized odontogenic cyst, staining, immunohistochemistry, immunostaining, *immunoexpression,* immunolabelling, immunocytochemistry, antibody, protein, marker, biomarker. 0 συνδυασμός αυτών των όρων διατυπώθηκε για την αναζήτηση σύμφωνα με τις απαιτήσεις κάθε βάσης δεδομένων (Πίνακας 5.1). Επιπλέον, έγινε αναζήτηση στη **γκρίζα βιβλιοθήκη** μέσω των ιστότοπων Google Scholar και ProQuest, στις οποίες οι παραπάνω όροι χρησιμοποιήθηκαν εντός εισαγωγικών και παραλήφθηκαν τα σύμβολα AND και OR, και έγινε έλεγχος της λίστας των βιβλιογραφικών παραπομπών των άρθρων που προέκυψαν από την παραπάνω αναζήτηση για παρόμοιες μελέτες. Τα 1545 άρθρα που προέκυψαν από την αναζήτηση καταχωρήθηκαν στο πρόγραμμα διαχείρισης της βιβλιογραφίας EndNote X6 Citation Manager και μέσω αυτού αφαιρέθηκαν τα πολλαπλά αντίγραφα του ίδιου άρθρου, καταλήγοντας σε 784 διαφορετικά άρθρα (Εικ. 5.1).

Ο αρχικός έλεγχος των 784 άρθρων αφορούσε στη μελέτη τίτλου και περίληψης και πραγματοποιήθηκε από δύο ερευνητές ανεξάρτητα. Ένα άρθρο κρίθηκε ως επιλέξιμο για μελέτη του πλήρους κειμένου του εφόσον πληρούσε τα ακόλουθα κριτήρια:

- (α) δημοσίευση στην αγγλική γλώσσα,
- (β) πρωτότυπη μελέτη με ανοσοϊστοχημικά δεδομένα,
- (γ) δείγμα μελέτης με ανθρώπινους ιστούς ΟΚΚ.

Βάση δεδομένων	Όροι ευρετηριάσεως
MEDLINE/ PubMed	(keratocyst*[Title/Abstract]) AND (immunohistochem*[Title/Abstract] OR immunostain*[Title/Abstract] OR stain*[Title/Abstract] OR immunolab*[Title/Abstract] OR immunocytochem*[Title/Abstract] OR stain*[Title/Abstract] OR antibod*[Title/Abstract] OR protein[Title/Abstract] OR marker[Title/Abstract] OR biomarker[Title/Abstract])
Embase via Ovid	keratocyst*.mp. AND (immunohistochem*.mp. OR immunostain*.mp. OR stain*.mp. OR immunolab*.mp. OR immunocytochem*.mp. OR stain*.mp. OR antibod*.mp. OR protein.mp. OR marker.mp. OR biomarker.mp.)
Web of Science	TI=(keratocyst* AND (immunohistochem* OR immunostain* OR stain* OR immunolab* OR immunocytochem* OR stain*OR antibod* OR protein OR marker OR biomarker)) OR AB=(keratocyst* AND (immunohistochem* OR immunostain* OR stain* OR immunolab* OR immunocytochem* OR stain*OR antibod* OR protein OR marker OR biomarker))

Πίνακας 5.1 Συνδυασμός όρων ευρετηριάσεως στις βάσεις δεδομένων.



Εικ. 5.1 Διάγραμμα ροής των επιμέρους σταδίων της συστηματικής ανασκόπησης σύμφωνα με τις PRISMA οδηγίες. ΟΚΚ: οδοντογενής κερατινοκύστη, ΟΟΚ: ορθοκερατινοποιημένη οδοντογενής κύστη. Τα στοιχεία των 310 άρθρων που εξαιρέθηκαν στο στάδιο ελέγχου καταλληλότητας είναι διαθέσιμα ως αρχείο ESM1 (Table S3) στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <u>https://link.springer.com/article/</u> 10.1007/s00784-021-03877-w#Sec18. Αν από την περίληψη του άρθρου δεν μπορούσαν να εξαχθούν με βεβαιότητα το (β) ή το (γ), τότε αξιολογήθηκε το πλήρες κείμενο του άρθρου. Αντίθετα, **αποκλείστηκαν** με βάση τον τίτλο ή την περίληψη 403 άρθρα με ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- δημοσιεύσεις σε γλώσσες διαφορετικές της αγγλικής,
- αναφορές μονήρων περιπτώσεων ή σειρών μικρού αριθμού περιστατικών, ανασκοπήσεις, επιστολές (letters to the editor/ correspondences/ commentaries) χωρίς πρωτότυπα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα,
- πειραματικές μελέτες χωρίς την ανοσοϊστοχημική μέθοδο,
- μελέτες αποκλειστικά με κυτταρικές σειρές ή πειραματόζωα.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε ανεξάρτητα από τους ίδιους δύο ερευνητές το **πλήρες κείμενο** των 381 άρθρων που θεωρήθηκαν επιλέξιμα κατά το προηγούμενο στάδιο ελέγχου. Περιπτώσεις στην οποίες υπήρχε διαφωνία για την καταλληλότητα ενός άρθρου επιλύθηκαν κατόπιν συζήτησης με έναν τρίτο ερευνητή. Στην ποιοτική ανάλυση της μελέτης συμπεριλήφθηκαν τελικά 71 άρθρα (Εικ. 5.1), τα οποία, επιπλέον των (α)-(γ) που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πληρούσαν τα ακόλουθα **κριτήρια**:

(δ) περιγραφικά ή/και αριθμητικά ανοσοϊστοχημικά δεδομένα προερχόμενα από ανθρώπινους ιστούς ΟΚΚ,

(ε) συμμετοχή και συνδρομικών και σποραδικών ΟΚΚ στο δείγμα της ίδιας μελέτης,

(στ) συμπέρασμα από τους συγγραφείς σχετικά με την ύπαρξη διαφοράς στα επίπεδα έκφρασης του υπό εξέταση ανοσοϊστοχημικού δείκτη μεταξύ των δύο υποτύπων ΟΚΚ, με ή χωρίς δεδομένα στατιστικής ανάλυσης. Σε περίπτωση που το συμπέρασμα απουσίαζε, η μελέτη κρίθηκε ως επιλέξιμη, εφόσον υπήρχαν αναλυτικά αριθμητικά δεδομένα, ώστε να εξαχθεί έμμεσα.

Τα παραπάνω κριτήρια ελέγχθηκαν ξεχωριστά για κάθε ένα ανοσοϊστοχημικό δείκτη στις μελέτες που εξέτασαν την έκφραση πολλαπλών μορίων και μεμονωμένοι δείκτες (bcl-2,⁵⁵¹ Ki-67,¹²² NK-1 receptor,¹²² p53,^{524, 552} TGF-β⁵⁵³), από 5 επιλέξιμες μελέτες αποκλείστηκαν από την ανάλυση, καθώς δε διευκρίνιζαν τον αριθμό

των θετικών περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ και παρουσίαζαν τα αποτελέσματα για το σύνολο των περιπτώσεων, χωρίς να συγκρίνουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση μεταξύ των δύο υποτύπων.

5.3.2. Εξαγωγή δεδομένων

Η εξαγωγή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην αγγλική γλώσσα και η αποθήκευσή τους έγινε σε φύλλα *Microsoft Office Excel 2010, κατά φθίνον έτος δημοσίευσης* για τα γενικά χαρακτηριστικά των μελετών, τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και την εντόπιση των ΟΚΚ (Εικ. 5.2), και κατά αλφαβητική σειρά των γονιδίων που κωδικοποιούσαν τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες για τα χαρακτηριστικά των πρωτογενών αντισωμάτων, της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου (Εικ. 5.3) και τα αποτελέσματα (Εικ. 5.4).

Από κάθε μία από τις **επιλέξιμες μελέτες** συγκεντρώθηκαν οι ακόλουθες πληροφορίες (Εικ. 5.2):

- πρώτος συγγραφέας,
- έτος δημοσίευσης,
- περιοδικό,
- χώρα προέλευσης συγγραφέων,
- αριθμός ασθενών,*
- φύλο και ηλικία ασθενών,*
- αριθμός ΟΚΚ,*
- εντόπιση ΟΚΚ,*
- ιστοπαθολογικά κριτήρια (αναλυτικά ή ως βιβλιογραφική παραπομπή) που στοιχειοθέτησαν τη διάγνωση της ΟΚΚ,
- αναφορά βιβλιογραφικής παραπομπής, στην οποία βασίστηκε η διάγνωση του ΣΣΒΚ.

Τα στοιχεία με την ένδειξη (*) καταγράφηκαν για το σύνολο των περιπτώσεων ή, όταν ήταν αναλυτικά διαθέσιμα, ξεχωριστά για κάθε υπότυπο ΟΚΚ.

Για κάθε έναν **ανοσοϊστοχημικό δείκτη** που συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση αντλήθηκαν τα εξής στοιχεία (Εικ. 5.3):

- όνομα πρωτεΐνης,
- όνομα γονιδίου από το οποίο κωδικοποιείται η πρωτεΐνη, σύμφωνα με την επιτροπή ονοματολογίας γονιδίων του

οργανισμού ανθρωπίνου γονιδιώματος [Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee],^{554, 555}

- αν ο δείκτης μελετήθηκε σε μία (μοναδικός δείκτης) ή σε πολλαπλές (επαναλαμβανόμενος δείκτης) μελέτες,
- χαρακτηριστικά πρωτογενούς αντισώματος (ξενιστής, κλωνικότητα, κλώνος, εταιρεία προέλευσης, αραίωση),
- αν ανέφεραν τη μέθοδο ανίχνευσης του σήματος της ανοσοϊστοχημείας (signal amplification system),
- πάχος τομής στην οποία εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική χρώση,
- θετικός και αρνητικός μάρτυρας,
- αριθμός ερευνητών που αξιολόγησαν τη χρώση,
- τρόπος αξιολόγησης της χρώσης [διχοτόμος (εκφράζεται ή δεν εκφράζεται), ημιποσοτικός (κατηγορίες με βάση ένταση και έκταση χρώσης), ποσοτικός (αριθμός ή ποσοστό θετικών περιπτώσεων)],
- συγκεκριμένο σύστημα/ κριτήρια αξιολόγησης.

Τέλος, καταγράφηκαν όλα τα στοιχεία που αφορούσαν στα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης κάθε δείκτη (Εικ. 5.4):

- αριθμός/ποσοστό θετικών περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ,
- ένταση χρώσης και εντόπιση στον ιστό (επιθήλιο/ μεσέγχυμα), σε συγκεκριμένη επιθηλιακή στιβάδα (βασική/ υπερβασική/ επιφανειακή) και σε συγκεκριμένο υποκυττάριο τμήμα (πυρήνα/ κυτταρόπλασμα/ κυτταρική μεμβράνη) για τα επιθηλιακά κύτταρα, ανά υπότυπο ΟΚΚ,
- συμπέρασμα σύγκρισης της έκφρασης του δείκτη μεταξύ των υποτύπων της ΟΚΚ.

1	Reference	Year	Authors' country of origin	Journal	Total OKCs	Total patients	Gender (both groups)	Age (both groups)	Site (both groups)
2	Santos et al	2020	Brazil	Arch Oral Biol	59	59	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
3	Mascitti et al	2020	Italy	Appl Immunohistochem Mol Morphol	30	30	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
4	Malaguez et al	2020	Brazil	Appl Immunohistochem Mol Morphol	48	48	NA	NA	NA
	Cota et al	2019	India	J Clin Exp Dent	30	NA	NA	NA	NA
	Hovos Cadavid et al	2019	Brazil	Clin Oral Investin	28	82	reported per subtype	reported per subtype	NA
	Doll et al	2018	Germany	I Stomatol Oral Maxillofac Sura	64	53	34 males 19 females	mean=38 (range 5-81)vears	NA
	Awni & Conn	2017	Sectland LIK	Oral Sura Oral Med Oral Pathol	17	17	male to female ratio=7:10	reported per subtype	reported per subtype
	Leite et al	2017	Bearil	Praz Oral Pac	44	NIA	MA	NA	NA
	Change et al (CD 1)	2017	Diazii	lowersh of the Earmonne Mediani Acce	20	80	22 males 27 females	11A	mandible=27 and may
20	Chang et al (CD-1)	2017	Tawan	Journal of the Pormosan Medical Asso	00		33 males, 27 remaies	mean age- 34210 years (rang	mandible-57 and max
11	Chang et al (S-100)	2011	Tawan	Journal of Dental Sciences	00	00	33 males, 27 temales	mean age= 34±18 years (rang	mandiple=37 and max
12	Sarobe et al	2017	India	J Oral Pathol Med	30	30	22 males, 13 temales	mean age=20.14±9.10 years	mandible=25, maxilla=
13	Mendes et al	2017	Brazil	J Oral Pathol Med	28	NA	NA	NA	NA
34	Ibrahim et al	2016	Malaysia	J Craniofac Surg	13	13	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
25	Vera-Sirera et al	2016	Spain	BMC Oral Health	48	48	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
10	Vera Sirera et al (CD56)	2015	Spain	Head and Face Medicine	48	NA	NA	NA	NA
11	Leonardi et al	2015	Brazil, Italy, UK	J Craniomaxillofac Surg	40	40	23 males, 7 females	mean age= 32 ± 8.7 years (ran	mandible=38, maxilla=
2.0	Johann et al	2015	Brazil	Med Oral Patol Oral Cir Bucal	14	NA	NA	NA	NA
25	Vera-Sirera et al (CCD1)	2015	Spain	Med Oral Patol Oral Cir Bucal	48	48	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
20	de Brito Monteiro	2015	Brazil	Oral Suro Oral Med Oral Pathol	42	NA	NA	NA	NA
21	Amm et al	2014	LISA	Connect Tissue Res	3	NA	NA	NA	NA
1	Abut at al	2014	India	LOral Maxillofac Pathol	12	NA	NA	NA	NA
1	da Olivaira Ramos et al	2014	Brazil	LOral Pathol Med	22	NIA	NA	NA	NA
-	Gueslet al	2017	Drazil	I Oral Pathol Med	22	22	10 males 12 famales	(10	mandibles 20 manilles
21	Gurger et al	2012	Drazii	J Oral Pathol Med	23	23	to males, to remales	10 years (21.74%), 10-30 ye	mandible=20, maxila=
2	Kadiub et al	2013	France	Human Pathology	17	10	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
×	Singh et al	2013	India	J Clin Imaging Sci	40	NA	22 males, 18 temales	NA	NA
22	Leonardi et al	2013	Brazil, Italy	Histol Histopathol	40	40	23 males, 17 temales	mean age=32 ± 8.7 (range 10	mandible=35, maxilla=
20	Shimada et al	2013	Japan	Plos One	36	38	20 males, 16 females	reported per subtype	NA
25	Mello et al	2013	Brazil	J Oral Pathol Med	18	NA	NA	NA	NA
x	de Assis Caldas Pereira et al	2012	Brazil	Tumor Biol	10	NA	NA	NA	NA
32	Nonaka et al	2012	Brazil	Arch Oral Biol	52	NA	NA	NA	NA
33	Diniz et al	2012	Brazil, USA	Cell Oncol	18	9	male to female ratio=2.75:	range 14-50 years	NA
33	Mendes et al (3 markers)	2011	Portugal	Oral Suro Oral Med Oral Pathol	20	20	16 males 4 females	mean age= 42 75+19 93 years	mandible=17 "more th
1	Mendes et al (COX-2)	2011	The Netherlands Portugal	J Oral Pathol Med	116	118	81 males 35 females	mean ages 41 48+21 04 (range	"predominantly in man
10	Hakim at al	2011	Garmany	Clin Oral Investio	10	NA	NA	NA	NA
	Eiguaroa at al	2010	Vecemela LISA	Otolan (meshad and Nack Surga	10	NA	NA	NA	NA
1	Loopardi et al	2010	Itaby UK	Oral Disassas	20	NA	NA	NA	NA
3	Leonardi et al	2010	Italy, OK	Oral Diseases	39	N/A	NA NA	NA	NA NA
3	Da et al	2010	Japan	Dentomaxilioracial Radiology	30	N/A	NA NA	NA	NA.
X	Caims et al	2010	UK, USA	Histopathology	19	NA	NA	NA	NA.
40	Silva-Gurgel et al	2010	Brazil	Acta Histochemica	20	NA	NA	NA	NA
41	Dos Santos et al	2009	Brazil	J Mol Hist	25	25	13 males, 12 females	mean age= 35.6± 12.8 years	NA
43	Pan & Li	2009	China	Oral Oncology	62	NA	NA	NA	NA
40	Vered et al	2009	Israel	J Oral Pathol Med	33	NA	NA	NA	NA
44	Cavalcante et al	2008	Brazil	Oral Surg Oral Med Oral Pathol	41	NA	NA	NA	NA
45	Mateus et al	2008	Brazil	Med Oral Patol Oral Cir Bucal	26	NA	NA	NA	NA
40	Gonzalez Moles et al	2008	Mexico	Oral Oncology	65	65	37 males, 28 females	mean age= 27 ± 14.3 years	NA
10	Guroel et al	2008	Brazil	J Mol Hist	37	NA	NA	NA	NA
	Grazinger et al	2008	USA	J Oral Pathol Med	5	5	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
	Katase et al	2007	Janan	I Oral Pathol Med	20	NA	NA	NA	reported per subtype
	Gonzalez Moles et al	2008	Maxico	Anticancer Research	22	22	47 males 38 females	mean ages 28 + 14 1 years f	mandible=57 maxilla=
	Kolar at al	2008	Crach	LOral Rathol Med	57	NA	NA	NA	NA
	Easehini at al	2008	Italia	Int I Cral Maxillaina Sura	27	20	NA	NA	NA
-	Obbi et al	20004	Italy	Int J Oral Maxillofac Surg	22	20	N/A	NIA NA	
5	Onkietal	2007	Dapan	Int J Oral Maxilorac Surg	12	15	NA .	INA	INA
2	Amonim et al	2004	Drazii	Utal Diseases	15	15	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
22	Barreto et al	2002	Brazil	J Dent Res	23	NA	NA	NA	NA
24	Pavelic et al	2001	Croatia	J Oral Pathol Med	10	NA	NA	NA	NA
53	Zedan et al	2001	UK	J Pathol	19	19	NA	NA	NA
52	Kimi et al	2001	Japan	J Oral Pathol Med	43	43	reported per subtype	reported per subtype	NA
50	Kimi et al	2000	Japan	Oral Med Pathol	62	NA	NA	NA	NA
64	Meara et al	2000	USA	J Oral Maxillofac Surg	13	NA	NA	NA	NA
63	Lo Muzio et al	1999	Italy	J Dent Res	32	NA	NA	NA	NA
63	Calvalhais et al	1999	Brazil	Oral Diseases	17	17	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype
63	Li et al (PTHRp)	1997	UK	Brit J Oral Max Surg	27	NA	NA	NA	NA
4	Li et al (EGF etc)	1997	UK	Mol Path	27	NA	NA	NA	NA
-	Robinson et al	1998	UK The Netherlands	J Oral Pathol Med	20	NA	NA	NA	NA
	El Murtadi et al	1998	Ineland	Oral Sura Oral Med Oral Pathol	41	NA	NA	NA	NA
-	liatal	1994	LIK	I Oral Pathol Med	22	22	NA	NA	NA
-	Listal	1005	11P	I Oral Pathol Med	27	NA	NA	NA	NA
G	Lombardi at al	1005	11P	Arch Oral Biol	20	NA	NA	NA	NA
G	Linh at al	1002	UK Comment	LOral Bathal Mad	20	100	10		100
×	right et al	1000	Castland LIV	Cia Dathal	12	10	A maine O famalas	10 00.00 14	in the second
71	ouver et al	1332	Soutand, UK	Oral Creat Mad Oral Dath 1	14	14	a males, o remales	mean age= 40.52123.14 years	manuloie= 10, maxilla
77	i Snuler & Shriver	1987	USA	Ural Surg Oral Med Oral Mathó	3	2	reported per subtype	reported per subtype	reported per subtype

Εικ. 5.2 Τμήμα του πίνακα καταγραφής των γενικών χαρακτηριστικών των επιλέξιμων μελετών, των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών και της εντόπισης των ΟΚΚ. Ο πλήρης πίνακας είναι διαθέσιμος ως αρχείο ESM1 (Table S5) στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <u>https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-03877-w#Sec18</u>. OKC: odontogenic keratocyst, NA: not available.

Reference	Year	Protein Marker	Gene Name (HUGO)	Single or repeated marker	Host	Clonality	Antibody (clone)	Source	Dilution	Thickness of section (in µm)	Report of detection method/ signal amplification system	Positive control	Negative control	Evaluation method	Scoring system	Number of observers
2 de Oliveira Ramos	s 2014	SMA	ACTA2	repeated	NA	polyclonal	NA	Sigma	1:1000	3	yes	blood vessels	omission of primary	quantitative	mean ratio of positive nuclei among	NA I
3 Nonaka et al	2012	SMA	ACTA2	repeated	NA	NA	a-SM1	Novocastra Laboratories, B	1:50	3	yes	lobular capillary hema	primary antibody wa	guantitative	mean number of SMA positive cells	s NA
4 Grazinger et al	2008	SMA	ACTA2	repeated	mouse	monoclonal	A-2547	Sigma, St Louis, MO, USA	1:400	4	no	NA	NA	semi-quantitative	positive (++), focal positive (+), nega	a NA
s Santos et al	2020	APE-1	APEX1	single	NA	monoclonal	clone C4 (so	Santa Cruz Biotechnology,	1:3000	3	no	ovarian carcinoma	omission of primary	¿ quantitative	percentage of positive cells to total	1 1
6 Kolar et al	2006	bax	BAX	single	rabbit	polycional	N-20	Santa Cruz Biotechnology,	1:100	NA	yes	NA	omission of primary	¿semi-quantitative	H-score =product of extent (% pos	si 2
> Awni & Conn	2017	bcl-2	BCL2	repeated	mouse	monoclonal	clone 124	Dako	NA	3	no	NA	NA	semi-quantitative	product of cytoplasmic extent (%) a	٤ 2
Ibrahim et al	2016	bcl-2	BCL2	repeated	NA	monoclonal	commercial	NA	1:50	4	yes	breast cancer	omission of primary	a semi-quantitative	the product of extent (percentage of	0 2
Shimada et al	2013	bcl-2	BCL2	repeated	NA	monoclonal	clone 124	Dako, Glostrup, Denmark	NA	NA	no	NA	NA	NA	NA	2
10 Diniz et al	2012	bcl-2	BCL2	repeated	mouse	monoclonal	clone 124	Dako, Carpinteria, CA	1:50	4	yes	tonsil	omission of primary	semi-quantitative	percentage of stained epithelial cell	it NA
11 Vered et al	2009	bcl-2	BCL2	repeated	mouse	monoclonal	clone 124	Dako Cytomation, Glostrup,	NA	3	no	follicular lymphoma	omission of primary	¿semi-quantitative	4-grade scoring system (0 - no sta	AN E
12 Kolar et al	2006	bcl-2	BCL2	repeated	NA	monoclonal	clone 100	Biogenex, San Ramon, CA,	1:50	NA	yes	NA	omission of primary	semi-quantitative	H-score =product of extent (% pos	si 2
13 Kimi et al	2000	bcl-2	BCL2	repeated	NA	monoclonal	clone 124	Dako, Glostrup, Denmark	1:40	3	yes	NA	NA	dichotomous	positive or negative	NA
14 Lo Muzio et al	1999	bcl-2	BCL2	repeated	NA	monoclonal	clone 124	Dako, Germany	1:80	5	yes	lymph node	primary antibody wa	dichotomous	0 (negative cases) and 1 (cases w	v 2
15 Leonardi et al	2013	survinin	BIRC5	single	rabbit	polyclonal	Ab469	AbCam, Cambridge UK	1:400	4	yes	colon adenocarcinom	primary antibody wa	a semi-quantitative	extent score=ES: (a) score 0, 0-5%	6 2
16 Kimi et al	2001	caspase-3	CASP3	single	NA	polycional	NA	Dako	1:200	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative, (+) marginally positive	NA
17 Doll et al	2018	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	monoclonal	AM29	Zymed, USA	1:25	4	yes	NA	NA	quantitative	mean of positive cells in 10 differen	n 2
18 Ibrahim et al	2016	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	monoclonal	commercial	NA	1:50	4	yes	normal toncil	omission of primary	¿semi-quantitative	product of extent (percentage of st	t 2
19 Vera-Sirera et al	2015	Cyclin D1	CCND1	repeated	rabbit	monoclonal	EP12	Dako, Glostrup, Denmark	NA	5	yes	tonsil	omission of primary	a quantitative	mean ratio of the depth of epitheliur	n NA
20 Gurgel et al	2014	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	monoclonal	DCS6	Dako, ClosDakoCytomation,	1:100	NA	yes	oral squamous cell ci	a omission of primary	¿semi-quantitative	a minimum of 500 epithelial nuclei in	1 1
21 Shimada et al	2013	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	NA	SP4	Nichirei Biosciences, Tokyo	NA	NA	no	NA	NA	NA	NA	2
22 Hakim et al	2011	Cyclin D1	CCND1	repeated	mouse	monoclonal	SP4	LABVison, UK	1:50	4	yes	NA	primary antibody wa	quantitative	percentage of stained cells of the t	IC NA
23 Kimi et al	2001	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	monoclonal	lgG2a	Zymed, San Francisco, CA,	NA	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative (5% or less of epithelia	a NA
24 Lo Muzio et al	1999	Cyclin D1	CCND1	repeated	NA	NA	5D4	Immunotech, Marseille, Fran	1:800	5	yes	normal colonic mucos	primary antibody wa	a semi-quantitative	0 (absence of staining), +1 (from 1	(2
25 Chang et al	2017	CD1a	CD1A	repeated	mouse	monoclonal	Ab-5	Thermo Fisher Scientific, Ru	1:50	4	yes	Langerhans cell histin	primary antibody wa	quantitative	langerhans cell (LC) count=the mea	a NA
26 Mello et al	2013	CD1a	CD1A	repeated	NA	monoclonal	clone O10	Dako Cytomation, Glostrup,	1:50	3	yes	linining epithelium, py	primary antibody wa	quantitative	mean CD1a positive cells per squar	r NA
27 Leite et al	2017	CD34	CD34	repeated	NA	monoclonal	QBEnd-10	Dako, Carpinteria, CA	1:50	3	yes	pyogenic granuloma	primary antibody wa	a semi-quantitative	percentage of positive cells at origi	# 2
28 Nonaka et al	2012	CD34	CD34	repeated	NA	monoclonal	QBEnd-10	Dako, Carpinteria, CA	1:50	3	yes	lobular capillary hema	primary antibody wa	quantitative	anti-CD34-immunoreactive vessels	NA
29 Mello et al	2013	e-cadherin	CDH1	repeated	NA	monoclonal	clone NCH-3	Dako Cytomation, Glostrup,	1:100	3	yes	linining epithelium, py	primary antibody wa	a semi-quantitative	0, no expression; +1:20% positive,	NA NA
30 Hakim et al	2011	e-cadherin	CDH1	repeated	mouse	monoclonal	4A2C7	Zytomed, Germany	1:75	4	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	10 fields of each sample were cho-	IS NA
31 Kimi et al	2001	p21	CDKN1A	repeated	NA	monoclonal	lgG1	Santa Cruz Biotechnology	1:200	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative (5% or less of epithelia	a NA
32 Kolar et al	2006	p21	CDKN1A	repeated	NA	monoclonal	clone 118	Dr B. Vojtesek, Masaryk, Me	1:100	NA	yes	NA	omission of primary	¿semi-quantitative	H-score =product of extent (% pos	i 2
33 Kimi et al	2001	p27	CDKN1B	repeated	NA	monoclonal	lgG2	Dako, Glostrup, Denmark	1:50	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative (5% or less of epithelia	a NA
34 Kolar et al	2006	p27	CDKN1B	repeated	NA	monoclonal	clone 1B4	Novocastra, Newcastle-up	1:25	NA	yes	NA	omission of primary	Esemi-quantitative	H-score =product of extent (% pos	JI 2
as Kimi et al	2001	p16	CDKN2A	single	NA	monoclonal	lgG2a	Santa Cruz Biotechnology,	1:100	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative (5% or less of epithelia	a NA
36 Grazinger et al	2008	calponin	CNN3	single	mouse	monocional	clone CALP	DAKO, Carpenteria, CA, US	1:50	4	yes	NA	NA	semi-quantitative	positive (++), focal positive (+), nega	a NA
37 Amorim et al	2004	collagen IV	COL4A5	single	mouse	monoclonal	CIV2 clone,	Dako A/S, Denmark	1:20	3	yes	vessels	primary antibody wa	a semi-quantitative	presence, continuity and thickness	. 2
38 Cota et al	2019	collagen VII	COL7A1	single	mouse	monoclonal	LH7.2	Abcam	1:200	4	yes	normal skin, oral muc	comission of primary	a semi-quantitative	intensity: absent (0), weak (1), mod	d NA
39 Leonardi et al	2013	beta-catenin	CTNNB1	repeated	NA	monoclonal	clone 6B3	Cell Signaling Technology, U	1:150	4	yes	colon adenocarcinom	primary antibody wa	a semi-quantitative	extent score=ES: (a) score 0, 0-5%	6 2
40 Hakim et al	2011	beta-catenin	CTNNB1	repeated	mouse	monoclonal	17C2	Novocastra, UK	1:200	4	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	10 fields of each sample were cho-	IS NA
41 Li et al	1997	EGF	EGF	single	rabbit	polycional	Z12	Santa Cruz Biotechnology)	NA	5	yes	oral squamous cell ca	a primary antibody wa	semi-quantitative	intensity (strong (++), weak (+),neg	g NA
42 Kolar et al	2006	c-erbB-2/HE	ERBB2	single	rabbit	polyclonal	A 0485	DakoCytomation	1:100	NA	yes	NA	omission of primary	¿semi-quantitative	H-score =product of extent (% pos	JI 2
43 Santos et al	2020	XPF	ERCC4	single	NA	monoclonal	clone 219	Thermo Scientific, Barringto	1:800	3	no	human tosnil	omission of primary	e quantitative	percentage of positive cells to total	1 1
44 Kimi et al	2001	Fas (CD95)	FAS	single	NA	polycional	NA	Wako, Osaka, Japan	1:200	3	yes	NA	primary antibody wa	a semi-quantitative	(-) negative, (+) marginally positive	NA
45 Kimi et al	2001	FasL	FASLG	single	NA	polyclonal	NA	Wako	1:200	3	yes	NA	primary antibody wa	dichotomous	positive or negative	NA
46 Amorim et al	2004	fibronectin	FN1	single	NA	NA	NA	Dako A/S, Denmark	1:500	3	yes	oral fibrous lesions	primary antibody wa	a semi-quantitative	presence, continuity and thickness	2
42 Shimada et al	2013	FOXM1	FOXM1	single	NA	NA	D12D5	Cell Signaling Technology	NA	NA	no	NA	NA	NA	NA	2

Εικ. 5.3 Τμήμα του πίνακα καταγραφής των χαρακτηριστικών των πρωτογενών αντισωμάτων, της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου και της αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Ο πλήρης πίνακας είναι διαθέσιμος ως αρχείο ESM1 (Table S6) στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <u>https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-03877-w#Sec18</u>. HUGO: Human Genome Organization, NA: not available.

