

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘ. Κ. ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ



«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΤΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ
ΑΣΤΡΟΚΥΤΩΜΑΤΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ»

Διδακτορική Διατριβή
Αθανασία Σεψά
Ιατρός, Παθολογοανατόμος

ΑΘΗΝΑ 2017

Γενικές Πληροφορίες

Ημερομηνία υποβολής της αίτησης για εκπόνηση διατριβής	13/7/2011
Ημερομηνία κατάθεσης πρωτοκόλλου και έγκρισή του από την επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας	13/2/2012
Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής	21/11/2011
Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής	Καθ. κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου (Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ) Καθ. κ. Ευστράτιος Πατσούρης Αν. Καθ. κ. Χαρίκλεια Γακιοπούλου
Καθορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής	27/1/2012
Ημερομηνία τροποποίησης θέματος	25/1/2013 Το αρχικό θέμα «Μελέτη των επιγενετικών αλλαγών στα νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του παγκρέατος» τροποποιήθηκε ως εξής: «Μελέτη του ρόλου των τροποποιήσεων της χρωματίνης και των επιγενετικών αλλαγών σε αστροκυτώματα εγκεφάλου»
Ημερομηνία κατάθεσης Α' προόδου	13/3/2013
Ημερομηνία κατάθεσης Β' προόδου	9/5/2014
Ημερομηνία κατάθεσης Γ' προόδου	19/10/2015

Αρ. πρωτοκόλλου 7μελούς Επιτροπής	1718006737 (Ημερ. 31/10/2017)
Μέλη 7μελούς Επιτροπής	<ol style="list-style-type: none"> 1. Καθ. κ. Ευστράτιος Πατσούρης 2. Καθ. κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου 3. Αν. Καθ. κ. Χαρίκλεια Γακιοπούλου 4. Καθ. κ. Ανδρέας Λάζαρης 5. Αν. Καθ. κ. Χριστίνα Πιπέρη 6. Αν. Καθ. κ. Ευστάθιος Μποβιάτσης 7. Επ. Καθ. κ. Ειρήνη Θυμαρά

Δημοσίευση από την παρούσα διδακτορική διατριβή:

Sepsa A, Levidou G, Gargalionis A, Adamopoulos C, Spyropoulou A, Dalagiorgou G, Thymara I, Boviatsis E, Themistocleous MS, Petraki K, Vrettakos G, Samaras V, Zisakis A, Patsouris E, Piperi C, Korkolopoulou P.

Emerging role of linker histone variant H1x as a biomarker with prognostic value in astrocytic gliomas. A multivariate analysis including trimethylation of H3K9 and H4K20.

PLoS One. 2015 Jan 20;10(1):e0115101.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ


 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΗ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΗΤΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΡΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙΣ
 ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
 Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο οποίο υπήρξα ειδικευόμενη ιατρός.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομική και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Ευστράτιο Πατσούρη για τη δυνατότητα και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε για την επίτευξη του παρόντος πονήματος.

Η πραγματοποίηση και η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την ουσιαστική συμβολή, ακούραστη βοήθεια και συνεχή στήριξη της επιβλέπουσας Καθηγήτριας κας Πηνελόπης Κορκολοπούλου. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ανεκτίμητη βοήθεια, τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου προσέφερε, όχι μόνο στα πλαίσια της διατριβής μου αλλά και κατά τη διάρκεια όλων των χρόνων παραμονής μου στο Εργαστήριο.

Θερμότατα ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χαρίκλεια Γακιοπούλου για την άριστη συνεργασία σε όλα τα επίπεδα και την ουσιαστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη νιώθω απέναντι στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κα Χριστίνα Πιπέρη για τη σημαντικότερη και ουσιαστική επιστημονική συμβολή της στην παρούσα μελέτη.

Πολύτιμη και ουσιαστικότερη υπήρξε και η βοήθεια της ιατρού κας Γεωργίας Λεβίδου στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά το τεχνολογικό και διοικητικό προσωπικό του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με έχει στηρίξει σε κάθε βήμα της επαγγελματικής μου πορείας.

*Στη μητέρα μου,
που με έμαθε τι σημαίνει
να είσαι γιατρός και άνθρωπος*

Περιεχόμενα

A. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	10
B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
1. Εμβρυογένεση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.....	17
2. Δομή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.....	19
2.1. Φαία και λευκή ουσία.....	19
2.2. Νευρώνες.....	19
2.3. Νευρογλοιακά κύτταρα.....	20
3. Περιγραφή και ταξινόμηση των γλοιωμάτων.....	23
3.1. Εισαγωγή στους όγκους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.....	23
3.2. Η ταξινόμηση των διάχυτων γλοιωμάτων.....	25
3.3. Διάχυτο αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH.....	27
3.4. Γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH.....	35
3.5. Διάχυτο αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH.....	36
3.6. Αναπλαστικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH.....	36
3.7. Αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH.....	41
3.8. Γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH.....	41
3.9. Γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH.....	51
4. Μοριακή φυσιολογία των ιστονών.....	57
4.1. Η σύμπτυξη του DNA στα χρωμοσώματα.....	57
4.2. Ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη.....	58
4.3. Τα νουκλεοσώματα ως βασική χρωμοσωμική δομή.....	59
4.4. Η δυναμική φύση των νουκλεοσωμάτων.....	62

4.5. Η διάταξη των νουκλεοσωμάτων στη χρωματίνη – η ιστόνη H1	64
4.6. Ομοιοπολικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμικών ιστονών	66
4.7. Ο ρόλος των ιστονικών παραλλαγών (variants), η αλληλεπίδρασή τους με τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις και ο κώδικας των ιστονών	68
4.8. Οι μεθυλοτρανσφεράσες SETDB1 και SUV39H1	70
4.9. Μοριακή φυσιολογία της H3K9me3	71
4.10. Μοριακή φυσιολογία της H4K20me3	73
4.11. Η ιστονική παραλλαγή H1x.....	77
Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
1. Εισαγωγή - Σκοπός	80
2. Υλικό και Μέθοδος.....	84
2.1. Περιγραφή των ασθενών.....	84
2.2. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών γλοιωμάτων και εφαρμογή chaetocin.....	85
2.3. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....	86
2.4. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	87
2.5. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων.....	88
2.6. Δοκιμασία κλωνικής έκπτυξης	88
2.7. Δοκιμασία μεταναστευτικής ικανότητας	89
2.8. Στατιστική ανάλυση	89
2.9. Κοόρτη επαλήθευσης.....	90
3. Αποτελέσματα	92

3.1. Έκφραση των δεικτών H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1 σε αστροκυτώματα και φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό	92
3.2. Συσχετίσεις μεταξύ H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1	94
3.3. Σχέση των δεικτών H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1 με την IDH1-R132H και κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	94
3.4. Ανάλυση επιβίωσης.....	95
3.5. Ανάλυση επιβίωσης- κοόρτη επαλήθευσης	95
3.6. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα των γλοιομάτων.....	96
3.7. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 οδηγεί σε μειωμένη κλωνική έκπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων	98
3.8. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 οδηγεί σε μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων.....	98
4. Συζήτηση	99
Δ. ΠΙΝΑΚΕΣ	109
Ε. ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ	116
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	136
Ζ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	169
Η. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (ENGLISH SUMMARY).....	171

Α. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΌΝΟΜΑ : ΣΕΨΑ ΑΘΑΝΑΣΙΑ του ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

ΈΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 1984

ΟΙΚ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : Έγγαμη με δύο παιδιά

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : Ήβης 20Α, 15234 Χαλάνδρι, Αθήνα

ΤΗΛΕΦΩΝΟ : (+30) 210-6838089, 6977733288

ΗΛ. ΤΑΧΥΔΡΟΜΕΙΟ : cynthia.sepsa@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

2015	Απόκτηση Τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογικής Ανατομικής
2002-2008	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Ιατρική Σχολή <i>Πτυχίο</i> : Ιατρικής «Λίαν Καλώς» Βαθμός πτυχίου: 8,3
1990-2002	Ελληνοαμερικάνικο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κολλέγιο Αθηνών Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου με γενικό βαθμό ΑΡΙΣΤΑ (19,5)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

09/08-05/09	Εργασία μέσω της 1ης ΥΠΕ Αττικής σε κλινικές μελέτες στην 7η Πνευμονολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών "Η Σωτηρία". Συμμετοχή στο κλινικό και εκπαιδευτικό έργο της κλινικής.
05/09-08/09	Ειδικευόμενη Παθολογικής Ανατομικής στο Γενικό Νοσοκομείο Μελισσίων «Αμαλία Φλέμιγκ»
08/09-07/14	Ειδικευόμενη Παθολογικής Ανατομικής στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ – Λαϊκό Νοσοκομείο

08/14-04/16	Ειδικευόμενη Κυτταρολογίας στο Κυτταρολογικό Εργαστήριο του Αντικαρκινικού - Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών "Ο Άγιος Σάββας"
2/10/2015	Απόκτηση Τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας Παθολογικής Ανατομικής
04/16-04/17	Επιμελήτρια Παθολογοανατόμος στο ΙΑΤΡΙΚΟ ΑΘΗΝΩΝ Ε.Α.Ε.
05/17-σήμερα	Επιμελήτρια Παθολογοανατόμος στο Νοσοκομείο METROPOLITAN

Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Αθηνών

(τίτλος διδακτορικής διατριβής «Μελέτη του ρόλου των τροποποιήσεων της χρωματίνης και των επιγενετικών αλλαγών σε αστροκυτώματα εγκεφάλου»)

ΓΝΩΣΕΙΣ

2000 : *Αγγλικά*: Cambridge Proficiency Certificate, Grade A

1998 : Cambridge First Certificate, Grade A

1996-2000 : *Γαλλικά*: DELF A1, A2, A3, A4, A6

H/Y: MS Office 2013, Internet, Windows 7

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΣΥΝΑΝΤΗΣΕΙΣ

- 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 16-19/6/2010
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της ομάδας Γυναικολογικού Συστήματος με θέμα: «Ενότητα: Όγκοι ωοθηκών», 3/2/2011
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Νευροπαθολογοανατομικής Ομάδας με θέμα: "Η διάγνωση όγκων του ΚΝΣ στην καθημέραν πράξη", 22/2/2011
- Ημερίδα «Οζώδης Νόσος Θυρεοειδούς Αδένα», Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου «Βενιζέλειο-Πανάνειο», 14/5/2011
- 23^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Ελσίνκι 27/8-1/9/2011

- Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Γυναικολογικού Συστήματος με θέμα «Μια περιήγηση στο ενδομήτριο: Από τα ξέσματα στο παρασκεύασμα της υστερεκτομής», 17-18/2/2012
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Επιθηλιακά και μη επιθηλιακά νεοπλάσματα σώματος μήτρας (slide seminar)», 1/3/2012
- 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Γεώργιος Ν. Παπανικολάου», Κύμη Ευβοίας, 21-23/9/2012
- Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Γυναικολογικού Συστήματος με θέμα «Μη νεοπλασματικές και νεοπλασματικές παθήσεις εξαρτημάτων: μια κλινικοπαθολογοανατομική συσχέτιση», 11-12/1/2013
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Από το οπτικό μικροσκόπιο στο ηλεκτρονικό: Η συμβολή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στην παθολογοανατομική διάγνωση», 25-26/4/2013
- Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Ενδοκρινών Αδένων με θέμα «Νευροενδοκρινείς όγκοι παγκρέατος», 17/5/2013
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Νεοπλάσματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας: Κυτταρολογική και Παθολογοανατομική Διερεύνηση», 24-25/5/2013
- Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Λεμφικού και Αιμοποιητικού συστήματος με θέμα «Επιθετικά Β-Λεμφώματα: Νέα δεδομένα – διαγνωστική προσέγγιση», 1/6/2013
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Athens Lymphoma, Αθήνα 31/10-2/11/2013
- 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αθήνα 18-21/6/2014
- Τακτικές συναντήσεις της Ομάδας Νεφροουρολογικής και Ανδρολογικής Παθολογικής Ανατομικής των ακαδημαϊκών ετών 2009-2015
- Πρόγραμμα Μαθημάτων: «Μαθήματα Παθολογικής Ανατομικής – Η Ώρα του Ειδικεύμενου των ακαδημαϊκών ετών 2009-2015

- Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Λεμφικού και Αιμοποιητικού συστήματος με θέμα «Λεμφώματα από μικρά Β-κύτταρα. Νεότερα δεδομένα και διαγνωστικές παγίδες», 16/5/2015
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Μεσεγγυματικά νεοπλάσματα του δέρματος», 30/3/2017

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΣΥΝΑΝΤΗΣΕΙΣ

- Παρουσίαση ενδιαφέροντος περιστατικού στο επιστημονικό σεμινάριο της Ομάδας Νεφροουρολογικής και Ανδρολογικής Παθολογικής Ανατομικής με θέμα: «Η Παθολογοανατομική Εξέταση του Πέους», 1/12/2009
- Παρουσίαση ενδιαφέροντος περιστατικού στη συνάντηση της Ομάδας Νεφροουρολογικής και Ανδρολογικής Παθολογικής Ανατομικής, 5/10/2010
- Παρουσίαση ενδιαφέροντος περιστατικού στην Επιστημονική Διημερίδα της Ομάδας Νεφροουρολογικής και Ανδρολογικής Παθολογικής Ανατομικής με θέμα: «Διαφοροδιάγνωση Νεοπλασιών Ουροποιητικού Συστήματος και Γεννητικού Συστήματος του Άρρενος Βάσει Ιστολογικών Προτύπων και Ανοσοφαινοτυπικών Χαρακτηριστικών», 8-9/4/2011
- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Όγκοι Μαλακών Μορίων», 8-9/12/2011
- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στην Επιστημονική Ημερίδα της Ομάδας Λεμφικού και Αιμοποιητικού συστήματος με θέμα «Η θέση της οστεομυελικής βιοψίας στη διαγνωστική προσέγγιση και παρακολούθηση των αιματολογικών νόσων», 16/12/2011
- Παρουσίαση 2 περιστατικών στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Όγκοι κεφαλής τραχήλου: Διαφοροδιάγνωση βάσει ιστολογικών προτύπων και ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών», 27-28/1/2012
- Παρουσίαση περιστατικού στην ομάδα Λεμφικού και Αιμοποιητικού συστήματος με θέμα «CD30(+) Τ-λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες δέρματος», 15/1/2013

- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Λέμφωμα Hodgkin και λεμφώματα από ώριμα Β κύτταρα», 4-5/4/2013
- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Ιστολογική διάγνωση Όγκων Νεφρού», 23-24/1/2014
- Παρουσίαση περιστατικού στην ομάδα Λεμφικού και Αιμοποιητικού συστήματος με θέμα «Μυελολίπωμα οπισθοπεριτοναϊκού χώρου με παρουσία διήθησης από Β λέμφωμα», 11/2/2014
- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Νέα δεδομένα στα Ενδοτορικά Νεοπλάσματα Παγκρέατος-Χολαγγείων», 27/2/2014
- Συμμετοχή ως εκπαιδεύτρια στο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Επιθηλιακά Νεοπλάσματα Σιελογόνων Αδένων: Κλινικοπαθολογο- ανατομική- Κυτταρολογική Προσέγγιση και Νεότερα Δεδομένα», 3-4/4/2014