Reference	Year	Protein Marker	Gene Name (HUGO)	Positive BCNS- associated OKCs	Total BCNS- associated OKCs	Tissue, compartmental and subcellular immunolocalization in BCNS-associated OKCs	Positive sporadic OKCs	Total sporadic OKCs	Tissue, compartmental and subcellular immunolocalization in sporadic OKCs	Comparison of immunoexpression between the two OKC groups
2 de Oliveira Ramos et al	2014	SMA	ACTA2	12	12	stroma	11	11	stroma	No difference
3 Nonaka et al	2012	SMA	ACTA2	NA	22	myofibroblasts	NA	30	myofibroblasts	No difference
4 Grazinger et al	2008	SMA	ACTA2	0	1	no expression	0	4	no expression	No difference
s Santos et al	2020	APE-1	APEX1	29	29	epithelium, no particular pattern of dis	30	30	epithelium, no particular pattern of d	No difference
6 Kolar et al	2006	bax	BAX	NA	18	NA	NA	39	NA	No difference
> Awni & Conn	2017	bcl-2	BCL2	3	3	epithelium, basal and suprabasal lave	14	14	epithelium, basal and suprabasal lay	No difference
* Ibrahim et al	2016	bcl-2	BCL2	1	5	epithelium, basal and suprabasal lave	3	8	epithelium, basal and suprabasal lay	No difference
Shimada et al	2013	bcl-2	BCL2	16	16	epithelium, basal and suprabasal lave	20	20	epithelium, basal and suprabasal lay	No difference
10 Diniz et al	2012	bcl-2	BCL2	NA	16	epithelium, basal laver	NA	2	epithelium, basal layer	No difference
11 Vered et al	2009	bcl-2	BCL2	6	6	epithelium, basal and (lower in) parat	27	27	epithelium, basal and (lower in) para	No difference
12 Kolar et al	2006	bcl-2	BCL2	NA	18	epithelium, basal laver	NA	39	epithelium, basal laver	BCNS-associated OKCs presented a significantly higher H-
13 Kimi et al	2000	bcl-2	BCL2	6	9	epithelium, basal laver, cytoplasmic	32	53	epithelium, basal laver, cytoplasmic	No difference
14 Lo Muzio et al	1999	bcl-2	BCL2	15	16	epithelium, basal laver, cytoplasmic	13	16	epithelium, basal laver, cytoplasmic	No difference
15 Leonardi et al	2013	survinin	BIRC5	12	12	epithelium, all lavers, nuclear and cyte	28	28	epithelium, primary; basal and parab	There was a pattern difference in epithelial expression of
16 Kimi et al	2001	caspase-3	CASP3	9	9	epithelium, basal to suprabasal or sur	24	24	epithelium, basal to suprabasal or su	No difference
12 Doll et al	2018	Cyclin D1	CCND1	"all"	NA	enithelium suprabasal laver nuclear	all	NA	enithelium suprabasal laver nuclea	BCNS-associated OKCs presented a significantly higher nu
18 Ibrahim et al	2016	Cyclin D1	CCND1	1	5	enithelium basal and suprabasal lave	3	8	epithelium basal and suprabasal lay	No difference
19 Vera-Sirera et al	2015	Cyclin D1	CCND1	6	6	epithelium, suprabasal (mainly) and b	40	40	epithelium, suprabasal (mainly) and	BCNS-associated OKCs presented a significantly higher nu
so Gurgel et al	2014	Cyclin D1	CCND1	5	5	enithelium suprabasal (mainly) and b	18	18	enithelium suprabasal (mainly) and	No difference
31 Shimada et al	2013	Cyclin D1	CCND1	16	16	enithelium basal and suprabasal lave	20	20	enithelium basal and suprabasal lay	No difference
n Hakim et al	2011	Cyclin D1	CCND1	NA	6	enithelium	NA	12	enithelium	No difference
w Kimi et al	2001	Cyclin D1	CCND1	9	9	enithelium basal and suprabasal lave	26	34	enithelium basal and suprabasal lay	No difference
a Lo Muzio et al	1999	Cyclin D1	CCND1	16	16	enithelium basal and suprabasal lave	0	16	no expression	Cyclin D1 was expressed only in the enthelium of BCNS-as
25 Chang et al	2017	CD1a	CD1A	NA	2	langerhans cells	NA	58	langerhans cells	No difference
w Mello et al	2013	CD1a	CD1A	NA	5	langerhans cells	NA	13	langerhans cells	No difference
1 Leite et al	2017	CD34	CD34	NA	17	endothelial cells	NA	24	endothelial cells	No difference
Nonaka et al	2012	CD34	CD34	NA	22	endothelial cells	NA	30	endothelial cells	No difference
m Mello et al	2013	e-cadherin	CDH1	5	5	enthelium suprahasal laver cytoplas	13	13	enithelium suprahasal laver cytopla	No difference
Hakim et al	2011	e-cadherin	CDH1	6	6	enithelium basal and luminal laver me	12	12	enithelium basal and luminal laver n	No difference
Kimi et al	2001	n21	CDKN1A	7	9	enithelium basal to superficial laver i	29	34	enthelium basal to superficial laver	No difference
si Kolar et al	2006	021 (Maf1)	CDKN1A	NA	18	NA	NA	30	NA	No difference
sz Kimi et al	2000	p21 (wall)	CDKN1B	0	9	anthalium suprabasal to suparficial k	33	34	anithalium suprahasal to superficial	No difference
Kolar et al	2001	p27 (Kin1)	CDKN1B	NA	18	epithelium, suprabasar to superficial i	NA	30	anithalium basal lavar	BCNS accorded OKCe presented a significantly higher H
kimi et al	2000	016	CDKN2A	9	9	enthelium basal and suprabasal lave	14	34	enthelium basal and suprabasal lay	BCNS-associated OKCs presented a significantly higher nu
Grazinger et al	2008	caloonin	CNN3	0	1	no expression	0	4	no expression	No difference
Amorim et al	2004	collagen N/	COL445	1	5	hasement membrane (discontinuous)	7	10	hasement membrane (6 discontinuo	No difference
S7 Anorini et al	2004	collagen IV	COLTAS	0	2	basement memorane (discontinuous :	0	24	basement membrane: stremal calls	No difference
sa Cota et al	2013	beta catania	CTNNR1	12	12	anithalium all lavars strang intensity	20	24	anthelium has al and parahas al lave	There was a pattern difference in anthalial expression of
Hakim at al	2013	beta catonia	CTNNP1	NA NA	6	epithelium, all layers, strong intensity,	NA	12	antholium, basal and parabasal lay	Absence of hets estable establishes was significant
40 Hakinet al	1007	ECE	EOE	0	0	epithelium, basar and suprabasar laye	10	12	epithelium, basar and suprabasar lay	No difference
41 Littal	2006	COF	2 EDEP2	NA	40	epithelium, suprabasariayer, cytopias	NA	20	epithelium, suprabasariayer, noroba	PCNS appropriated OKCo proported a pignificanthy higher H
42 Noidr et al	2000	VDE	EROD2	20	20	epithelium, basariayer	20	39	epithelium, basariayer	Bons-associated once presented a significantly higher H-
Kimi at al	2020	Eas (CDOS)	EAS	20	23	epithelium, no particular pattern of dis	24	24	epithelium, no particular pattern of d	The Eas (CD05) immunostaining had a more bread distribution
44 runn et al	2001	Fas (CD95)	FASIO	3	3	epithelium, suprabasar to superficial la	34	34	epitrenom, suprabasar to superficial	The ras (CD00) immunostaining had a more broad distributi
Amorim at al	2001	fibranactio	ENIA	4	3	epinnenum, basar and supradasal laye	20	10	bacamost membrane (2-discosting	There was a pattern difference in the avarageirs of fiberer
Anorim et al	2004	FOVILL	FOVAL	4	5	casement memorane (3=discontinuou	10	10	pasement memorane (2=discontinuo	There was a pattern unterence in the expression of fibroni
47 Shimada et al	2013	FUAMI	FUAM1	10	16	epimelium, pasar and suprabasal lave	20	20	epimelium, pasar and suprabasar lay	No difference

Εικ. 5.4 Τμήμα του πίνακα καταγραφής των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας. Ο πλήρης πίνακας είναι διαθέσιμος ως αρχείο ESM1 (Table S7) στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <u>https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-03877-w#Sec18</u>. BCNS: Basal Cell Nevus Syndrome, HUGO: Human Genome Organization, NA: not available, OKC: odontogenic keratocyst.

5.3.3. Αξιολόγηση κινδύνου μεροληψίας

Ο έλεγχος του κινδύνου μεροληψίας (risk of bias) των 71 μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην ποιοτική ανάλυση έγινε από δύο ερευνητές ανεξάρτητα και περιπτώσεις διχογνωμίας επιλύθηκαν κατόπιν συζήτησης με έναν τρίτο ερευνητή. Επειδή το σύνολο των άρθρων που αξιολογήθηκαν αφορούσε σε αναδρομικές μελέτες, χωρίς στοιχεία παρακολούθησης των ασθενών, ο έλεγχος του κινδύνου μεροληψίας έγινε με το εργαλείο κριτικής αξιολόγησης για σειρές περιστατικών του Ινστιτούτου Joanna Briggs. 556 Αυτό το εργαλείο περιλαμβάνει 10 ερωτήσεις-κριτήρια που λαμβάνουν τις απαντήσεις «ναι» (όταν πληρείται το αντίστοιχο κριτήριο), «όχι» (όταν δεν πληρείται το αντίστοιχο κριτήριο), «είναι ασαφές», ή «είναι μη εφαρμόσιμο». Οι 3 ερωτήσεις που έλαβαν την απάντηση «είναι μη εφαρμόσιμο» εξαιρέθηκαν από την αξιολόγηση (Πίνακας 5.2). Στις μελέτες που εξετάστηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση πολλαπλών δεικτών, τα ερωτήματα εξετάστηκαν για κάθε δείκτη ξεχωριστά και κάθε ερώτημα έλαβε την απάντηση «ναι», εφόσον αυτή αντιστοιχούσε σε όλους τους δείκτες της μελέτης. Αν έστω και ένας δείκτης λάμβανε την απάντηση «είναι ασαφές» ή «όχι» σε κάποιο ερώτημα, η τελική απάντηση για όλους τους δείκτες της μελέτης σε αυτό το ερώτημα ήταν «είναι ασαφές» ή «όχι», αντίστοιχα. Μία μελέτη χαρακτηρίστηκε με χαμηλό *κίνδυνο μεροληψίας*, όταν έλαβε την απάντηση «ναι» σε ≥70% των ερωτήσεων (δηλαδή σε ≥5 ερωτήσεις), με *μέτριο κίνδυνο μεροληψίας*, όταν έλαβε την απάντηση «ναι» σε 50–69% των ερωτήσεων (δηλαδή σε 4 ερωτήσεις), και **υψηλό κίνδυνο μεροληψίας**, όταν έλαβε την απάντηση «ναι» σε έως 49% των ερωτήσεων (δηλαδή σε ≤3 ερωτήσεις). 557, 558 Η οπτικοποίηση της αξιολόγησης του κινδύνου μεροληψίας έγινε με τη χρήση των προγραμμάτων MORPHEUS⁴³⁷ (ανά μελέτη) και Review Manager 5.4⁵⁵⁹ (για το σύνολο των μελετών).

Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist	Ερώτηση με βάση το αντίστοιχο κριτήριο στην παρούσα μελέτη	Απαντήσεις
1. Were there clear criteria for inclusion in the case	Α) Ανέφεραν οι συγγραφείς κριτήρια στα οποία βασίστηκε η διάγνωση του ΣΣΒΚ;	· Α και Β= ναι
series?	B) Ανέφεραν οι συγγραφείς κριτήρια στα οποία βασίστηκε η διάννωση της ΟΚΚ? (π.χ., έκδοση ΠΟΥ ή αναλυτική	· Α ή Β= ασαφές
	ιστοπαθολογική περιγραφή, με αναφορά στην παρακερατινοποιημένη επιφανειακή επιθηλιακή στιβάδα και στην παραλληλία των κυττάρων της βασικής στιβάδας);	· ούτε Α ούτε Β= όχι
2. Was the condition measured in a standard,	Ανέφεραν οι συγγραφείς αναλυτικά στοιχεία για τις ακόλουθες παραμέτρους της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου;	· όλα (Α-Ε)= ναι
reliable way for all participants included in the case series?	Α) αντίσωμα (όνομα/κλώνος ή εταιρεία προέλευσης) Β) αραίωση Γ) μέθοδος ανίχνευσης <i>(signal amplification system)</i> Δ) θετικός μάρτυρας* Ε) αρνητικός μάρτυρας*	· Α, χωρίς κάποιο από τα Β-Ε= ασαφές
		· όχι Α (ανεξάρτητα από τα Β-Ε)= όχι
3. Were valid methods used for identification of the	Ανέφεραν οι συγγραφείς αναλυτικά στοιχεία για τη μέθοδο	· ναι
condition for all participants included in the case series?	βαθμονόμησης);**	· όχι
4. Did the case series have con	secutive inclusion of participants?	Μη εφαρμόσιμο

Πίνακας 5.2 Κριτήρια αξιολόγησης κινδύνου μεροληψίας των 71 μελετών σύμφωνα με το Ινστιτούτο Joanna Briggs.⁵⁵⁶

5. Did the case series have complete inclusion of participants?Μη εφαρμόσιμο									
6. Was there clear reporting of the demographics of the	Ανέφεραν οι συγγραφείς στοιχεία για τα δημογραφικά χαρακτηριστικά;	· Α και Β= ναι							
participants in the study?	Α) το φύλο ή την αναλογία φύλου*** Β) ηλικία/περίπτωση ή μέση/διάμεση ηλικία ή εύρος ηλικίας***	· Α ή Β= ασαφές							
		· ούτε Α ούτε Β= όχι							
7. Was there clear reporting of clinical information of the	Ανέφεραν οι συγγραφείς τις ακόλουθες πληροφορίες για τις περιπτώσεις ΟΚΚ;	· όλα (Α-Γ)= ναι							
participants?	Α) αριθμό περιπτώσεων ΟΚΚ ανά υπότυπο Β) αριθμό ασθενών ανά υπότυπο	· Α, χωρίς Β ή/και Γ= ασαφές							
	Γ) εντόπιση των ΟΚΚ στην άνω ή κάτω γνάθο***	· όχι Α (ανεξάρτητα από Β, Γ)= όχι							
8. Were the outcomes of cases clearly reported?	Ανέφεραν οι συγγραφείς τις ακόλουθες πληροφορίες για τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα;	· Α και Β= ναι							
	A) αριθμό θετικών περιπτώσεων ανά υπότυπο **** B) περιγραφή αγοσοϊστοχριμκής χρώσης εντός του κειμένου:	· Α, χωρίς Β= ασαφές							
	εντόπιση σε ιστό (π.χ., επιθήλιο ή κυστικό τοίχωμα) και, όταν η χρώση ήταν στο επιθήλιο, στιβάδα και υποκυττάριο διαμέρισμα (πυρήνα, κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη)	· όχι Α (ανεξάρτητα από Β)= όχι							
9. Was there clear reporting of the presenting site(s)/clinic(s) demographic information? Μη εφαρμόσιμο									
10. Was statistical analysis appropriate?	Ανέφεραν οι συγγραφείς τη στατιστική μέθοδο με την οποία συνέκριναν την ανοσοϊστοχημική έκφραση (κάθε υπό εξέταση	·ναι							
	δείκτη) μεταξύ των δύο υποτύπων ΟΚΚ;	· όχι							

Συντομογραφίες: ΠΟΥ: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ΟΚΚ: Οδοντογενής Κερατινοκύστη, ΣΣΒΚ: Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων *Αναφορές "as appropriate" ή "according to protocol" χωρίς περισσότερα στοιχεία για τους μάρτυρες θεωρήθηκαν ελλιπείς και δεν προσμετρήθηκαν.

**Για παράδειγμα, αν εφαρμόστηκε διχοτόμος (εκφράζεται ή δεν εκφράζεται), ημιποσοτική (κατηγορίες), ή ποσοτική μέθοδος και εάν συνυπολογίστηκε η ένταση ή/και η έκταση της χρώσης.

***Είτε ανά υπότυπο είτε για το σύνολο των περιπτώσεων ΟΚΚ.

****Εάν τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρουσιάζονταν ως μέσο score (π.χ., μέσο % θετικών κυττάρων) ή περιγραφικά (π.χ., «σχεδόν όλες» ή «όχι όλες»), και όχι ως αριθμός θετικών περιπτώσεων, ανά υπότυπο, τότε η απάντηση στην αντίστοιχη ερώτηση ήταν «ασαφές», ενώ αν παρουσιάζονταν ως ο συνολικός αριθμός θετικών περιπτώσεων, χωρίς επιμέρους στοιχεία ανά υπότυπο, η απάντηση ήταν «όχι».

5.3.4. Στατιστική ανάλυση

Η ποσοτική ανάλυση (μετα-ανάλυση), η οποία διενεργήθηκε με τον πρόγραμμα Meta-DiSc Version 1.4,⁵⁶⁰ αποσκοπούσε να ελεγχθεί αν η έκφραση κάποιου ανοσοϊστοχημικού δείκτη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό κριτήριο για να προβλέψει τις συνδρομικές ΟΚΚ. Για το σκοπό αυτό ορίστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες:⁵⁶¹

Πραγματική κατάσταση (νόσος)

- **θετική**: ΟΚΚ με το ΣΣΒΚ ή συνδρομική ΟΚΚ (σΟΚΚ)
- αρνητική: ΟΚΚ χωρίς το ΣΣΒΚ ή σποραδική ΟΚΚ (ΟΚΚ)

Προβλέψιμη κατάσταση (έκφραση δείκτη)

- αληθώς θετική (true positive, TP): σΟΚΚ που εκφράζει το δείκτη
- αληθώς αρνητική (true negative, TN): ΟΚΚ που δεν εκφράζει το δείκτη
- ψευδώς αρνητική (false negative, FN): σΟΚΚ που δεν εκφράζει το δείκτη
- ψευδώς θετική (false positive, FP): ΟΚΚ που εκφράζει το δείκτη

Ένας δείκτης που θα αποτελούσε άριστο διαγνωστικό κριτήριο θα ήταν αυτός που θα εκφραζόταν σε όλες τις συνδρομικές περιπτώσεις (100% αληθώς θετικές) και σε καμία σποραδική (100% αληθώς αρνητικές). Έτσι μία περίπτωση χαρακτηρίζεται ως **θετική** ή **αρνητική** με βάση το αν εκφράζει η όχι το δείκτη, αντίστοιχα, και ως **αληθώς** ή **ψευδώς** ανάλογα με το αν ικανοποιεί τη συνθήκη ότι οι σΟΚΚ θα πρέπει να εκφράζουν το δείκτη ενώ οι ΟΚΚ όχι.

Με βάση το συνολικό αριθμό περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ και τον αριθμό περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ που εξέφραζαν ένα δείκτη υπολογίστηκαν οι ακόλουθες έννοιες σε κάθε μελέτη για τους δείκτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση:

- ευαισθησία (sensitivity ή true positive ratio, TPR): ποσοστό αληθώς θετικών περιπτώσεων επί του συνόλου των θετικών [TP/(TP+FN)],^{561, 562}
- ειδικότητα (specificity ή true negative ratio, TNR): ποσοστό αληθώς αρνητικών περιπτώσεων επί του συνόλου των αρνητικών [TN/(TN+FP)],^{561, 562}
- λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive likelihood ratio, LR+): λόγος του ποσοστού αληθώς θετικών περιπτώσεων επί του συνόλου των θετικών προς το ποσοστό ψευδώς θετικών περιπτώσεων επί του συνόλου των αρνητικών [TPR/FPR, όπου FPR=FP/(FP+TN)],^{561, 563}
- λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative likelihood ratio, LR-): λόγος του ποσοστού ψευδώς αρνητικών περιπτώσεων επί του συνόλου των θετικών προς το ποσοστό αληθώς αρνητικών περιπτώσεων επί του συνόλου των αρνητικών [FNR/TNR, όπου FNR=FN/(FN+TP)],^{561, 563}
- λόγος διαγνωστικών πιθανοτήτων (diagnostic odds ratio, DOR): πηλίκο του λόγου θετικών πιθανοτήτων προς το λόγο αρνητικών πιθανοτήτων (LR+/LR-).^{561, 564}

Επιλέξιμοι για μετα-ανάλυση θεωρήθηκαν οι δείκτες για τους οποίους υπήρχαν **αναλυτικά αριθμητικά δεδομένα** (συνολικός αριθμός περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ, αριθμός περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ που εξέφραζαν ένα δείκτη) **σε τουλάχιστον 2 μελέτες** με **ειδικότητα>0**.^{565, 566} Ειδικότητα=0 προϋπέθετε ότι TN=0, δηλαδή ότι δεν υπήρχαν αληθώς αρνητικές περιπτώσεις, άρα ότι όλες οι σποραδικές ΟΚΚ εξέφραζαν το δείκτη, γεγονός που δε θα του προσέδιδε καμία διαγνωστική αξία για τον προσδιορισμό των συνδρομικών ΟΚΚ. Με βάση αυτά τα κριτήρια, από τους 32 επαναλαμβανόμενους δείκτες που περιλαμβάνονταν στις 71 μελέτες της συστηματικής ανασκόπησης, **6** δείκτες (bcl-2, Cyclin D1, CD56, CK18, p53 και PCNA) με δεδομένα σε **11** μελέτες επιλέχθηκαν για τη μετα-ανάλυση (Εικ. 5.1). Ο έλεγχος της ετερογένειας μεταξύ των πολλαπλών μελετών που ανέφεραν έναν δείκτη πραγματοποιήθηκε με το Cochran Q test⁵⁶⁷ και αντιπροσωπεύτηκε με το ποσοστό Higgins $(I^2)^{568}$ ως εξής: ασήμαντη ετερογένεια για $I^2 < 25\%$, χαμηλή ετερογένεια για $25 \le I^2 < 50\%$, μέτρια ετερογένεια για 50≤ I^2 <75%, και υψηλή ετερογένεια για I^2 ≥75%.⁵⁶⁹ Για τους 6 δείκτες, υπολογίστηκαν, επίσης, συγκεντρωτικά αποτελέσματα του λόγου διαγνωστικών πιθανοτήτων (pooled DOR), χρησιμοποιώντας το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων DerSimonian–Laird⁵⁷⁰ με τη μέθοδο της αντίστροφης διακύμανσης, τα οποία απεικονίστηκαν σε forest plots, με διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI) 95%. Με βάση την ευαισθησία και την ειδικότητα, υπολογίστηκαν η καμπύλη ROC (receiver operating characteristic),⁵⁷¹ για τους δείκτες, για τους οποίους συμπεριλήφθηκαν 2 μελέτες στη μετα-ανάλυση, ή η συνοπτική καμπύλη ROC (summary receiver operating characteristic, SROC),⁵⁷² για τους δείκτες, για τους οποίους συμπεριλήφθηκαν >2 μελέτες στη μεταανάλυση. Για τους τελευταίους δείκτες, με χρήση του στατιστικού πακέτου meta R package,⁵⁷³ υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC),⁵⁶¹ που αντιστοιχούσε στην πιθανότητα ο δείκτης να κατατάξει σωστά μία τυχαία επιλεγμένη περίπτωση συνδρομικής ΟΚΚ πάνω από μία τυχαία επιλεγμένη περίπτωση σποραδικής ΟΚΚ. Το AUC λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 και 1, με την τιμή 1 να αντιστοιχεί σε ένα δείκτη με 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα.561

5.4. Αποτελέσματα

71 μελέτες με δεδομένα για 93 διαφορετικούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες που εξετάστηκαν παράλληλα στη σποραδική και συνδρομική ΟΚΚ συμπεριλήφθηκαν στην ποιοτική ανάλυση, ενώ τα στοιχεία για 6 δείκτες προερχόμενα από 11 μελέτες εντάχθηκαν στην ποσοτική ανάλυση.

5.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά μελετών

Οι 71 μελέτες είχαν δημοσιευθεί σε 39 επιστημονικά περιοδικά κατά το χρονικό διάστημα 1987 και 2019 (οι 3 πρώτες μελέτες στην Εικ. 5.2 δημοσιεύθηκαν το 2019, αλλά έχουν καταχωρηθεί πλέον ως δημοσιεύσεις του 2020), εκ των οποίων 39 (54,9%) δημοσιεύθηκαν κατά τη δεκαετία 2010-2019 και 22 (31%) προέρχονταν από το Journal of Oral Pathology & Medicine (16 εργασίες) ή το Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology (6 εργασίες). Οι 60 μελέτες προέρχονταν από ερευνητές από ένα κράτος, εκ των οποίων οι 20 (33,3%) μελέτες ήταν από τη Βραζιλία, 6 (10%) από την Ιαπωνία και 6 (10%) από το Ηνωμένο Βασίλειο. Επίσης, 11 μελέτες ήταν αποτέλεσμα διακρατικής συνεργασίας μεταξύ ερευνητών από 2 ή 3 κράτη, για παράδειγμα μεταξύ Βραζιλίας και Ιταλίας ή Ηνωμένου Βασιλείου και Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (Εικ. 5.2).

5.4.2. Χαρακτηριστικά υποομάδων μελέτης

Ο συνολικός πληθυσμός της μελέτης αποτελείτο από 2356 ΟΚΚ, που κατανέμονταν σε 1-102 (διάμεση τιμή: 20) σποραδικές ΟΚΚ και 1-29 (διάμεση τιμή: 7) συνδρομικές ΟΚΚ ανά μελέτη (Πίνακας 5.3). Ο αριθμός των ασθενών από τους οποίους προήλθαν οι ΟΚΚ ήταν διαθέσιμος ανά υποομάδα ή ως σύνολο σε 33/71 (46,5%) μελέτες και αφορούσε σε 1-49 (διάμεση τιμή: 18) ασθενείς με σποραδικές ΟΚΚ και 1-29 (διάμεση τιμή: 6) ασθενείς με ΟΚΚ ως εκδήλωση του ΣΣΒΚ (Εικ. 5.2). Το φύλο των ασθενών ήταν γνωστό σε 29/71 (40,8%) μελέτες, με βάση τις οποίες η αναλογία ανδρών/γυναικών ήταν 1,23:1 στις σποραδικές ΟΚΚ και 1:1,13 στις συνδρομικές ΟΚΚ. Στοιχεία για την ηλικία των ασθενών ήταν διαθέσιμα σε 28/71 (39,4%) μελέτες, με τη μέση ηλικία των ασθενών με σποραδικές και συνδρομικές ΟΚΚ να κυμαίνεται μεταξύ 13,62-51,1 και 12,84-28,53 χρόνια, αντίστοιχα. Σε 22/71 (31%) μελέτες αναφερόταν η εμπλεκόμενη γνάθος, με την αναλογία εντόπισης στην άνω/κάτω γνάθο να είναι 1:2,56 στις σποραδικές ΟΚΚ και 1:1,42 στις συνδρομικές ΟΚΚ (Εικ. 5.2). Η τεκμηρίωση της ιστοπαθολογικής διάγνωσης της ΟΚΚ είτε με αναλυτική περιγραφή των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών είτε με βιβλιογραφική παραπομπή των διαγνωστικών κριτηρίων ήταν διαθέσιμη σε 32/71 (45,1%) μελέτες, ενώ αναφορά στα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία τέθηκε η διάγνωση του ΣΣΒΚ υπήρχε σε 24/71 (33,8%) μελέτες. Τέλος, σε 16/71 (22,5%) εργασίες πληρούνταν και τα δύο διαγνωστικά κριτήρια.

5.4.3. Χαρακτηριστικά ανοσοϊστοχημικών δεικτών

Από τους 93 ανοσοϊστοχημικούς δείκτες που συμπεριλήφθηκαν στη συστηματική ανασκόπηση, οι 61 μελετήθηκαν σε μία εργασία (μοναδικοί δείκτες) και οι 32 σε 2 έως 17 εργασίες (επαναλαμβανόμενοι δείκτες) (Πίνακας 3, Εικ. 5.3). Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα, ένα μονοκλωνικό και ένα πολυκλωνικό, για τον έλεγχο της

έκφρασης του ίδιου δείκτη, συγκεκριμένα της parathyroid hormonerelated protein (PTHrP).⁵⁷⁴ Οι περισσότερο μελετημένοι δείκτες στους δύο υπότυπους ΟΚΚ ήταν οι Ki-67 (17 μελέτες), p53 (17 μελέτες), Cyclin D1 (8 μελέτες) και bcl-2 (8 μελέτες), ενώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αντισώματα για τον ίδιο επαναλαμβανόμενο δείκτη, καθώς και διαφορετικές αραιώσεις του ίδιου αντισώματος, για παράδειγμα από 1:25 έως 1:1000 για την πρωτεΐνη Κi-67 (Εικ. 5.3). Πληροφορίες σχετικά με τη μέθοδο ανίχνευσης του ανοσοϊστοχημικού σήματος ήταν διαθέσιμες σε 60/71 (84,5%) μελέτες και στην πλειονότητα αφορούσαν στο σύστημα αβιδίνης/στρεπταβιδίνηςβιοτίνης. Η αξιολόγηση της χρώσης έγινε από 1 έως 3 ερευνητές σύμφωνα με 28/71 (39,4%) μελέτες που ανέφεραν αυτήν την πληροφορία] με παρατήρηση τομών πάχους 3-5μm [ννωστή πληροφορία σε 64/71 (90,1%) μελέτες] (Εικ. 5.3). Δεδομένα σχετικά με την ύπαρξη θετικού και αρνητικού μάρτυρα ήταν διαθέσιμα σε 42/71 (59,2%) και 54/71 (76,1%) μελέτες, αντίστοιχα, με την πλειοψηφία των αρνητικών μαρτύρων να συνίσταται σε παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος (Εικ. 5.3).

5.4.4. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Οι 84/93 δείκτες που εξετάστηκαν εκφράζονταν και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ (Πίνακας 3), χωρίς ιδιαίτερες διαφορές στο πρότυπο χρώσης μεταξύ των περιπτώσεων κάθε υποτύπου (Εικ. 5.4). Πλήρης απουσία έκφρασης καταγράφηκε για τους δείκτες calponin, CK8, CK10, GFAP, laminin (που κωδικοποιείται από τα γονίδια LAMA1, LAMA2, LAMB1, LAMB2), και laminin α2 (που κωδικοποιείται από το LAMA2), που εξετάστηκαν σε μία μελέτη έκαστος, 132, 575-577 καθώς και για τον επαναλαμβανόμενο δείκτη CK7.576, 577 Το κολλαγόνο VII εκφραζόταν μόνο στις συνδρομικές ΟΚΚ,⁵⁷⁸ ενώ έκφραση της πρωτεΐνης TLR3 παρατηρήθηκε μόνο στις σποραδικές ΟΚΚ.⁵⁷⁹ Για τους περισσότερους επαναλαμβανόμενους δείκτες δε σημειώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των μελετών που εξέτασαν τον ίδιο δείκτη. Εξαίρεση ήταν το CD56^{580, 581} και το S100,^{577, 582} η έκφραση των οποίων παρατηρήθηκε και στους δύο υπότυπους ΟΚΚ σε μία από τις δυο μελέτες που εξετάστηκε έκαστο, το SMA, το οποίο βρέθηκε να εκφράζεται σε 2 από τις 3 μελέτες που εξέτασαν την έκφρασή του,^{321, 577, 583} και το GLI1, το οποίο σύμφωνα με 3 μελέτες εκφραζόταν και στις σποραδικές και στις συνδρομικές ΟΚΚ.^{488, 541, 542} ενώ πλήρης απουσία έκφρασης αναφέρθηκε από μία άλλη μελέτη.¹¹⁴ Επιπλέον, δύο μελέτες ανέφεραν έκφραση των Ki-67 και Cyclin D1 μόνο στις συνδρομικές OKK,^{539, 584} σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ερευνών που παρατήρησε έκφραση των δύο δεικτών και στους δύο υπότυπους (Εικ. 5.4). Πλήρης απουσία έκφρασης του p53 αναφέρθηκε σε μία μελέτη και έκφραση μόνο στο συνδρομικό υπότυπο σε μία άλλη, σε αντίθεση με 15 μελέτες που βρήκαν p53 έκφραση και στους δύο υπότυπους OKK (Εικ. 5.4). Τέλος, μία μελέτη βρήκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της β-catenin στις σποραδικές OKK,¹³² ενώ μία άλλη στις συνδρομικές OKK.¹³⁷

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρουσιάζονταν ως αριθμός/ ποσοστό θετικών περιπτώσεων [διαθέσιμα σε 49/71 (69%) μελέτες] ή/και με περιγραφή του προτύπου της χρώσης, δηλαδή της χρώσης ιστό (επιθήλιο/ μεσέγχυμα), εντόπισης της στον σε στιβάδα συγκεκριμένη επιθήλιου (βασική/ ενδιάμεση/ του επιφανειακή) και σε συγκεκριμένη υποκυττάρια εντόπιση (πυρηνική/ κυτταροπλασματική/ μεμβρανική), που ήταν διαθέσιμα σε 51/71 (71,8%) μελέτες (Εικ. 5.4). Η συντριπτική πλειοψηφία των δεικτών που εξετάστηκαν είχαν επιθηλιακή έκφραση, ενώ ορισμένοι δείκτες εκφράζονταν στη βασική μεμβράνη, στις ινοβλάστες και τα φλεγμονώδη κύτταρα του κυστικού τοιχώματος, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μαστοκύτταρα και τα κύτταρα Langerhans (Εικ. 5.4).

Οι 46/71 (64,8%) μελέτες δεν κατέληξαν σε καμία ανοσοϊστοχημική διαφορά μεταξύ των δύο υποτύπων, ενώ σε 25/71 (35,2%) μελέτες παρατηρήθηκε διαφορά σε συνολικά 29 δείκτες, οι περισσότεροι εκ των οποίων (22/29) εμφάνιζαν «αυξημένη» έκφραση στις συνδρομικές ΟΚΚ (Πίνακας 3). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η «αυξημένη» έκφραση συνίστατο σε μεγαλύτερο αριθμό θετικών κυττάρων ή σε μεγαλύτερο γινόμενο έντασης*έκτασης χρώσης, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον αριθμό/ποσοστό θετικών περιπτώσεων ανά υπότυπο. Συγκεκριμένα, οι θετικές περιπτώσεις αναφέρονταν σε 19/25 μελέτες που βρήκαν διαφορές και σε >2/3 αυτών αφορούσαν στο σύνολο του δείγματος (Εικ. 5.4). Τέλος, σε ορισμένες μελέτες αναφέρθηκαν περιγραφικές διαφορές στο πρότυπο χρώσης, που ήταν πιο διάχυτο ή πιο μεγάλης έντασης στις συνδρομικές (για τους δείκτες CK17,⁶¹¹ β-catenin, survinin,¹³⁷ και heparanase⁶⁰⁶) ή στις σποραδικές (για τους δείκτες CK18,⁶¹¹ fibronectin, and tenascin⁵⁷⁵) ΟΚΚ (Πίνακας 5.3).

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	ОКК	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[⁵⁸⁵]	59	29	30	APE-1, XRCC-1, XPF	Μεγαλύτερος αριθμός επιθηλιακών κυττάρων με κυτταροπλασματική XPF χρώση στις σποραδικές ΟΚΚ (p=0,039).
[⁵⁸⁶]	30	10	20	p53, p63, p73	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁸⁷]	46	18	28	podoplanin	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁷⁸]	30	3	27	κολλαγόνο VII	Δε βρέθηκαν διαφορές.*
[⁵⁴¹]	86	29	57	SHH, PTCH1, PTCH2, SMO, GLI1, GLI2, GLI3	Μεγαλύτερο ποσοστό επιθηλιακών κυττάρων SHH+, SMO+ και GLI1+ στις σΟΚΚ (p<0,05).
[⁴⁸⁶]	54	NA	NA	Ki-67, p53, Cyclin D1	Μεγαλύτερος αριθμός Cyclin D1+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ (p=0,001).
[⁵⁸⁸]	17	3	14	Ki-67, p53, bcl-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁸⁹]	41	17	24	GLUT1, GLUT3, CD34	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁸²]	60	2	58	S100	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁰]	60	2	58	CD1a	Δε βρέθηκαν διαφορές.

Πίνακας 5.3 Συγκριτικό ανοσοϊστοχημικό προφίλ της συνδρομικής ΟΚΚ (σΟΚΚ) και της σποραδικής ΟΚΚ. Με έντονη γραφή (bold) συμβολίζονται οι πρωτεϊνικοί δείκτες με σημαντική διαφορά στο πρότυπο έκφρασης μεταξύ των δύο υποτύπων ΟΚΚ.

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	ΟΚΚ	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[³²³]	35	3	32	FAK	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹¹]	28	5	23	glypican-3	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁴³⁴]	13	5	8	p53, PCNA, bcl-2, Cyclin D1	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹²]	46	6	40	GLUT1	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁸¹]	46	6	40	CD56 (NCAM)	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁷⁹]	40	12	28	TLR3, TLR4	Μεγαλύτερος αριθμός TLR4+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ σε σχέση με τις πρωτοπαθείς σποραδικές ΟΚΚ (p<0,0001).**
[⁵⁹³]	14	6	8	Ki-67, metallothionein	Μεγαλύτερος αριθμός metallothionein+ επιθηλιακών κυττάρων στις σποραδικές ΟΚΚ (p<0,05).
[⁵⁴⁰]	46	6	40	Cyclin D1	Μεγαλύτερος αριθμός Cyclin D1+ κυττάρων στην παραβασική στιβάδα των σΟΚΚ σε σχέση με τις σποραδικές ΟΚΚ (p<0,001).
[⁵⁹⁴]	42	17	25	hMLH1, p63, MDM2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁵]	3	1	2	MMP1, 2, 3, 11, 12, 14, 16	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁶]	13	7	6	Ki-67, p53	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[³²¹]	23	12	11	Ki-67, MMP1, MMP2, MMP9, SMA	Δε βρέθηκαν διαφορές.
Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	OKK	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
--------------------	---------------	------	-----	---	---
[551]	23	5	18	Cyclin D1	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁷]	14	9	5	Ki-67	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁸]	40	2	38	PCNA	Μεγαλύτερος αριθμός PCNA+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ (p<0,01).
[¹³⁷]	40	12	28	β-catenin, survinin	Εντονότερη έκφραση σε όλες τις στιβάδες για β-catenin (p=0,0003) και survivin (p<0,0048) στις σΟΚΚ, ενώ ασθενής χρώση μόνο στη βασική και παραβασική στιβάδα στις σποραδικές ΟΚΚ.
[¹¹⁴]	36	16	20	PTCH1, PTCH2, SUFU, GLI1, GLI2, FOXM1, Cyclin D1, bcl-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁴²⁷]	18	5	13	CD1a, E-cadherin	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁹⁹]	10	5	5	mast cell tryptase	Μεγαλύτερος αριθμός mast cell tryptase+ κυττάρων στις σΟΚΚ (p=0,03).
[⁵⁸³]	52	22	30	RANK, OPG, CD34, SMA	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[¹⁴⁴]	18	16	2	bcl-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵²⁶]	20	2	18	Ki-67, p53, COX-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰⁰]	116	14	102	COX-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	OKK	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[⁵⁸⁴]	19	7	12	Ki-67, p53, PCNA	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[¹³²]	18	6	12	Ki-67, p53, p63, Cyclin D1, Wnt-1, Wnt-10A, β-catenin , E-cadherin, laminin a2, tenascin-C	Μεγαλύτερη απουσία β-catenin επιθηλιακής χρώσης στις σΟΚΚ (p<0,05).
[⁶⁰¹]	39	13	26	MMP13	Μεγαλύτερο ποσοστό σΟΚΚ με >50% ΜΜΡ13+ επιθηλιακά κύτταρα (p=0,03).
[⁵²³]	30	7	23	Ki-67	Μεγαλύτερος αριθμός Κi67+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ συγκριτικά με τις μονήρεις (p=0,018) ή τις πολλαπλές (p=0,002) σποραδικές ΟΚΚ.
[⁵⁸⁰]	19	3	16	CD56 (NCAM)	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰²]	20	5	15	laminin-1	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁷⁶]	25	5	20	CKs (7, 8, 10, 13, 14, 18, 19)	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰³]	62	20	42	Ki-67	Μεγαλύτερος αριθμός Ki-67+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ (p<0,01).
[⁴⁸⁸]	33	6	27	PTCH, SMO, GLI1, bcl-2	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰⁴]	41	21	20	MMP1 , MMP7, MMP26	Πιο έντονη MMP-1 χρώση στο επιθήλιο των σΟΚΚ (p=0,001).

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	ОКК	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[⁶⁰⁵]	26	15	11	Ki-67	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[¹²²]	65	17	48	substance P	Σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση substance Ρ στο επιθήλιο και στο το συνδετικό ιστό των σΟΚΚ (μη διαθέσιμο p-value).
[³⁹⁵]	37	9	28	Ki-67, p53, p63	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[577]	5	1	4	CK5/6, CK7, p63, calponin, GFAP, SMA, S100	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰⁶]	20	10	10	heparanase	Έντονη χρώση για heparanase στις σΟΚΚ και ασθενής στις σποραδικές ΟΚΚ.
[⁵²⁴]	83	29	54	Ki-67	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵³⁸]	57	18	39	p53, p53 phosphorylated, bcl-2, Bax, p21Waf1, p27Kip1, c-erbB- 2/HER2/neu, PCNA, Ki-67	Μεγαλύτερο γινόμενο έντασης*αριθμού θετικών επιθηλιακών κυττάρων για bcl-2 (p=0,006), p27Kip1 (p=0,018) και c-erbB- 2/HER2/neu (p=0,029) στις σΟΚΚ, ενώ για Ki-67 (p=0,011) στις σποραδικές ΟΚΚ.
[⁶⁰⁷]	37	7	30	р63	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁴²]	22	4	18	SHH, PTCH, SMO, GLI1	Μεγαλύτερος αριθμός GLI1+ υποεπιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ συγκριτικά με τις πρωτοπαθείς σποραδικές ΟΚΚ (p<0,01).

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	OKK	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[⁵⁷⁵]	15	5	10	fibronectin, tenascin, laminin, κολλαγόνο IV	Ασυνεχής/εντοπισμένη χρώση για fibronectin και tenascin στη βασική μεμβράνη των σΟΚΚ, ενώ συνεχής/ διάχυτη στις σποραδικές ΟΚΚ.
[⁶⁰⁸]	29	NA	NA	РТСН	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶⁰⁹]	10	3	7	Nm23-H1 (NME1)	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁴³]	19	11	8	PTCH, GLI1	Η ΡΤCΗ χρώση ήταν πιο έντονη στη βασική στιβάδα στις σΟΚΚ και στην επιφανειακή στιβάδα στη σποραδικές ΟΚΚ.
[⁵³⁷]	43	9	34	Cyclin D1, p16, p21, p27, DNA topoisomerase IIa, Fas (CD95), FasL, caspase-3, single-stranded DNA	Μεγαλύτερος αριθμόςDNA topoisomerase IIa+ (p<0,001) και single- stranded DNA+ (p<0,001) επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ σε σχέση με τις σποραδικές ΟΚΚ. Μεγαλύτερος αριθμός σΟΚΚ ήταν p16+ συγκριτικά με τις σποραδικές ΟΚΚ (p<0,01). Πιο διάχυτη Fas (CD95) χρώση παρατηρήθηκε στο επιθήλιο των σΟΚΚ σε σχέση με τις πρωτοπαθείς σποραδικές ΟΚΚ (p<0,01).
[⁶¹⁰]	62	9	53	Ki-67, p53, bcl-2, Ley	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶¹¹]	13	6	7	CK13, CK18, CK17, AE1/AE3, CEA, CAM 5.2	Η χρώση της CK18 ήταν πιο εμφανής στις σποραδικές OKK, ενώ η χρώση της CK17 ήταν πιο έντονη και διάχυτη στις σOKK.
[⁵³⁹]	32	16	16	p53, PCNA, bcl-2, Cyclin D1	Η Cyclin D1 και το p53 εκφράζονταν στο επιθήλιο μόνο των σΟΚΚ.
[⁶¹²]	17	8	9	p53, MDM2	Δε βρέθηκαν διαφορές.

Μελέτη	Σύνολο ΟΚΚ	σΟΚΚ	ОКК	Πρωτεϊνικοί δείκτες	Αποτέλεσμα σύγκρισης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων
[⁵⁷⁴]	27	9	18	PTHrP	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵⁵³]	27	9	18	EGF, TGFa	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁴⁶¹]	20	10	10	SKALP	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵³⁶]	41	21	20	PCNA	Μεγαλύτερος αριθμός PCNA+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ (p<0,05).
[⁵⁵²]	22	6	16	p53	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁵²⁵]	27	9	18	Ki-67	Μεγαλύτερος αριθμός Ki-67+ επιθηλιακών κυττάρων στις σΟΚΚ (p<0,009).
[⁶¹³]	30	5	25	p53	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶¹⁴]	30	NA	NA	gp38 (MH99)	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶¹⁵]	12	1	11	p53, PCNA	Δε βρέθηκαν διαφορές.
[⁶¹⁶]	3	2	1	AE1/AE3 (pankeratin)	Δε βρέθηκαν διαφορές.

*Το κολλαγόνο VII εκφραζόταν μόνο σε 8/27 ΟΚΚ, ενώ σε 0/3 σΟΚΚ, αλλά η διαφορά αυτή ήταν μη στατιστικά σημαντική (p= 0.5448). **Ο TLR3 εμφάνιζε πολύ ασθενή χρώση σε μεμονωμένα κύτταρα της βασικής και παραβασικής στιβάδας μόνο των σΟΚΚ, αλλά η διαφορά μεταξύ των ΟΚΚ και σΟΚΚ με βάση τον αριθμό των θετικών κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

5.4.5. Αποτελέσματα αξιολόγησης κινδύνου μεροληψίας

Ο έλεγχος του κινδύνου μεροληψίας έγινε εφαρμόζοντας 7 κριτήρια (Πίνακας 5.2), προτεινόμενα για την κριτική αξιολόγηση σειρών περιστατικών από το Ινστιτούτο *Joanna Briggs*.⁵⁵⁶ Με βάση αυτά τα κριτήρια, 34 (47,9%) μελέτες είχαν υψηλό, 22 (31%) μέτριο και 15 (21,1%) χαμηλό κίνδυνο μεροληψίας (Εικ. 5.6).

Ο κίνδυνος μεροληψίας για κάθε κριτήριο ήταν ανάλογος του αριθμού των μελετών που δεν το πληρούσαν (Εικ. 5.7). Το 1° κριτήριο, που αφορούσε στην επιλογή των ασθενών, δηλαδή στην τεκμηρίωση της ιστοπαθολογικής διάγνωσης της ΟΚΚ και της διάγνωσης του ΣΣΒΚ, πληρείτο σε 16/71 (22,5%) μελέτες. Το 2° κριτήριο αφορούσε στην περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου, η οποία ήταν πλήρης σε λιγότερες από τις μισές (32/71, 45,1%) μελέτες, με το θετικό μάρτυρα να είναι η πιο συχνά (σε 29/39 μελέτες) παραλειπόμενη πληροφορία. Αντίθετα, το 3° κριτήριο, το οποίο αφορούσε στην αξιολόγηση της μεθόδου, δηλαδή στην περιγραφή συστήματος βαθμονόμησης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, πληρείτο σχεδόν σε όλες (67/71, 94,4%) τις μελέτες. Το 4° και 5° κριτήριο αφορούσε στα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης, αντίστοιχα. Το φύλο και η ηλικία των ασθενών αναφέρονταν σε 27/71 (38%) μελέτες, ενώ ο αριθμός των ασθενών και των ΟΚΚ ανά υπότυπο και η εντόπισή τους στις γνάθους ήταν γνωστή σε 16/71 (22,5%) μελέτες. Το 6° κριτήριο αφορούσε στα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης, για τα οποία γινόταν αναλυτική περιγραφή του αριθμού/ποσοστού θετικών περιπτώσεων και των ποιοτικών χαρακτηριστικών (έκταση/εντόπιση) της χρώσης σε 36/71 (50,7%) μελέτες. Τέλος, 48/71 (67,6%) μελέτες πληρούσαν το 7° κριτήριο που αφορούσε στην εφαρμογή στατιστικής ανάλυσης για τον έλεγχο διαφορών στην ανοσοϊστοχημική έκφραση μεταξύ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ.

Επισημαίνεται, επίσης, πως 12/15 μελέτες με χαμηλό κίνδυνο μεροληψίας είχαν δημοσιευθεί τη δεκαετία 2010-2019, γεγονός που υποδηλώνει τάση μείωσης του κινδύνου μεροληψίας με την πάροδο των ετών (Εικ. 5.8).



Santos et al 2020 Mascitti et al 2020 Malaguez et al 2020 Cota et al 2019 Hoyos Cadavid et al 2019 Doll et al 2018 Awni & Conn 2017 Leite et al 2017 Chang et al 2017 (CD-1) Chang et al 2017 (S-100) Sarode et al 2017 Mendes et al 2017 Ibrahim et al 2016 Vera-Sirera et al 2016 Vera-Sirera et al 2015 (CD56) Leonardi et al 2015 Johann et al 2015 Vera-Sirera et al 2015 (Cyclin D1) de Brito Monteiro 2015 Amm et al 2014 Alur et al 2014 de Oliveira Ramos et al 2014 Gurgel et al 2014 Kadlub et al 2013 Singh et al 2013 Leonardi et al 2013 Shimada et al 2013 Mello et al 2013 de Assis Caldas Pereira et al 2012 Nonaka et al 2012 Diniz et al 2012 Mendes et al 2011 Mendes et al 2011 (COX-2) Hakim et al 2011 Figueroa et al 2010 Leonardi et al 2010 Ba et al 2010 Cairns et al 2010 Silva-Gurgel et al 2010

χαμηλός μέτριος μέτριος μέτριος μέτριος υψηλός μέτριος μέτριος μέτριος μέτριος χαμηλός μέτριος χαμηλός χαμηλός υψηλός χαμηλός υψηλός χαμηλός χαμηλός υψηλός υψηλός υψηλός χαμηλός μέτριος υψηλός χαμηλός υψηλός υψηλός μέτριος χαμηλός μέτριος χαμηλός υψηλός υψηλός υψηλός χαμηλός υψηλός υψηλός μέτριος



Εικ. 5.6 Έλεγχος του κινδύνου μεροληψίας ανά μελέτη με τα κριτήρια κριτικής αξιολόγησης για σειρές περιστατικών που έχουν προταθεί από το Ινστιτούτο Joanna Briggs.⁵⁵⁶ Το χρώμα κάθε κύκλου αντιστοιχεί στην απάντηση για το αν κάθε μελέτη πληρούσε το αντίστοιχο κριτήριο (πράσινο: ναι, κίτρινο: ασαφές, κόκκινο: όχι).



Εικ. 5.7 Έλεγχος του κινδύνου μεροληψίας για το σύνολο των 71 μελετών με τα κριτήρια κριτικής αξιολόγησης για σειρές περιστατικών που έχουν προταθεί από το Ινστιτούτο Joanna Briggs.⁵⁵⁶ Το χρώμα της κλίμακας αντιστοιχεί στο ποσοστό των μελετών που στο αντίστοιχο κριτήριο έλαβαν την απάντηση ναι (πράσινο), ασαφές (κίτρινο) ή όχι (κόκκινο). Υψηλότερος κίνδυνος μεροληψίας παρατηρήθηκε στα κριτήρια που αφορούσαν στην επιλογή των ασθενών και τα δημογραφικά τους χαρακτηριστικά, καθώς και στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Εικ. 5.8 Ο κίνδυνος μεροληψίας των μελετών που δημοσιεύθηκαν σε δύο χρονικές περιόδους. Παρατηρείται τάση μείωσης των μελετών με υψηλό κίνδυνο και αύξηση των μελετών με χαμηλό κίνδυνο τη δεκαετία 2010-2019, συγκριτικά με παλαιότερα.

5.4.6. Μετα-ανάλυση

Στην ποσοτική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν δεδομένα σχετικά με την έκφραση 6 δεικτών προερχόμενα από 11 μελέτες (Εικ. 5.1). Πιο αναλυτικά, αριθμητικά δεδομένα (συνολικός αριθμός περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ, αριθμός περιπτώσεων ανά υπότυπο ΟΚΚ που εξέφραζαν το δείκτη) για το **bcl-2** αντλήθηκαν από 3 μελέτες (Πίνακας 5.4), για την **Cyclin D1** από 3 μελέτες (Πίνακας 5.5), για το **CD56** από 2 μελέτες (Πίνακας 5.6), για το **CK18** από 2 μελέτες (Πίνακας 5.7), για το **p53** από 6 μελέτες (Πίνακας 5.8), και για το **PCNA** από 3 μελέτες (Πίνακας 5.9).