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- "Rare involvement of central nervous system (CNS) in typical chronic lymphocytic leukemia (CLL): Report of a case and literature review", 23rd European Congress of Pathology, Helsinki, Finland, 27 August – 1 September 2011
- «Σύνθετο Ορώδες Μικροκυστικό Αδένωμα και Νευροενδοκρινής Όγκος Παγκρέατος», 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Καλαμάτα, 13-16 Ιουνίου 2012
- "The role of CXC-Chemokines IL-6, IL-8 and CXCR2 receptor in lymphoplasmacytic lymphoma: correlations with microvascular characteristics and clinical features", 18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm, Sweden, 13-16 June 2013

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Vassilakopoulos TP, Levidou G, Milionis V, Hartmann S, Lakiotaki E, Sepsa A, Thymara I, Ntailiani P, Spanou K, K Angelopoulou M, P Siakantaris M, Moschogiannis M, A Pangalis G, Panayiotidis P, Konstantopoulos K, Patsouris E, Hansmann ML, Korkolopoulou P. Thioredoxin-1, chemokine (C-X-C motif) ligand-9 and interferon- γ expression in the neoplastic cells and macrophages of Hodgkin lymphoma: clinicopathologic correlations and potential prognostic implications. *Leuk Lymphoma*. 2017 Sep;58(9):1-13.
- Lakiotaki E, Levidou G, Angelopoulou MK, Adamopoulos C, Pangalis G, Rassidakis G, Vassilakopoulos T, Gainaru G, Flevari P, Sachanas S, Saetta AA, Sepsa A, Moschogiannis M, Kalpadakis C, Tsesmetzis N, Milionis V, Chatziandreu I, Thymara I, Panayiotidis P, Dimopoulou M, Plata E, Konstantopoulos K, Patsouris E, Piperi C, Korkolopoulou P. Potential role of AKT/mTOR signalling proteins in hairy cell leukaemia: association with BRAF/ERK activation and clinical outcome. *Sci Rep*. 2016 Feb 19;6:21252.
- Levidou G, Sachanas S, Pangalis GA, Kalpadakis C, Yiakoumis X, Moschogiannis M, Sepsa A, Lakiotaki E, Milionis V, Kyrtonis MC, Vassilakopoulos TP, Tsirkinidis P, Kontopidou F, Kokoris S, Siakantaris M, Angelopoulou M, Papadaki H, Kavantzias N, Panayiotidis P, Patsouris E, Korkolopoulou P. Immunohistochemical analysis of IL-6, IL-8/CXCR2 axis, Tyr p-STAT-3, and SOCS-3 in lymph nodes from patients with chronic lymphocytic leukemia: correlation between microvascular characteristics and prognostic significance. *Biomed Res Int*. 2014;2014:251479. Epub 2014 May 5
- Korompelis P, Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Korkolopoulou P, Sepsa A, Antsaklis A, Papavassiliou AG. Expression of vascular endothelial factor-A, gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-1 in uterine leiomyomas. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Dec 3
- Sepsa A, Levidou G, Gargalionis A, Adamopoulos C, Spyropoulou A, Dalagiorgou G, Thymara I, Boviatsis E, Themistocleous MS, Petraki K, Vrettakos G, Samaras V, Zisakis A, Patsouris E, Piperi C, Korkolopoulou P. Emerging role of linker histone variant H1x as a biomarker with prognostic value in astrocytic gliomas. A multivariate analysis including trimethylation of H3K9 and H4K20. *PLoS One*. 2015 Jan 20

- Levidou, Georgia; Tzenou, Tatiana; Kyrtsonis, Marie-Christine; Nikolaou, Eftychia; Kavantzias, Nikolaos; Maltezas, Dimitris; Xirokosta, Katerina; Koulteris, Efstathios; Sepsa, Athanasia; Bitsanis, Katerina; Pessach, Ilias; Bartzis, Vassiliki; Dimou, Maria; Panayiotidis, Panayiotis; A Pangalis, Gerassimos; Patsouris, Efstratios; Korkolopoulou, Penelope. The Role of CXC-Chemokine IL-8, IL-6 and CXCR2 Receptor in Lymphoplasmacytic Lymphoma: Correlations with Microvascular Characteristics and Clinical Features, [Current Angiogenesis](#), Volume 2, Number 2, September 2013, pp. 110-118(9)
- Kalogeraki A, Korkolopoulou P, Tamiolakis D, Papadakis CE, Sepsa C, Lagoudaki E, Patsouris E. Myoepithelial carcinoma of the parotid gland, *The Malaysian Journal of Pathology* [2014, 36(1):51-54]
- Παρουσίαση τεσσάρων περιστατικών στο διεθνές πρόγραμμα HIPON PROJECT στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού Προγράμματος Δια Βίου Επιμόρφωσης στην Ιστοπαθολογία (υπό την αιγίδα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών) με τίτλο «HIPON/ E-modules on histopathology: a valuable online tool for students, researchers and professionals. Έγκριση από Education, Audiovisual and Executive Agency, Brussels, E.E. 17.7.2012 (Reference: 531203-LLP-2012-GR-KA3-KA3MP) <http://www.hiponproject.eu/>

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Σεψά Α., Σάλλα Χ., Σακελλαρίου Σ., Λάζαρης Α.Χ., Διαγνωστική εκτίμηση των παγκρεατικών νεοπλασμάτων, *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*, 2013, 27(1-3):19-30

B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εμβρυογένεση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός προέρχονται από τη νευρική πλάκα η οποία κατά την 4η εβδομάδα της ενδομήτριας ανάπτυξης, με τη διαδικασία της πτύχωσης (νευριδίωσης), μετατρέπεται στο νευρικό σωλήνα. Οι νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα προέρχονται από το νευροεπιθήλιο του νευρικού σωλήνα. Επίσης, κατά τη νευριδίωση στα πλάγια χείλη των νευρικών πτυχών, αναπτύσσονται τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, από τα οποία προέρχονται τα χρωμόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων, τα γαγγλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του Schwann, τα νευρογλοιακά κύτταρα των περιφερικών γαγγλίων, τα κύτταρα της χοριοειδούς και αραχνοειδούς μήνιγγας και τα μελανοκύτταρα.

Ο σχηματιζόμενος εγκέφαλος αποτελείται από τον πρόσθιο εγκέφαλο-προσεγκέφαλο, το μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο-ρομβεγκέφαλο. Μετά τη σύγκλιση των νευρικών πτυχών, τα κύτταρα του νευρικού σωλήνα αρχίζουν να διαφοροποιούνται στο ρομβεγκέφαλο. Οι νευροβλάστες είναι οι πρόδρομες μορφές των νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και προέρχονται από τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν άμεσα τον αρχέγονο νευρικό πόρο. Παράλληλα, αρχίζει η πολυστιβάδωση του νευρικού σωλήνα, κατά την οποία σχηματίζονται η κοιλιακή στιβάδα, η διάμεση στιβάδα που περιλαμβάνει τα σώματα των νευρώνων και η επιχείλια στιβάδα, η οποία περιέχει τις νευρικές ίνες. Αφού ολοκληρωθεί η παραγωγή των νευροβλαστών από τη νευροεπιθηλιακή στιβάδα, αρχίζουν να παράγονται γλοιοβλάστες από τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα. Οι γλοιοβλάστες είναι οι πρόδρομες μορφές των νευρογλοιακών και των επενδυματικών κυττάρων.

Αρχικά οι νευροβλάστες βρίσκονται στην κοιλιακή στιβάδα, όμως στη συνέχεια μεταναστεύουν στη διάμεση στιβάδα, από την οποία προέρχεται η φαιά ουσία.

Παράλληλα, οι αναπτυσσόμενες νευρικές ίνες δημιουργούν περιφερικότερα την οριακή στιβάδα. Σημειώνεται ότι στην οριακή στιβάδα δεν ανευρίσκονται κυτταρικά σώματα και ότι από εκείνη προέρχεται η λευκή ουσία. Το πρότυπο της διαφοροποίησης στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και την παρεγκεφαλίδα είναι περισσότερο πολύπλοκο.

Τα ανωτέρω συμβαίνουν στο τέλος της 4ης εβδομάδας και αμέσως μετά παρατηρείται η διαίρεση του προσεγκεφάλου σε τελεγκέφαλο (από τον οποίο προέρχονται τα εγκεφαλικά ημισφαίρια) και διεγκέφαλο. Παράλληλα, ο ρομβεγκέφαλος διαιρείται σε μετεγκέφαλο (πρόδρομο της παρεγκεφαλίδας και της γέφυρας), και μυελεγκέφαλο (πρόδρομο του προμήκους μυελού). Το στέλεχος του εγκεφάλου προέρχεται από το μεσεγκέφαλο, το μετεγκέφαλο και το μυελεγκέφαλο [1]

Με βάση την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο εγκέφαλος του ενηλίκου υποδιαιρείται στον έσχατο εγκέφαλο (προμήκη μυελό), τον οπίσθιο εγκέφαλο (γέφυρα και παρεγκεφαλίδα), το μέσο εγκέφαλο (τετράδυμο πέταλο και εγκεφαλικά σκέλη), το διάμεσο εγκέφαλο (θάλαμο και υποθάλαμο), και τον τελικό εγκέφαλο (βασικά γάγγλια και εγκεφαλικά ημισφαίρια) [2].

2. Δομή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

2.1. Φαία και λευκή ουσία

Το ΚΝΣ υποδιαιρείται στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Τα κύτταρα του ΚΝΣ περιλαμβάνουν τους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα. Ο ιστός του ΚΝΣ διακρίνεται σε φαία και λευκή ουσία. Η φαία ουσία αντιστοιχεί στα σώματα των νευρικών κυττάρων, ενώ η λευκή ουσία αποτελείται από τους νευράξονες. Η λευκή απόχρωση της δεύτερης οφείλεται στο γεγονός ότι τα έλυτρα μυελίνης που περιβάλλουν τους νευράξονες είναι πλούσια σε λιπίδια. Η κατανομή της φαίας και της λευκής ουσίας, καθώς επίσης η διάταξη και μορφολογία των νευρικών κυττάρων, ποικίλλουν ανάλογα με το τμήμα του εγκεφάλου [3].

2.2. Νευρώνες

Μορφολογικά, οι νευρώνες έχουν στρογγυλό, κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα, ο οποίος περιέχει πυρήνια. Έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, πλούσιο σε νευροϊνίδια, και ενδοπλασματικό δίκτυο με ριβοσώματα και βασεόφιλα κοκκία (σωμάτια Nissl). Το κυτταρικό τους σώμα καταλήγει σε νευράξονα του οποίου το μέγεθος μπορεί να υπερβεί το ένα μέτρο. Οι νευράξονες μπορεί να περιβάλλονται από έλυτρο μυελίνης (εμύελοι) ή όχι (αμύελοι).

Οι νευρώνες είναι οριστικά διαφοροποιημένα κύτταρα, δεν διαιρούνται και δεν μπορούν να αντικατασταθούν σε περίπτωση κυτταρικού θανάτου, με αποτέλεσμα κατά τη γήρανση να παρατηρείται απώλεια νευρώνων στο ΚΝΣ. Παρόλο που εν γένει νευράξονες και δενδρίτες μπορούν να αναγεννηθούν σε περίπτωση βλάβης με την προϋπόθεση ότι το κυτταρικό σώμα είναι βιώσιμο, οι νευρώνες του ΚΝΣ δεν έχουν την ικανότητα να αναγεννήσουν αποτελεσματικά τους νευράξονές τους, διότι δεν υφίστανται επαρκή επαναμυελινοποίηση μετά από την πρόκληση της βλάβης.

Οι νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού περιλαμβάνουν πέντε υποκατηγορίες κυττάρων. Τα πυραμιδικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από κυτταρικά σώματα με σχήμα πυραμίδας με την κορυφή προς την επιφάνεια του εγκεφαλικού φλοιού. Τα αστεροειδή ή κοκκιώδη κύτταρα είναι νευρώνες μικρού μεγέθους, με βραχύ κάθετο άξονα και πολυάριθμους βραχείς δενδρίτες, οι οποίοι διακλαδίζονται και προσδίδουν στα κύτταρα σχήμα άστρου. Τα κύτταρα Martinotti είναι κύτταρα μικρού μεγέθους, πολύγωνα κύτταρα με ολιγάριθμους, βραχείς δενδρίτες. Τα ατρακτοειδή κύτταρα προσανατολίζονται κάθετα προς την επιφάνεια του φλοιού, ενώ τα οριζόντια κύτταρα του Cajal είναι μικρά ατρακτοειδή κύτταρα τα οποία προσανατολίζονται παράλληλα προς την επιφάνεια.

2.3. Νευρογλοιακά κύτταρα

Αναγνωρίζονται τέσσερεις βασικοί τύποι νευρογλοιακών κυττάρων: τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα, τα επενδυματικά και τα μικρογλοιακά κύτταρα.

Τα αστροκύτταρα προέρχονται από το νευροεξώδερμα και κατανέμονται σε όλο το νευρικό σύστημα. Οι πυρήνες τους είναι ωοειδείς ή ελαφρά ακανόνιστοι, με χρωματίνη αραιά κατανεμημένη. Η ονομασία τους οφείλεται στην έντονη αστεροειδή τους διαμόρφωση, με πολλές λεπτές ακτινωτές αποφυάδες οι οποίες πορεύονται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η αστεροειδής μορφολογία δεν είναι εμφανής στις συνήθεις τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης, διότι οι αποφυάδες συγχέονται με τις αποφυάδες άλλων κυττάρων, ωστόσο μπορεί να γίνει ορατή με ειδικές χρώσεις, όπως με τη μέθοδο της άνοσο-υπεροξειδάσης. Στις αποφυάδες εντοπίζεται ειδική μορφή ενδιάμεσου ινιδίου του κυτταροσκελετού η οποία λέγεται όξινη γλοιοϊνιδιακή πρωτεΐνη (GFAP).

Η λειτουργία των αστροκυττάρων είναι πολυποίκιλη. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθοδηγούν τη μετανάστευση των νευρώνων και συνεισφέρουν στην

αύξησή τους μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Παρέχουν μηχανική στήριξη στους νευρώνες, απομακρύνουν την αμμωνία, ενώ επίσης συνεισφέρουν στην ομοίωση του καλίου και του γλουταμινικού οξέος εξωκυττάρια. Η ενεργοποίησή τους ως επιδιορθωτική αντίδραση σε βλάβες, τραυματισμό ή νόσο είναι επίσης σημαντική λειτουργία. Μοιράζονται χαρακτηριστικά με τους νευρώνες, όπως τους διάυλους ιόντων, τους υποδοχείς για νευροδιαβιβαστές και παράγουν ασθενείς ηλεκτρικές αποκρίσεις συμμετέχοντας στη μετάδοση σήματος στον εγκέφαλο.