Μελέτη	bcl-2+ σΟΚΚ	Σύνολο σΟΚΚ	bcl-2+ σΟΚΚ	Σύνολο ΟΚΚ	TP	FP	FN	TN
Awni & Conn 2017	3	3	14	14	3	14	0	0
Ibrahim et al 2016	1	5	3	8	1	3	4	5
Shimada et al 2013	16	16	20	20	16	20	0	0
Vered et al 2009	6	6	27	27	6	27	0	0
Kimi et al 2000	6	9	32	53	6	32	3	21
Lo Muzio et al 1999	15	16	13	16	15	13	1	3

Πίνακας 5.4 Μελέτες με αριθμητικά δεδομένα για το bcl-2. Με bold είναι σημειωμένες οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση.**

Πίνακας 5.5 Μελέτες με αριθμητικά δεδομένα για την Cyclin-D1. Με bold είναι σημειωμένες οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση.**

Μελέτη	Cyclin D1+ σΟΚΚ	Σύνολο σΟΚΚ	Cyclin D1+ σΟΚΚ	Σύνολο ΟΚΚ	TP	FP	FN	ΤN
Ibrahim et al 2016	1	5	3	8	1	3	4	5
Vera-Sirera et al 2015	6	6	40	40	6	40	0	0
Gurgel et al 2014	5	5	18	18	5	18	0	0
Shimada et al 2013	16	16	20	20	16	20	0	0
Kimi et al 2001	9	9	26	34	9	26	0	8
Lo Muzio et al 1999	16	16	0	16	16	0	0	16

Πίνακας	5.6	Δύο	μελέτες	με	αριθμητικά	δεδομένα	για	το	CD56
συμπεριλ	ήφθη	καν στ	η μετα-αν	άλυσ	η.**				

Μελέτη	CD56+ σOKK	Σύνολο σΟΚΚ	CD56+ σOKK	Σύνολο ΟΚΚ	ТР	FP	FN	ΤN
Vera Sirera et al 2015	4	6	12	40	4	12	2	28
Cairns et al 2010	0	3	1	16	0	1	3	15

Πίνακας 5.7 Δύο μελέτες με αριθμητικά δεδομένα για το CK18 συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση.**

Μελέτη	CK18+ σOKK	Σύνολο σΟΚΚ	CK18+ σOKK	Σύνολο ΟΚΚ	ТР	FP	FN	ΤN
Dos Santos et al 2009	1	5	6	20	1	6	4	14
Meara et al 2000	1	6	4	7	1	4	5	3

Πίνακας 5.8 Μελέτες με αριθμητικά δεδομένα για το p53. Με bold είναι σημειωμένες οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση.**

Μελέτη	p53+ σΟΚΚ	Σύνολο σΟΚΚ	p53+ σΟΚΚ	Σύνολο ΟΚΚ	TP	FP	FN	ΤN
Awni & Conn 2017	3	3	14	14	3	14	0	0
Ibrahim et al 2016	1	5	1	8	1	1	4	7
Hakim et al 2011	6	6	12	12	6	12	0	0
Figueroa et al 2010	1	7	5	12	1	5	6	7
Kimi et al 2000	1	9	10	53	1	10	8	43
Lo Muzio et al 1999	15	16	0	16	15	0	1	16
Calvalhais et al	0	8	0	9	0	0	8	9
Li et al 1996	6	6	16	16	6	16	0	0
Lombardi et al 1995	3	5	12	25	3	12	2	13
Ogden et al 1992	1	1	4	11	1	4	0	7

Μελέτη	PCNA+	Σύνολο	PCNA+	Σύνολο	TP	FP	FN	ΤN
	σΟΚΚ	σΟΚΚ	σΟΚΚ	ОКК				
Ibrahim et al 2016	3	5	5	8	3	5	2	3
Figueroa et al 2010	6	7	9	12	6	9	1	3
Lo Muzio et al 1999	16	16	16	16	16	16	0	0
El Murtadi et al 1996	21	21	20	20	21	20	0	0
Ogden et al 1992	1	1	4	11	1	4	0	7

Πίνακας 5.9 Μελέτες με αριθμητικά δεδομένα για το PCNA. Με bold είναι σημειωμένες οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση.**

**Συντομογραφίες: ΟΚΚ: σποραδική οδοντογενής κερατινοκύστη, σΟΚΚ: συνδρομική OKK, TP: true positive, FP: false positive, FN: false negative, TN: true negative

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του λόγου διαγνωστικών πιθανοτήτων (pooled DOR) για το bcl-2 ήταν 1,32 (95% CI: 0,42–4,11) (Εικ. 5.9), για την Cyclin D1 ήταν 11,20 (95% CI: 0,17–755,25) (Εικ. 5.10), για το CD56 ήταν 3,61 (95% CI: 0,72–18,05) (Εικ. 5.11), για το CK18 ήταν 0,31 (95% CI: 0,05–1,84) (Εικ. 5.12), για το p53 ήταν 2,35 (95% CI: 0,37–14,90) (Εικ. 5.13), και για το PCNA ήταν 1,69 (95% CI: 0,37–7,67) (Εικ. 5.14). Η τιμή του DOR δεν ήταν στατιστικά σημαντική⁶¹⁷ για κανένα δείκτη. Έτσι, κανένας από τους 6 δείκτες δεν επιτρέπει τη διαφορική διάγνωση συνδρομικών και σποραδικών OKK στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



Εικ. 5.9 Forest plot που απεικονίζει το Diagnostic Odds Ratio για το bcl-2.







Εικ. 5.11 Forest plot που απεικονίζει το Diagnostic Odds Ratio για το CD56.



Εικ. 5.12 Forest plot που απεικονίζει το Diagnostic Odds Ratio για το CK18.

301



Εικ. 5.13 Forest plot που απεικονίζει το Diagnostic Odds Ratio για το p53.



Εικ. 5.14 Forest plot που απεικονίζει το Diagnostic Odds Ratio για το PCNA.

Επίσης, υπολογίστηκαν τα συγκεντρωτικά (pooled) αποτελέσματα για την ευαισθησία (sensitivity), την ειδικότητα (specificity), το λόγο θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και το λόγο αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για κάθε δείκτη (Εικ. 5.15-5.20). Τέλος, σχεδιάστηκε η συνοπτική καμπύλη ROC (Summary Receiver Operating Characteristic, SROC) για τους δείκτες bcl-2 (Εικ. 5.21), Cyclin D1 (Εικ. 5.22), p53 (Εικ. 5.23) και PCNA (Εικ. 5.24), για καθένα από τους οποίους συμπεριλήφθηκαν >2 μελέτες στη μετα-ανάλυση, και υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC), καθώς και η καμπύλη ROC για τους δείκτες CD56 (Εικ. 5.25) και CK18 (Εικ. 5.26).



Εικ. 5.15 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για το bcl-2.



Εικ. 5.16 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για την Cyclin D1.



Εικ. 5.17 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για το CD56.



Εικ. 5.18 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για το CK18.



Specificity (95% CI)





Positive LR (95% CI)

1,60	(0,13 – 20,22)
0,34	(0,05 – 2,37)
0,59	(0,09 – 4,06)
31,00	(2,01 – 477,58)
1,25	(0,55 – 2,85)
2,00	(0,68 – 5,91)

Random Effects Model Pooled Positive LR= 1,43 (0,56 - 3,63) Cochran-Q= 10,22, df= 5 (p= 0,0692) 477,6 Inconsistency (I²)= 51,1% Tau-squared= 0,6257



Εικ. 5.19 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για το p53.





Εικ. 5.20 Ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), λόγος θετικών πιθανοτήτων (positive LR) και λόγος αρνητικών πιθανοτήτων (negative LR) για το PCNA.



Εικ. 5.21 Συνοπτική καμπύλη ROC (SROC) για το bcl-2, με Area Under Curve= 0,4742.



Εικ. 5.22 Συνοπτική καμπύλη ROC (SROC) για την Cyclin D1, με Area Under Curve= 0,8360.



Εικ. 5.23 Συνοπτική καμπύλη ROC (SROC) για το p53, με Area Under Curve= 0,7492.



Εικ. 5.24 Συνοπτική καμπύλη ROC (SROC) για το PCNA, με Area Under Curve= 0,5739.



Εικ. 5.25 Καμπύλη ROC για το CD56.



Εικ. 5.26 Καμπύλη ROC για το CK18.

5.5. Συζήτηση

Στην παρούσα συστηματική ανασκόπηση συνοψίζονται για πρώτη φορά όλοι οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που έχουν εξεταστεί ταυτόχρονα στη σποραδική και τη συνδρομική ΟΚΚ. Σε περισσότερο από το 1/3 των μελετών παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση ορισμένων δεικτών, οι οποίες κατά κανόνα αφορούσαν σε μεγαλύτερης έντασης ανοσοϊστοχημικό σήμα ή σε μεγαλύτερο αριθμό/ποσοστό θετικών κυττάρων ανά πεδίο μελέτης σε μία από τις δύο υποομάδες, συνηθέστερα στη συνδρομική (Πίνακας 5.3). Η βαθμονόμηση της έντασης της χρώσης είναι σε μεγάλο βαθμό υποκειμενική και επηρεάζεται από τον παρατηρητή, καθώς και από τη μέθοδο αξιολόγησης που μπορεί να γίνεται με οπτική παρατήρηση ή με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυσης εικόνας. 618, 619 Επίσης, ο προσδιορισμός του ποσοστού των θετικών κυττάρων ανά μικροσκοπικό πεδίο, ακόμα και όταν διενεργείται μέσω υπολογιστικών συστημάτων, μπορεί να επηρεαστεί από μεθοδολογικές παραμέτρους, όπως είναι ο αριθμός πεδίων που εξετάζονται και η μεγέθυνση στην οποία γίνεται η αξιολόγηση, γεγονός που περιορίζει τη δυνατότητα αποτελεσμάτων.620, 621 των αναπαραγωγής Λόγω της υποκειμενικότητας που ενέχει ο προσδιορισμός διαφορών στην ένταση και στον αριθμό/ποσοστό των θετικών κυττάρων, οι παράμετροι αυτοί στερούνται διαγνωστικού χαρακτήρα, γι' αυτό αποκλείστηκαν από τη μετα-ανάλυση που βασίστηκε στις διαφορές στον αριθμό των θετικών περιπτώσεων μεταξύ των δύο υποτύπων, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.^{565, 566}

Οι 93 δείκτες που εξετάστηκαν στις 71 μελέτες σχετίζονταν με ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, 132, 321, 395, 434, 486, 523-526, 536, 538, 539, 553, 584, 588, 593, 596-598, 603, 605, 610, 611, 615 TOV κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαφοροποίηση,^{114, 132, 395, 434, 486, 525,} 526, 537-540, 551, 552, 574, 577, 584, 586, 588, 594, 596, 607, 609, 610, 612, 613, 615 THV απόπτωση,^{114, 137, 144, 434, 488, 537-539, 588, 593, 610} την κερατινοποίηση, την των ενδοκυττάριων ινιδίων οργάνωση ή τη μυοεπιθηλιακή διαφοροποίηση,^{576, 577, 611, 616} την προσκόλληση των κυττάρων,^{132, 427, 580,} 581, 587, 614 την οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, 321, 323, 461, 575, 578, 595, 601, 602, 604, 606 την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, 526, 583, 589, 600 τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, 321, 577, 583 την ανοσιακή απόκριση, 122, 579 την οστική απορρόφηση,⁵⁸³ τη μετάδοση ενδοκυττάριων σημάτων,⁵³⁸ την επανόρθωση του DNA,^{585, 594} και τη διαμεμβρανική μεταφορά γλυκόζης.^{589, 592} Επίσης, κάποιοι αποτελούσαν δείκτες κυττάρων Langerhans^{582, 590} ή μαστοκυττάρων,⁵⁹⁹ καθώς και μέλη ή ρυθμιστές των σηματοδοτικών οδών Sonic Hedgehog και Wnt/β-catenin.^{132, 137, 488, 541,} 543, 591, 608, 615

Η πλειοψηφία των δεικτών που εξετάστηκαν εκφράζονταν στο κυστικό επιθήλιο των υποτύπων ΟΚΚ (Εικ. 5.4), γεγονός ενδεικτικό της προτίμησης των ερευνητών για τη μελέτη επιθηλιακών δεικτών, η οποία πιθανώς σχετίζεται με την έμφαση που έχει αποδοθεί στο ρόλο του επιθηλίου της ΟΚΚ στην παθογένεση και τη βιολογική της συμπεριφορά.⁹⁶ Συγκεκριμένα, τα μορφολογικά στοιχεία του επιθήλιου αποτελούν τα παθογνωμονικά χαρακτηριστικά της ΟΚΚ,63 ενώ η υπερέκφραση δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως το Ki-67 και το PCNA, στο επιθήλιο της ΟΚΚ έχει συσχετιστεί με την τοπικά πιο επιθετική της συμπεριφορά συγκριτικά με άλλες οδοντογενείς κύστεις.⁴⁷⁷ Εντούτοις, πληθώρα μελετών υποστηρίζει πως το κυστικό τοίχωμα δεν αποτελεί μόνο δομικό συστατικό της ΟΚΚ, αλλά διαδραματίζει καίριο ρόλο στη βιολογική της συμπεριφορά, 97, 102, 104, 109 την ανάγκη υπαγορεύει περαιτέρω γεγονός που μελέτης μεσεγχυματικών δεικτών στην ΟΚΚ.

Όσον αφορά στην επιμέρους εντόπιση της χρώσης σε επιθηλιακές στιβάδες ή σε υποκυττάρια τμήματα (πυρήνα, κυτταρόπλασμα, κυτταρική μεμβράνη), αναλυτική αναφορά γινόταν σε περιορισμένες μελέτες, οι οποίες δεν κατέληξαν σε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υποτύπων της OKK. Εξαίρεση αποτελεί η μελέτη των Shimada et al,¹¹⁴ στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GLI2 σε μία υποομάδα σποραδικών OKK που χαρακτηρίζονταν κλινικά από απουσία υποτροπών και ιστοπαθολογικά από απουσία επιθηλιακών εκβλαστήσεων και δορυφόρων κύστεων, σε αντίθεση με τις συνδρομικές OKK που εμφάνιζαν πυρηνική έκφραση του GLI2. Η δεύτερη μελέτη που εξέτασε την έκφραση του GLI2 στους δύο υπότυπους της OKK ανέφερε πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση και στις σποραδικές και στις συνδρομικές OKK, χωρίς να καταλήγει σε κάποια διαφορά σχετικά με αυτό το δείκτη.⁵⁴¹

Σε 8 επαναλαμβανόμενους δείκτες, συγκεκριμένα στους CD56,^{580, 581} S100,^{577, 582} SMA,^{321, 577, 583} GLI1,^{114, 488, 541, 542} Ki-67,⁵⁸⁴ Cyclin D1,⁵³⁹ και βcatenin,^{132, 137} παρατηρήθηκαν αποκλίνοντα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών που εξέτασαν τον ίδιο δείκτη. Οι αποκλίσεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε παραμέτρους σχετιζόμενες με την προέλευση του δείγματος ή τη μέθοδο που εφαρμόστηκε, για παράδειγμα τον κλώνο και την αραίωση του αντισώματος, το σύστημα ενίσχυσης του ανοσοϊστοχημικού σήματος ή τη μέθοδο αξιολόγησης της χρώσης. Η συστηματική καταγραφή των χαρακτηριστικών του δείγματος και των αντισωμάτων, καθώς και των μεθοδολογικών επιλογών στην παρούσα μελέτη αναδεικνύει την ανάγκη λεπτομερούς παρουσίασης όλων των δεδομένων που πρέπει να αναφέρονται σε μία ανοσοϊστοχημική μελέτη⁶²² και μπορεί να αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό επόμενων ερευνών με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Η ποιοτική αξιολόγηση των μελετών που αποσκοπούσε στον έλεγχο του κινδύνου μεροληψίας ανέδειξε ως συνηθέστερα ελλείποντα στοιχεία αυτά που σχετίζονταν με τα διαγνωστικά κριτήρια που καθόρισαν την επιλογή του δείγματος, καθώς και με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων που συμπεριλήφθηκαν. Πιθανές αιτίες αυτών των παραλείψεων είναι η απουσία καθολικά αποδεκτών κριτηρίων για τη διάγνωση του ΣΣΒΚ²⁶ και η αναδρομική φύση του υλικού μίας ανοσοϊστοχημικής μελέτης που δεν καθιστά πάντα δυνατή τη συλλογή κλινικών πληροφοριών. Αξίζει να επισημανθεί πως οι μελέτες της δεκαετίας 2010-2019 εμφάνιζαν χαμηλότερο κίνδυνο μεροληψίας συγκριτικά με παλαιότερα δημοσιευμένες εργασίες, γεγονός που συνάδει με την τάση καλύτερης ποιότητας στις πιο σύγχρονες μελέτες παρατήρησης που έχει καταγραφεί και σε άλλες συστηματικές ανασκοπήσεις.⁶²³ Πιθανή αιτία αυτής της τάσης βελτίωσης είναι η διαμόρφωση οδηγιών για το σχεδιασμό της έρευνας και την ανακοίνωση των αποτελεσμάτων σε μελέτες παρατήρησης, όπως είναι η λίστα STROBE,⁶²⁴ χωρίς, ωστόσο, να έχει διευκρινιστεί η χρήση αυτών των οδηγιών σε καμία από τις 71 μελέτες της παρούσας συστηματικής ανασκόπησης.

Τα ελλείποντα στοιχεία, που δεν ήταν δυνατό να αποφευχθούν, ανήκουν στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης, ενώ δεν επιχειρήθηκε επικοινωνία με τους συγγραφείς με στόχο την άντληση περαιτέρω πληροφοριών, καθώς σκοπός ήταν να συμπεριληφθούν στη μελέτη μόνο δημοσιευμένα στοιχεία που είχαν υποβληθεί σε έλεγχο μέσω του συστήματος των κριτών (peer-review process). Ο μικρός αριθμός περιπτώσεων ΟΚΚ σε ορισμένες μελέτες μπορεί, επίσης, να θεωρηθεί περιορισμός της παρούσας εργασίας. Ωστόσο, η επιλογή ελάχιστου ορίου περιπτώσεων ανά μελέτη θα περιόριζε τον τελικό αριθμό των εργασιών, και άρα και των ανοσοϊστοχημικών δεικτών, που θα συμπεριλαμβάνονταν στη συστηματική ανασκόπηση και γι' αυτό δεν εφαρμόστηκε. Ακόμα, ο μεγάλος αριθμός δεικτών που εξετάστηκαν σε μία μόνο μελέτη περιόρισε τους δείκτες που ήταν επιλέξιμοι για μετα-ανάλυση.

Η παρούσα εργασία αναδεικνύει πως με τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα, η ανοσοϊστοχημική μέθοδος δεν μπορεί να εξασφαλίσει τη διαφορική διάγνωση των δύο υποτύπων της ΟΚΚ. Δείκτες που σε μία μελέτη φάνηκε να εκφράζονται μόνο στη σποραδική, π.χ. TLR3,⁵⁷⁹ ή μόνο στη συνδρομική ΟΚΚ, π.χ. κολλαγόνο VII,⁵⁷⁸ θα πρέπει να εξεταστούν σε επιπλέον έρευνες για να ελεγχθεί αν επανειλημμένα μπορούν να διαχωρίσουν τους δύο υπότυπους. Τέλος, η αξιοποίηση των τεχνικών της NGS, που διερευνούν ταυτόχρονα τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων, μπορεί να συμβάλλει στην επιβεβαίωση της ομοιότητας και στην ανάδειξη διαφορών στο μοριακό προφίλ της σποραδικής και της συνδρομικής ΟΚΚ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την εφαρμογή της μεθόδου της RNA-seq στον ολικό ιστό της οδοντογενούς κερατινοκύστης (OKK) αποκαλύφθηκε το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που διέπει τον κλινικοπαθολογικό της φαινότυπο, το οποίο, σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση, είναι κατά κανόνα κοινό μεταξύ του σποραδικού και συνδρομικού υποτύπου. Επίσης, με τη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης πρωτεϊνικών δεικτών στη σποραδική και συνδρομική ΟΚΚ αναδείχθηκε το κοινό γονιδιακό προφίλ των δύο υποτύπων. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη πως οι ΟΚΚ στους ασθενείς με και χωρίς το Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (ΣΣΒΚ) μοιράζονται την ίδια κυτταρική προέλευση και αναπτύσσονται με τη συμμετοχή κοινών μοριακών μηχανισμών.^{63, 483}

Η ανάλυση μεταγραφώματος ανέδειξε πως ο φαινότυπος της ΟΚΚ στην επιδερμίδα, διατηρώντας, προσομοιάζει όμως, στοιχεία επιθηλίου και ασθενείς ενδείξεις οδοντογενούς οδοντογενούς μεσεγχύματος, και χαρακτηρίζεται από σημαντική αναδιαμόρφωση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ) και καταστολή των μορίων προσκόλλησης κυττάρων-ΕΘΟ. Αξιοσημείωτη, επίσης, ήταν υπερέκφραση δεικτών πολυδύναμων βλαστοκυττάρων και μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, οι οποίοι εκφράζονταν σε μεγάλο τμήμα του επιθηλίου της ΟΚΚ, κυρίως στις ενδιάμεσες στιβάδες. Η έντονη επιδερμική διαφοροποίηση της οδοντογενούς προέλευσης¹¹ ΟΚΚ θα μπορούσε να σχετίζεται με τα κοινά προγονικά κύτταρα της επιδερμίδας και του οδοντικού επιθηλίου, που διαφοροποιούνται από το επιφανειακό εξώδερμα, υπό την επίδραση του μεσεγχύματος και κοινών μεταγραφικών ρυθμιστών της κυτταρικής μοίρας.^{498, 499} Σε ένα in vitro πειραματικό μοντέλο του επιθηλίου του κερατοειδούς ποντικού, τα επιθηλιακά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα μπορούν, υπό την επίδραση αλλαγών στην αποδιαφοροποιηθούν ΕΘΟ, να προς οργάνωση της ένα κερατινοποιημένο φαινότυπο που προσομοιάζει στην επιδερμίδα.⁶²⁵ Η διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε επιδερμικά κύτταρα μπορεί να κατευθυνθεί από αλλαγές στην οργάνωση της ΕΘΟ,^{518, 626} επαγόμενες από ποικίλα αίτια, όπως αυξημένες μηχανικές φορτίσεις, που είναι συχνές στις γνάθους, 519 ή την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών, όπως είναι το μονοπάτι Sonic Hedgehog, που συμμετέχει ενεργά στην παθογένεια της ΟΚΚ.⁵²⁰ Επίσης, η ενδογεγής έκφραση παραγόντων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στα σωματικά κύτταρα έχει υποστηριχθεί πως συνδέεται με την αυξημένη ικανότητά τους για επαναπρογραμματισμό. 627-630 Με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προτείνουμε πως η παρουσία οδοντογενούς σήματος, έστω ασθενούς, στο μεσέγχυμα της ΟΚΚ επάγει την οδοντογενή διαφοροποίηση στη βασική στιβάδα του επιθηλίου της ΟΚΚ, ενώ η αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ στο κυστικό της τοίχωμα κατευθύνει την επιδερμική μοίρα στα κύτταρα των υπερβασικών επιθηλιακών στιβάδων, που αποκτούν πλακώδη διαφοροποίηση. Στην κατεύθυνση αυτή συμβάλλει υπερέκφραση μεταγραφικών ŋ παραγόντων αποτελούν δείκτες βλαστοκυττάρων που και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κυτταρικό στον επαναπρογραμματισμό και την επιδερμική διαφοροποίηση (Εικ. 6.1).



Εικ. 6 Προτεινόμενη θεωρία: Η ανάπτυξη ενός επιδερμικού φαινότυπου στο υπερβασικό τμήμα του επιθηλίου της ΟΚΚ και η οδοντογενής διαφοροποίηση στη βασική στιβάδα του επιθηλίου επάγονται από την αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ και το ασθενές σήμα του οδοντογενούς μεσεγχύματος, παράλληλα με την επίδραση δεικτών βλαστοκυττάρων που υπερεκφράζονται στις ενδιάμεσες επιθηλιακές στιβάδες.

Στη ΟΚΚ παρατηρήσαμε πολύ χαμηλή έκφραση των κρίσιμων γονιδίων για την ολοκλήρωση του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού^{400, 430, 470} POU5F1/OCT4, NANOG και LIN28A, ενώ, αντίθετα, σημαντική επαγωγή του γονιδίου TACSTD2/TROP2, που θεωρείται δείκτης ενός πληθυσμού ενδιάμεσα κυττάρων που βρίσκονται σε στάδια κυτταρικού επαναπρογραμματισμού ("reprogramming *intermediates"*).⁴¹² Δεδομένου ότι η ατελής προσπάθεια επαναπρογραμματισμού έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων και την ογκογένεση, 631, 632 θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστεί εάν ο μηχανισμός του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού συμμετέχει στην παθογένεια και την επιθετική βιολογική συμπεριφορά της ΟΚΚ. Η παρουσία κυττάρων που εκφράζουν δείκτες βλαστοκυττάρων έχει υποστηριχθεί και σε άλλες οδοντογενείς κύστεις, συγκεκριμένα στην ακρορριζική κύστη.⁶³³ Επίσης, τα επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez που απομονώθηκαν από γνάθους χοίρων έχει αποδειχθεί πως μπορούν να σε διαφοροποιημένα επαναπρογραμματιστούν κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο, χωρίς να αποδιαφοροποιηθούν πρώτα πλήρως σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, κατόπιν εξωγενούς χορήγησης επιγενετικών παραγόντων.⁶³⁴ Η μελλοντική έρευνα σχετικά με τις δυνατότητες εφαρμογής του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού σε παθολογικούς ιστούς θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάπτυξη εξατομικευμένων μοντέλων μελέτης για την παθογένεια νοσημάτων ("disease-in-a-dish" models),⁶³⁵ καθώς και στην αξιοποίηση των βλαστοκυττάρων σε αναγεννητικές τεχνικές στη στοματική και γναθοπροσωπική περιοχή.636

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επιβεβαιώνει τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη δυνατότητα επιτυχούς εφαρμογής της τεχνολογίας της Νέας Γενιάς Αλληλούχησης σε δείγματα ιστών μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκιβωτισμένα σε παραφίνη (FFPE δείγματα). Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με τις επικρατούσες απόψεις που υποστηρίζουν την προέλευση της ΟΚΚ από SOX2+ κύτταρα της οδοντικής ταινίας.^{11, 86} Τα πρωτογενή δεδομένα της RNA-seq, τα οποία είναι διαθέσιμα με accession number GSE180706 στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus του ιστότοπου National Center of Biotechnology Information μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά, για παράδειγμα για τον έλεγχο συσχέτισης του μεταγραφώματος της ΟΚΚ με τα γονίδια που έχει βρεθεί πως επάγονται στα επιμέρους στάδια της οδοντογένεσης.^{501, 637, 638} Επίσης, τα ευρήματα της μελέτης που συνηγορούν υπέρ μίας ατελούς ή τροποποιημένης πλακώδους διαφοροποίησης, n οποία έχει συσχετισθεί με «βιολογική συμπεριφορά δίκην νεοπλάσματος»,³⁹⁵ καθώς και η επαγωγή δεικτών μεταβολισμού και ογκογονιδίων που παρατηρήσαμε συνάδουν με την τοπικά επιθετική συμπεριφορά της ΟΚΚ. Περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση, για παράδειγμα για την ανίχνευση κοινών επαγόμενων γονιδίων μεταξύ της ΟΚΚ και άλλων εκδηλώσεων του ΣΣΒΚ, πιθανώς να διαλευκάνει τους παθογενετικούς μηχανισμούς που διέπουν τη νόσο και να αναδείξει νέους μοριακούς στόχους θεραπείας.

Τα κύρια συμπεράσματα της μελέτης ήταν τα ακόλουθα:

- Είναι δυνατή η εφαρμογή της μεθόδου RNA-seq σε FFPE δείγματα, αποθηκευμένα έως 20 έτη.
- Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ολικά reads ή σε αυτά που αντιστοιχήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς μεταξύ των πρόσφατα (≤36 μήνες) αποθηκευμένων και των παλαιότερων (≥82 μήνες) δειγμάτων
- 3. Οι δείκτες ακεραιότητας του RNA DV100 και DV200 σχετίζονται με τα συνολικά reads που προέκυψαν από τη μέθοδο RNA-seq και με αυτά που αντιστοιχήθηκαν (ολικά ή μοναδικά) στο γονιδίωμα αναφοράς. Η συσχέτιση αυτή ήταν πιο ισχυρή στα FFPE δείγματα που ήταν αποθηκευμένα έως 3 έτη.
- 4. Ο σποραδικός και ο συνδρομικός υπότυπος της ΟΚΚ χαρακτηρίζονται από κοινό πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης.
- 5. Κοινές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση παρατηρούνται στις πρωτοπαθείς βλάβες και στις υποτροπές της σποραδικής ΟΚΚ.
- 6. Το μεταγραφικό προφίλ της ΟΚΚ χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη επιδερμική διαφοροποίηση, με στοιχεία οδοντογενούς επιθηλιακής διαφοροποίησης και ενδείξεις περιορισμένης συμμετοχής οδοντογενούς μεσεγχύματος, σημαντική του αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ, καθώς και υπερέκφραση δεικτών βλαστοκυττάρων.
- 7. Το μεταγραφικό προφίλ της ΟΚΚ χαρακτηρίζεται από την επαγωγή δεικτών του επιφανειακού εξωδέρματος, του περιδέρματος, καθώς και δεικτών πρώιμης επιδερμικής διαφοροποίησης. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με την p63 ανοσοϊστοχημική έκφραση στις

ενδιάμεσες στιβάδες του κυστικού επιθηλίου συνηγορούν υπέρ ατελούς ή τροποποιημένης επιδερμικής διαφοροποίησης.

- Το μεταγραφικό προφίλ της ΟΚΚ διακρίνεται από σημαντική επαγωγή οδών του μεταβολισμού, εύρημα που πιθανώς σχετίζεται με την τοπικά επιθετική βιολογική συμπεριφορά της.
- 9. Στο μεταγράφωμα της ΟΚΚ παρατηρείται σημαντική καταστολή μορίων προσκόλλησης κυττάρων-ΕΘΟ, που συνάδει με την ιστοπαθολογικά παρατηρούμενη αποκόλληση του επιθηλίου από το κυστικό τοίχωμα.
- Πολυδύναμοι δείκτες βλαστοκυττάρων (SOX2, KLF4) και γονίδια που συμμετέχουν στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (OVOL1, IRF6) ή επάγονται στα αρχικά (CDH1/E-cadherin) ή τα ενδιάμεσα (TACSTD2/TROP2) στάδιά του εκφράζονταν κυρίως στις υπερβασικές στιβάδες του επιθηλίου της OKK.
- Δεν υπάρχει δημοσιευμένος ανοσοϊστοχημικός δείκτης που να μπορεί να διακρίνει τη συνδρομική από τη σποραδική ΟΚΚ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η οδοντογενής κερατινοκύστη (ΟΚΚ) εμφανίζει μεγάλο κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω της υψηλής συχνότητάς και της επιθετικής βιολογικής της συμπεριφοράς, δηλαδή της τάσης της να καταλαμβάνει μεγάλη έκταση στις γνάθους και να υποτροπιάζει. Επίσης, εκτός από το να αναπτύσσεται ως μοναδική βλάβη σε έναν ασθενή (σποραδική ΟΚΚ), μπορεί να αποτελεί εκδήλωση του Συνδρόμου Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (συνδρομική ΟΚΚ). Σκοπός της μελέτης είναι να γίνει: α) ανάλυση του μεταγραφώματος του ολικού ιστού της ΟΚΚ με τη μέθοδο της RNAαλληλούχησης (RNA-sequencing, RNA-seq), β) σύγκριση του μεταγραφώματος των πρωτοπαθών βλαβών και των υποτροπών της ΟΚΚ, γ) σύγκριση του μεταγραφώματος των σποραδικών και συνδρομικών ΟΚΚ, δ) έλεγχος επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων της RNA-seq με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time Polymerase Chain Reaction, gPCR) και την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, ε) σύγκριση των αποτελεσμάτων της RNA-seq με τα δεδομένα προηγούμενης μελέτης που εξέτασε το μεταγράφωμα της ολικής ΟΚΚ με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (GSE38494) και στ) σύγκριση του ανοσοϊστοχημικού προφίλ των σποραδικών και συνδρομικών ΟΚΚ.

Μέθοδοι: Το υλικό της μελέτης αποτελείτο από τους ιστούς 21 ΟΚΚ και οδοντοθυλακίων εγκλείστων δοντιών (OΘE), 6 που ήταν μονιμοποιημένοι στη φορμόλη για έως 48 ώρες και εγκιβωτισμένοι στην παραφίνη για έως 20 έτη. Έγινε απομόνωση του ολικού RNA, εξάντληση του rRNA με τη μέθοδο της RNase Η και κατασκευή της cDNA βιβλιοθήκης με τη χρήση τυχαίων εξαμερών εκκινητών. Πραγματοποιήθηκε διπλής κατεύθυνσης αλληλούχηση (μήκος ανάγνωσης 150bp) των 27 βιβλιοθηκών στο μηχάνημα HiSeq 4000 (Illumina Inc., San Diego, CA). Σε 7 βιβλιοθήκες επαναλήφθηκε δεύτερος κύκλος αλληλούχησης στο μηχάνημα NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA). Η ποιότητα της αλληλούχησης ελέγχθηκε με το %Q30 Phred score. Ένινε ανάλυση κυρίων συνιστωσών και ιεραρχική συσταδοποίηση με Ευκλείδεια απόσταση για τον έλεγχο ύπαρξης δειγμάτων. περιπτώσεις ακραίων 18 χρησιμοποιήθηκαν στη βιοπληροφορική ανάλυση. Η ανίχνευση των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ) πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο DESeq2,

χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα όρια στατιστικής σημαντικότητας: i) False Discovery Rate (FDR)-adjusted p-value <0,05, ii)|log₂Fold-Change (FC)|>1, iii) μέση τιμή των DESeg2's normalized counts>20. Εφαρμόστηκαν 3 γενιές ανάλυσης εμπλουτισμού για τον εντοπισμό των γονιδιακών οντολογιών και των Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) μονοπατιών που ήταν υπερεκπροσωπημένα ανάμεσα στα επαγόμενα και κατεσταλμένα γονίδια. Έγινε έλεγχος της επαγωγής των γονιδίων ALDH3A1, ATP12A, EPCAM, FETUB, GRHL3, OVOL1, TACSTD2, και TP63 με τη μέθοδο της qPCR και SERPINB3, ανοσοϊστοχημικός έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών p63, SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2/TROP2 και E-cadherin. Μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας GEO2R, με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις, συγκεντρώθηκαν τα ΔΕΓ που είχαν βρεθεί στην προηγούμενη μελέτη μεταγραφώματος με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (GSE38494). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της αγγλόφωνης βιβλιογραφίας μέσω των βάσεων δεδομένων MEDLINE/Pubmed, Web of Science, EMBASE μέσω OVID, καθώς και στην γκρίζα βιβλιογραφία, αναφορικά με τις μελέτες που συγκρίνουν το ανοσοϊστοχημικό προφίλ της σποραδικής και συνδρομικής ΟΚΚ. Η ποιοτική αξιολόγηση των μελετών έγινε με το Εργαλείο Κριτικής Αξιολόγησης για σειρές περιστατικών του Ινστιτούτου Joanna Briggs. Η ευαισθησία, η ειδικότητα, ο λόγος θετικών και αρνητικών πιθανοτήτων, ο λόγος διαγνωστικών πιθανοτήτων, η περιοχή κάτω από την καμπύλη και οι συνολικές εκτιμήσεις υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.

Αποτελέσματα: Προέκυψαν κατά μέσο όρο 19,3 εκατομμύρια pairedend reads ανά δείγμα, εκ των οποίων 73,5% (διάμεση τιμή) reads/δείγμα αντιστοιχήθηκαν μοναδικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ολικά reads ή σε αυτά που αντιστοιχήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς μεταξύ των πρόσφατα (≤36 μήνες) αποθηκευμένων και των παλαιότερων (≥82 μήνες) δειγμάτων. Μεταξύ των ΔΕΓ που ανιχνεύθηκαν στους δύο κύκλους αλληλούχησης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επικάλυψη. Ανιχνεύθηκαν 2654 και 2427 ΔΕΓ που χαρακτήριζαν το μεταγράφωμα της σποραδικής και της συνδρομικής ΟΚΚ, αντίστοιχα, συγκριτικά με το ΟΘΕ. Οι γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με την «ανάπτυξη επιδερμίδας/δέρματος» και τη «διαφοροποίηση

κερατινοκυττάρων/επιδερμιδικών κυττάρων» ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων (KRT10, NCCRP1, TP63, GRHL3, SOX21), ενώ οι γονιδιακές οντολογίες «οργάνωσης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ)» (ITGA5, LOXL2) και της «οδοντογένεσης» (MSX1, LHX8) ήταν εμπλουτισμένες μεταξύ των κατεσταλμένων γονιδίων στην ΟΚΚ. Επίσης, παρατηρήθηκε επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, για παράδειγμα του αραχιδονικού οξέος (ALOX12B, PLA2G4E) ή της γλουταθειόνης (GGT6, RRM1), και καταστολή μορίων προσκόλλησης κυττάρων-ΕΘΟ (PECAM1, VCAM1). Ένα αξιοσημείωτο εύρημα ήταν η επαγωγή δεικτών εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (EPHA1, SCNN1A) και γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2, CDH1) στην ΟΚΚ. Αυτά τα ευρήματα ήταν σε μεγάλο βαθμό κοινά μεταξύ των σποραδικών και των συνδρομικών ΟΚΚ, καθώς και μεταξύ πρωτοπαθών βλαβών και υποτροπών. Με τη μέθοδο της qPCR επιβεβαιώθηκε η επαγωγή των ALDH3A1, ATP12A, EPCAM, FETUB, GRHL3, OVOL1, SERPINB3, TACSTD2, και TP63, και με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο χαρτογραφήθηκε η έκφραση των SOX2, KLF4, IRF6, TACSTD2/TROP2, CDH1/E-cadherin και p63, OVOL1, που εντοπίζονταν κυρίως στις υπερβασικές επιθηλιακές στιβάδες της ΟΚΚ. Επίσης, παρατηρήθηκε μεγάλος βαθμός επικάλυψης μεταξύ των ΔΕΓ της παρούσας μελέτης και της προηγούμενης μελέτης μικροσυστοιχιών (GSE38494) και εμπλουτισμός των γονιδιακών οντολογιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη επιδερμίδας και τη διαφοροποίηση κερατινοκυττάρων μεταξύ των κοινών επαγόμενων γονιδίων. Η συστηματική ανασκόπηση συμπεριέλαβε 93 ανοσοϊστοχημικούς δείκτες από 71 μελέτες στην ποιοτική ανάλυση. Ο κίνδυνος μεροληψίας ήταν υψηλός σε 34 μελέτες, μέτριος σε 22, και χαμηλός σε 15. Η έκφραση 29 δεικτών σε συνολικά 25 μελέτες διέφερε μεταξύ των δύο υποτύπων της ΟΚΚ, καθώς στις συνδρομικές ΟΚΚ παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός θετικών στο δείκτη κυττάρων ή/και μεγαλύτερη ένταση χρώσης. Τα δεδομένα για 6 δείκτες (bcl-2, Cyclin D1, CD56, CK18, p53 και PCNA) από 11 μελέτες συμπεριλήφθηκαν στη μεταανάλυση, η οποία αποκάλυψε πως κανένας εξ αυτών δεν μπορούσε να διακρίνει τις συνδρομικές από τις σποραδικές ΟΚΚ, σε 95% διάστημα εμπιστοσύνης.
Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τις δυνατότητες εφαρμογής της μεθόδου RNAseq σε ιστούς μονιμοποιημένους στη φορμόλη και αποθηκευμένους στην παραφίνη έως 20 έτη. Η σποραδική (πρωτοπαθής βλάβη ή υποτροπή) και η συνδρομική ΟΚΚ χαρακτηρίζονται από κατά κανόνα κοινό πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης. Το μεταγράφωμα της ΟΚΚ διακρίνεται από αξιοσημείωτη επιδερμική διαφοροποίηση, με στοιχεία οδοντογενούς επιθηλιακής διαφοροποίησης και ενδείξεις οδοντογενούς μεσεγχύματος, περιορισμένης συμμετοχής του σημαντική αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ, καθώς και υπερέκφραση δεικτών βλαστοκυττάρων. Επίσης, χαρακτηρίζεται από σημαντική επαγωγή οδών του μεταβολισμού, εύρημα που πιθανώς σχετίζεται με την τοπικά επιθετική βιολογική συμπεριφορά της, και από την καταστολή μορίων προσκόλλησης κυττάρων-ΕΘΟ, που συνάδει με την ιστοπαθολογικά παρατηρούμενη αποκόλληση του επιθηλίου από το κυστικό τοίχωμα. Πολυδύναμοι δείκτες βλαστοκυττάρων (SOX2, KLF4), γονίδια που συμμετέχουν στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (OVOL1, IRF6) ή επάγονται κατά τα αρχικά (CDH1/E-cadherin) ή τα ενδιάμεσα (TACSTD2/TROP2) στάδιά του, εκφράζονταν κυρίως στις υπερβασικές στιβάδες του επιθηλίου της ΟΚΚ. Τέλος, δεν υπάρχει δημοσιευμένος ανοσοϊστοχημικός δείκτης που να μπορεί να διακρίνει με ασφάλεια τη συνδρομική από τη σποραδική ΟΚΚ.

ABSTRACT

<u>Aim:</u> Odontogenic keratocyst (OKC) has great research and clinical interest, due to its high frequency and aggressive behavior, i.e., growth potential within jaw bones and high recurrence rate. OKC may appear as a single lesion (sporadic OKC) or as a manifestation of Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (syndromic OKC). The aim of the present study is to perform a) transcriptomics analysis of the whole OKC via RNA-sequencing (RNA-seq), b) comparison of the transcriptome of primary cases and recurrences, c) comparison of the transcriptome of sporadic and syndromic OKC, d) validation of the RNA-seq results via real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) and immunohistochemistry, and e) intersection of the results of the present study with those obtained by a previous microarray-based study (GSE38494), and f) comparison of the immunohistochemical profile of syndromic and sporadic OKC.

Methods: The study material consisted of formalin-fixed paraffinembedded tissues of 21 OKC cases and 6 dental follicles of impacted teeth. The samples had been fixed in formalin for up to 48 hours and had been stored for up to 20 years. Total RNA was extracted, followed by RNase H-based rRNA depletion. The library preparation protocol utilized random hexamers for first strand priming. For 27 samples, 150bp paired-end RNA-sequencing was implemented using an Illumina Hiseq4000 sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA). A second run of 150-bp paired-end RNA-sequencing was applied for 7 samples using NextSeq 500 sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA). %Q30 Phred score was calculated for the quality control of sequencing results. Principal Component Analysis and Euclidean Distance Analysis were performed to identify outliers. Finally, RNA-seg data from 18 cases were included in downstream bioinformatics analysis. Differential gene expression was evaluated using the DEsSeq2 algorithm, setting the significance threshold as i) False Discovery Rate (FDR)-adjusted p-value<0.05, ii) llog2[fold-change (FC)]|>1, iii) base mean of DESeq2's normalized counts>20. Three generations of enrichment analysis were performed to identify Gene Ontologies and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways that were overrepresented among the upregulated and downregulated genes. Real-time Polymerase Chain Reaction was applied as a validation screen method of the induction levels of ALDH3A1, ATP12A, EPCAM, FETUB, GRHL3, OVOL1, SERPINB3,

TACSTD2, and *TP63*. Immunohistochemical analysis was performed to verify the RNA-seq results at the protein level and to spatially map the expression of p63, SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2/TROP2 and E-cadherin. The GEO2R online platform was implemented, with default settings, to extract the differentially expressed genes (DEGs) of the previous microarray-based transcriptomics study (GSE38494). Next, we searched MEDLINE/Pubmed, Web of Science, EMBASE via OVID and grey literature for publications in the English language that compared the immunohistochemical profile of the sporadic and syndromic OKC subtype. The studies were qualitatively assessed using the Critical Appraisal Tool for Case Series proposed by Joanna Briggs Institute. Sensitivity and Specificity, Positive and Negative Likelihood Ratio, Diagnostic Odds Ratio and Area Under the Curve and pooled estimates were calculated, using a random effects model.

Results: On average, RNA-seq generated 19.3 million paired-end reads, of which a median of 73.5% of reads per sample was uniquely mapped to the human genome. The count of total reads, mapped reads and uniquely mapped reads did not differ significantly between samples stored for up to 36 months in comparison with samples stored for more than 82 months. 2,654 and 2,427 DEGs were captured to characterize the transcriptome of sporadic and syndromic OKCs, respectively. Gene ontologies related to "epidermis/skin development" and "keratinocyte/epidermal cell differentiation" were enriched among the upregulated genes (KRT10, NCCRP1, TP63, GRHL3, SOX21), while "extracellular matrix (ECM) organization" (ITGA5, LOXL2) and "odontogenesis" (MSX1, LHX8) Gene Ontologies were overrepresented among the downregulated genes in OKC. Moreover, several metabolic pathways were overrepresented among the upregulated genes, e.g., "arachidonic acid metabolism" (ALOX12B, PLA2G4E) and "glutathione metabolism" (GGT6, RRM1), whereas genes related to cell-matrix adhesion were downregulated (PECAM1, VCAM1). Interestingly, upregulation of various embryonic stem cells (ESCs) markers (EPHA1, SCNN1A) and genes committed in cellular reprogramming (SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2, CDH1) was found in OKC. These findings were highly shared between sporadic and syndromic OKCs. qPCR confirmed the induction of ALDH3A1, ATP12A, EPCAM, FETUB, GRHL3, OVOL1, SERPINB3, TACSTD2, and TP63 in OKC. Immunohistochemistry verified

SOX2, KLF4, OVOL1, IRF6, TACSTD2/TROP2, CDH1/E-cadherin, and p63 expression predominantly in the OKC suprabasal epithelial layers. In addition, we observed a considerable overlap by intersecting the DEGs dataset obtained from this study with the DEG dataset captured by a previous microarray-based study (GSE38494) and noticed the enrichment of Gene Ontologies related to epidermis development and keratinocyte differentiation among the overlapping upregulated genes. The qualitative analysis phase of the systematic review included 71 studies reporting data about the immunoexpression of 93 markers. Risk of bias was high in 34 studies, moderate in 22 studies, and low in 15 studies. 25 studies reported differential expression of 29 markers in the form of higher number of positive cells or/and greater staining intensity in syndromic OKCs. Meta-analysis for bcl-2, Cyclin D1, CD56, CK18, p53 and PCNA showed that none of those markers is distinguishable between syndromic and sporadic OKCs, in a 95% confidence interval.

Conclusions: The results of the present study are in accordance with the pertinent literature regarding the utility of formalin-fixed paraffinembedded tissues, stored for up to 20 years, in RNA-seq-based experiments. Our findings indicate a highly shared gene expression program between the sporadic (either primary cases or recurrences) and the syndromic OKCs. The OKC transcriptome is characterized by a prominent epidermal and dental epithelial fate, a repressed dental mesenchyme fate, combined with deregulation of the ECM organization, and enhanced stemness gene signatures. Moreover, significant upregulation of several metabolic pathways was observed in the transcriptome of OKC and could be linked to its locally aggressive behavior. On the other hand, the downregulation of cell-matrix adhesion mediators in OKC is in alignment with the microscopically noticed detachment of its epithelium from the underlying cystic wall. Core pluripotency factors (SOX2, KLF4), genes committed in cellular reprogramming (OVOL1, IRF6) or induced during early (CDH1/Ecadherin) or intermediate (TACSTD2/TROP2) reprogramming stages, were predominantly expressed in the suprabasal cells of OKC epithelium. Finally, there are no published immunohistochemical markers that can discriminate between syndromic and sporadic OKCs.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ВКК	βασικοκυτταρικό καρκίνωμα
ΔΕΓ	διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια
EOO	εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
ΟΘΕ	οδοντοθυλάκιο εγκλείστων δοντιών
ОКК	οδοντογενής κερατινοκύστη
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΣΣΒΚ	Σύνδρομο Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων
3' UTR	3' untranslated region
5' UTR	5' untranslated region
A	adenine
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
AUC	Area Under the Curve
Вр	base pair
С	cytosine
CAGE	Cap Analysis of Gene Expression
cDNA	complementary DNA
CDS	Coding Sequence Exons
CI	Confidence Interval
ddNTPs	Deoxynucleotides
DLRs	Dental lamina rests
DOR	Diagnostic Odds Ratio
ES	Enrichment Score
ESTs	Expressed Sequence Tags
FC	Fold-Change

FCS	Functional Class Scoring
FDR	False Discovery Rate
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FN	False negative
FNR	False negative ratio
FP	False posotive
FWER	Family-wise error rate
G	guanine
GAIIx	Genome Analyzer II
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HUGO	Human Genome Organization
IGV	Integrated Genome Viewer
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LOH	loss of heterozygosity
LR	Likelihood ratio
NES	Normalized Enrichment Score
NGS	Next Generation Sequencing
ΟΜΙΜ	Online Mendelian Inheritance in Man
ORA	Overrepresentation analysis
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PICO	Population, Intervention, Comparator, Outcome
pNDE	η πιθανότητα τυχαίας εμφάνισης σε ένα μονοπάτι αριθμού διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων ίσου με τον πραγματικό αριθμό που έχει βρεθεί

- pPERT η πιθανότητα τυχαίας διατάραξης στο μονοπάτι, η οποία να είναι μεγαλύτερη από την συνολικά παρατηρούμενη διατάραξη που σχετίζεται με το φαινότυπο ενδιαφέροντος
- PRISMA Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
- PROSPERO Prospective International Registration of Systematic Reviews
- qPCR quantitative PCR
- Q-score Quality score
- RF Representation factor
- RNA-seq RNA-sequencing
- ROC Receiver operating characteristic
- RT-PCR Reverse Transcription PCR
- SAGE Serial Analysis of Gene Expression
- SNPs Single Nucleotide Polymorphisms
- SPIA Signaling Pathway Impact Analysis
- SROC Summary receiver operating characteristic
- STROBE Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
- T thymine
- TCGA The Cancer Genome Atlas
- TES Transcription End Site
- TF Transcription Factor
- TN True negative
- TNR True negative ratio
- TP True positive
- TPR True positive ratio
- U uracil

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Ide F, Ito Y, Muramatsu T, et al. The Advent of Studies on Jaw Cysts with Keratinization: A Review of Overlooked Papers on Odontogenic Keratocyst and Orthokeratinized Odontogenic Cyst. *Head Neck Pathol.* 2020;14:785-791.
- 2. Mikulicz J. Beitrag zur Genese der Dermoide am Kopfe. . *Wien med Wochenschr*. 1876;26(39):953–956, (940)983–956, (941)1004–1008.
- 3. Pindborg JJ, Hansen J. Studies on Odontogenic Cyst Epithelium. 2. Clinical and Roentgenologic Aspects of Odontogenic Keratocysts. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1963;58:283-294.
- 4. Philipsen HP. Om keratocyster (kolesteatomer) i kzeberne. . *Tandlsegebladet*. 1956;60:963-980.
- 5. Hauer A. Ein Cholesteatom im linken Unterkiefer unter einem retinierten Weisheitszahn. *Z Stomat*. 1926;24:40-49.
- 6. Brosch F. Ueber einen Fall von Epidermoidzyste des Unterkiefers. *Dtsch zahnirztl Wschr*. 1938;41:1020-1022.
- 7. Robinson HBG. Classification of cysts of the jaws. *Am J Ortho Oral Surg*. 1945;31:370-375.
- 8. Pindborg J, Kramer I. Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions. in: WHO International Histological Classification of Tumours. *WHO, Geneva*. 1971.
- 9. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M, editors. Histological typing of odontogenic tumors. in: International Histological Classification of Tumours. 2nd edition. *Berlin: Springer Verlag.* 1992;35-36.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Odontogenic Tumours. in: WHO classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumours, 3rd edition. *IARC, Lyon*. 2005;306-307.
- 11. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Odontogenic and maxillofacial bone tumors. in: WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th edition. *IARC, Lyon*. 2017;235-236.
- 12. Wright JM. The odontogenic keratocyst: orthokeratinized variant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1981;51:609-618.
- 13. Imran A, Jayanthi P, Tanveer S, Gobu SC. Classification of odontogenic cysts and tumors Antecedents. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016;20:269-271.
- 14. Nayak MT, Singh A, Singhvi A, Sharma R. Odontogenic keratocyst: What is in the name? *J Nat Sci Biol Med*. 2013;4:282-285.
- 15. Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *J Can Dent Assoc*. 2008;74:165-165h.

- 16. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*. 1960;262:908-912.
- 17. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:32.
- Scully C, Langdon J, Evans J. Marathon of eponyms: 7 Gorlin-Goltz syndrome (Naevoid basal-cell carcinoma syndrome). Oral Dis. 2010;16:117-118.
- 19. Carlson ER, Oreadi D, McCoy JM. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome and the Keratocystic Odontogenic Tumor. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;73:S77-86.
- 20. Witmanowski H, Szychta P, Blochowiak K, Jundzill A, Czajkowski R. Basal cell nevus syndrome (Gorlin-Goltz syndrome): genetic predisposition, clinical picture and treatment. *Postepy Dermatol Alergol.* 2017;34:381-387.
- 21. Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:117-124.
- 22. Onodera S, Nakamura Y, Azuma T. Gorlin Syndrome: Recent Advances in Genetic Testing and Molecular and Cellular Biological Research. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7559.
- 23. Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;69:299-308.
- 24. MacDonald DS. A systematic review of the literature of nevoid basal cell carcinoma syndrome affecting East Asians and North Europeans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120:396-407.
- 25. Stojanov IJ, Schaefer IM, Menon RS, et al. Biallelic PTCH1 Inactivation Is a Dominant Genomic Change in Sporadic Keratocystic Odontogenic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2020;44:553-560.
- 26. Bree AF, Shah MR, Group BC. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A*. 2011;155A:2091-2097.
- 27. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet*. 1993;30:460-464.
- 28. Kimonis VE, Mehta SG, Digiovanna JJ, Bale SJ, Pastakia B. Radiological features in 82 patients with nevoid basal cell carcinoma (NBCC or Gorlin) syndrome. *Genet Med*. 2004;6:495-502.
- 29. Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet*. 1994;50:282-290.

- 30. Jones EA, Sajid MI, Shenton A, Evans DG. Basal cell carcinomas in gorlin syndrome: a review of 202 patients. *J Skin Cancer*. 2011;2011:217378.
- 31. Lindeboom JA, Kroon FH, de Vires J, van den Akker HP. Multiple recurrent and de novo odontogenic keratocysts associated with oral-facial-digital syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:458-462.
- 32. Carr RJ, Green DM. Multiple odontogenic keratocysts in a patient with type II (mitis) Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988;26:205-214.
- 33. Connor JM, Evans DA, Goose DH. Multiple odontogenic keratocysts in a case of the Noonan syndrome. *Br J Oral Surg*. 1982;20:213-216.
- 34. Krimmel M, Reinert S. Multiple odontogenic keratocysts in mental retardation-overgrowth (Simpson-Golabi-Behmel) syndrome. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38:221-223.
- 35. Aquilanti L, Mascitti M, Togni L, et al. Non-neoplastic jaw cysts: a 30-year epidemiological study of 2150 cases in the Italian population. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2021;59:168-173.
- 36. Tamiolakis P, Thermos G, Tosios KI, Sklavounou-Andrikopoulou A. Demographic and Clinical Characteristics of 5294 Jaw Cysts: A Retrospective Study of 38 Years. *Head Neck Pathol*. 2019;13:587-596.
- 37. MacDonald-Jankowski DS. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011;40:1-23.
- 38. Schuch LF, de Arruda JAA, Mosconi C, et al. A Brazilian multicentre study of 2,497 isolated cases of odontogenic keratocysts. *Oral Dis*. 2020;26:711-715.
- 39. Chrcanovic BR, Gomez RS. Recurrence probability for keratocystic odontogenic tumors: An analysis of 6427 cases. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45:244-251.
- 40. Titinchi F, Nortje CJ. Keratocystic odontogenic tumor: a recurrence analysis of clinical and radiographic parameters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114:136-142.
- 41. Shimada Y, Morita K, Kabasawa Y, Taguchi T, Omura K. Clinical manifestations and treatment for keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: a study in 25 Japanese patients. *J Oral Pathol Med*. 2013;42:275-280.
- 42. Bello IO. Keratocystic odontogenic tumor: A biopsy service's experience with 104 solitary, multiple and recurrent lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21:e538-546.
- 43. Leung YY, Lau SL, Tsoi KY, Ma HL, Ng CL. Results of the treatment of keratocystic odontogenic tumours using enucleation and treatment of the residual bony defect with Carnoy's solution. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45:1154-1158.