Αναγνωρίζονται δύο τύποι αστροκυττάρων, τα ινιδώδη (στη λευκή ουσία) και τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα (στη φαιά ουσία). Τα ινιδώδη αστροκύτταρα έχουν μακρύτερες, λεπτότερες προεκβολές πλούσιες σε δεσμίδες GFAP, ενώ στα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα οι προεκβολές είναι επίπεδες με περισσότερες διακλαδώσεις και λίγες δεσμίδες GFAP. Σημειώνεται ότι τα ινιδώδη αστροκύτταρα είναι περισσότερο επιρρεπή σε νεοπλασματική εξαλλαγή και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων στα γλοιώματα.

Τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα επίσης προέρχονται από το νευροεξώδερμα και είναι τα αντίστοιχα των κυττάρων Schwann του περιφερικού νευρικού συστήματος. Κατά την ενδομήτρια ανάπτυξη και για τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής, παράγουν μυελίνη. Είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία ελύτρων μυελίνης μέσα στο ΚΝΣ και συντηρούν αυτές τις λιπιδιακές μεμβράνες για όλη την διάρκεια της ζωής. Οι πυρήνες τους είναι πυκνοχρωματικοί και στρογγυλοί, ενώ φέρουν λεπτό δακτύλιο κυτταροπλάσματος. Η συχνότητα νεοπλασματικής εξαλλαγής είναι μικρότερη σε σχέση με τα αστροκύτταρα.

Τα επενδυματικά κύτταρα ρυθμίζουν τη μεταφορά υγρών μεταξύ του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και των κυττάρων του ΚΝΣ. Μονήρες στρώμα αυτών των κυβοειδών έως επίπεδων κυττάρων επενδύει τις εγκεφαλικές κοιλίες, τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού και το τελικό νημάτιο του νωτιαίου μυελού. Τα χοριοειδή

πλέγματα βρίσκονται στις τέσσερις εγκεφαλικές κοιλίες και παράγουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Αποτελούνται από σύμπλεγμα θηλών, προερχόμενο από καταδύσεις λεπτομηνίγγων, με κεντρικό άξονα συνδετικού ιστού και άφθονα τριχοειδή αγγεία, που επενδύεται από μονή στιβάδα κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων. Τα καλυπτικά επιθηλιακά κύτταρα των χοριοειδών πλεγμάτων θεωρούνται τροποποιημένα επενδυματικά κύτταρα, τα οποία έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και ειδικές εκκριτικές ικανότητες. Τα καλυπτικά κύτταρα στηρίζονται σε βασική μεμβράνη και συνδέονται στενά μεταξύ τους με συναπτικά συμπλέγματα. Μικρολάχνες παρατηρούνται στην προσαύλια επιφάνειά τους ενώ τα πολυάριθμα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα τους υποδεικνύουν τις ενεργειακές ανάγκες τους για την παραγωγή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα (5% των νευρογλοιακών κυττάρων) προέρχονται κατ' εξαίρεση από μεσεγχυματικά κύτταρα που διηθούν το ΚΝΣ στο τελικό στάδιο της εμβρυικής ανάπτυξης. Είναι ο αντιπρόσωπος των μονοκυττάρων-μακροφάγων στο ΚΝΣ και διαθέτουν ανοσολογικές, φαγοκυτταρικές και αμυντικές λειτουργίες. Σε κατάσταση ηρεμίας έχουν υπερχρωματικούς, επιμηκυσμένους πυρήνες και λεπτό δακτύλιο κυτταροπλάσματος. Στη φαιά ουσία είναι δορυφόρα κύτταρα νευρώνων και αγγείων και στη λευκή ουσία εντοπίζονται κυρίως περιαγγειακά [1,4].

3. Περιγραφή και ταξινόμηση των γλοιωμάτων

3.1. Εισαγωγή στους όγκους του Κεντρικού Νευρικού

Συστήματος

Για περίπου έναν αιώνα, η ταξινόμηση των όγκων του εγκεφάλου βασιζόταν στην έννοια της ιστογένεσης και στην ιδέα ότι οι όγκοι μπορούν να ταξινομηθούν βάσει των μικροσκοπικών τους ομοιοτήτων με πιθανά κύτταρα προέλευσης και τα αναπτυξιακά στάδια της διαφοροποίησής τους. Οι ιστολογικές αυτές ομοιότητες έχουν χαρακτηριστεί κυρίως με βάση την εμφάνιση των όγκων κατά την απλή μικροσκόπηση τομών αιματοξυλίνης-ηωσίνης, την ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών και την αξιολόγηση υποκυτταρικών δομών με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι ταξινομήσεις της WHO του 2000 και 2007 λάμβαναν υπόψη τα ιστολογικά χαρακτηριστικά καθώς επίσης την ταχέως αυξανόμενη γνώση σχετικά με τις γενετικές μεταβολές που εμπλέκονται στην ογκογένεση στο ΚΝΣ [5,6]. Πολλές γενετικές μεταλλάξεις είχαν ταυτοποιηθεί κατά το χρόνο της δημοσίευσης της ταξινόμησης της WHO το 2007, όμως τότε η κοινή πεποίθηση ήταν ότι τέτοιες μεταβολές δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον ορισμό των νεοπλασμάτων, αλλά μόνο ως συμπληρωματική πληροφορία εντός του πλαισίου των διαγνωστικών κατηγοριών που προέκυπταν από την ιστολογική προσέγγιση. Αντιθέτως, η ταξινόμηση της WHO το 2016 έρχεται σε ρήξη με αυτή την παράδοση που διαρκεί έναν αιώνα, εντάσσοντας τις επαρκώς τεκμηριωμένες μοριακές παραμέτρους στην ταξινόμηση των διάχυτων γλοιωμάτων [7].

Ο βαθμός της ιστολογικής κακοήθειας είναι μέσο πρόβλεψης της βιολογικής συμπεριφοράς ενός νεοπλασματος. Στο κλινικό πλαίσιο, ο βαθμός κακοήθειας είναι παράγοντας κλειδί για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Η ταξινόμηση του βαθμού κακοήθειας κατά WHO (**Πίνακας 1**) χρησιμοποιείται ευρέως,

ενσωματώνοντας ή αντικαθιστώντας άλλα παλαιότερα συστήματα ταξινόμησης για τους όγκους του εγκεφάλου.

Οι αλλοιώσεις βαθμού κακοήθειας I είναι γενικά όγκοι με χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, για τους οποίους υπάρχει δυνατότητα ίασης μετά από τη χειρουργική εκτομή, χωρίς άλλη θεραπεία. Οι όγκοι βαθμού κακοήθειας II είναι συνήθως διηθητικής φύσεως και συχνά υποτροπιάζουν, παρόλο που εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ορισμένοι όγκοι βαθμού II έχουν την τάση να εκτρέπονται σε υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, π.χ. το διάχυτο αστροκύτωμα βαθμού II έχει την τάση να εξαλλάσσεται σε βαθμού III αναπλαστικό αστροκύτωμα και γλοιοβλάστωμα.

Η κατηγορία όγκων βαθμού III αναφέρεται σε αλλοιώσεις με καθαρή ιστολογική ένδειξη κακοήθειας, συμπεριλαμβανομένης της πυρηνικής ατυπίας και ορισμένες φορές της έντονης μιτωτικής δραστηριότητας. Στα περισσότερα κέντρα, οι ασθενείς με όγκους βαθμού κακοήθειας III λαμβάνουν ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία. Ο βαθμός κακοήθειας IV αναφέρεται σε κυτταρολογικά κακοήγη, μιτωτικά ενεργά νεοπλάσματα τα οποία συχνά εμφανίζουν νέκρωση και σχετίζονται με ταχεία εξέλιξη πριν και μετά την επέμβαση, καθώς επίσης με υψηλή θνητότητα. Το γλοιοβλάστωμα και τα περισσότερα εμβρυικά νεοπλάσματα είναι παραδείγματα όγκων βαθμού IV. Η ευρεία διήθηση του παρακείμενου ιστού και η τάση για επέκταση στο κρανίο και τη σπονδυλική στήλη χαρακτηρίζουν πολλά νεοπλάσματα βαθμού IV, παρόλο που αυτά τα χαρακτηριστικά δεν είναι απαραίτητα παρόντα [7].

Οι ασθενείς με όγκους βαθμού κακοήθειας II κατά WHO χαρακτηριστικά επιβιώνουν για >5 έτη, ενώ εκείνοι με όγκους βαθμού κακοήθειας III για 2-3 έτη. Για τους ασθενείς με όγκους βαθμού κακοήθειας IV, η πρόγνωση εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα αποτελεσματικών θεραπευτικών μεθόδων. Οι περισσότεροι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, ιδιαίτως οι ηλικιωμένοι, υποκύπτουν στη νόσο εντός έτους. Σε ασθενείς με άλλα νεοπλάσματα βαθμού κακοήθειας IV, η έκβαση μπορεί να είναι

σημαντικά καλύτερη. Για παράδειγμα, τα μυελοβλαστώματα της παρεγκεφαλίδας βαθμού IV και όγκοι εκ γεννητικών κυττάρων όπως γερμινώματα είναι ταχέως θανατηφόρα αν παραμείνουν χωρίς θεραπεία, όμως ο συνδυασμός ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας οδηγούν σε ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης που υπερβαίνουν το 60% και 80%, αντίστοιχα [8-10].

3.2. Η ταξινόμηση των διάχυτων γλοιωμάτων

Η ενσωμάτωση των μοριακών παραμέτρων στην ταξινόμηση των διάχυτων γλοιωμάτων από τη WHO το 2016 επέφερε σημαντικές αλλαγές. Ενώ παλαιότερα οι αστροκυτταρικοί όγκοι ταξινομούταν όλοι μαζί, πλέον όλα τα διάχυτα γλοιώματα (αστοκυτταρικά ή μη) ταξινομούνται μαζί, επί τη βάση όχι μόνο του προτύπου ανάπτυξής τους, αλλά και της παρουσίας μεταλλάξεων στα γονίδια IDH1 και IDH2. Από άποψη παθογένεσης παρέχεται δυναμική ταξινόμηση βάσει του φαινοτύπου και του γονοτύπου, από προγνωστική άποψη συνταξινομούνται όγκοι με παρόμοια προγνωστικά χαρακτηριστικά, ενώ από θεραπευτική άποψη η νέα ταξινόμηση ενδέχεται να δώσει ώθηση σε θεραπείες βάσει των βιολογικών ομοιοτήτων.

Στη νέα ταξινόμηση της WHO (2016), η κατηγορία των διάχυτων γλοιωμάτων περιλαμβάνει τους αστροκυτταρικούς όγκους βαθμού κακοήθειας II και III, τα ολιγοδενδρογλοιώματα βαθμού κακοήθειας II και III, τα σπάνια ολιγοαστροκυτώματα βαθμού κακοήθειας II και III, τα γλοιοβλαστώματα βαθμού IV και τα λοιπά διάχυτα γλοιώματα π.χ. της παιδικής ηλικίας. Με αυτή την προσέγγιση διακρίνονται τα αστροκυτώματα τα οποία είναι περιγράπτα, δεν εμφανίζουν διαταραχές στα γονίδια IDH και ορισμένες φορές έχουν BRAF μεταλλάξεις (πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα, πλειόμορφο ξανθοαστροκύτωμα, υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύτωμα) από τα διάχυτα γλοιώματα. Το διάχυτο αστροκύτωμα και το ολιγοδενδρογλοίωμα θεωρούνται τώρα εγγύτερα νοσολογικά σε σχέση με τη συγγένεια που έχει το

διάχυτο αστροκύτωμα με το πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα. Είναι προφανές ότι η νέα ταξινόμηση έχει επαναχαράξει το γενεαλογικό δένδρο των γλοιωμάτων.

Σύμφωνα με τη νεότερη ταξινόμηση, οι όγκοι με κυτταρολογική ατυπία μόνο (διάχυτα αστροκυτώματα) θεωρούνται βαθμού κακοήθειας II, οι όγκοι οι οποίοι επίσης εμφανίζουν αναπλασία και μιτωτική δραστηριότητα (αναπλαστικά αστροκυτώματα) θεωρούνται βαθμού κακοήθειας III και οι όγκοι που επιπροσθέτως εμφανίζουν μικροαγγειακή υπερπλασία ή/και νέκρωση θεωρούνται βαθμού κακοήθειας IV. Η ατυπία ορίζεται ως πολυμορφία στο πυρηνικό σχήμα ή μέγεθος, με συνοδό υπερχρωμασία. Η ύπαρξη των μιτώσεων πρέπει να είναι αδιαμφισβήτητη, ωστόσο δεν αποδίδεται σημασία στον αριθμό ή τη μορφολογία τους κατά την ταξινόμηση. Η εύρεση μονήρους μίτωσης σε επαρκές δείγμα δεν είναι επαρκές τεκμήριο βιολογικής συμπεριφοράς WHO βαθμού κακοήθειας III, όμως η διάκριση των όγκων βαθμού κακοήθειας II από εκείνους βαθμού III μπορεί να διευκολυνθεί από τη χρήση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 [11]. Η μικροαγγειακή υπερπλασία ορίζεται ως η εμφανής πολυστιβάδωση του ενδοθηλίου (αντί για απλή υπεραγγείωση) ή η σπειραματοειδής αγγείωση. Η νέκρωση μπορεί να είναι οποιοδήποτε τύπου και δεν απαιτείται η ύπαρξη περινεκρωτικού πασσαλοειδούς προτύπου. Η ύπαρξη κυτταρικών ζωνών που διαχωρίζονται μεταξύ τους από ενδιάμεσες ωχρότερες περιοχές δεν αρκεί για να στοιχειοθετηθεί η παρουσία νέκρωσης. Τα ανωτέρω κριτήρια εμφανίζονται σε προβλέψιμη αλληλουχία: η ατυπία ακολουθείται από μιτωτική δραστηριότητα, έπειτα από αυξημένη κυτταροβρίθεια και τελικά από μικροαγγειακή υπερπλασία ή/και νέκρωση.

3.3. Διάχυτο αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH

Ορισμός: Το διάχυτο αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH αποτελείται από κύτταρα με μέτριο πυρηνικό πλειομορφισμό και χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό κυτταρικής διαφοροποίησης και αργό ρυθμό ανάπτυξης. Η διάγνωση του εν λόγω νεοπλασματος υποστηρίζεται από την ανεύρεση μεταλλάξεων του ATRX και του TP53. Η παρουσία σε μορφολογικό επίπεδο συνιστώσας που ομοιάζει με ολιγοδενδρογλοίωμα είναι συμβατή με αυτή τη διάγνωση, εφόσον αποκλειστεί η παρουσία της απάλειψης 1p/19q. Το εν λόγω νεόπλασμα εμφανίζεται συνήθως σε νέους ενήλικες οπουδήποτε στο ΚΝΣ, αν και συχνότερα εντοπίζεται στο μετωπιαίο λοβό [12]. Τα διάχυτα αστροκυτώματα διαθέτουν ενδογενή τάση κακοήθους εξαλλαγής αρχικά σε αναπλαστικά αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH και τελικά σε γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH.