- 44. Azevedo RS, Cabral MG, dos Santos TC, de Oliveira AV, de Almeida OP, Pires FR. Histopathological features of keratocystic odontogenic tumor: a descriptive study of 177 cases from a Brazilian population. *Int J Surg Pathol*. 2012;20:154-160.
- 45. Myoung H, Hong SP, Hong SD, et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91:328-333.
- 46. Brookes CCD, Harris GJ. Surgical Management of a Recurrent Odontogenic Keratocyst With Orbital and Temporal Fossa Invasion. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2019;35:e151-e154.
- 47. Zhou J, Wang L, Chen Z, Qiu J, Dong Q. Giant keratocystic odontogenic tumor of the maxillary sinus and zygoma: A case report. *Oncol Lett*. 2014;8:2675-2677.
- 48. Woolgar JA, Rippin JW, Browne RM. A comparative histological study of odontogenic keratocysts in basal cell naevus syndrome and control patients. *J Oral Pathol.* 1987;16:75-80.
- 49. Woolgar JA, Rippin JW, Browne RM. The odontogenic keratocyst and its occurrence in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;64:727-730.
- 50. da Silva YS, Stoelinga PJW, Naclerio-Homem MDG. The presentation of odontogenic keratocysts in the jaws with an emphasis on the toothbearing area: a systematic review and meta-analysis. *Oral Maxillofac Surg*. 2019;23:133-147.
- 51. Rodrigues BT, Israel MS, de Moura KL, Pinheiro GL, Carlos R, Pires FR. Peripheral odontogenic keratocyst: Report of two new cases and review of the literature. *J Clin Exp Dent*. 2020;12:e1005-e1010.
- 52. Sakamoto K, Morita K, Shimada Y, Omura K, Izumo T, Yamaguchi A. Peripheral odontogenic keratocyst associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118:e19-23.
- 53. Stoelinga PJ, Cohen MM, Jr., morgan AF. The origin of keratocysts in the basal cell nevus syndrome. *J Oral Surg.* 1975;33:659-663.
- 54. Kitisubkanchana J, Reduwan NH, Poomsawat S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Wongchuensoontorn C. Odontogenic keratocyst and ameloblastoma: radiographic evaluation. *Oral Radiol*. 2021;37:55-65.
- 55. Melo ES, Kawamura JY, Alves CA, Nunes FD, Jorge WA, Cavalcanti MG. Imaging modality correlations of an odontogenic keratocyst in the nevoid basal cell carcinoma syndrome: a family case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98:232-236.
- 56. van Rensburg LJ, Nortje CJ, Thompson I. Correlating imaging and histopathology of an odontogenic keratocyst in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dentomaxillofac Radiol*. 1997;26:195-199.

- 57. Vanagundi R, Kumar J, Manchanda A, Mohanty S, Meher R. Diffusionweighted magnetic resonance imaging in the characterization of odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;130:447-454.
- 58. Rajendra Santosh AB. Odontogenic Cysts. *Dent Clin North Am*. 2020;64:105-119.
- 59. Altini M, Cohen M. The follicular primordial cyst odontogenic keratocyst. *Int J Oral Surg.* 1982;11:175-182.
- 60. Brannon RB. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977;43:233-255.
- 61. Pogrel MA. The history of the odontogenic keratocyst. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2003;15:311-315.
- 62. Haring JI, Van Dis ML. Odontogenic keratocysts: a clinical, radiographic, and histopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;66:145-153.
- 63. Li TJ. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm? *J Dent Res*. 2011;90:133-142.
- 64. Lam KY, Chan AC. Odontogenic keratocysts: a clinicopathological study in Hong Kong Chinese. *Laryngoscope*. 2000;110:1328-1332.
- 65. Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer*. 1970;26:699-710.
- 66. Ahlfors E, Larsson A, Sjogren S. The odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor? *J Oral Maxillofac Surg*. 1984;42:10-19.
- 67. Magnusson BC. Odontogenic keratocysts: a clinical and histological study with special reference to enzyme histochemistry. *J Oral Pathol*. 1978;7:8-18.
- 68. Deshmukh RS, Bavle RM, Deo PN, Chavan S. Odontogenic keratocyst with granular cell changes: A distinctive finding. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23:432-437.
- 69. Kahraman D, Gunhan O, Celasun B. A series of 240 odontogenic keratocysts: Should we continue to use the terminology of 'keratocystic odontogenic tumour' for the solid variant of odontogenic keratocyst? J Craniomaxillofac Surg. 2018;46:942-946.
- Kawano K, Okamura K, Kashima K, et al. Solid variant of keratocystic odontogenic tumor of the mandible: report of a case with a clear cell component and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013;116:e393-398.
- 71. Zhang R, Yang J, Zhang J, Hong Y, Xie X, Li T. Should the solid variant of odontogenic keratocyst and keratoameloblastoma be classified as the same entity? A clinicopathological analysis of nine cases and a review of the literature. *Pathology*. 2021;53:478-486.

- 72. Ide F, Ito Y, Muramatsu T, Saito I, Abiko Y. Histogenetic relations between keratoameloblastoma and solid variant of odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114:812-813; author reply 813-814.
- 73. Martinez-Martinez M, Mosqueda-Taylor A, Delgado-Azanero W, Rumayor-Pina A, de Almeida OP. Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in an odontogenic keratocyst previously treated with marsupialization: case report and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121:e87-95.
- 74. Dominguez FV, Keszler A. Comparative study of keratocysts, associated and non-associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Oral Pathol*. 1988;17:39-42.
- 75. Shear M. Odontogenic keratocysts: natural history and immunohistochemistry. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2003;15:347-362.
- 76. Juuri E, Isaksson S, Jussila M, Heikinheimo K, Thesleff I. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci*. 2013;121:509-516.
- 77. Fraser GJ, Hamed SS, Martin KJ, Hunter KD. Shark tooth regeneration reveals common stem cell characters in both human rested lamina and ameloblastoma. *Sci Rep.* 2019;9:15956.
- 78. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003;116:1647-1648.
- 79. Philipsen HP, Reichart PA. The development and fate of epithelial residues after completion of the human odontogenesis with special reference to the origins of epithelial odontogenic neoplasms, hamartomas and cysts. *Oral Biosci Med*. 2004;1:171-179.
- 80. Rajkumar K, Ramya R. Textbook of Oral Anatomy, Physiology, Histology and Tooth Morphology. Wolters kluwer india Pvt Ltd, 2017.
- 81. Hovorakova M, Zahradnicek O, Bartos M, et al. Reawakening of Ancestral Dental Potential as a Mechanism to Explain Dental Pathologies. *Integr Comp Biol.* 2020;60:619-629.
- 82. Juuri E, Jussila M, Seidel K, et al. Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development*. 2013;140:1424-1432.
- 83. Juuri E, Saito K, Ahtiainen L, et al. Sox2+ stem cells contribute to all epithelial lineages of the tooth via Sfrp5+ progenitors. *Dev Cell*. 2012;23:317-328.
- 84. Rappaport NH (1997) Odontogenesis. Book title. Springer,
- 85. Silva BS, Silva LR, Lima KL, et al. SOX2 and BCL-2 Expressions in Odontogenic Keratocyst and Ameloblastoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25:e283-e290.

- 86. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Laiho A, et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J Dent Res.* 2015;94:101-111.
- 87. Stoelinga PJ. Etiology and pathogenesis of keratocysts. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2003;15:317-324.
- 88. Shivali V, Pandey A, Khanna VD, Khanna P, Singh A, Ahuja T. A rare case of extrafollicular adenomatoid odontogenic tumour in the posterior region of the mandible: misdiagnosed as residual cyst. *J Int Oral Health*. 2013;5:124-128.
- 89. Ide F, Kikuchi K, Miyazaki Y, Mishima K, Saito I, Kusama K. Keratocyst of the buccal mucosa: is it odontogenic? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110:e42-47.
- 90. Yamamoto K, Matsusue Y, Kurihara M, Takahashi Y, Kirita T. A keratocyst in the buccal mucosa with the features of keratocystic odontogenic tumor. *Open Dent J*. 2013;7:152-156.
- 91. Diniz MG, Gomes CC, de Sousa SF, Xavier GM, Gomez RS. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol*. 2017;72:165-173.
- 92. Amm HM, MacDougall M. Molecular Signaling in Benign Odontogenic Neoplasia Pathogenesis. *Curr Oral Health Rep.* 2016;3:82-92.
- 93. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*. 2009;45:1011-1014.
- 94. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment an overview. *Oral Oncol.* 2010;46:19-24.
- 95. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. *Oral Oncol.* 2002;38:219-226.
- 96. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. *Oral Oncol.* 2002;38:407-415.
- 97. Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. Interleukin-1alpha-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. J Dent Res. 2000;79:1423-1430.
- 98. Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. *J Dent Res.* 2002;81:23-27.
- 99. Ogata S, Kubota Y, Yamashiro T, et al. Signaling pathways regulating IL-1alpha-induced COX-2 expression. *J Dent Res.* 2007;86:186-191.

- 100. Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, et al. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res.* 2005;84:913-918.
- 101. Vedtofte P, Holmstrup P, Dabelsteen E. Human odontogenic keratocyst transplants in nude mice. *Scand J Dent Res.* 1982;90:306-314.
- 102. Hirshberg A, Sherman S, Buchner A, Dayan D. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:410-412.
- 103. Kulkarni PG, Kumari MA, Jahagirdar A, Nandan S, Reddy DS, Keerthi M. Collagen and Its Role in predicting the Biological Behavior of Odontogenic Lesions. *J Contemp Dent Pract*. 2017;18:137-141.
- 104. Singh HP, Shetty DC, Wadhwan V, Aggarwal P. A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma on biological behavior of odontogenic cysts: A histochemical study. *Natl J Maxillofac Surg.* 2012;3:15-20.
- 105. Moure SP, Carrard VC, Lauxen IS, et al. Collagen and elastic fibers in odontogenic entities: analysis using light and confocal laser microscopic methods. *Open Dent J.* 2011;5:116-121.
- 106. Donoff RB, Harper E, Guralnick WC. Collagenolytic activity in keratocysts. *J* Oral Surg. 1972;30:879-884.
- 107. Teronen O, Salo T, Laitinen J, et al. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *Eur J Oral Sci*. 1995;103:141-147.
- 108. Diniz MG, Duarte-Andrade FF, Stussi F, et al. Deregulation of desmosomal proteins and extracellular matrix proteases in odontogenic keratocyst. *Oral Dis.* 2021;27:952-961.
- 109. Stenman G, Magnusson B, Lennartsson B, Juberg-Ode M. In vitro growth characteristics of human odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol*. 1986;15:143-145.
- 110. Scharffetter K, Balz-Herrmann C, Lagrange W, Koberg W, Mittermayer C. Proliferation kinetics-study of the growth of keratocysts. Morphofunctional explanation for recurrences. J Craniomaxillofac Surg. 1989;17:226-233.
- 111. Chuong CM, Patel N, Lin J, Jung HS, Widelitz RB. Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: perspectives in development and evolution. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1672-1681.
- 112. Carpenter D, Stone DM, Brush J, et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1998;95:13630-13634.
- 113. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis. *Clin Cancer Res.* 2010;16:442-450.

- 114. Shimada Y, Katsube K, Kabasawa Y, et al. Integrated genotypic analysis of hedgehog-related genes identifies subgroups of keratocystic odontogenic tumor with distinct clinicopathological features. *PLoS One*. 2013;8:e70995.
- 115. Gomes CC, Guimaraes LM, Diniz MG, Gomez RS. Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets. *J Oral Pathol Med*. 2017;46:877-882.
- 116. Rui Z, Li-Ying P, Jia-Fei Q, Ying-Ying H, Feng C, Tie-Jun L. Smoothened gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *Head Face Med*. 2014;10:36.
- 117. Guo YY, Zhang JY, Li XF, Luo HY, Chen F, Li TJ. PTCH1 gene mutations in Keratocystic odontogenic tumors: a study of 43 Chinese patients and a systematic review. *PLoS One*. 2013;8:e77305.
- 118. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a Keratocystic odontogenic tumour exclusive alteration. *Oral Oncol*. 2011;47:226-227.
- 119. Hu S, Divaris K, Parker J, Padilla R, Murrah V, Wright JT. Transcriptome Variability in Keratocystic Odontogenic Tumor Suggests Distinct Molecular Subtypes. *Sci Rep.* 2016;6:24236.
- 120. Qu J, Zhang J, Zhang H, et al. PTCH1 alterations are frequent but other genetic alterations are rare in sporadic odontogenic keratocysts. *Oral Dis*. 2019;25:1600-1607.
- 121. Chaisuparat R, Yodsanga S, Montaner S, Jham BC. Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116:336-342.
- 122. Gonzalez Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F, et al. Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol.* 2008;44:1127-1133.
- 123. de Vicente JC, Torre-Iturraspe A, Gutierrez AM, Lequerica-Fernandez P. Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15:e709-715.
- 124. Junior JF, de Franca GM, da Silva Barros CC, et al. Biomarkers involved in the proliferation of the odontogenic keratocyst, glandular odontogenic cyst and botryoid odontogenic cyst. *Oral Maxillofac Surg.* 2022.
- 125. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cysts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423:137-144.
- 126. Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 1992;21:314-317.

- 127. Ivanisevic Malcic A, Breen L, Josic D, et al. Proteomics profiling of keratocystic odontogenic tumours reveals AIDA as novel biomarker candidate. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:367-377.
- 128. Franca JA, de Sousa SF, Diniz MG, et al. Absence of BRAFV600E mutation in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2018;47:186-191.
- 129. Zhang R, Yang Q, Qu J, Hong Y, Liu P, Li T. The BRAF p.V600E mutation is a common event in ameloblastomas but is absent in odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;129:229-235.
- 130. Cha YH, Cho ES, Kang HE, et al. Frequent oncogenic BRAF V600E mutation in odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*. 2017;74:62-67.
- 131. Guimaraes DM, Antunes DM, Saturno JL, Massuda F, Paiva KB, Nunes FD. Immunohistochemical expression of WNT5A and MMPs in odontogenic epithelial tumors and cysts. *Acta Histochem*. 2015;117:667-674.
- 132. Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules beta-catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Investig.* 2011;15:321-328.
- 133. Santos HBP, Medeiros HCM, Mafra RP, Miguel MCC, Galvao HC, de Souza LB. Regulation of Wnt/beta-catenin pathway may be related to Reggamma in benign epithelial odontogenic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019;128:43-51.
- 134. Thermos G, Piperi E, Tosios KI, Nikitakis NG. Expression of BMP4 and FOXN1 in orthokeratinized odontogenic cyst compared to odontogenic keratocyst suggests an epidermal phenotype. *Biotech Histochem*. 2022.
- 135. Wang GN, Zhong M, Chen Y, Ji J, Gao XQ, Wang TF. Expression of WNT1 in ameloblastoma and its significance. *Oncol Lett*. 2018;16:1507-1512.
- 136. de Matos Paraguassú G, da Silva VP, Gurgel CA, et al. Characterization of Wingless-Type signaling pathway proteins in odontogenic keratocyst and ameloblastoma. *J Oral Diagn*. 2019;4:1-6.
- 137. Leonardi R, Matthews JB, Loreto C, et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol*. 2013;28:1175-1184.
- 138. Man QW, Ma YQ, Liu JY, Zhao Y, Liu B, Zhao YF. Expression of YAP/TAZ in Keratocystic Odontogenic Tumors and Its Possible Association with Proliferative Behavior. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4624890.
- 139. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis.* 2010;16:286-291.

- 140. Moreira PR, Guimaraes MM, Guimaraes AL, et al. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:99-103.
- 141. Pereira KMA, Costa S, Pereira NB, et al. DNA methylation profiles of 22 apoptosis-related genes in odontogenic keratocysts before and after marsupialization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;124:483-489.
- 142. Gomes CC, Brito JA, Andrade CI, Gomez RS. DNA methyltransferase expression in odontogenic cysts and tumours. *Oncol Lett.* 2010;1:143-146.
- 143. Guimaraes DM, Antunes DM, Duarte CM, Ferro LB, Nunes FD. DNA methyltransferase immunohistochemical expression in odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:59-66.
- 144. Diniz MG, Gomes CC, de Castro WH, et al. miR-15a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Cell Oncol (Dordr)*. 2012;35:285-291.
- 145. Tay ZW, Sue WL, Leeson RMA. Chemical adjuncts and cryotherapy in the management Of odontogenic keratocysts: A systematic review. *Advances in Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021;3:100116.
- 146. Fidele NB, Zhao Y, Tianfu W, Sun Y, Man Q, Liu B. Treatment of Multiple Odontogenic Keratocysts Involving Chinese Patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2019;77:2044-2054.
- 147. de Castro MS, Caixeta CA, de Carli ML, et al. Conservative surgical treatments for nonsyndromic odontogenic keratocysts: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22:2089-2101.
- 148. Dias G, Marques T, Coelho P. Treatment options for keratocyst odontogenic tumour (KCOT): a systematic review. *Oral Surgery*. 2017;10:193-209.
- 149. Pogrel MA. The keratocystic odontogenic tumor. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2013;25:21-30, v.
- 150. Caminiti MF, El-Rabbany M, Jeon J, Bradley G. 5-Fluorouracil Is Associated With a Decreased Recurrence Risk in Odontogenic Keratocyst Management: A Retrospective Cohort Study. J Oral Maxillofac Surg. 2021;79:814-821.
- 151. Ledderhof NJ, Caminiti MF, Bradley G, Lam DK. Topical 5-Fluorouracil is a Novel Targeted Therapy for the Keratocystic Odontogenic Tumor. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75:514-524.
- 152. Goldberg LH, Landau JM, Moody MN, Kazakevich N, Holzer AM, Myers A. Resolution of odontogenic keratocysts of the jaw in basal cell nevus syndrome with GDC-0449. *Arch Dermatol*. 2011;147:839-841.
- 153. Ally MS, Tang JY, Joseph T, et al. The use of vismodegib to shrink keratocystic odontogenic tumors in patients with basal cell nevus syndrome. *JAMA Dermatol*. 2014;150:542-545.

- 154. Augustine D, Rao RS, Lakshminarayana S, Prasad K, Patil S. Sub-epithelial hyalinization, incomplete cystic lining, and corrugated surface could be a predictor of recurrence in Odontogenic Keratocysts. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2021;11:423-429.
- 155. Cottom HE, Bshena FI, Speight PM, Craig GT, Jones AV. Histopathological features that predict the recurrence of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2012;41:408-414.
- 156. Cunha JF, Gomes CC, de Mesquita RA, Andrade Goulart EM, de Castro WH, Gomez RS. Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121:629-635.
- 157. Al-Moraissi EA, Dahan AA, Alwadeai MS, et al. What surgical treatment has the lowest recurrence rate following the management of keratocystic odontogenic tumor?: A large systematic review and meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45:131-144.
- 158. Kaczmarzyk T, Mojsa I, Stypulkowska J. A systematic review of the recurrence rate for keratocystic odontogenic tumour in relation to treatment modalities. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:756-767.
- 159. Kinard B, Hansen G, Newman M, et al. How well do we manage the odontogenic keratocyst? A multicenter study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019;127:282-288.
- 160. Brown TA. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; Chapter 1, The Human Genome. 2002.
- 161. Brown TA. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; Chapter 3, Transcriptomes and Proteomes. 2002.
- 162. Clark DP, Pazdernik NJ. Chapter 2-DNA, RNA, and Protein in: Biotechnology (2nd edition), Academic Cell. 2016;33-61.
- 163. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:29-59.
- 164. Makalowski W. The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol.* 2001;48:587-598.
- 165. Shafee T, Lowe R. Eukaryotic and prokaryotic gene structure. *WikiJournal* of *Medicine*. 2017;4:2.
- 166. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931-945.
- 167. Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccodicola A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:853916.
- 168. Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res*. 2007;17:669-681.
- 169. Tutar Y. Pseudogenes. Comp Funct Genomics. 2012;2012:424526.
- 170. McGettigan PA. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17:4-11.

- 171. Pietu G, Mariage-Samson R, Fayein NA, et al. The Genexpress IMAGE knowledge base of the human brain transcriptome: a prototype integrated resource for functional and computational genomics. *Genome Res.* 1999;9:195-209.
- 172. Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, et al. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*. 1997;88:243-251.
- 173. Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010;Chapter 4:Unit 4 11 11-13.
- 174. Milward EA, Shahandeh A, Heidari M, Johnstone DM, Daneshi N, Hondermarck H. Transcriptomics. *in: Encyclopedia of Cell Biology Academic Press, Waltham*. 2016;160–165.
- 175. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10:57-63.
- 176. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*. 2017;13:e1005457.
- 177. Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, et al. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. *Med Sci Monit Basic Res*. 2014;20:138-142.
- 178. Marinov GK. On the design and prospects of direct RNA sequencing. *Brief Funct Genomics*. 2017;16:326-335.
- 179. Buzdin A, Sorokin M, Garazha A, et al. RNA sequencing for research and diagnostics in clinical oncology. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:311-323.
- 180. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5350-5354.
- 181. Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc.* 2009;4:37-43.
- 182. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1675-1680.
- 183. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-470.
- 184. Stekel D. Microarrays: making them and using them. . *Microarray Bioinf Cambridge university press, Chapter 1*. 2003;1–18.
- 185. Russell S, Meadows LA, Russell RR. Microarray Technology in Practice. 1st ed San Diego: Academic Press. 2009.
- 186. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*. 2001;29:365-371.

- 187. Sui Y, Zhao X, Speed TP, Wu Z. Background adjustment for DNA microarrays using a database of microarray experiments. *J Comput Biol*. 2009;16:1501-1515.
- 188. Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e99.
- 189. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5:621-628.
- 190. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350-1354.
- 191. Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol.* 1990;162:99-117.
- 192. Doak SH, Zair ZM. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis. *Methods Mol Biol*. 2012;817:251-270.
- 193. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
- 194. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008;44:619-626.
- 195. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30:503-512.
- 196. Fang Z, Cui X. Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief Bioinform*. 2011;12:280-287.
- 197. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463-5467.
- 198. Maxam AM, Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 1980;65:499-560.
- 199. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94:441-448.
- 200. Wang B, Kumar V, Olson A, Ware D. Reviving the Transcriptome Studies: An Insight Into the Emergence of Single-Molecule Transcriptome Sequencing. *Front Genet*. 2019;10:384.
- 201. Kchouk M, Gibrat J-F, Mourad Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol Med (Aligarh)*. 2017;9.
- 202. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991;252:1651-1656.
- 203. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270:484-487.

- 204. Metzker ML. Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11:31-46.
- 205. Bainbridge MN, Warren RL, Hirst M, et al. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC Genomics*. 2006;7:246.
- 206. Wilhelm BT, Landry JR. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods*. 2009;48:249-257.
- 207. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*. 2011;12:87-98.
- 208. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320:1344-1349.
- 209. Weber AP. Discovering New Biology through Sequencing of RNA. *Plant Physiol*. 2015;169:1524-1531.
- 210. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015;2015:951-969.
- 211. Li X, Wang CY. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. *Int J Oral Sci.* 2021;13:36.
- 212. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20:631-656.
- 213. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376-380.
- 214. Sultan M, Schulz MH, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008;321:956-960.
- 215. Huang SW, Hung SJ, Wang JR. Application of deep sequencing methods for inferring viral population diversity. *J Virol Methods*. 2019;266:95-102.
- 216. Molnar M, Haghshenas E, Ilie L. SAGE2: parallel human genome assembly. *Bioinformatics*. 2018;34:678-680.
- 217. Knief C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Front Plant Sci.* 2014;5:216.
- 218. <u>https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/comparison-tool.html</u>.
- 219. <u>https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-</u> <u>marketing/documents/products/datasheets/hiseq-3000-4000-</u> <u>specification-sheet-770-2014-057.pdf</u>.
- 220. <u>https://emea.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053.pdf</u>.

- 221. Head SR, Komori HK, LaMere SA, et al. Library construction for nextgeneration sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*. 2014;56:61-64, 66, 68, passim.
- 222. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell*. 2010;1:520-536.
- 223. Hoeijmakers WA, Bartfai R, Francoijs KJ, Stunnenberg HG. Linear amplification for deep sequencing. *Nat Protoc*. 2011;6:1026-1036.
- 224. Cock PJ, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:1767-1771.
- 225. Ji F, Sadreyev RI. RNA-seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;124:e68.
- 226. Schubert M, Lindgreen S, Orlando L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res Notes*. 2016;9:88.
- 227. Yu X, Guda K, Willis J, et al. How do alignment programs perform on sequencing data with varying qualities and from repetitive regions? *BioData Min.* 2012;5:6.
- 228. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <u>http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc</u>. 2010.
- 229. Chen G, Shi T, Shi L. Characterizing and annotating the genome using RNAseq data. *Sci China Life Sci*. 2017;60:116-125.
- 230. Church DM, Schneider VA, Graves T, et al. Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biol*. 2011;9:e1001091.
- 231. Li X, Nair A, Wang S, Wang L. Quality control of RNA-seq experiments. Methods Mol Biol. 2015;1269:137-46.
- 232. Finotello F, Di Camillo B. Measuring differential gene expression with RNAseq: challenges and strategies for data analysis. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:130-142.
- 233. Deschamps-Francoeur G, Simoneau J, Scott MS. Handling multi-mapped reads in RNA-seq. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:1569-1576.
- 234. Oshlack A, Robinson MD, Young MD. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biol*. 2010;11:220.
- 235. Wang L, Wang SH, Li W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*. 2012;28:2184-2185.
- 236. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14:178-192.
- 237. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29:24-26.
- 238. Li X, Cooper NGF, O'Toole TE, Rouchka EC. Choice of library size normalization and statistical methods for differential gene expression

analysis in balanced two-group comparisons for RNA-seq studies. *BMC Genomics*. 2020;21:75.

- 239. Huang HC, Niu Y, Qin LX. Differential Expression Analysis for RNA-Seq: An Overview of Statistical Methods and Computational Software. *Cancer Inform*. 2015;14:57-67.
- 240. Evans C, Hardin J, Stoebel DM. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinform*. 2018;19:776-792.
- 241. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS One*. 2017;12:e0190152.
- 242. Risso D, Ngai J, Speed TP, Dudoit S. Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat Biotechnol*. 2014;32:896-902.
- 243. Dwaraka VB, Smith JJ, Woodcock MR, Voss SR. Comparative transcriptomics of limb regeneration: Identification of conserved expression changes among three species of Ambystoma. *Genomics*. 2019;111:1216-1225.
- 244. Baser O. Modeling transformed health care cost with unknown heteroskedasticity. *Applied Economics Research*. 2007;1:1-6.
- 245. Liew AW, Law NF, Yan H. Missing value imputation for gene expression data: computational techniques to recover missing data from available information. *Brief Bioinform*. 2011;12:498-513.
- 246. Lorenz DJ, Gill RS, Mitra R, Datta S. Using RNA-seq data to detect differentially expressed genes. in: Statistical analysis of next generation sequencing data. Springer, Cham, 2014: 25-49.
- 247. Yang Q, Cui J, Chazaro I, Cupples LA, Demissie S. Power and type I error rate of false discovery rate approaches in genome-wide association studies. *BMC Genet*. 2005;6 Suppl 1:S134.
- 248. Hochberg Y. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika*. 1988;75:800-802.
- 249. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*. 1995;57:289-300.
- 250. Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *J Roy Stat Soc Ser B Meth*. 2002;64:479-498.
- 251. Li J, Witten DM, Johnstone IM, Tibshirani R. Normalization, testing, and false discovery rate estimation for RNA-sequencing data. *Biostatistics*. 2012;13:523-538.
- 252. Schurch NJ, Schofield P, Gierliński M, et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Rna*. 2016;22:839-851.

- 253. Saidin A. Transcriptomics. in: Bioinformatics-A Practical Handbook of Next Generation Sequencing and Its Applications. World Scientific, 2017.
- 254. Hart SN, Therneau TM, Zhang Y, Poland GA, Kocher JP. Calculating sample size estimates for RNA sequencing data. *J Comput Biol*. 2013;20:970-978.
- 255. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*. 2016;17:13.
- 256. Liu P, Si Y. Cluster analysis of RNA-sequencing data. in: Statistical analysis of next generation sequencing data. Springer, Cham, 2014: 191-217.
- 257. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nature biotechnology*. 2008;26:303-304.
- 258. Esbensen KH, Geladi P, Larsen A. Understanding principal component analysis (PCA) is the responsibility of the data analyst—PCA is not an automatic shotgun solution for all data matrices. *NIR news*. 2014;25:23-26.
- 259. Popat SK, Emmanuel M. Review and comparative study of clustering techniques. *International journal of computer science and information technologies*. 2014;5:805-812.
- 260. Murtagh F, Contreras P. Algorithms for hierarchical clustering: an overview. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery*. 2012;2:86-97.
- 261. Moseley B, Wang JR. Approximation bounds for hierarchical clustering: Average linkage, bisecting k-means, and local search. Advances in neural information processing systems. 2017;30.
- 262. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Comput Biol*. 2012;8:e1002375.
- 263. Garcia-Campos MA, Espinal-Enriquez J, Hernandez-Lemus E. Pathway Analysis: State of the Art. *Front Physiol*. 2015;6:383.
- 264. The Gene Ontology C. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D330-D338.
- 265. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25:25-29.
- 266. Gene Ontology C. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:D325-D334.
- 267. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci.* 2019;28:1947-1951.
- 268. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:D545-D551.
- 269. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27-30.

- 270. Das S, McClain CJ, Rai SN. Fifteen Years of Gene Set Analysis for High-Throughput Genomic Data: A Review of Statistical Approaches and Future Challenges. *Entropy (Basel)*. 2020;22.
- 271. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W90-97.
- 272. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:128.
- 273. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16:284-287.
- 274. Ren Y, Wang TY, Anderton LC, Cao Q, Yang R. LncGSEA: a versatile tool to infer IncRNA associated pathways from large-scale cancer transcriptome sequencing data. *BMC Genomics*. 2021;22:574.
- 275. Debrabant B. The null hypothesis of GSEA, and a novel statistical model for competitive gene set analysis. *Bioinformatics*. 2017;33:1271-1277.
- 276. Maciejewski H. Gene set analysis methods: statistical models and methodological differences. *Brief Bioinform*. 2014;15:504-518.
- 277. Ebrahimpoor M, Spitali P, Hettne K, Tsonaka R, Goeman J. Simultaneous Enrichment Analysis of all Possible Gene-sets: Unifying Self-Contained and Competitive Methods. *Brief Bioinform*. 2020;21:1302-1312.
- 278. Qureshi R, Sacan A. Weighted set enrichment of gene expression data. *BMC Syst Biol*. 2013;7 Suppl 4:S10.
- 279. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15545-15550.
- 280. Liu L, Ruan J. Network-based Pathway Enrichment Analysis. *Proceedings* (*IEEE Int Conf Bioinformatics Biomed*). 2013;218-221.
- 281. Draghici S, Khatri P, Tarca AL, et al. A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res.* 2007;17:1537-1545.
- 282. Tarca AL, Draghici S, Khatri P, et al. A novel signaling pathway impact analysis. *Bioinformatics*. 2009;25:75-82.
- 283. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007;2:e1261.
- 284. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:4436-4443.
- 285. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:e12.

- 286. Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 2001;195:66-71.
- 287. Mies C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol*. 1994;25:555-560.
- 288. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*. 2013;11:101-106.
- 289. Xiao YL, Kash JC, Beres SB, Sheng ZM, Musser JM, Taubenberger JK. Highthroughput RNA sequencing of a formalin-fixed, paraffin-embedded autopsy lung tissue sample from the 1918 influenza pandemic. *J Pathol*. 2013;229:535-545.
- 290. Eikrem O, Beisland C, Hjelle K, et al. Transcriptome Sequencing (RNAseq) Enables Utilization of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Biopsies with Clear Cell Renal Cell Carcinoma for Exploration of Disease Biology and Biomarker Development. *PLoS One*. 2016;11:e0149743.
- 291. Esteve-Codina A, Arpi O, Martinez-Garcia M, et al. A Comparison of RNA-Seq Results from Paired Formalin-Fixed Paraffin-Embedded and Fresh-Frozen Glioblastoma Tissue Samples. *PLoS One*. 2017;12:e0170632.
- 292. Graw S, Meier R, Minn K, et al. Robust gene expression and mutation analyses of RNA-sequencing of formalin-fixed diagnostic tumor samples. *Sci Rep.* 2015;5:12335.
- 293. Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One*. 2014;9:e98187.
- 294. Li J, Fu C, Speed TP, Wang W, Symmans WF. Accurate RNA Sequencing From Formalin-Fixed Cancer Tissue To Represent High-Quality Transcriptome From Frozen Tissue. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018: PO.17.00091.
- 295. Li P, Conley A, Zhang H, Kim HL. Whole-Transcriptome profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded renal cell carcinoma by RNA-seq. *BMC Genomics*. 2014;15:1087.
- 296. Norton N, Sun Z, Asmann YW, et al. Gene expression, single nucleotide variant and fusion transcript discovery in archival material from breast tumors. *PLoS One*. 2013;8:e81925.
- 297. Vukmirovic M, Herazo-Maya JD, Blackmon J, et al. Identification and validation of differentially expressed transcripts by RNA-sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) lung tissue from patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2017;17:15.

- 298. Sinicropi D, Qu K, Collin F, et al. Whole transcriptome RNA-Seq analysis of breast cancer recurrence risk using formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue. *PLoS One*. 2012;7:e40092.
- 299. Morlan JD, Qu K, Sinicropi DV. Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue. *PLoS One*. 2012;7:e42882.
- 300. Morton ML, Bai X, Merry CR, et al. Identification of mRNAs and lincRNAs associated with lung cancer progression using next-generation RNA sequencing from laser micro-dissected archival FFPE tissue specimens. *Lung Cancer*. 2014;85:31-39.
- 301. Guo Y, Wu J, Zhao S, et al. RNA Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Specimens for Gene Expression Quantification and Data Mining. *Int J Genomics*. 2016;2016:9837310.
- 302. Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA. Recurrent Fusions in MYB and MYBL1 Define a Common, Transcription Factor-Driven Oncogenic Pathway in Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer Discov*. 2016;6:176-187.
- 303. Haile S, Pandoh P, McDonald H, et al. Automated high throughput nucleic acid purification from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples for next generation sequence analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0178706.
- 304. Jovanovic B, Sheng Q, Seitz RS, et al. Comparison of triple-negative breast cancer molecular subtyping using RNA from matched fresh-frozen versus formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *BMC Cancer*. 2017;17:241.
- 305. Kresse SH, Namlos HM, Lorenz S, et al. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. *PLoS One*. 2018;13:e0197456.
- 306. Pennock ND, Jindal S, Horton W, et al. RNA-seq from archival FFPE breast cancer samples: molecular pathway fidelity and novel discovery. *BMC Med Genomics*. 2019;12:195.
- 307. Zhao Y, Mehta M, Walton A, et al. Robustness of RNA sequencing on older formalin-fixed paraffin-embedded tissue from high-grade ovarian serous adenocarcinomas. *PLoS One*. 2019;14:e0216050.
- 308. Liang K-H. Bioinformatics for biomedical science and clinical applications. Elsevier, 2013.
- 309. Schadt EE, Lamb J, Yang X, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet*. 2005;37:710-717.
- 310. Sathasivam HP, Casement J, Bates T, et al. Gene expression changes associated with malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *J Oral Pathol Med*. 2021;50:60-67.
- 311. Yang Q, Guo B, Sun H, et al. Identification of the key genes implicated in the transformation of OLP to OSCC using RNA-sequencing. *Oncol Rep.* 2017;37:2355-2365.

- 312. Thangaraj SV, Shyamsundar V, Krishnamurthy A, Ramshankar V. Deregulation of extracellular matrix modeling with molecular prognostic markers revealed by transcriptome sequencing and validations in Oral Tongue squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2021;11:250.
- 313. Tang M, Dai W, Wu H, et al. Transcriptome analysis of tongue cancer based on highthroughput sequencing. *Oncol Rep.* 2020;43:2004-2016.
- 314. Bell D, Bell AH, Bondaruk J, Hanna EY, Weber RS. In-depth characterization of the salivary adenoid cystic carcinoma transcriptome with emphasis on dominant cell type. *Cancer*. 2016;122:1513-1522.
- 315. Heft Neal ME, Gensterblum-Miller E, Bhangale AD, et al. Integrative sequencing discovers an ATF1-motif enriched molecular signature that differentiates hyalinizing clear cell carcinoma from mucoepidemoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2021;117:105270.
- 316. Fonseca I, Bell A, Wani K, Bell D. Global transcriptome and sequenome analysis of formalin-fixed salivary epithelial-myoepithelial carcinoma specimens. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54:249-259.
- 317. Pongpanich M, Sanguansin S, Kengkarn S, Chaiwongkot A, Klongnoi B, Kitkumthorn N. An integrative analysis of genome-wide methylation and expression in ameloblastoma: A pilot study. *Oral Dis.* 2021;27:1455-1467.
- 318. Bose P, Pleasance ED, Jones M, et al. Integrative genomic analysis of ghost cell odontogenic carcinoma. *Oral Oncol*. 2015;51:e71-75.
- 319. Duarte-Andrade FF, Vitorio JG, Pereira T, Gomes CC, Gomez RS. A review of the molecular profile of benign and malignant odontogenic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;129:357-368.
- 320. da Silva TA, Batista AC, Mendonca EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105:333-341.
- 321. de Oliveira Ramos G, Costa A, Meurer MI, Vieira DS, Rivero ER. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. *J Oral Pathol Med*. 2014;43:282-288.
- 322. Porto LP, dos Santos JN, Ramalho LM, et al. E-cadherin regulators are differentially expressed in the epithelium and stroma of keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2016;45:302-311.
- 323. Sarode SC, Sarode GS, Choudhary S, Patil S. FAK is overexpressed in keratocystic odontogenic tumor: a preliminary study. *J Oral Pathol Med*. 2017;46:611-617.
- 324. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res*. 2000;79:1418-1422.

- 325. Heikinheimo K, Jee KJ, Morgan PR, Nagy B, Knuutila S, Leivo I. Genetic changes in sporadic keratocystic odontogenic tumors (odontogenic keratocysts). *J Dent Res.* 2007;86:544-549.
- 326. Qu J, Yu F, Hong Y, et al. Underestimated PTCH1 mutation rate in sporadic keratocystic odontogenic tumors. *Oral Oncol*. 2015;51:40-45.
- 327. Jiang WP, Sima ZH, Wang HC, et al. Identification of the involvement of LOXL4 in generation of keratocystic odontogenic tumors by RNA-Seq analysis. *Int J Oral Sci.* 2014;6:31-38.
- 328. Man Q-W, Li R-F, Li S-R, et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals CXCLs Enriched Fibroblasts Within Odontogenic Keratocysts. *J Inflamm Res*. 2021;14:7359-7369.
- 329. Ge J, Zheng JW, Yang C, Qian WT. Variations in the buccal-lingual alveolar bone thickness of impacted mandibular third molar: our classification and treatment perspectives. *Sci Rep.* 2016;6:16375.
- 330. Almendros-Marques N, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. Influence of lower third molar position on the incidence of preoperative complications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102:725-732.
- 331. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:1520-1530.
- 332. Carithers LJ, Agarwal R, Guan P, et al. The Biospecimen Preanalytical Variables Program: A Multiassay Comparison of Effects of Delay to Fixation and Fixation Duration on Nucleic Acid Quality. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143:1106-1118.
- 333. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968.
- 334. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*. 2008;2008:pdb. prot4986.

at:

- 335. ObjectiveView[™]. Available <u>https://www.objectivepathology.com/objectiveview</u>.
- 336. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671-675.
- 337. Cashion AK, Umberger RA, Goodwin SB, Sutter TR. Collection and storage of human blood and adipose for genomic analysis of clinical samples. *Res Nurs Health*. 2011;34:408-418.
- 338. How should I quantify RNA isolated with RNeasy Kits? Qiagen FAQ ID -32. Available at: <u>https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=fc31b2a3-f727-4d10-b7cf-444add819597&lang=en</u>.
- 339. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*. 1995;19:208-210.

- 340. Pu Q, Li Z, Nie G, Zhou J, Liu L, Peng Y. Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in White Clover (Trifolium repens L.) Involved in Five Abiotic Stresses. *Plants (Basel)*. 2020;9.
- 341. Agilent 2100 Bioanalyzer System, Agilent 4200 TapeStation System-Applications for DNA, RNA, and Protein Analysis- Application Compendium. Available at: <u>https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-</u> <u>8974EN_Bioanalyzer-TapeStation_appcompendium.pdf</u>.
- 342. Masotti A, Preckel T. Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Nat Methods*. 2006;3:658-658.
- 343. RNA 6000 Nano Chip Quick Guide. Available at: <u>https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-</u> <u>90034_RNA6000Nano_KG.pdf</u>.
- 344. Agilent R6K ScreenTape System Quick Guide. Available at: <u>https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/ScreenTape_HSR_NA_QG.pdf</u>.
- 345. Comparison of RIN and RINe algorithms for the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent 2200 TapeStation systems-Technical Overview. Available at: <u>https://www.chem-agilent.com/pdf/5990-9613EN_RINe.pdf</u>.
- 346. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
- 347. Evaluating RNA Quality from FFPE Samples. Illumina Technical Note, publication number 470-2014-001. Available at: <u>https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote</u>truseq-rna-access.pdf.
- 348. KAPA Pure Beads. Available at: <u>https://rochesequencingstore.com/wp-content/uploads/2017/10/KAPA-Pure-Beads_KR1245-%E2%80%93-v4.17.pdf</u>.
- 349. DeAngelis MM, Wang DG, Hawkins TL. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4742-4743.
- 350. Fisher S, Barry A, Abreu J, et al. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol.* 2011;12:R1.
- 351. <u>https://emea.support.illumina.com/bulletins/2016/11/converting-ngl-to-</u><u>nm-when-calculating-dsdna-library-concentration-.html</u>.
- 352. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11:R86.

- 353. Lin MH, Jones DF, Fleming R. Transcriptomic analysis of degraded forensic body fluids. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;17:35-42.
- 354. Andrews S, Krueger F, Segonds-Pichon A, et al. Trim Galore. Available online <u>http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/</u>. *Trim Galore*. 2015;
- 355. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol*. 2019;37:907-915.
- 356. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166-169.
- 357. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
- 358. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11:R106.
- 359. Gerst R, Hölzer M. PCAGO: An interactive web service to analyze RNA-Seq data with principal component analysis. *BioRxiv*. 2018;433078.
- 360. Yousif A, Drou N, Rowe J, Khalfan M, Gunsalus KC. NASQAR: a web-based platform for high-throughput sequencing data analysis and visualization. *BMC Bioinformatics*. 2020;21:267.
- 361. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:W77-83.
- Sales G, Calura E, Martini P, Romualdi C. Graphite Web: Web tool for gene set analysis exploiting pathway topology. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:W89-97.
- 363. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdottir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* 2015;1:417-425.
- 364. Balwierz PJ, Pachkov M, Arnold P, Gruber AJ, Zavolan M, van Nimwegen E. ISMARA: automated modeling of genomic signals as a democracy of regulatory motifs. *Genome Res.* 2014;24:869-884.
- 365. Caldwell AB, Liu Q, Schroth GP, et al. Dedifferentiation and neuronal repression define familial Alzheimer's disease. *Science advances*. 2020;6:
- 366. Roy S, Schmeier S, Arner E, et al. Redefining the transcriptional regulatory dynamics of classically and alternatively activated macrophages by deepCAGE transcriptomics. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:6969-6982.
- 367. Wang LK, Chen XF, He DD, Li Y, Fu J. Dissection of functional lncRNAs in Alzheimer's disease by construction and analysis of lncRNA-mRNA networks based on competitive endogenous RNAs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;485:569-576.
- 368. Zerrouk N, Miagoux Q, Dispot A, Elati M, Niarakis A. Identification of putative master regulators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

using gene expression data and network inference. *Sci Rep.* 2020;10:16236.

- 369. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, et al. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018;172:650-665.
- 370. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix Biol*. 2016;49:10-24.
- 371. Dong X, Shi M, Lee M, et al. Global, integrated analysis of methylomes and transcriptomes from laser capture microdissected bronchial and alveolar cells in human lung. *Epigenetics*. 2018;13:264-274.
- 372. Gomez-Orte E, Cornes E, Zheleva A, et al. Effect of the diet type and temperature on the C. elegans transcriptome. *Oncotarget*. 2018;9:9556-9571.
- 373. Wheeler MM, Robinson GE. Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Sci Rep*. 2014;4:5726.
- 374. King N, O'Connell DJ. RT-PCR Protocols. Springer, 2010.
- 375. Peralta S, Duhamel GE, Katt WP, et al. Comparative transcriptional profiling of canine acanthomatous ameloblastoma and homology with human ameloblastoma. *Sci Rep.* 2021;11:17792.
- 376. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- 377. Reddy PR, Raju N. Gel-electrophoresis and its applications. *Gel Electrophoresis-Principles and basics, InTech.* 2012;15-32.
- 378. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012;3923.
- 379. Lim JCT, Yeong JPS, Lim CJ, et al. An automated staining protocol for seven-colour immunofluorescence of human tissue sections for diagnostic and prognostic use. *Pathology*. 2018;50:333-341.
- 380. Rocha RM, Miller K, Soares F, Schenka N, Vassallo J, Gobbi H. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2009;62:699-704.
- 381. Krenacs L, Krenacs T, Stelkovics E, Raffeld M. Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol Biol*. 2010;588:103-119.
- 382. Munson P. Immunohistochemistry. in: Basic Science Techniques in Clinical Practice. Springer, London, 2007; 18-30.
- 383. Akasha AM, Kato A, Luan Y, Zhou LT, Duncan FE. Immunohistochemistry in the ovary: Moving beyond the brown and blue. *Molecular reproduction and development*. 2017;84:199-199.
- 384. Luna LG. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Amer Histolabs Pub Department, 1992; 78-79.

- 385. Wolber P, Nachtsheim L, Hoffmann F, et al. Trophoblast Cell Surface Antigen 2 (Trop-2) Protein is Highly Expressed in Salivary Gland Carcinomas and Represents a Potential Therapeutic Target. *Head Neck Pathol.* 2021;15:1147-1155.
- 386. Monti P, Ciribilli Y, Bisio A, et al. N-P63alpha and TA-P63alpha exhibit intrinsic differences in transactivation specificities that depend on distinct features of DNA target sites. *Oncotarget*. 2014;5:2116-2130.
- 387. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, et al. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*. 2005;24:2458-2471.
- 388. Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2:305-316.
- 389. Sen GL, Boxer LD, Webster DE, et al. ZNF750 is a p63 target gene that induces KLF4 to drive terminal epidermal differentiation. *Dev Cell*. 2012;22:669-677.
- 390. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999;398:714-718.
- 391. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999;398:708-713.
- 392. Bishop JA, Montgomery EA, Westra WH. Use of p40 and p63 immunohistochemistry and human papillomavirus testing as ancillary tools for the recognition of head and neck sarcomatoid carcinoma and its distinction from benign and malignant mesenchymal processes. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:257-264.
- 393. Shah RB, Zhou M, LeBlanc M, Snyder M, Rubin MA. Comparison of the basal cell-specific markers, 34betaE12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:1161-1168.
- 394. Argyris PP, Malz C, Taleb R, Koutlas IG. Benign and malignant odontogenic neoplasms of the jaws show a concordant nondiscriminatory p63/p40 positive immunophenotype. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;126:506-512.
- 395. Gurgel CA, Ramos EA, Azevedo RA, Sarmento VA, da Silva Carvalho AM, dos Santos JN. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. *J Mol Histol*. 2008;39:311-316.
- 396. Atarbashi Moghadam S, Atarbashi Moghadam F, Mokhtari S, Eini E. Immunohistochemical analysis of P63 expression in odontogenic lesions. *Biomed Res Int*. 2013;2013:624176.

- 397. Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, et al. p63 expression in odontogenic cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;34:668-673.
- 398. Brkic A, Mutlu S, Kocak-Berberoglu H, Olgac V. Pathological changes and immunoexpression of p63 gene in dental follicles of asymptomatic impacted lower third molars: an immunohistochemical study. *J Craniofac Surg*. 2010;21:854-857.
- 399. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013;12:15-30.
- 400. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676.
- 401. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*. 2014;3:19.
- 402. Bandyopadhyay A, Nishat R, Behura SS, Panda A, Ramachandra S, Mohiddin G. Cancer stem cell markers, SOX 2 and OCT 4 in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor: An immunohistochemical study. *Journal of International Oral Health*. 2017;9:28.
- 403. Banerjee A, Kamath VV, Sundaram L, Krishnamurthy SS. OCT4 and SOX2 are reliable markers in detecting stem cells in odontogenic lesions. *Journal of Orofacial Sciences*. 2016;8:16.
- 404. Phattarataratip E, Panitkul T, Khodkaew W, Anupuntanun P, Jaroonvechatam J, Pitarangsikul S. Expression of SOX2 and OCT4 in odontogenic cysts and tumors. *Head Face Med*. 2021;17:29.
- 405. Wang L, Shen F, Stroehlein JR, Wei D. Context-dependent functions of KLF4 in cancers: Could alternative splicing isoforms be the key? *Cancer Lett*. 2018;438:10-16.
- 406. Evans PM, Liu C. Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40:554-564.
- 407. Tiwari A, Loughner CL, Swamynathan S, Swamynathan SK. KLF4 Plays an Essential Role in Corneal Epithelial Homeostasis by Promoting Epithelial Cell Fate and Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:2785-2795.
- 408. Ghaleb AM, Yang VW. Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017;611:27-37.
- 409. Pandya AY, Talley LI, Frost AR, et al. Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2709-2719.
- 410. Saxena K, Srikrishnan S, Celia-Terrassa T, Jolly MK. OVOL1/2: Drivers of Epithelial Differentiation in Development, Disease, and Reprogramming. *Cells Tissues Organs*. 2020;1-10.

- 411. Papathanasiou M, Tsiftsoglou SA, Polyzos AP, et al. Identification of a dynamic gene regulatory network required for pluripotency factorinduced reprogramming of mouse fibroblasts and hepatocytes. *EMBO J*. 2021;40:e102236.
- 412. Kagawa H, Shimamoto R, Kim SI, et al. OVOL1 Influences the Determination and Expansion of iPSC Reprogramming Intermediates. *Stem Cell Reports*. 2019;12:319-332.
- 413. Tsuji G, Ito T, Chiba T, et al. The role of the OVOL1-OVOL2 axis in normal and diseased human skin. *J Dermatol Sci*. 2018;90:227-231.
- 414. Roca H, Hernandez J, Weidner S, et al. Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. *PLoS One*. 2013;8:e76773.
- 415. Xu C, Yan T, Yang J. OVOL1 inhibits oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by suppressing zinc finger E-box binding homeobox 1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12:2801-2808.
- 416. Ito T, Tsuji G, Ohno F, et al. Activation of the OVOL1-OVOL2 Axis in the Hair Bulb and in Pilomatricoma. *Am J Pathol*. 2016;186:1036-1043.
- 417. Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet*. 2006;38:1335-1340.
- 418. Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, et al. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet*. 2006;38:1329-1334.
- 419. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002;32:285-289.
- 420. Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Kondo S, et al. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. *J Biol Chem*. 2005;280:34210-34217.
- 421. Botti E, Spallone G, Moretti F, et al. Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:13710-13715.
- 422. Ke CY, Xiao WL, Chen CM, Lo LJ, Wong FH. IRF6 is the mediator of TGFbeta3 during regulation of the epithelial mesenchymal transition and palatal fusion. *Sci Rep*. 2015;5:12791.
- 423. Li D, Cheng P, Wang J, et al. IRF6 Is Directly Regulated by ZEB1 and ELF3, and Predicts a Favorable Prognosis in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:220.
- 424. McDougall AR, Tolcos M, Hooper SB, Cole TJ, Wallace MJ. Trop2: from development to disease. *Dev Dyn.* 2015;244:99-109.
- 425. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes Cancer*. 2015;6:84-105.
- 426. Wang F, Liu X, Yang P, et al. Loss of TACSTD2 contributed to squamous cell carcinoma progression through attenuating TAp63-dependent apoptosis. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1133.
- 427. Mello LA, Figueiredo AL, Ramos EA, et al. CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2013;42:454-461.
- 428. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol*. 2001;32:690-697.
- 429. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil AV. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci.* 2011;3:227-233.
- 430. Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*. 2012;151:994-1004.
- 431. Kolle G, Ho M, Zhou Q, et al. Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells*. 2009;27:2446-2456.
- 432. Pinheiro JC, de Carvalho CHP, Galvao HC, Pereira Pinto L, de Souza LB, de Andrade Santos PP. Relationship between mast cells and E-cadherin in odontogenic keratocysts and radicular cysts. *Clin Oral Investig*. 2020;24:181-191.
- 433. Azevedo RS, Mosqueda-Taylor A, Carlos R, et al. Calcifying epithelial odontogenic tumor (CEOT): a clinicopathologic and immunohistochemical study and comparison with dental follicles containing CEOT-like areas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116:759-768.
- 434. Ibrahim N, Nazimi AJ, Ajura AJ, Nordin R, Latiff ZA, Ramli R. The Clinical Features and Expression of bcl-2, Cyclin D1, p53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Syndromic and Nonsyndromic Keratocystic Odontogenic Tumor. *J Craniofac Surg*. 2016;27:1361-1366.
- 435. GraphPad Prism version 9.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, <u>www.graphpad.com</u>.
- 436. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [Internet]. Springer-Verlag New York. Available from: <u>https://ggplot2.tidyverse.org</u>. 2016.
- 437. Morpheus by Broad Institute. Available at: <u>https://software.broadinstitute.org/morpheus/</u>.
- 438. https://biorender.com/.

- 439. Khan A, Mathelier A. Intervene: a tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics*. 2017;18:287.
- 440. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D412-416.
- 441. Farragher SM, Tanney A, Kennedy RD, Paul Harkin D. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochem Cell Biol*. 2008;130:435-445.
- 442. Peiro-Chova L, Pena-Chilet M, Lopez-Guerrero JA, et al. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch*. 2013;463:765-774.
- 443. Todd R, August M. Molecular approaches to the diagnosis of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated odontogenic keratocysts. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2003;15:447-461.
- 444. Taylor JM, Street TL, Hao L, et al. Dynamic and physical clustering of gene expression during epidermal barrier formation in differentiating keratinocytes. *PLoS One*. 2009;4:e7651.
- 445. Henry J, Toulza E, Hsu CY, et al. Update on the epidermal differentiation complex. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1517-1532.
- 446. Edqvist PH, Fagerberg L, Hallstrom BM, et al. Expression of human skinspecific genes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *J Histochem Cytochem*. 2015;63:129-141.
- 447. Gerber PA, Hevezi P, Buhren BA, et al. Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins. *PLoS One*. 2013;8:e63949.
- 448. Rakha EA, Alsaleem M, ElSharawy KA, et al. Visual histological assessment of morphological features reflects the underlying molecular profile in invasive breast cancer: a morphomolecular study. *Histopathology*. 2020;77:631-645.
- 449. Xie T, Pan S, Zheng H, et al. PEG10 as an oncogene: expression regulatory mechanisms and role in tumor progression. *Cancer Cell Int*. 2018;18:112.
- 450. Liu X, Cheng I, Plummer SJ, et al. Fine-mapping of prostate cancer aggressiveness loci on chromosome 7q22-35. *Prostate*. 2011;71:682-689.
- 451. Hussain S, Berki DM, Choon SE, et al. IL36RN mutations define a severe autoinflammatory phenotype of generalized pustular psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:1067-1070 e1069.
- 452. Seki Y, Yoshida Y, Ishimine H, et al. Lipase member H is a novel secreted protein selectively upregulated in human lung adenocarcinomas and bronchioloalveolar carcinomas. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;443:1141-1147.
- 453. Binkert C, Demetriou M, Sukhu B, Szweras M, Tenenbaum HC, Dennis JW. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J Biol Chem*. 1999;274:28514-28520.