Βαθμός κακοηθείας: II κατά WHO 2016.

Επιδημιολογία: Τα διάχυτα αστροκυτώματα αντιστοιχούν περίπου στο 11-15% των αστροκυτταρικών εγκεφαλικών όγκων, με ετήσια συχνότητα που υπολογίζεται σε 0,55 και 0,75 νέες περιπτώσεις σε πληθυσμό 100.000 ατόμων [13,14]. Σημειώνεται ότι τα αρχεία καταγραφής νεοπλασμάτων δε διαχωρίζουν στην παρούσα φάση τα διάχυτα αστροκυτώματα με βάση την παρουσία ή μη της μετάλλαξης IDH, ωστόσο λόγω του ότι οι περισσότερες περιπτώσεις φέρουν τη μετάλλαξη IDH, τα υπάρχοντα δεδομένα αντανακλούν σε ένα βαθμό την επιδημιολογία του γενετικά πλέον καθορισμένου αυτού νεοπλασματος. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 36-38 έτη και είναι πολύ παρόμοια με αυτή του αναπλαστικού αστροκυτώματος με μετάλλαξη της IDH [15].

Εντόπιση: Το διάχυτο αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH μπορεί να εντοπίζεται σε οποιαδήποτε περιοχή του ΚΝΣ, αλλά συχνότερα εμφανίζεται στο μετωπιαίο λοβό [12].

Συμπτωματολογία: Συχνά οι επιληπτικές κρίσεις είναι το πρώτο σύμπτωμα, ωστόσο δυσκολίες στην ομιλία ή ελάχιστες αλλαγές στην όραση, στην κινητικότητα ή στην αισθητικότητα μπορεί να προϋπάρχουν. Η έναρξη της συμπτωματολογίας είναι πολύ σταδιακή και για το λόγο αυτό πολλοί από αυτούς τους όγκους αποτελούν τυχαία ευρήματα [16,17].

Απεικονιστικά ευρήματα: Όπως και τα κλινικά ευρήματα, έτσι και τα αποτελέσματα του νευροαπεικονιστικού ελέγχου μπορεί να ποικίλουν θεαματικά. Στην αξονική τομογραφία τα περισσότερα διάχυτα αστροκυτώματα εμφανίζονται ως ασαφώς καθοριζόμενες ομοιογενείς μάζες χαμηλής πυκνότητας, χωρίς ενίσχυση αντίθεσης. Σημειώνεται ωστόσο ότι από σχετικά νωρίς στην εξέλιξη του όγκου μπορεί να υπάρχουν αποπιτανώσεις ή κυστική εκφύλιση. Στη μαγνητική τομογραφία παρατηρείται χαμηλή ένταση σήματος στις ακολουθίες T1 και υψηλή στις T2.

Μακροσκοπικά ευρήματα: Λόγω της διηθητικής φύσης τους, οι εν λόγω όγκοι προκαλούν συνήθως ασαφοποίηση των παρακειμένων ανατομικών δομών. Συγκεκριμένα παρατηρείται διόγκωση και παραμόρφωση (αλλά όχι καταστροφή) των διηθούμενων ανατομικών δομών. Οι όγκοι δύνανται να εντοπίζονται στη φαιά ή στη λευκή ουσία, έχουν πάντα ασαφή όρια και μπορεί να περιλαμβάνουν μικρότερες ή μεγαλύτερες κύστεις, κοκκιώδεις περιοχές, ή ζώνες υπόσκληρης ή μαλθακής σύστασης. Σπάνια παρατηρείται επέκταση στις ετερόπλευρες ανατομικές δομές.

Μικροσκοπικά ευρήματα: Το διάχυτο αστροκύτωμα αποτελείται από καλά διαφοροποιημένα ινιδώδη αστροκύτταρα μέσα σε ένα χαλαρό και ενίοτε μικροκυστικό υπόστρωμα. Η κυτταροβρίθεια είναι μετρίως αυξημένη σε σύγκριση με το φυσιολογικό εγκεφαλικό παρέγχυμα και η κυτταρική ατυπία αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο. Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρείται μιτωτική δραστηριότητα, ωστόσο η ανεύρεση μεμονωμένης μίτωσης δε στοιχειοθετεί τη διάγνωση του αναπλαστικού αστροκυτώματος εκτός αν πρόκειται για βιοπτικό υλικό ή αν συνυπάρχει εμφανής πυρηνική αναπλασία. Η παρουσία νέκρωσης ή

μικροαγγειακής υπερπλασίας είναι στοιχεία μη συμβατά με τη διάγνωση του διαχύτου αστροκυτώματος. Σημειώνεται ότι φαινοτυπικά τα νεοπλασματικά αστροκύτταρα μπορεί να διαφέρουν έντονα, αναφορικά με το μέγεθος, τις κυτταρικές τους προσεκβολές και την ποσότητα των κυτταροπλασματικών γλοιακών τους ινιδίων. Μπορεί επίσης να υπάρχουν μορφολογικές διαφορές σε επιμέρους περιοχές του ίδιου νεοπλάσματος. Σε κάθε περίπτωση, η ιστολογική τυποποίηση των νεοπλασματικών αστροκυττάρων σε τομές Η/Ε βασίζεται κυρίως στα πυρηνικά τους χαρακτηριστικά. Ο πυρήνας του φυσιολογικού αστροκυττάρου έχει σχήμα ωειδές έως επίμηκες, αν και συχνά παρατηρούνται υποστρόγγυλου σχήματος εγκάρσιες διατομές, είναι φυσαλιδώδης και συχνά περικλείει διακριτό πυρήνιο. Τα φυσιολογικά αστροκύτταρα δε διαθέτουν εμφανές κυτταρόπλασμα στη χρώση Η/Ε που να διαφέρει από το νευροπίλημα που βρίσκεται στο υπόστρωμα. Αντίθετα, τα αντιδραστικά αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από διογκωμένους πυρήνες και από την παρουσία κεχρωσμένου σαφούς κυτταροπλάσματος προσλαμβάνοντας τελικά γειστοκυτταρική μορφολογία. Η τελευταία χαρακτηρίζεται από έκκεντρο πυρήνα και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα με παρουσία λεπτότατων κυτταροπλασματικών προσεκβολών.

Διαφορική διάγνωση: Η κύρια νοσολογική οντότητα που περιλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση είναι η αντιδραστική γλοίωση. Λόγω του ότι τα περισσότερα διάχυτα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH έχουν τη μετάλλαξη R132H, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για την IDH1 R132H μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, σε συνδυασμό κάποιες φορές με ανοσοϊστοχημεία για πρωτεΐνη p53 και έλεγχο για τρισωμία 7, έχει αποδειχθεί λίαν βοηθητικός στη διάκριση των νεοπλασματικών από τα αντιδραστικά αστροκύτταρα [18]. Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η διαφορική διάγνωση μπορεί να είναι εξαιρετικά δύσκολη και να πρέπει να βασιστεί σε ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά. Το διάχυτο αστροκύτωμα αποτελείται από αστροκύτταρα αυξημένα σε αριθμό και συνήθως σε μέγεθος, τα οποία όμως, αν

εξετασθούν μεμονωμένα, δε διαφέρουν σημαντικά από τα φυσιολογικά ή τα αντιδραστικά αστροκύτταρα. Σε περιπτώσεις με εξαιρετικά ήπια ατυπία, ο αριθμός των αστροκυττάρων (η κυτταροβρίθεια δηλαδή) και κυρίως η ομοιομορφία τους, είναι τα στοιχεία που οδηγούν στη διάγνωση νεοπλασματος. Τα αντιδραστικά αστροκύτταρα δε βρίσκονται όλα στο ίδιο στάδιο ενεργοποίησης και, ως εκ τούτου, στην αντιδραστική γλοίωση ο κυτταρικός πληθυσμός είναι μικτός: ορισμένα κύτταρα έχουν διογκωμένους πυρήνες και άλλα έχουν περισσότερο ή λιγότερο κυτταρόπλασμα, συνήθως σε ένα σχετικά αραιό υπόστρωμα. Στο διάχυτο αστροκύτωμα σχεδόν όλοι οι πυρήνες δείχνουν πανομοιότυποι, και το υπόστρωμα παρουσιάζει τουλάχιστον φυσιολογική πυκνότητα ή αυξημένο αριθμό κυτταρικών προσεκβολών. Είναι πιθανό ωστόσο το υπόστρωμα να εμφανίζει μικροκυστική εκφύλιση, αλλά και σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα δείχνουν πανομοιότυπα, χωρίς συνοδό παρουσία γειστοκυττάρων, τα οποία κυρίως απαντώνται στο πλαίσιο αντιδραστικών αλλοιώσεων μετά από τραυματισμό ή κυτταρική βλάβη.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 είναι συνήθως <4%. Τα γειστοκυτταρικά νεοπλασματικά αστροκύτταρα εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού σε σχέση με τη μικροκυτταρική αστροκυτταρική συνιστώσα που αναμιγνύεται με αυτά [19-22]. Ωστόσο έρευνες που περιλαμβάνουν laser μικροεκτομή (laser microdissection) αποκαλύπτουν πανομοιότυπες μεταλλάξεις στο TP53 τόσο στα γειστοκύτταρα όσο και στα μη-γειστοκυτταρικά νεοπλασματικά κύτταρα [23]. Παρά τις αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με το ότι το γειστοκυτταρικό αστροκύτωμα έχει αυξημένη τάση εξέλιξης σε αναπλαστικό αστροκύτωμα και γλοιοβλάστωμα [21,24], αυτό δε θα πρέπει να ταξινομείται ως αναπλαστικό αστροκύτωμα [24,25] διότι η παρατήρηση αυτή δε στηρίζεται στα σύγχρονα μοριακά κριτήρια και ειδικά στην ύπαρξη ή μη μετάλλαξης της IDH.

Ανοσοφαινότυπος: Τα διάχυτα αστροκυτώματα εκφράζουν σταθερά την GFAP, ωστόσο σε άλλοτε άλλη ένταση και όχι στο σύνολο των νεοπλασματικών κυττάρων. Συγκεκριμένα τα μικρά υποστρόγγυλα νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν ελάχιστο κυτταρόπλασμα και ελάχιστες κυτταροπλασματικές προσεκβολές έχουν την τάση να μην εκφράζουν έντονα την GFAP. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανοσοθετικότητα ενδέχεται να περιορίζεται σε μία μικρή παραπυρηνική κυκλοτερή περιοχή και στις αναμιγνυόμενες νεοπλασματικές κυτταρικές προσεκβολές του ινιδώδους υποστρώματος [26]. Η βιμεντίνη είναι επίσης θετική και εμφανίζει πρότυπο έκφρασης ανάλογο με αυτό της GFAP [27]. Η μοριακή υπογραφή του διαχύτου αστροκυτώματος μπορεί στις περισσότερες περιπτώσεις να αναδειχθεί με ανοσοϊστοχημικό έλεγχο. Συγκεκριμένα η παρουσία της μετάλλαξης IDH1 R132H, η οποία αποτελεί το 90% όλων των IDH μεταλλάξεων στα γλοιώματα, μπορεί να ανιχνευθεί με αντίσωμα εξειδικευμένο για τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη [28]. Στους όγκους που έχουν την εν λόγω μετάλλαξη, όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα επιδεικνύουν κάποιο βαθμό κυτταροπλασματικής (εντονότερης) και πυρηνικής (ασθενέστερης) ανοσοθετικότητας [29]. Για το λόγο αυτό, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για IDH1 R132H αποτελεί πια ανεκτίμητης αξίας διαγνωστικό εργαλείο όχι μόνο για τη μοριακή ταξινόμηση των διαχύτων γλοιωμάτων αλλά και για τη διαφορική διάγνωση του νεοπλάσματος από την αντιδραστική γλοίωση [18,29]. Συχνά επίσης παρατηρείται έντονη πυρηνική έκφραση του p53, στοιχεί το οποίο συνάδει με την υψηλή συχνότητα της μετάλλαξης του ογκογονιδίου TP53 που ανευρίσκεται στα διάχυτα αστροκυτώματα [30]. Ωστόσο ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος με p53 για ανάδειξη των μεταλλάξεων του γονιδίου TP53 δεν αποτελεί απόλυτα ευαίσθητη ή ειδική μέθοδο [31,32]. Αντίθετα, η έκφραση του ATRX όταν αυτό είναι μεταλλαγμένο, χάνεται σχεδόν στο σύνολο των περιπτώσεων, και αυτή η μετάλλαξη είναι επίσης ιδιαίτερα συχνή στα διάχυτα αστροκυτώματα [10,33-35]. Σημειώνεται ότι ο φυσιολογικός, μη μεταλλαγμένος ιστός εμφανίζει έντονη πυρηνική έκφραση του

ATRX, και ως εκ τούτου η διατήρηση της ανοσοθετικότητας σε μη νεοπλασματικά στοιχεία, όπως σε αγγεία και σε αναμιγνυόμενους νευρώνες, γλοιακά και μικρογλοιακά κύτταρα, χρησιμεύει ως απαραίτητος θετικός εσωτερικός μάρτυρας για τη σωστή αξιολόγηση μιας αρνητικής ATRX ανοσοχρώσης. Τέλος, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στα διάχυτα αστροκυτώματα είναι <4%, στοιχείο το οποίο είναι συμβατό με την παρατηρούμενη απουσία μιτωτικής δραστηριότητας σε μορφολογικό επίπεδο [36-39].

Κύτταρο προέλευσης: Με βάση τα σημερινά ερευνητικά δεδομένα τα ολιγοδενδρογλοιώματα με μετάλλαξη της IDH και απάλειψη 1p/19q, τα διάχυτα αστροκυτώματα με IDH μετάλλαξη, τα αναπλαστικά αστροκυτώματα με IDH μετάλλαξη και τα γλοιοβλαστώματα με IDH μετάλλαξη αναπτύσσονται από έναν διακριτό πληθυσμό πρόδρομων κυττάρων που διαφέρει από αυτόν των γλοιοβλαστωμάτων χωρίς IDH μετάλλαξη [40,41].

Γενετικό προφίλ: Τα διάχυτα γλοιώματα ιστολογικού βαθμού κακοηθείας II και III, συμπεριλαμβανομένου του διαχύτου αστροκυτώματος, χαρακτηρίζονται σχεδόν στο σύνολό τους από μεταλλάξεις στα γονίδια της IDH, είτε της IDH1 είτε της IDH2 [42-45]. Τα διάχυτα γλοιώματα των ενηλίκων τα οποία δεν εμφανίζουν μετάλλαξη της IDH τείνουν να παρουσιάζουν πιο επιθετική συμπεριφορά, ανεξαρτήτως ιστολογικού βαθμού κακοηθείας [40,46].

Οι σχετιζόμενες με τα γλοιώματα μεταλλάξεις της IDH1 και IDH2 προσδίδουν στα αντίστοιχα μεταβολικά ένζυμα έναν υπερλειτουργικό φαινότυπο με αποτέλεσμα τα εν λόγω ένζυμα να παράγουν μεγάλες ποσότητες του ογκομεταβολίτη 2-υδροξυγλουταρικό οξύ (2-HG) [47]. Η υπερπαραγωγή του τελευταίου προκαλεί τόσο σημαντικότερες επιγενετικές αλλαγές όσο και αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις της IDH έχουν σαν αποτέλεσμα τον απαντώμενο στα γλοιώματα παθολογικό φαινότυπο μεθυλίωσης των νησιδίων CpG (G-CIMP: glioma-CpG island methylator phenotype), μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα εκτεταμένη

υπερμεθυλίωση σε περιοχές υποκινητών γονιδίων. Η τελευταία προκαλεί τη γονιδιακή σίγαση διαφόρων σημαντικών γονιδίων σχετικών με την κυτταρική διαφοροποίηση [48,49]. Με τον τρόπο αυτό, η μετάλλαξη της IDH και ο παθολογικός φαινότυπος G-CIMP θεωρείται ότι κρατούν τα κύτταρα των γλοιωμάτων σε κατάσταση τύπου προγονικών κυττάρων (stem cells), τα οποία έχουν εγγενή τάση προς πολλαπλασιασμό και δημιουργία νεοπλασματικών όγκων. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις της IDH ευοδώνουν τη δημιουργία των γλοιωμάτων διαταράσσοντας τη χρωμοσωμική τοπολογία και επιτρέποντας αποκλίνουσες ρυθμίσεις της χρωμοσωμικής έκφρασης, οι οποίες προκαλούν την έκφραση ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που σχετίζονται με τα γλοιώματα όπως το PDGFRA [50]. Σε συμφωνία με αυτή τη θεωρία, οι μεταλλάξεις της IDH φαίνεται να συγκαταλέγονται ανάμεσα στις πρώτες γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα διάχυτα γλοιώματα βαθμού κακοηθείας II [51]. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MDMT είχε ανευρεθεί στο 50% περίπου των διαχύτων αστροκυτωμάτων, πριν ανακαλυφθούν οι μεταλλάξεις της IDH, ωστόσο αυτό το ποσοστό μπορεί να είναι ακόμα υψηλότερο στα διάχυτα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH, αν και δε σχετίζεται σταθερά με τον παθολογικό φαινότυπο G-CIMP [49].

Η συντριπτική πλειοψηφία των διαχύτων αστροκυτωμάτων με μεταλλάξεις της IDH, καθώς και τα αναπλαστικά αστροκυτώματα (βαθμού κακοηθείας III) και τα γλοιοβλαστώματα (βαθμού κακοηθείας IV) που προέρχονται από αυτά, χαρακτηρίζονται επίσης από μεταλλάξεις στα γονίδια TP53 και ATRX, που έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργικότητας των γονιδίων αυτών [34,35,52-54]. Το γονίδιο ATRX κωδικοποιεί μία εξαιρετικά σημαντική πρωτεΐνη που προσδένεται στη χρωματίνη, και της οποίας η απώλεια έχει σχετισθεί με επιγενετική απορρύθμιση και δυσλειτουργία των τελομεριδίων [55]. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις του ATRX έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός παθολογικού μηχανισμού διατήρησης των τελομεριδίων, που είναι γνωστός ως εναλλακτική επιμήκυνση των τελομεριδίων [56].

Οι μεταλλάξεις του ATRX και η εναλλακτική επιμήκυνση των τελομεριδίων είναι αμοιβαία εξαιρετές με τις μεταλλάξεις ενεργοποίησης του γονιδίου TERT, το οποίο κωδικοποιεί το καταλυτικό τμήμα του ενζύμου τελομεράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταλλάξεις του TERT ανευρίσκονται στη μεγάλη πλειοψηφία των ολιγοδενδρογλοιωμάτων και των γλοιοβλαστωμάτων χωρίς μετάλλαξη της IDH [57-59]. Συμπερασματικά αξίζει να υπογραμμιστεί ότι διακριτοί μηχανισμοί διατήρησης ή μη των τελομεριδίων, διαμεσολαβούμενοι είτε από ενεργοποίηση της τελομεράσης, είτε από τον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομεριδίων, φαίνεται να είναι απαραίτητοι για την παθογένεση όλων των διαχύτων γλοιωμάτων.

Η απώλεια του ATRX έχει επίσης συσχετισθεί με γενικευμένη γενετική αστάθεια, η οποία μπορεί να προκαλέσει p53-εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο, υπό συγκεκριμένες συνθήκες [60]. Συνεπώς οι μεταλλάξεις του TP53 στα διάχυτα αστροκυτώματα μπορεί να επιτρέψουν την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, με δεδομένη την απώλεια του ATRX. Η γενετική αστάθεια των διαχύτων αστροκυτωμάτων με μετάλλαξη της IDH αντανακλάται στους χαρακτηριστικούς παθολογικούς αριθμούς αντιγράφων του DNA (DNA copy number abnormalities), οι οποίοι περιλαμβάνουν ηπίου βαθμού ενίσχυση των ογκογονιδίων MYC και CCND2. Οι αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του DNA που χαρακτηριστικά σχετίζονται με το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH, όπως η ενίσχυση του EGFR και η ομόζυγη διαγραφή του CDKN2A, σπάνια απαντώνται, στοιχείο το οποίο υπογραμμίζει τις μεγάλες παθοφυσιολογικές διαφορές ανάμεσα στα αστροκυτώματα με ή χωρίς μετάλλαξη της IDH [40,57,58].

Προγνωστικοί παράγοντες: Την εποχή που προηγήθηκε της ανακάλυψης των IDH μεταλλάξεων, η μέση επιβίωση των ασθενών κυμαινόταν από έξι έως οκτώ έτη. Η πορεία της νόσου επηρεαζόταν κυρίως από τη δυναμική της κακοήθους εξαλλαγής, η οποία συνέβαινε μετά από μία μέση περίοδο τεσσάρων έως πέντε ετών [52,61,62]. Οι μελέτες 22844 και 22845 του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για τη Μελέτη

και τη Θεραπεία του Καρκίνου (EORTC) έδειξαν ότι ορισμένοι παράγοντες και συγκεκριμένα ηλικία ασθενούς > 40 έτη, διάμετρος του νεοπλασματικού όγκου >6 εκ., διήθηση των δομών της μέσης γραμμής καθώς και ύπαρξη νευρολογικών διαταραχών πριν τη χειρουργική επέμβαση σχετίζονταν με δυσμενέστερη έκβαση [63]. Ωστόσο τα εν λόγω προγνωστικά δεδομένα θα πρέπει να αναθεωρηθούν αναφορικά με την παρουσία ή μη μεταλλάξεων της IDH στα μελετώμενα περιστατικά. Μία μελέτη, η οποία περιελάμβανε 683 διάχυτα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH από τρεις διαφορετικές σειρές ασθενών, έδειξε μέση επιβίωση της τάξης των 10,9 ετών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH έχουν σημαντικά ευνοϊκότερη πρόγνωση σε σχέση με αυτά χωρίς IDH μετάλλαξη. Επίσης οι μεταλλάξεις της IDH σχετίζονται και με άλλες μοριακές παραμέτρους. Συγκεκριμένα και όπως προαναφέρθηκε, έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ισχυρής συσχέτισης μεταξύ των μεταλλάξεων της IDH και του TP53 (στο 94% των περιπτώσεων) καθώς και της απενεργοποίησης του ATRX (στο 86% των περιπτώσεων).

3.4. Γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH

Το γεμιστοκυτταρικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH αποτελεί υπότυπο του διάχυτου αστροκυτώματος με μετάλλαξη της IDH, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παρουσία γεμιστοκυττάρων σε ποσοστό >20% των νεοπλασματικών κυττάρων. Η παρουσία ολιγάριθμων, διάσπαρτων γεμιστοκυττάρων δεν αρκεί για να στοιχειοθετηθεί η εν λόγω διάγνωση.

Τα γεμιστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από έκκεντρο πυρήνα και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και εκφράζουν έντονα την GFAP περιπυρηνικά και στις κυτταρικές τους προσεκβολές. Έκφραση του p53 παρατηρείται επίσης πολύ συχνά στα γεμιστοκύτταρα [64]. Γονιδιακές μεταλλάξεις του TP53 και της IDH ανευρίσκονται τόσο στα γεμιστοκύτταρα όσο και στα μη-γεμιστοκυτταρικά νεοπλασματικά κύτταρα,

γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι η φύση των γεμιστοκυττάρων είναι νεοπλασματική και όχι αντιδραστική [23].

Τα γεμιστοκυτταρικά αστροκυτώματα θεωρείται βιβλιογραφικά ότι εξελίσσονται σε αναπλαστικά αστροκυτώματα και γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH συχνότερα από τα λοιπά διάχυτα αστροκυτώματα [21,52,65,66]. Ωστόσο τα δεδομένα αυτά αναφέρονται σε γεμιστοκυτταρικά αστροκυτώματα των οποίων η διάγνωση έγινε ιστολογικά χωρίς αναζήτηση των IDH μεταλλάξεων. Απομένει λοιπόν να διερευνηθεί το κατά πόσον η πρόγνωση του γεμιστοκυτταρικού αστροκυτώματος με μετάλλαξη της IDH διαφέρει σε σχέση με εκείνη των IDH-μεταλλαγμένων λοιπών διαχύτων αστροκυτωμάτων.

3.5. Διάχυτο αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH

Τα διάχυτα αστροκυτώματα χωρίς μετάλλαξη της IDH είναι σπάνια. Τα περισσότερα γλοιώματα των ενηλίκων τα οποία ομοιάζουν με διάχυτα αστροκυτώματα σε ιστολογικό επίπεδο, μπορούν μετά από περαιτέρω γενετική ανάλυση να ταξινομηθούν ως διαφορετικοί όγκοι. Τα νεοπλάσματα που μετά από γενετική ανάλυση όντως εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία πιθανότατα αποτελούν ανομοιογενείς μεταξύ τους οντότητες με διαφορετική ανά περίπτωση κλινική έκβαση. Ως εκ τούτου, το διάχυτο αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH θεωρείται προσωρινή μόνο κατηγορία.

3.6. Αναπλαστικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH

Ορισμός: Διάχυτα διηθητικό αστροκύτωμα με εστιακή ή εκτεταμένη αναπλασία, αξιωσημείωτη μιτωτική δραστηριότητα και μετάλλαξη στο γονίδιο IDH1 ή IDH2. Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα μπορούν να αναπτυχθούν σε έδαφος αστροκυτώματος χαμηλότερου βαθμού κακοηθείας, αλλά συνήθως διαγιγνώσκονται χωρίς ένδειξη κάποιας λιγότερο κακοήθους, πρόδρομης αλλοίωσης. Η παρουσία

συνιστώσας ομοιάζουσας με ολιγοδενδρογλοίωμα είναι συμβατή με την εν λόγω διάγνωση, με δεδομένη την απουσία απάλειψης 1p/19q. Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα έχουν την εγγενή τάση εξέλιξης σε γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH.

Βαθμός κακοηθείας: III κατά WHO 2016.

Επιδημιολογία: Η μέση ηλικία των ασθενών με αναπλαστικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH είναι τα 38 έτη [15]. Ωστόσο, μέχρι την ανακάλυψη των μεταλλάξεων της IDH, η διάγνωση των αναπλαστικών αστροκυτωμάτων γινόταν μόνο με ιστολογικά κριτήρια και οι μελέτες έδειχναν πως η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 45-46 έτη [62,67,68].

Εντόπιση: Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά συνήθως εντοπίζονται στα εγκεφαλικά ημισφαίρια. Οι όγκοι αυτοί όπως και τα λοιπά διάχυτα γλοιώματα με μετάλλαξη της IDH (συμπεριλαμβανομένων των ολιγοδενδρογλοιωμάτων, των διάχυτων αστροκυτωμάτων και των γλοιοβλαστωμάτων) εντοπίζονται συνηθέστερα στο μετωπιαίο λοβό.

Συμπτωματολογία: Η συμπτωματολογία είναι παρόμοια με εκείνη των βαθμού κακοηθείας II διάχυτων αστροκυτωμάτων. Σε ορισμένους ασθενείς με ιστορικό διάχυτου αστροκυτώματος βαθμού κακοηθείας II, ενδεχομένως να παρατηρηθεί αύξηση των νευρολογικών ελλειμμάτων, επιληπτικές κρίσεις και σημεία αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης. Ωστόσο οι περισσότεροι ασθενείς με αναπλαστικό αστροκύτωμα προσέρχονται με συμπτώματα από ολίγων μηνών και χωρίς ενδείξεις προϋπάρχοντος βαθμού κακοηθείας II διάχυτου αστροκυτώματος.

Απεικονιστικά ευρήματα: Το αναπλαστικό αστροκύτωμα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζεται ως ασαφών ορίων μάζα χαμηλής έντασης σήματος. Σε αντίθεση με τα διάχυτα αστροκυτώματα βαθμού κακοηθείας II, συχνά παρατηρείται περιοχικά

αυξημένη ένταση σήματος, ωστόσο η κεντρική νέκρωση με δακτυλιοειδή ενίσχυση που είναι χαρακτηριστική του γλοιοβλαστώματος απουσιάζει.

Μακροσκοπικά ευρήματα: Ακριβώς όπως και τα διάχυτα αστροκυτώματα βαθμού κακοηθείας II, έτσι και τα αναπλαστικά αστροκυτώματα τείνουν να διηθούν το παρακείμενο εγκεφαλικό παρέγχυμα χωρίς να προκαλούν εμφανή ιστική καταστροφή. Αυτό συχνά προκαλεί σημαντική διόγκωση των διηθούμενων δομών, όπως οι παρακείμενες εγκεφαλικές έλικες και τα βασικά γάγγλια. Κατά τις διατομές του παρασκευάσματος, η υψηλότερη κυτταροβρίθεια του αναπλαστικού αστροκυτώματος έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση διακριτής νεοπλασματικής μάζας, η οποία ξεχωρίζει σαφέστερα από τις παρακείμενες εγκεφαλικές δομές σε σχέση με τα βαθμού κακοηθείας II διάχυτα αστροκυτώματα. Η παρουσία μακροσκοπικά παρατηρούμενων κύστεων είναι σπάνια, ωστόσο ενδεχομένως να υπάρχουν περιοχές κοκκιώδους ή μαλθακής σύστασης ή έντονα λευκωπής χροιάς. Τις περισσότερες φορές είναι δύσκολη η μακροσκοπική διάκριση των βαθμού κακοηθείας II και III αστροκυτωμάτων.