- 454. Chakrabarti R, Hwang J, Andres Blanco M, et al. Elf5 inhibits the epithelialmesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nat Cell Biol*. 2012;14:1212-1222.
- 455. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:328-340.
- 456. Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:95-118.
- 457. Madsen DH, Szabo R, Molinolo AA, Bugge TH. TMPRSS13 deficiency impairs stratum corneum formation and epidermal barrier acquisition. *Biochem J.* 2014;461:487-495.
- 458. Chermnykh ES, Alpeeva EV, Vorotelyak EA. Transglutaminase 3: The Involvement in Epithelial Differentiation and Cancer. *Cells*. 2020;9:1996.
- 459. Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J. Kallikreins The melting pot of activity and function. *Biochimie*. 2016;122:270-282.
- 460. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1892-1908.
- 461. Robinson PA, Markham AF, Schalkwijk J, High AS. Increased elafin expression in cystic, dysplastic and neoplastic oral tissues. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:135-139.
- 462. Hirabayashi T, Anjo T, Kaneko A, et al. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun*. 2017;8:14609.
- 463. Miwa T, Kanda M, Koike M, et al. Identification of NCCRP1 as an epigenetically regulated tumor suppressor and biomarker for malignant phenotypes of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Lett*. 2017;14:4822-4828.
- 464. Qu Y, Zhou B, Yang W, et al. Transcriptome and proteome characterization of surface ectoderm cells differentiated from human iPSCs. *Sci Rep*. 2016;6:32007.
- 465. Sweat YY, Sweat M, Yu W, et al. Sox2 Controls Periderm and Rugae Development to Inhibit Oral Adhesions. *J Dent Res*. 2020;99:1397-1405.
- 466. Neil JE, Brown MB, Williams AC. Human skin explant model for the investigation of topical therapeutics. *Sci Rep.* 2020;10:21192.
- 467. Compagnone M, Gatti V, Presutti D, et al. DeltaNp63-mediated regulation of hyaluronic acid metabolism and signaling supports HNSCC tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:13254-13259.
- 468. Saito K, Michon F, Yamada A, et al. Sox21 Regulates Anapc10 Expression and Determines the Fate of Ectodermal Organ. *iScience*. 2020;23:101329.
- 469. Zheng Y, Cai J, Hutchins AP, et al. Remission for Loss of Odontogenic Potential in a New Micromilieu In Vitro. *PLoS One*. 2016;11:e0152893.

- 470. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*. 2012;151:1617-1632.
- 471. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*. 2008;2:230-240.
- 472. Schwarz BA, Cetinbas M, Clement K, et al. Prospective Isolation of Poised iPSC Intermediates Reveals Principles of Cellular Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2018;23:289-305 e285.
- 473. Kousa YA, Fuller E, Schutte BC. IRF6 and AP2A Interaction Regulates Epidermal Development. *J Invest Dermatol*. 2018;138:2578-2588.
- 474. Turato C, Pontisso P. SERPINB3 (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2015;19:202-209.
- 475. Bansho Y, Lee J, Nishida E, Nakajima-Koyama M. Identification and characterization of secreted factors that are upregulated during somatic cell reprogramming. *FEBS Lett*. 2017;591:1584-1600.
- 476. Kushwaha R, Jagadish N, Kustagi M, et al. Interrogation of a contextspecific transcription factor network identifies novel regulators of pluripotency. *Stem Cells*. 2015;33:367-377.
- 477. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol.* 2002;38:323-331.
- 478. Patel PG, Selvarajah S, Guerard KP, et al. Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. *PLoS One*. 2017;12:e0179732.
- 479. Kocjan BJ, Hosnjak L, Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffinembedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2015;24:47-53.
- 480. Choi Y, Kim A, Kim J, Lee J, Lee SY, Kim C. Optimization of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks for Targeted Next-Generation Sequencing. *J Breast Cancer*. 2017;20:393-399.
- 481. Adiconis X, Borges-Rivera D, Satija R, et al. Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat Methods*. 2013;10:623-629.
- 482. Sultan M, Dokel S, Amstislavskiy V, et al. A simple strand-specific RNA-Seq library preparation protocol combining the Illumina TruSeq RNA and the dUTP methods. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;422:643-646.
- 483. Noguchi K, Wakai K, Kiyono T, et al. Molecular analysis of keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and basal cell nevus syndrome patients. *Int J Oncol*. 2017;51:1731-1738.

- 484. Pammer J, Rossiter H, Bilban M, et al. PIWIL-2 and piRNAs are regularly expressed in epithelia of the skin and their expression is related to differentiation. *Arch Dermatol Res.* 2020;312:705-714.
- 485. Song W, Wenhui Z, Ruiqiang Y, et al. Long noncoding RNA PP7080 promotes hepatocellular carcinoma development by sponging mir-601 and targeting SIRT1. *Bioengineered*. 2021;12:1599-1610.
- 486. Doll C, Dauter K, Johrens K, et al. Clinical characteristics and immunohistochemical analysis of p53, Ki-67 and cyclin D1 in 80 odontogenic keratocysts. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2018;119:359-364.
- 487. Portes J, Cunha KSG, da Silva LE, da Silva AKF, Conde DC, Silva Junior A. Computerized Evaluation of the Immunoexpression of Ki-67 Protein in Odontogenic Keratocyst and Dentigerous Cyst. *Head Neck Pathol*. 2020;14:598-605.
- 488. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:597-604.
- 489. Kang J, Wang J, Tian J, Shi R, Jia H, Wang Y. The emerging role of EGFL6 in angiogenesis and tumor progression. *Int J Med Sci*. 2020;17:1320-1326.
- 490. Bulanova DR, Akimov YA, Rokka A, et al. Orphan G protein-coupled receptor GPRC5A modulates integrin β 1-mediated epithelial cell adhesion. *Cell adhesion & migration*. 2017;11:434-446.
- 491. Mohrin M, Liu J, Zavala-Solorio J, et al. Inhibition of longevity regulator PAPP-A modulates tissue homeostasis via restraint of mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*. 2021;20:e13313.
- 492. Steinbusch MMF, Caron MMJ, Surtel DAM, et al. Expression of RMRP RNA is regulated in chondrocyte hypertrophy and determines chondrogenic differentiation. *Sci Rep.* 2017;7:6440.
- 493. Ridanpaa M, van Eenennaam H, Pelin K, et al. Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell*. 2001;104:195-203.
- 494. Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol*. 1995;104:271-276.
- 495. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, et al. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology*. 2000;141:1554-1559.
- 496. Lee B, Villarreal-Ponce A, Fallahi M, et al. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev Cell*. 2014;29:47-58.

- 497. Deng Z, Cangkrama M, Butt T, Jane SM, Carpinelli MR. Grainyhead-like transcription factors: guardians of the skin barrier. *Vet Dermatol*. 2021;32:553-e152.
- 498. Jimenez-Rojo L, Granchi Z, Graf D, Mitsiadis TA. Stem Cell Fate Determination during Development and Regeneration of Ectodermal Organs. *Front Physiol*. 2012;3:107.
- 499. Yoshizaki K, Fukumoto S, Bikle DD, Oda Y. Transcriptional Regulation of Dental Epithelial Cell Fate. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8952.
- 500. Saito K, Chiba Y, Yamada A, Fukumoto S. Identification and function analysis of ameloblast differentiation-related molecules using mouse incisors. *pediatric dental journal*. 2020;30:129-138.
- 501. Chiba Y, Yoshizaki K, Tian T, et al. Integration of Single-Cell RNA- and CAGE-seq Reveals Tooth-Enriched Genes. *J Dent Res.* 2021;220345211049785.
- 502. Rasch LJ, Martin KJ, Cooper RL, Metscher BD, Underwood CJ, Fraser GJ. An ancient dental gene set governs development and continuous regeneration of teeth in sharks. *Dev Biol*. 2016;415:347-370.
- 503. St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol.* 2000;217:323-332.
- 504. Jones FS, Kioussi C, Copertino DW, Kallunki P, Holst BD, Edelman GM. Barx2, a new homeobox gene of the Bar class, is expressed in neural and craniofacial structures during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2632-2637.
- 505. Miletich I, Yu WY, Zhang R, et al. Developmental stalling and organautonomous regulation of morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:19270-19275.
- 506. Olson LE, Zhang J, Taylor H, Rose DW, Rosenfeld MG. Barx2 functions through distinct corepressor classes to regulate hair follicle remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3708-3713.
- 507. Sander G, Bawden CS, Hynd PI, Nesci A, Rogers G, Powell BC. Expression of the homeobox gene, Barx2, in wool follicle development. *J Invest Dermatol*. 2000;115:753-756.
- 508. Goodnough LH, Dinuoscio GJ, Ferguson JW, Williams T, Lang RA, Atit RP. Distinct requirements for cranial ectoderm and mesenchyme-derived wnts in specification and differentiation of osteoblast and dermal progenitors. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004152.
- 509. Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4520-4524.
- 510. Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev.* 1999;85:197-200.

- 511. Chen D, Yu F, Wu F, et al. The role of Wnt7B in the mediation of dentinogenesis via the ERK1/2 pathway. *Arch Oral Biol*. 2019;104:123-132.
- 512. Kandyba E, Kobielak K. Wnt7b is an important intrinsic regulator of hair follicle stem cell homeostasis and hair follicle cycling. *Stem Cells*. 2014;32:886-901.
- 513. Bonifas JM, Pennypacker S, Chuang PT, et al. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2001;116:739-742.
- 514. Chapman KB, Prendes MJ, Sternberg H, et al. COL10A1 expression is elevated in diverse solid tumor types and is associated with tumor vasculature. *Future Oncol.* 2012;8:1031-1040.
- 515. Wang Y, Lu S, Xiong J, et al. ColXalpha1 is a stromal component that colocalizes with elastin in the breast tumor extracellular matrix. *J Pathol Clin Res.* 2019;5:40-52.
- 516. Kim IW, Jeong HS, Kwon NS, Baek KJ, Yun HY, Kim DS. LGI3 promotes human keratinocyte differentiation via the Akt pathway. *Exp Dermatol*. 2018;27:1224-1229.
- 517. Herum KM, Lunde IG, Skrbic B, et al. Syndecan-4 signaling via NFAT regulates extracellular matrix production and cardiac myofibroblast differentiation in response to mechanical stress. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;54:73-81.
- 518. Pardo-Saganta A, Calvo IA, Saez B, Prosper F. Role of the extracellular matrix in stem cell maintenance. *Current Stem Cell Reports*. 2019;5:1-10.
- 519. lezzi G, Mangano C, Barone A, et al. Jawbone remodeling: a conceptual study based on Synchrotron High-resolution Tomography. *Sci Rep*. 2020;10:3777.
- 520. Lichtenberger BM, Mastrogiannaki M, Watt FM. Epidermal beta-catenin activation remodels the dermis via paracrine signalling to distinct fibroblast lineages. *Nat Commun*. 2016;7:10537.
- 521. Lontos K, Adamik J, Tsagianni A, Galson DL, Chirgwin JM, Suvannasankha A. The Role of Semaphorin 4D in Bone Remodeling and Cancer Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:322.
- 522. Chacham M, Almoznino G, Zlotogorski-Hurvitz A, Buchner A, Vered M. Expression of stem cell markers in stroma of odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2020;49:1068-1077.
- 523. Ba K, Li X, Wang H, et al. Correlation between imaging features and epithelial cell proliferation in keratocystic odontogenic tumour. *Dentomaxillofac Radiol*. 2010;39:368-374.
- 524. Gonzalez-Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Delgado-Rodriguez M, et al. Analysis of p53 protein by PAb240, Ki-67 expression and human papillomavirus DNA detection in different types of odontogenic keratocyst. *Anticancer Res.* 2006;26:175-181.

- 525. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. J Oral Pathol Med. 1995;24:221-226.
- 526. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111:333-339.
- 527. Xia J, Cao T, Ma C, et al. miR-7 Suppresses Tumor Progression by Directly Targeting MAP3K9 in Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;13:121-132.
- 528. Wang F, Hu YL, Feng Y, et al. High-level expression of PRSS3 correlates with metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol.* 2019;119:1108-1121.
- 529. Zhu B, Wu Y, Niu L, et al. Silencing SAPCD2 Represses Proliferation and Lung Metastasis of Fibrosarcoma by Activating Hippo Signaling Pathway. *Front Oncol.* 2020;10:574383.
- 530. Schmit K, Michiels C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Front Pharmacol.* 2018;9:1345.
- 531. Xia P, Choi AH, Deng Z, et al. Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas. *Oncotarget*. 2017;8:14147-14157.
- 532. Tanese K, Nakamura Y, Hirai I, Funakoshi T. Updates on the Systemic Treatment of Advanced Non-melanoma Skin Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:160.
- 533. Yao CD, Haensel D, Gaddam S, et al. AP-1 and TGFss cooperativity drives non-canonical Hedgehog signaling in resistant basal cell carcinoma. *Nat Commun*. 2020;11:5079.
- 534. Yamamoto T, Ichioka H, Yamamoto K, et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: Clinical features and implications of development of basal cell carcinoma in skin and keratocystic odontogenic tumor in jaw and their gene expressions. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 2011;23:105-112.
- 535. Antonoglou GN, Sandor GK, Koidou VP, Papageorgiou SN. Non-syndromic and syndromic keratocystic odontogenic tumors: systematic review and meta-analysis of recurrences. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42:e364-371.
- 536. el Murtadi A, Grehan D, Toner M, McCartan BE. Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;81:217-220.
- 537. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:434-442.

- 538. Kolar Z, Geierova M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdy P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2006;35:75-80.
- 539. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, et al. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res.* 1999;78:1345-1353.
- 540. Vera-Sirera B, Forner-Navarro L, Vera-Sempere F. Differential expression of cyclin D1 in keratin-producing odontogenic cysts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e59-65.
- 541. Hoyos Cadavid AM, Kaminagakura E, Rodrigues M, Pinto CAL, Teshima THN, Alves FA. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig*. 2019;23:153-159.
- 542. Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, Takahashi N, Ooya K. PTC gene mutations and expression of SHH, PTC, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33:584-592.
- 543. Zedan W, Robinson PA, Markham AF, High AS. Expression of the Sonic Hedgehog receptor "PATCHED" in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts. *J Pathol*. 2001;194:473-477.
- 544. Schacht V, Kern JS. Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1-4.
- 545. Raab SS. The cost-effectiveness of immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:1185-1191.
- 546. Ong CJ, Tan QX, Lim HJ, et al. An Optimised Protocol Harnessing Laser Capture Microdissection for Transcriptomic Analysis on Matched Primary and Metastatic Colorectal Tumours. *Sci Rep.* 2020;10:682.
- 547. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339:b2700.
- 548. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ*. 2015;350:g7647.
- 549. Booth A, Clarke M, Dooley G, et al. The nuts and bolts of PROSPERO: an international prospective register of systematic reviews. *Syst Rev.* 2012;1:2.
- 550. Higgins JPT, Green S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1. 0. The Cochrane Collaboration. Available from: <u>http://www.cochrane-handbook.org</u>. 2013.

- 551. Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, et al. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43:619-626.
- 552. Li TJ, Browne RM, Prime SS, Paterson IC, Matthews JB. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:249-255.
- 553. Li T, Browne RM, Matthews JB. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. *Mol Pathol*. 1997;50:21-27.
- 554. Braschi B, Denny P, Gray K, et al. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D786-D792.
- 555. HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom. Available from: <u>http://www.genenames.org</u>.
- 556. Moola S, Munn Z, Tufanaru C, et al. Systematic reviews of etiology and risk. In: Aromataris E, Munn Z (eds) Joanna Briggs Institute Reviewer's. The Joanna Briggs Institute, Manual. 2017.
- 557. Gouvea GR, Vieira WA, Paranhos LR, Bernardino IM, Bulgareli JV, Pereira AC. Assessment of the ergonomic risk from saddle and conventional seats in dentistry: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13:e0208900.
- 558. Pereira L, Monyror J, Almeida FT, et al. Prevalence of adenoid hypertrophy: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev.* 2018;38:101-112.
- 559. Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.4, The Cochrane Collaboration, 2020.
- 560. Zamora J, Abraira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol*. 2006;6:31.
- 561. Bossuyt P, Davenport C, Deeks J, Hyde C, Leeflang M, Scholten R. Chapter 11: Interpreting results and drawing conclusions. In: Deeks JJ, Bossuyt PM, Gatsonis C (editors), Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy Version 0.9. The Cochrane Collaboration. Available from: <u>http://srdta.cochrane.org/</u>. 2013.
- 562. Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Public Health Rep.* 1947;62:1432-1449.
- 563. Swets JA. The Relative Operating Characteristic in Psychology: A technique for isolating effects of response bias finds wide use in the study of perception and cognition. *Science*. 1973;182:990-1000.

- 564. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bonsel GJ, Bossuyt PM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol*. 2003;56:1129-1135.
- 565. Heatley MK. Immunohistochemical biomarkers of value in distinguishing primary ovarian carcinoma from gastric carcinoma: a systematic review with statistical meta-analysis. *Histopathology*. 2008;52:267-276.
- 566. Wiggers JK, Ruys AT, Groot Koerkamp B, Beuers U, ten Kate FJ, van Gulik TM. Differences in immunohistochemical biomarkers between intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:1582-1594.
- 567. Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics*. 1954;10:101-129.
- 568. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med.* 2002;21:1539-1558.
- 569. Raffone A, Travaglino A, Saccone G, et al. Loss of PTEN expression as diagnostic marker of endometrial precancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019;98:275-286.
- 570. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*. 1986;7:177-188.
- 571. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978;8:283-298.
- 572. Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med.* 1993;12:1293-1316.
- 573. Balduzzi S, Rucker G, Schwarzer G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health*. 2019;22:153-160.
- 574. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Immunocytochemical expression of parathyroid hormone related protein (PTHrP) in odontogenic jaw cysts. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1997;35:275-279.
- 575. Amorim RF, Godoy GP, Galvao HC, Souza LB, Freitas RA. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Oral Dis*. 2004;10:265-270.
- 576. Dos Santos JN, Oliveira GQ, Gurgel CA, et al. Altered expression of cytokeratins in primary, recurrent and syndrome keratocystic odontogenic tumors. *J Mol Histol*. 2009;40:269-275.
- 577. Gratzinger D, Salama ME, Poh CF, Rouse RV. Ameloblastoma, calcifying epithelial odontogenic tumor, and glandular odontogenic cyst show a distinctive immunophenotype with some myoepithelial antigen expression. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:177-184.

- 578. Cota JE, Spadigam A, Dhupar A. Detection of Type VII collagen in odontogenic keratocyst: An immunohistochemical study. *J Clin Exp Dent*. 2019;11:e310-e314.
- 579. Leonardi R, Perrotta RE, Crimi S, et al. Differential expression of TLR3 and TLR4 in keratocystic odontogenic tumor (KCOT): A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent, and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)--associated lesions. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43:733-737.
- 580. Cairns L, Naidu A, Robinson CM, Sloan P, Wright JM, Hunter KD. CD56 (NCAM) expression in ameloblastomas and other odontogenic lesions. *Histopathology*. 2010;57:544-548.
- 581. Vera-Sirera B, Forner-Navarro L, Vera-Sempere F. NCAM (CD56) expression in keratin-producing odontogenic cysts: aberrant expression in KCOT. *Head Face Med*. 2015;11:3.
- 582. Chang CH, Wu YC, Wu YH, Sun A, Cheng SJ, Chen HM. Significant association of inflammation grade with the number of Langerhans cells in odontogenic keratocysts. *J Formos Med Assoc*. 2017;116:798-805.
- 583. Nonaka CF, Cavalcante RB, Nogueira RL, de Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol*. 2012;57:230-237.
- 584. Figueroa A, Correnti M, Avila M, Andea A, DeVilliers P, Rivera H. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: similar behavior to sporadic type? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142:179-183.
- 585. Santos HBP, Morais EF, Cavalcante RB, et al. Immunoexpression of DNA base excision repair and nucleotide excision repair proteins in ameloblastomas, syndromic and non-syndromic odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104627.
- 586. Mascitti M, Togni L, Balercia A, Balercia P, Rubini C, Santarelli A. p53-Family Proteins in Odontogenic Cysts: An Immunohistochemical Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2020;28:369-375.
- 587. Malaguez GG, Munhoz EA, Rivero ERC, Rados PV, Oliveira MG. Podoplanin Expression in Odontogenic Keratocysts Associated or not Associated With Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2020;28:513-517.
- 588. Awni S, Conn B. Decompression of keratocystic odontogenic tumors leading to increased fibrosis, but without any change in epithelial proliferation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;123:634-644.
- 589. Leite RB, Cavalcante RB, Nogueira RLM, Souza LB, Pereira Pinto L, Nonaka CFW. Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and

non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. *Braz Oral Res*. 2017;31:e34.

- 590. Chang CH, Wu YC, Wu YH, Sun A, Chen HM, Lin HP. Langerhans cells in 60 odontogenic keratocysts. *J Dent Sci*. 2017;12:283-290.
- 591. Mendes RB, Dias RB, Figueiredo AL, et al. Glypican-3 distinguishes aggressive from non-aggressive odontogenic tumors: a preliminary study. *J Oral Pathol Med*. 2017;46:297-300.
- 592. Vera-Sirera B, Forner-Navarro L, Vera-Sempere F. Immunohistochemical expression of glucose transporter 1 in keratin-producing odontogenic cysts. *BMC Oral Health*. 2016;16:32.
- 593. Johann AC, Caldeira PC, Caliari MV, Gomez RS, Aguiar MC, Mesquita RA. Metallothionein immunoexpression in non-syndromic and syndromic keratocystic odontogenic tumour. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e408-412.
- 594. de Brito Monteiro BV, Cavalcante RB, Maia Nogueira RL, da Costa Miguel MC, Weege Nonaka CF, da Silveira EJ. Participation of hMLH1, p63, and MDM2 proteins in the pathogenesis of syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120:52-57.
- 595. Amm HM, Casimir MD, Clark DB, Sohn P, MacDougall M. Matrix metalloproteinase expression in keratocystic odontogenic tumors and primary cells. *Connect Tissue Res.* 2014;55 Suppl 1:97-101.
- 596. Alur J, Narayan TV, Mohanty L, Shenoy S, Jamadar S, Shetty S. Ki-67 and p53 expression in solitary sporadic, syndrome associated and recurrent keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18:S21-25.
- 597. Kadlub N, Coudert A, Gatibelza ME, et al. PTCH1 mutation and local aggressiveness of odontogenic keratocystic tumors in children: is there a relationship? *Hum Pathol*. 2013;44:1071-1078.
- 598. Singh HP, Nayar A, Raj A, Kumar P. Are All Odontogenic Keratocysts Keratocystic Odontogenic Tumors? Correlation between Imaging Features and Epithelial Cell Proliferation. *J Clin Imaging Sci*. 2013;3:3.
- 599. de Assis Caldas Pereira F, Gurgel CA, Ramos EA, et al. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. *Tumour Biol.* 2012;33:455-461.
- 600. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Potential relevance of cyclooxygenase-2 expression in keratocystic odontogenic tumours an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:497-503.
- 601. Leonardi R, Matthews JB, Caltabiano R, et al. MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumour associated with NBCCS and sporadic keratocysts. *Oral Dis*. 2010;16:795-800.
- 602. Silva Gurgel CA, Goncalves Ramos EA, Araujo Melo L, et al. Immunolocalisation of laminin-1 in keratocystic odontogenic tumors. *Acta Histochem*. 2010;112:624-629.

- 603. Pan S, Li TJ. PTCH1 mutations in odontogenic keratocysts: are they related to epithelial cell proliferation? *Oral Oncol.* 2009;45:861-865.
- 604. Cavalcante RB, Pereira KM, Nonaka CF, Nogueira RL, de Souza LB. Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106:99-105.
- 605. Mateus GC, Lanza GH, de Moura PH, Marigo Hde A, Horta MC. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:E697-702.
- 606. Katase N, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, et al. Analysis of the neoplastic nature and biological potential of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:550-554.
- 607. Foschini MP, Cocchi R, Marucci G, et al. High DeltaN p63 isoform expression favours recurrences in odontogenic keratocyst--odontogenic keratocystic tumour. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35:673-675.
- 608. Barreto DC, Bale AE, De Marco L, Gomez RS. Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. *J Dent Res.* 2002;81:757-760.
- 609. Pavelic B, Levanat S, Crnic I, et al. PTCH gene altered in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:569-576.
- 610. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Analysis of apoptosis-related factors and apoptotic cells in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *Oral Med Pathol*. 2000;5:35-40.
- 611. Meara JG, Pilch BZ, Shah SS, Cunningham MJ. Cytokeratin expression in the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:862-865; discussion 866.
- 612. Carvalhais J, Aguiar M, Araujo V, Araujo N, Gomez R. p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. *Oral Dis.* 1999;5:218-222.
- 613. Lombardi T, Odell EW, Morgan PR. p53 immunohistochemistry of odontogenic keratocysts in relation to recurrence, basal-cell budding and basal-cell naevus syndrome. *Arch Oral Biol*. 1995;40:1081-1084.
- 614. High AS, Robinson PA, Klein CE. Discrimination of parakeratinised odontogenic keratocysts from other odontogenic and non-odontogenic cyst types by expression of a 38kd cell-surface glycoprotein. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:363-367.
- 615. Ogden GR, Chisholm DM, Kiddie RA, Lane DP. p53 protein in odontogenic cysts: increased expression in some odontogenic keratocysts. *J Clin Pathol*. 1992;45:1007-1010.
- 616. Shuler CF, Shriver BJ. Identification of intermediate filament keratin proteins in parakeratinized odontogenic keratocysts. A preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;64:439-444.

- 617. Grant RL. Converting an odds ratio to a range of plausible relative risks for better communication of research findings. *BMJ*. 2014;348:f7450.
- 618. Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol*. 1999;52:75-77.
- 619. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006;49:411-424.
- 620. Meruvia-Pastor OE, Soh J, Schmidt EJ, et al. Estimating cell count and distribution in labeled histological samples using incremental cell search. *Int J Biomed Imaging*. 2011;2011:874702.
- 621. Pons MN, Vivier H. Biomass quantification by image analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2000;66:133-184.
- 622. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:1204-1207.
- 623. Gonzalez-Moles MA, Warnakulasuriya S, Gonzalez-Ruiz I, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of oral squamous cell carcinomas arising in patients with oral lichen planus: A systematic review and a comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol*. 2020;106:104688.
- 624. von Elm E, Altman DG, Egger M, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*. 2014;12:1495-1499.
- 625. Nowell CS, Odermatt PD, Azzolin L, et al. Chronic inflammation imposes aberrant cell fate in regenerating epithelia through mechanotransduction. *Nat Cell Biol*. 2016;18:168-180.
- 626. Chermnykh E, Kalabusheva E, Vorotelyak E. Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1003.
- 627. Di Stefano B, Prigione A, Broccoli V. Efficient genetic reprogramming of unmodified somatic neural progenitors uncovers the essential requirement of Oct4 and Klf4. *Stem Cells Dev.* 2009;18:707-716.
- 628. Liebau S, Mahaddalkar PU, Kestler HA, Illing A, Seufferlein T, Kleger A. A hierarchy in reprogramming capacity in different tissue microenvironments: what we know and what we need to know. *Stem Cells Dev*. 2013;22:695-706.
- 629. Azevedo JL, Feldman RA. Tinkering with transcription factors uncovers plasticity of somatic cells. *Genes Cancer*. 2010;1:1089-1099.
- 630. Poon MW, He J, Fang X, et al. Human Ocular Epithelial Cells Endogenously Expressing SOX2 and OCT4 Yield High Efficiency of Pluripotency Reprogramming. *PLoS One*. 2015;10:e0131288.
- 631. Amici AW, Onikoyi FO, Bonfanti P. Lineage potential, plasticity and environmental reprogramming of epithelial stem/progenitor cells. *Biochem Soc Trans*. 2014;42:637-644.

- 632. Cai J, He B, Li X, et al. Regulation of tumorigenesis in oral epithelial cells by defined reprogramming factors Oct4 and Sox2. *Oncol Rep.* 2016;36:651-658.
- 633. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int J Biol Sci*. 2013;9:1070-1078.
- 634. Yoshida K, Uehara O, Kurashige Y, et al. Direct reprogramming of epithelial cell rests of malassez into mesenchymal-like cells by epigenetic agents. *Sci Rep.* 2021;11:1852.
- 635. Mack DL, Guan X, Wagoner A, Walker SJ, Childers MK. Disease-in-a-dish: the contribution of patient-specific induced pluripotent stem cell technology to regenerative rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil*. 2014;93:S155-168.
- 636. Spagnuolo G, Codispoti B, Marrelli M, Rengo C, Rengo S, Tatullo M. Commitment of Oral-Derived Stem Cells in Dental and Maxillofacial Applications. *Dent J (Basel)*. 2018;6:
- 637. Chiba Y, Saito K, Martin D, et al. Single-Cell RNA-Sequencing From Mouse Incisor Reveals Dental Epithelial Cell-Type Specific Genes. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:841.
- 638. Krivanek J, Soldatov RA, Kastriti ME, et al. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat Commun.* 2020;11:4816.