Μικροσκοπικά ευρήματα: Οι κύριοι ιστολογικοί χαρακτήρες του εν λόγω όγκου, είναι αυτοί ενός διάχυτα διηθητικού αστροκυτώματος με αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα βαθμού κακοηθείας II αστροκυτώματα, η οποία συνήθως συνοδεύεται από αξιοσημείωτη πυρηνική ατυπία και υψηλή κυτταροβρίθεια. Η μιτωτική δραστηριότητα θα πρέπει να εκτιμάται αναλογικά με την έκταση του δείγματος. Σε μικρά δείγματα, όπως αυτά που λαμβάνονται με στερεοτακτική βιοψία, ακόμη και μία μίτωση αντανακλά αξιοσημείωτη μιτωτική δραστηριότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η διενέργεια ανοσοϊστοχημικού ελέγχου με το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 μπορεί να είναι πολύ βοηθητική. Στα μεγάλα χειρουργικά παρασκευάσματα, λίγες μόνο μίτωση δεν αρκούν για να καταταγεί ένας όγκος στα αναπλαστικά αστροκυτώματα [10068313].

Η εστιακή ή διάχυτη υψηλή κυτταροβρίθεια αποτελεί επίσης σημαντικό διαγνωστικό κριτήριο, αλλά ακόμη κι αν ένας όγκος εμφανίζει χαμηλή κυτταροβρίθεια, μπορεί να καταταγεί στα αναπλαστικά αστροκυτώματα, αρκεί να διαθέτει σημαντική μιτωτική δραστηριότητα.

Τέλος, η πυρηνική ατυπία είναι εντονότερη σε σχέση με τα βαθμού κακοηθείας II διάχυτα αστροκυτώματα. Παρατηρείται πυρηνικός πλειομορφισμός και ποικιλομορφία αναφορικά με το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, την κατανομή και την αδρότητα της χρωματίνης καθώς και με το μέγεθος του πυρηνίου. Οι πολυπύρηνες κυτταρικές μορφές και οι άτυπες μιτώσεις αποτελούν επιπρόσθετα στοιχεία αναπλασίας, χωρίς όμως η παρουσία τους να είναι υποχρεωτική στα νεοπλάσματα βαθμού κακοηθείας III. Εξ ορισμού, απουσιάζουν η μικροαγγειακή υπερπλασία (αγγεία με πολυστιβάδωση του ενδοθηλίου) και η νέκρωση.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: Σε αντίθεση με τα διάχυτα αστροκυτώματα βαθμού κακοηθείας II, τα αναπλαστικά αστροκυτώματα επιδεικνύουν μιτωτική δραστηριότητα. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 κυμαίνεται από 5 έως 10%, αλλά μπορεί να εμφανίζει αλληλοεπικάλυψη με τις τιμές τόσο του χαμηλού βαθμού κακοηθείας διάχυτου αστροκυτώματος στο ένα άκρο του φάσματος, όσο και με αυτές του γλοιοβλαστώματος στο άλλο [36-39]. Σημειώνεται επίσης ότι ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις σε διαφορετικές περιοχές ακόμη και του ίδιου όγκου.

Ανοσοφαινότυπος: Σε γενικές γραμμές, τα ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά του αναπλαστικού αστροκυτώματος ταυτίζονται με αυτά του βαθμού κακοηθείας II διάχυτου αστροκυτώματος, καθώς η ιστογένεσή τους είναι κοινή. Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH είναι θετικά στο δείκτη GFAP και συχνά εμφανίζουν έντονη και διάχυτη πυρηνική έκφραση του p53. Η πλειοψηφία τους εκφράζει την IDH1 με τη μετάλλαξη R132H ενώ επιδεικνύει αρνητική ανοσοέκφραση για τον πυρηνικό δείκτη ATRX.

Κύτταρο προέλευσης: Το κύτταρο προέλευσης είναι εν πολλοίς άγνωστο. Το γεγονός ότι τα βαθμού κακοηθείας II και III αστροκυτώματα, τα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH και τα ολιγοδενδρογλιώματα φέρουν όλα μετάλλαξη της IDH, υπαινίσσεται ότι μοιράζονται ένα κοινό κύτταρο προέλευσης, διαφορετικό από αυτό των γλοιοβλαστωμάτων χωρίς μετάλλαξη της IDH και των πιλοκυτταρικών αστροκυτωμάτων [43].

Γενετικό προφίλ: Τα μοριακά χαρακτηριστικά του αναπλαστικού αστροκυτώματος ταυτίζονται εν πολλοίς με αυτά του βαθμού κακοηθείας II διάχυτου αστροκυτώματος. Εξ ορισμού, μεταλλάξεις της IDH1 ή IDH2 ανευρίσκονται σε όλους τους όγκους, και μοριακές αλλαγές στα γονίδια TP53 και ATRX ανευρίσκονται στην πλειοψηφία αυτών [34,35,42-45,53,54,69]. Σημειώνεται επίσης ότι τα αναπλαστικά αστροκυτώματα σε σχέση με τα βαθμού κακοηθείας II διάχυτα αστροκυτώματα εμφανίζουν συχνότερα απώλειες των 9p και 19q χρωμοσωμικών σκελών.

Προγνωστικοί παράγοντες: Την εποχή που προηγήθηκε της ανακάλυψης των IDH μεταλλάξεων, η μέση επιβίωση των ασθενών κυμαινόταν από τρία έως πέντε έτη. Ωστόσο σε περιπτώσεις ασθενών μεγάλης ηλικίας ή κακής φυσικής κατάστασης, η μέση επιβίωση ήταν σημαντικά μικρότερη [70]. Στη σημερινή εποχή, ήτοι μετά την ανακάλυψη των IDH μεταλλάξεων, οι υπολογισμοί της επιβίωσης εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερες διακυμάνσεις. Ένα ακόμη στοιχείο που επηρεάζει την έκβαση είναι η έκταση της χειρουργικής εκτομής (επί υγιών ή μη ορίων) [70].

Η μιτωτική δραστηριότητα, όπως εκτιμάται με το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67, δεν αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για το αναπλαστικό αστροκύτωμα.

Οι μεταλλάξεις της IDH1 ή IDH2 έχουν συσχετισθεί με ευμενέστερη έκβαση, ενώ το αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH έχει παρόμοια πρόγνωση με το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH [8]. Μελέτη η οποία περιελάμβανε 562 αναπλαστικά αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH από τρεις

σειρές ασθενών έδειξε μέση επιβίωση της τάξης των 9,3 ετών [15]. Σημειώνεται επίσης ότι η ενίσχυση του EGFR, η απώλεια του χρωμοσωμικού σκέλους 10q και ο διπλασιασμός του 7q έχουν συσχετισθεί με δυσμενέστερη έκβαση.

3.7. Αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH

Ορισμός: Διάχυτα διηθητικό αστροκύτωμα με εστιακή ή εκτεταμένη αναπλασία και αξιοσημείωτη μιτωτική δραστηριότητα αλλά χωρίς μεταλλάξεις στα IDH γονίδια.

Το αναπλαστικό αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH είναι σπάνιο και αποτελεί το 20% όλων των αναπλαστικών αστροκυτωμάτων. Παρ' όλα αυτά, τα αναπλαστικά αστροκυτώματα έχουν την υψηλότερη συχνότητα μη μεταλλαγμένης IDH1 και IDH2 στο σύνολο των διαχύτων γλοιωμάτων βαθμού κακοηθείας II και III [45,71]. Τα περισσότερα γλοιώματα με ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά αναπλαστικού αστροκυτώματος αλλά χωρίς μετάλλαξη της IDH έχουν παρόμοια μοριακά χαρακτηριστικά με το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH. Οι εν λόγω όγκοι είναι πολύ επιθετικότεροι κλινικά σε σχέση με τα αναπλαστικά αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH και ακολουθούν παρόμοια κλινική πορεία με αυτή του γλοιοβλαστώματος.

Βαθμός κακοηθείας: III κατά WHO 2016.

3.8. Γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH

Ορισμός: Γλοίωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας κυρίως με αστροκυτταρική διαφοροποίηση, το οποίο εμφανίζει πυρηνική ατυπία, κυτταρικό πλειομορφισμό (στις περισσότερες περιπτώσεις), μιτωτική δραστηριότητα και τυπικά διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης, μικροαγγειακή υπερπλασία ή/και νέκρωση, καθώς επίσης έλλειψη μεταλλάξεων της IDH.

Το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH είναι το πιο κοινό και το περισσότερο κακόηθες αστροκυτταρικό γλοίωμα, αντιστοιχώντας περίπου στο 90%

του συνόλου των γλοιοβλαστωμάτων. Χαρακτηριστικά προσβάλλει ενηλίκους, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 62 έτη και αναλογία ανδρών:γυναικών 1,35:1. Όπως υποδεικνύει και η συνώνυμη ονομασία «πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH», το συγκεκριμένο γλοιοβλάστωμα τυπικά εμφανίζεται εκ νέου χωρίς αναγνωρίσιμη πρόδρομη συνιστώσα χαμηλότερου βαθμού κακοηθείας. Η υπερσκηνίδια εντόπιση είναι χαρακτηριστική για το συγκεκριμένο γλοιοβλάστωμα, καθώς και η διήθηση παρακειμένων και απομακρυσμένων εγκεφαλικών δομών.

Βαθμός κακοηθείας: Το γλοιοβλάστωμα και οι ιστολογικοί του υπότυποι αντιστοιχούν στο βαθμό κακοηθείας IV κατά WHO. Ωστόσο, με βάση τα δεδομένα των σύγχρονων θεραπειών, τα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζουν λιγότερο επιθετική κλινική πορεία σε σχέση με τους λοιπούς όγκους βαθμού κακοηθείας IV.

Επιδημιολογία: Το γλοιοβλάστωμα είναι ο συνηθέστερος κακοήθης όγκος εγκεφάλου στους ενήλικους, καθώς αποτελεί το 15% όλων των ενδοκρανιακών νεοπλασμάτων και το 45-50% όλων των πρωτοπαθών κακοήθων εγκεφαλικών όγκων [14,62]. Στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής και την Αυστραλία η ετήσια επίπτωση είναι περίπου 3-4 περιπτώσεις / 100.000 πληθυσμού [14], ενώ η επίπτωση είναι σημαντικά χαμηλότερη στην Ανατολική Ασία, με 0,59 περιπτώσεις/100.000 πληθυσμού [72].

Το γλοιοβλάστωμα μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς οποιασδήποτε ηλικίας, κυρίως όμως εμφανίζεται σε ασθενείς ηλικίας 55 έως 85 ετών. Σημειώνεται δε ότι είναι το δεύτερο συχνότερο ενδοκρανιακό νεόπλασμα σε ενήλικους άνω των 55 ετών [14], ενώ είναι ασύνηθες σε ασθενείς κάτω των 40 ετών. Η μέση ηλικία διάγνωσης του γλοιοβλαστώματος χωρίς μετάλλαξη της IDH είναι 62 έτη.

Εντόπιση: Το γλοιοβλάστωμα κυρίως εντοπίζεται στην υποφλοιώδη λευκή ουσία, αλλά και στην εν τω βάθει φαιά ουσία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Σε μελέτη του Πανεπιστημίου της Ζυρίχης που περιελάμβανε 987 γλοιοβλαστώματα οι

συχνότερες εντοπίσεις ήταν ο κροταφικός λοβός (31%), ο βρεγματικός λοβός (24%), ο μετωπιαίος λοβός (23%) και ο ινιακός λοβός (16%) [14]. Ενώ το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH παρουσιάζει μια ευρεία ανατομική κατανομή, το δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζεται κατεξοχήν στο μετωπιαίο λοβό και ιδιαίτερα στην περιοχή γύρω από τις πλάγιες κοιλίες [73]. Συνήθως η νεοπλασματική διήθηση εκτείνεται στον παρακείμενο φλοιό και μέσω του μεσολοβίου στο ετερόπλευρο ημισφαίριο. Το γλοιοβλάστωμα των βασικών γαγγλίων και του θαλάμου είναι σύνηθες κυρίως στην παιδική ηλικία, ενώ το γλοιοβλάστωμα του εγκεφαλικού στελέχους είναι ιδιαίτερος σπάνιο και επίσης ανευρίσκεται συνήθως στα παιδιά [74]. Η παρεγκεφαλίδα και η σπονδυλική στήλη αποτελούν εξαιρετικά σπάνιες εντοπίσεις.

Συμπτωματολογία: Τα γλοιοβλαστώματα εξελίσσονται ταχέως. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την εντόπιση του όγκου και συνήθως εμφανίζονται ως εστιακά νευρολογικά ελλείμματα (π.χ. ημιπάρεση και αφασία), καθώς και ως αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης λόγω σχετιζόμενου με το νεόπλασμα οιδήματος. Οι μισοί περίπου από τους ασθενείς διαγιγνώσκονται μετά από μία επιληπτική κρίση. Άλλα συνήθη συμπτώματα είναι οι αλλαγές στη συμπεριφορά, η ναυτία, οι έμετοι και σπανίως οι έντονες ημικρανίες με αίσθημα παλμών [75,76]. Σε μελέτη που περιελάμβανε 677 ασθενείς με γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH, τα συμπτώματα έως το χρόνο της αρχικής διάγνωσης είχαν διαρκέσει λιγότερο από τρεις μήνες στο 68% των περιπτώσεων και λιγότερο από 6 μήνες στο 84% [68]. Σε ασθενείς με σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια συμπτωμάτων θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα γλοιοβλαστώματος με μετάλλαξη της IDH, το οποίο έχει προκύψει από εξαλλαγή ενός αστροκυτώματος χαμηλότερου βαθμού κακοηθείας.

Απεικονιστικά ευρήματα: Τα γλοιοβλαστώματα απεικονιστικά έχουν ακανόνιστο σχήμα και παρουσιάζουν δακτυλιοειδή ζώνη ενίσχυσης γύρω από μία κεντρική περιοχή νέκρωσης. Συνήθως εκτείνονται ευρέως σε παρακείμενους λοβούς,

στο ετερόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο και στο στέλεχος του εγκεφάλου. Με δεδομένη την παρουσία νεοπλασματος εγκεφάλου με δακτυλιοειδή ενίσχυση απεικονιστικά, βιοψίες που δείχνουν αστροκύτωμα υψηλού βαθμού κακοηθείας χωρίς σαφή ιστολογικά χαρακτηριστικά γλοιοβλαστώματος θα πρέπει να θεωρηθεί ότι πιθανώς περιέλαβαν ανεπαρκές υλικό.

Επέκταση: Η διηθητική ανάπτυξη αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των διάχυτων γλοιωμάτων, όμως το γλοιοβλάστωμα είναι ιδιαίτερα φημισμένο για την ταχύτατη διήθηση των παρακείμενων εγκεφαλικών δομών [77].

Η διήθηση προκύπτει, ως επί το πλείστον, μέσω των οδών της λευκής ουσίας αλλά μπορεί ενδεχομένως να περιλαμβάνει εγκεφαλικές δομές του φλοιού αλλά και της εν τω βάθει φαιάς ουσίας. Σε περίπτωση που η διήθηση εκτείνεται πέραν του μεσολοβίου με επακόλουθη ανάπτυξη στο ετερόπλευρο ημισφαίριο, το αποτέλεσμα ενδέχεται να είναι μια αμφοτερόπλευρη συμμετρική αλλοίωση, γνωστή ως γλοίωμα δίκην πεταλούδας.

Τα διηθητικά κύτταρα εντοπίζονται τόσο εντός όσο και εκτός της δακτυλιοειδούς περιοχής ενίσχυσης του γλοιοβλαστώματος, αλλά η πυκνότητά τους μειώνεται όσο αυξάνεται η απόσταση από το κέντρο του νεοπλασματος. Τα εν λόγω μεμονωμένα διηθητικά κύτταρα είναι δυνατόν να αναγνωριστούν ιστολογικά σε απόσταση αρκετών εκατοστών από το κέντρο του όγκου, τόσο σε περιοχές με απεικονιστικά ευρήματα όσο και σε περιοχές που φαίνονται υγιείς απεικονιστικά. Τα κύτταρα αυτά είναι πιθανότατα υπεύθυνα για τις τοπικές υποτροπές μετά την αρχική θεραπεία, καθώς διαφεύγουν της χειρουργικής εξαίρεσης, δεν λαμβάνουν υψηλές δόσεις ακτινοθεραπείας και εντοπίζονται σε περιοχές με άθικτο αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων [78].

Μεταστατικό δυναμικό: Παρ' όλη την ταχύτατη διηθητική του ανάπτυξη, το γλοιοβλάστωμα συνήθως δεν επεκτείνεται στον υπαραχνοειδή χώρο και δεν

διασπείρεται μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, αν και αυτός ο τρόπος διασποράς απαντάται ενίοτε στα παιδιατρικά περιστατικά [79]. Ομοίως, η διήθηση της σκληράς μήνιγγας, του φλεβώδους κόλπου και των οστών του κρανίου είναι εξαιρετικά ασυνήθης [80]. Αν και η περιαγγειακή επέκταση αποτελεί τυπικό εύρημα, η διήθηση των αγγειακών αυλών είναι ιδιαίτερος ασύνηθες εύρημα. Οι εξωκρανιακές μεταστάσεις είναι ασυνήθεις σε ασθενείς που δεν έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση [81]. Πρόσφατα βρέθηκαν νεοπλασματικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με γλοιοβλάστωμα, στοιχείο το οποίο υποδεικνύει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα ή το αφιλόξενο ενδεχομένως περιβάλλον απομακρυσμένων οργάνων καταπνίγουν τη μεταστατική εμφύτευση και ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων [82]. Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι ανοσοκατεσταλμένοι δέκτες μεταμοσχευμένων οργάνων από ασθενείς με γλοιοβλάστωμα ανέπτυξαν γλοιοβλάστωμα στα όργανα-μοσχεύματα. Συνεπώς το ανοσοποιητικό σύστημα φυσιολογικά καταπνίγει το μεταστατικό δυναμικό των κυκλοφορούντων νεοπλασματικών κυττάρων [83].

Μακροσκοπικά ευρήματα: Παρά τη σύντομη διάρκεια των συμπτωμάτων, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα γλοιοβλαστώματα συνήθως είναι ιδιαίτερα ευμεγέθη τη στιγμή της διάγνωσης και μπορούν να καταλαμβάνουν έναν ολόκληρο εγκεφαλικό λοβό. Είναι συνήθως μονήρη, αλλά τα γλοιοβλαστώματα που εμπλέκουν το εγκεφαλικό στέλεχος ή το μεσολόβιο είναι συνήθως αμφοτερόπλευρα και συμμετρικά. Τα γλοιοβλαστώματα είναι ασαφώς αφοριζόμενοι όγκοι και παρουσιάζουν ποικίλη χροιά στις διατομές. Συνήθως εμφανίζουν φαιή χροιά στην περιφέρεια και κιτρινόφαιη χροιά στις κεντρικές νεκρωτικές περιοχές. Επιπρόσθετα παρουσιάζουν βαθυέρυθρες στικτές περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν σε πρόσφατες και παλαιές αιμορραγικές διηθήσεις. Όταν περικλείουν κύστες, αυτές αφορούν σε ιστό που έχει υποστεί πηκτική νέκρωση, σε αντίθεση με τις καλώς αφοριζόμενες κύστες που απαντώνται στα διάχυτα γλοιώματα βαθμού κακοηθείας II.

Μικροσκοπικά ευρήματα: Το τυπικό γλοιοβλάστωμα είναι ένα κυτταροβριθές γλοίωμα, αποτελούμενο από χαμηλής διαφοροποίησης, ενίοτε πλειόμορφα, νεοπλασματικά κύτταρα με έντονη πυρηνική ατυπία και υψηλή μιτωτική δραστηριότητα. Η παρουσία προέχουσας μικροαγγειακής υπερπλασίας ή/και νέκρωσης αποτελεί επίσης απαραίτητο διαγνωστικό στοιχείο.

Όπως υπαινίσσεται ο απαρχαιωμένος όρος «πολύμορφο γλοιοβλάστωμα», η ιστοπαθολογία του εν λόγω νεοπλασματος είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφη. Ορισμένοι όγκοι παρουσιάζουν έντονο πυρηνικό πλειομορφισμό με παρουσία πολυαρίθμων πολυπυρήνων γιγαντοκυττάρων, σε αντίθεση με άλλους όγκους, οι οποίοι είναι έντονα κυτταροβριθείς άλλα σχετικά μονόμορφοι. Η αστροκυτταρική φύση των νεοπλασμάτων είναι εύκολα αναγνωρίσιμη σε ορισμένους όγκους, αλλά δύσκολα αναγνωρίσιμη σε πτωχής διαφοροποίησης όγκους.

Η περιοχική πολυμορφία του γλοιοβλαστώματος είναι έντονη και συνεπώς η διάγνωση από στερεοταξικές βιοψίες μπορεί να γίνει εξαιρετικά δύσκολη [84].

Ιστολογικοί υπότυποι:

-Μικροκυτταρικό γλοιοβλάστωμα: στο συγκεκριμένο υπότυπο απαντώνται ομοιόμορφα, μικρού μεγέθους νεοπλασματικά κύτταρα με βαθυχρωματικούς πυρήνες και ελάχιστη ποσότητα κυτταροπλάσματος. Παρατηρείται ήπια πυρηνική ατυπία και υψηλή μιτωτική δραστηριότητα.

-Γλοιοβλάστωμα με αρχέγονα νευρωνικά κύτταρα: ο συγκεκριμένος υπότυπος περιλαμβάνει ένα τυπικό διάχυτο γλοίωμα με ένα ή περισσότερα συμπαγούς όψης αρχέγονα/ εμβρυϊκού τύπου οζίδια με νευρωνική διαφοροποίηση. Η αρχέγονη/ εμβρυϊκού τύπου συνιστώσα εμφανίζει έντονη ανοσοθετικότητα στον ανοσοϊστοχημικό δείκτη συναπτοφυσίνη και απώλεια της GFAP.

-Γλοιοβλάστωμα με ολιγοδενδρογλοιακή συνιστώσα: Η σύγχρονη ταξινόμηση κατά WHO (2016) δε θεωρεί το γλοιοβλάστωμα με ολιγοδενδρογλοιακή συνιστώσα ξεχωριστή νοσολογική οντότητα. Με βάση τη γενετική ανάλυση, οι εν λόγω όγκοι θα

πρέπει να ταξινομηθούν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες: γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH, γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH ή αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα με μετάλλαξη της IDH και απάλειψη 1p/19q.

-Γιγαντοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα: τα ευμεγέθη, πολυπύρρηνα νεοπλασματικά κύτταρα θεωρούνται συνήθως χαρακτηριστικό γνώρισμα του γλοιοβλαστώματος και απαντώνται όταν αυξάνεται εν γένει ο πυρηνικός πλειομορφισμός. Αν και συχνή, η παρουσία των πολυπύρρηνων γιγαντοκυττάρων δεν αποτελεί ούτε απαραίτητο διαγνωστικό στοιχείο αλλά ούτε και δυσμενή προγνωστικό παράγοντα [85]. Παρά την ανησυχητική εμφάνισή τους, τα εν λόγω κύτταρα απαντώνται στο πλαίσιο εκφυλιστικών αλλοιώσεων. Στην περίπτωση που τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα κυριαρχούν στην ιστολογική εικόνα, τότε τίθεται η διάγνωση γιγαντοκυτταρικού γλοιοβλαστώματος.

-Κοκκιοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα: στο συγκεκριμένο υπότυπο παρατηρούνται άφθονα, ευμεγέθη κύτταρα με κοκκιώδες, ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα, θετικό στην ιστοχημική χρώση PAS.

-Γλοιοβλάστωμα με λιπιδιωμένα/αφρώδη κύτταρα: στον εν λόγω υπότυπο είναι τα αφρώδη κύτταρα, τα οποία κυριαρχούν στην ιστολογική εικόνα.

-Μεταπλαστικό γλοιοβλάστωμα: είναι ένα γλοιοβλάστωμα, το οποίο εμφανίζει θέσεις πλακώδους ή αδενικής διαφοροποίησης. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρούνται επιθηλιακοί στροβιλοειδείς σχηματισμοί (ή αλλιώς πλακώδη μορίδια) με παρουσία περλών κερατίνης. Στη δεύτερη περίπτωση παρατηρούνται ψευδοαδενικοί και δοκιδώδεις σχηματισμοί σε ένα βλενώδες υπόστρωμα. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις παρατηρείται μειωμένη έκφραση της GFAP καθώς και έκφραση κερατινών στις περιοχές της επιθηλιακής μετάπλασης.

-Γλοιοσάρκωμα: η διάγνωση του γλοιοσαρκώματος τίθεται όταν ένα γλοιοβλάστωμα εμφανίζει σε ικανή έκταση μεσεγχυματική συνιστώσα, η οποία

συνήθως προσομοιάζει με ατρακτοκυτταρικό σάρκωμα. Ενίοτε παρατηρείται παραγωγή οστού ή χόνδρου από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Πολλαπλασιασμός: Η μιτωτική δραστηριότητα είναι συνήθως υψηλή, με παρουσία αναγνωρίσιμων μιτώσεων σχεδόν σε κάθε περίπτωση. Συχνό εύρημα αποτελούν και οι άτυπες μιτώσεις. Ωστόσο η μιτωτική δραστηριότητα παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις τόσο ανάμεσα σε διαφορετικούς όγκους όσο και σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου όγκου. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 παρουσιάζει συνήθως ετερογενή κατανομή και κυμαίνεται από 15-20% έως και >50% εστιακά. Έχουν ωστόσο περιγραφεί και σπάνιες περιπτώσεις όγκων με χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά με αναγνώριση όλων των υπολοίπων διαγνωστικών στοιχείων του γλοιοβλαστώματος.

Μικροαγγειακή υπερπλασία: Η παρουσία μικροαγγειακής υπερπλασίας αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του γλοιοβλαστώματος σε ιστολογικό επίπεδο. Σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης η μικροαγγειακή υπερπλασία έχει τη μορφή σπειραματοειδών σχηματισμών, οι οποίοι αποτελούνται από πολυστιβαδωμένα, μιτωτικώς ενεργά ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα/περικύτταρα [86]. Η μικροαγγειακή υπερπλασία συνήθως γεινιάζει με τις νεκρωτικές περιοχές, αντανakλώντας το ότι τα ισχαιμούντα νεοπλασματικά κύτταρα απελευθερώνουν αγγειογενετικούς παράγοντες. Σημειώνεται επίσης ότι τα λοιπά αγγεία του γλοιοβλαστώματος εκφράζουν Ki-67 της τάξης του 2-4% ενώ στις περιοχές της μικροαγγειακής υπερπλασίας το Ki-67 είναι >10%.

Νέκρωση: Η νεοπλασματική νέκρωση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του γλοιοβλαστώματος και η παρουσία της συνδέεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά [85]. Η έκταση των νεκρωτικών περιοχών μπορεί να κυμαίνεται από ελάχιστη έως >80% της συνολικής έκτασης του όγκου. Οι απεικονιστικά παρατηρούμενες εκτεταμένες περιοχές νέκρωσης σχετίζονται με μικρότερη επιβίωση [87]. Ιστολογικά, εντός των νεκρωτικών περιοχών αναγνωρίζονται νεοπλασματικά

κύτταρα σε ποικίλα στάδια εκφύλισης καθώς και ικριώματα διατεταμένων, νεκρωτικών αγγείων του όγκου.

Στην περίπτωση της πασσαλοειδούς νέκρωσης παρατηρούνται πολυάριθμες, ακανόνιστου σχήματος νεκρωτικές περιοχές, οι οποίες περικυκλώνονται από κάθετα διατασσόμενα νεοπλασματικά κύτταρα [88]. Τα πασσαλοειδώς διατασσόμενα νεοπλασματικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση έντονης υποξίας και εκφράζουν τον παράγοντα HIF1A και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες σχετιζόμενους με την υποξία [89]. Οι εν λόγω παράγοντες ενεργοποιούν αγγειογενετικούς παράγοντες, οι οποίοι ευθύνονται για τη μικροαγγειακή υπερπλασία που εντοπίζεται σε ακριβώς παρακείμενες θέσεις των πασσαλοειδώς διατασσόμενων κυττάρων.

Ανοσοφαινότυπος: Τα γλοιοβλαστώματα εκφράζουν συνήθως την πρωτεΐνη GFAP, ωστόσο ο βαθμός της ανοσοθετικότητας ποικίλει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, οι γεμιστοκυτταρικές περιοχές εμφανίζουν έντονη και διάχυτη ανοσοθετικότητα, σε αντίθεση με τα αρχέγονα/εμβρυϊκού τύπου κυτταροβριθή στοιχεία, τα οποία είναι συνήθως αρνητικά. Η σαρκωματούδης συνιστώσα του γλοιοσαρκώματος είναι επίσης αρνητική ή εστιακά θετική στην πρωτεΐνη GFAP και ενδέχεται να εκφράζει άλφα-1-αντιθρυψίνη, άλφα-1-αντιχυμοθρυψίνη, SMA και EMA. Συνήθης επίσης είναι η έκφραση της πρωτεΐνης S-100 από τα γλοιοβλαστώματα. Σε πτωχά διαφοροποιημένα νεοπλάσματα, η έκφραση του OLIG2 έχει μεγάλη διαγνωστική χρησιμότητα, καθώς είναι έντονα θετική στα αστροκυτώματα και στα ολιγοδενδρογλωιώματα σε αντίθεση με τα επενδυμώματα και τους λοιπούς μη-γλοιακούς όγκους [90]. Στα γλοιοβλαστώματα ενδέχεται να παρατηρηθεί και κάποια ανοσοέκφραση κυτταροκερατινών, και κυρίως του κοκτέιλ AE1/AE3, λόγω της διασταυρούμενης θετικότητας με την πρωτεΐνη GFAP. Ωστόσο, οι λοιπές κερατίνες είναι αρνητικές [91]. Σε ένα σημαντικό ποσοστό των γλοιοβλαστωμάτων και συγκεκριμένα στο 25-53% παρατηρείται πυρηνική υπερέκφραση του p53 [92,93]. Η εν λόγω ανοσοέκφραση, όπως και εκείνη του WT-1,

βοηθά στη διαφορική διάγνωση των νεοπλασματικών αστροκυττάρων από την αντιδραστική γλοίωση, σε περιπτώσεις που έχουν λάβει θεραπεία [94]. Τέλος, η έκφραση του EGFR παρατηρείται σε ποσοστό 40-98% των γλοιοβλαστωμάτων και σχετίζεται με την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου [95].

Γενετικό προφίλ: Οι περισσότερες γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες χαρακτηρίζουν τα γλοιοβλαστώματα χωρίς μετάλλαξη της IDH είναι παρούσες στην πλειονότητα των γλοιωμάτων βαθμού κακοηθείας II και III κατά WHO, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι εν λόγω οντότητες αποτελούν ένα συνεχές φάσμα και υπογραμμίζει την ανάγκη διάκρισής τους από τα νεοπλάσματα που φέρουν μεταλλάξεις της IDH1 [57].

Η πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία στο γλοιοβλάστωμα είναι η προσθήκη του σκέλους 7p σε συνδυασμό με την απώλεια του 10q [96,97]. Ο συνδυασμός αυτός σχετίζεται με την ενίσχυση του γονιδίου EGFR. Απώλεια του αλληλομόρφου στη χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει το γονίδιο PTEN παρατηρείται σε 75-95% των γλοιοβλαστωμάτων, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN είναι παρούσες σε 30-44% των περιστατικών. Άλλος συχνός συνδυασμός είναι η ταυτόχρονη προσθήκη γενετικού υλικού στα χρωμοσώματα 19 και 20 [98].

Το γονίδιο του EGFR είναι εκείνο το οποίο υφίσταται συχνότερα ενίσχυση στα γλοιοβλαστώματα [99], η οποία παρατηρείται σε περίπου 40% των πρωτοπαθών γλοιοβλαστωμάτων [67,98,100,101]. Εκτός από τις αλλοιώσεις του EGFR, αλλοιώσεις στην οδό των κινασών τυροσίνης αφορούν στην ενίσχυση του γονιδίου του υποδοχέα PDGFR1 (σε 15% των περιστατικών), στην ενίσχυση του γονιδίου MET (σε 5%) και σπανίως στις πρωτεΐνες συγχώνευσης FGFR1-TACC1 και FGFR3-TACC3 [102,103]. Διαταραχές στην οδό της p53 απαντώνται στο 90% των γλοιοβλαστωμάτων, ως μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, ως ενίσχυση του γονιδίου MDM2 ή ως απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p14ARF [104-106]. Αλλοιώσεις στην οδό του ρετινοβλαστώματος είναι παρούσες σε ποσοστό 80% των

γλοιοβλαστωμάτων, ενώ σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονίδιου TERT είναι παρούσες περίπου στο 80% των περιπτώσεων [59]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο NF1 παρατηρούνται περίπου στο 20% των γλοιοβλαστωμάτων [104]. Συχνές επίσης είναι οι επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς επίσης και οι μεταλλάξεις σε γονίδια αναδιάταξης της χρωματίνης, οι οποίες και εξετάζονται ενδελεχώς στην παρούσα διατριβή.

Προγνωστικοί παράγοντες: Το γλοιοβλάστωμα είναι σχεδόν πάντοτε θανατηφόρος νόσος. Οι περισσότεροι ασθενείς πεθαίνουν εντός 15-18 μηνών από τη διάγνωση και <5% των ασθενών επιβιώνουν μετά τα 5 έτη [107]. Η νεότερη ηλικία (<50 έτη) και η πλήρης μακροσκοπική εξαίρεση του όγκου σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση. Σε μοριακό επίπεδο, οι όγκοι οι οποίοι εμφανίζουν καλύτερη επιβίωση χαρακτηρίζονται από την ευνοϊκή μοριακή διαταραχή της μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT [108,109] Επιπρόσθετα, η παρουσία εκτεταμένης νέκρωσης σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση [85,110,111].

3.9. Γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH

Ορισμός: Γλοίωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας κυρίως με αστροκυτταρική διαφοροποίηση, το οποίο εμφανίζει πυρηνική ατυπία, κυτταρικό πλειομορφισμό (στις περισσότερες περιπτώσεις), μιτωτική δραστηριότητα και τυπικά διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης, μικροαγγειακή υπερπλασία ή/και νέκρωση, καθώς επίσης μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1 είτε IDH2.

Το γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH αντιστοιχεί περίπου στο 10% του συνόλου των γλοιοβλαστωμάτων. Τα γλοιοβλαστώματα τα οποία αναπτύσσονται μέσω κακοήθους εξαλλαγής από τα διάχυτα αστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας II κατά WHO) ή από το αναπλαστικό αστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας III κατά WHO) σχεδόν πάντοτε σχετίζονται με μετάλλαξη της IDH και ως εκ τούτου έχουν ως συνώνυμο τον όρο «δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα, με μετάλλαξη της IDH».

Μορφολογικά, το γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH δεν διακρίνεται από εκείνο χωρίς μετάλλαξη της IDH, με εξαίρεση το μικρότερο βαθμό νέκρωσης. Τα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζονται σε νεότερους ασθενείς (μέση ηλικία διάγνωσης τα 45 έτη) και εντοπίζονται κυρίως στο μετωπιαίο λοβό, ενώ έχουν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση από τα γλοιοβλαστώματα χωρίς μετάλλαξη της IDH [45,112]. Το βασικό γενετικό χαρακτηριστικό, ήτοι η παρουσία IDH μετάλλαξης [44], σχετίζεται με φαινότυπο υπερμεθυλίωσης [113].

Βαθμός κακοηθείας: Το γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH αντιστοιχεί ιστολογικά σε βαθμό κακοήθειας IV κατά WHO. Η πρόγνωσή του είναι σημαντικά καλύτερη σε σχέση με το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH.

Επιδημιολογία: Πριν την ανακάλυψη της μετάλλαξης της IDH1 ως μοριακού δείκτη, η διάγνωση των δευτεροπαθών γλοιοβλαστωμάτων βασιζόταν σε κλινικές παρατηρήσεις (νευροαπεικονιστικά ή/και ιστολογικά στοιχεία προϋπάρχοντος αστροκυτώματος χαμηλού βαθμού κακοηθείας ή αναπλαστικού) [67,68]. Σε μεγάλη σουηδική μελέτη, και με βάση κλινικά και ιστοπαθολογικά κριτήρια, μόνο το 5% των γλοιοβλαστωμάτων θεωρήθηκαν δευτεροπαθή, υπό την έννοια του προϋπάρχοντος χαμηλού βαθμού κακοηθείας γλοιώματος [62,67]. Αντίθετα, με βάση τη μετάλλαξη της IDH1, τα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα αντιστοιχούν στο 9-13% του συνόλου των γλοιοβλαστωμάτων [42,112].

Αναφορικά με την ηλικία των ασθενών, τα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα αναπτύσσονται σε ασθενείς σημαντικά νεότερους (μέση ηλικία 45 έτη) σε σχέση με τα πρωτοπαθή (μέση ηλικία 62 έτη) [67]. Αναφορικά με το φύλο, η αναλογία ανδρών/γυναικών είναι 0,96:1 στα δευτεροπαθή και 1,63:1 στα πρωτοπαθή γλοιοβλαστώματα [73].

Εντόπιση: Το δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζεται κυρίως στο μετωπιαίο λοβό, συνηθέστερα στην περιοχή γύρω από τις

πλάγιες κοιλίες [73], ενώ το γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη της IDH χαρακτηρίζεται από ευρεία ανατομική κατανομή.

Μακροσκοπικά ευρήματα: Όπως όλα τα γλοιοβλαστώματα, το γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH διηθεί ευρέως το εγκεφαλικό παρέγχυμα χωρίς να αφορίζεται σαφώς στη μακροσκοπική εξέταση. Ωστόσο οι εκτεταμένες, κιτρινόφαιης χροιάς περιοχές κεντρικής νέκρωσης, οι οποίες χαρακτηρίζουν το γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη της IDH, συνήθως απουσιάζουν.

Μικροσκοπικά ευρήματα: Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του γλοιοβλαστώματος με μετάλλαξη της IDH είναι παρόμοια με αυτά του γλοιοβλαστώματος χωρίς μετάλλαξη της IDH. Ωστόσο, υπάρχουν δύο σημαντικές διαφορές. Πρώτον, οι περιοχές της ισχαιμικής/πασσαλοειδούς νέκρωσης παρατηρούνται στο 90% των γλοιοβλαστωμάτων χωρίς IDH μετάλλαξη, αλλά μόνο στο 50% των γλοιοβλαστωμάτων με IDH μετάλλαξη. Δεύτερον, η ολιγοδενδρογλοιακή συνιστώσα παρατηρείται συχνότερα στις περιπτώσεις με IDH μετάλλαξη (ποσοστό 54%) σε σχέση με αυτές που δεν εμφανίζουν μετάλλαξη της IDH (ποσοστό 20%).

Ανοσοφαινότυπος: Η παρουσία της IDH1 R132H μετάλλαξης μπορεί να ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά με αντίσωμα έναντι του προϊόντος του συγκεκριμένου γονιδίου. Η εν λόγω μετάλλαξη είναι η συχνότερη μετάλλαξη της IDH1 στα ολιγοδενδρογλοιώματα, αστροκυτώματα και γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH [114]. Ο αρνητικός ανοσοϊστοχημικός έλεγχος μπορεί να οφείλεται σε μια λιγότερο συνήθη μετάλλαξη της IDH1, σε μετάλλαξη της IDH2 ή/και σε πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα χωρίς IDH μετάλλαξη [43].

Με τη μετάλλαξη της IDH1/2 συνήθως συνυπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο ATRX και στο TP53 τόσο στα διάχυτα αστροκυτώματα βαθμού κακοηθείας II και III όσο και στα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH [34].

Οι μεταλλάξεις του ATRX έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασής του, η οποία ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά [115]. Η πυρηνική υπερέκφραση του p53 είναι συχνή, αντανακλώντας την υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου TP53. Ωστόσο, η υπερέκφραση του EGFR είναι ασυνήθης, και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του γλοιοβλαστώματος χωρίς IDH μετάλλαξη. Η πρωτεΐνη GFAP εκφράζεται στο σύνολο των περιπτώσεων, αν και η ένταση της έκφρασης μπορεί να ποικίλλει.

Γενετικό προφίλ: Οι μεταλλάξεις της IDH περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 2008, όταν και αναγνωρίστηκε η συσχέτισή τους με καλύτερη συνολική επιβίωση [44]. Συμβαίνουν νωρίς κατά την ανάπτυξη των χαμηλού βαθμού κακοηθείας γλοιωμάτων και παραμένουν παρούσες κατά την εξαλλαγή τους σε γλοιοβλάστωμα. Όλες οι γνωστές μεταλλάξεις της IDH1 εντοπίζονται στην πρώτη ή δεύτερη βάση του κωδικονίου 132 [42,44,51]. Η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η R132H (CGT → CAT), η οποία ανευρίσκεται στο 83-91% των αστροκυτταρικών και ολιγοδενδρογλοιακών γλοιωμάτων. Άλλες μεταλλάξεις, που είναι ωστόσο ασυνήθεις, είναι οι R132C, R132G, R132S και R132L [51]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της IDH2 εντοπίζονται στο αμινοξικό υπόλειμμα R172, το οποίο είναι ανάλογο του R132 της IDH1. Οι μεταλλάξεις της IDH2 είναι σπάνιες στα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH και η συνηθέστερη εξ αυτών είναι η R172K [45].

Έχουν περιγραφεί ελάχιστα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα τα οποία στερούνται μεταλλάξεων της IDH, ωστόσο συνήθως εμφανίζουν μεταλλάξεις του TP53. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς έχουν βραχύτερο κλινικό ιστορικό και πτωχή πρόγνωση [112]. Τα περισσότερα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα που στερούνται μεταλλάξεων της IDH αναπτύσσονται στο έδαφος αναπλαστικών αστροκυτωμάτων, σε αντίθεση με τα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH, τα οποία συνήθως αναπτύσσονται στο έδαφος διάχυτων αστροκυτωμάτων βαθμού κακοηθείας II.

Οι συνηθέστερες γενετικές αλλαγές στα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH είναι οι μεταλλάξεις του TP53 και η απώλεια του χρωμοσωμικού σκέλους 19q [68]. Μελέτες του γενετικού προφίλ του πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς γλοιοβλαστώματος δείχνουν ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων του TP53 είναι σημαντικά υψηλότερη στα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα (67%) σε σχέση με τα πρωτοπαθή (11%) [116]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο ATRX έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασής του. Συνήθως συνυπάρχουν με μεταλλάξεις της IDH και του TP53, τόσο στα διάχυτα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH όσο και στα αναπλαστικά αστροκυτώματα και στα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH [34]. Υπερέκφραση του EGFR κυριαρχεί στα γλοιοβλαστώματα χωρίς μετάλλαξη της IDH, αλλά είναι ασυνήθης στα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα. Σε μία μελέτη μόνο σε 1 από τα 49 γλοιοβλαστώματα συνυπήρχε μετάλλαξη του TP53 και υπερέκφραση του EGFR, στοιχείο το οποίο υπαινίσσεται πως οι συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες και ότι η ανάπτυξη των γλοιοβλαστωμάτων συμβαίνει μέσω δύο διαφορετικών γενετικών οδών [116].

Τα γλοιοβλαστώματα με μετάλλαξη της IDH εμφανίζουν μεθυλίωση των CpG νησιδίων σε πολυάριθμους γενετικούς τόπους [113]. Παρόμοιος φαινότυπος υπερμεθυλίωσης έχει παρατηρηθεί στα διάχυτα αστροκυτώματα με μετάλλαξη της IDH, στα ολιγοδενδρογλοιώματα με μετάλλαξη της IDH αλλά και στην οξεία μυελοειδή λευχαιμία με μετάλλαξη IDH [117]. Η εισαγωγή μεταλλαγμένης IDH1 σε φυσιολογικά ανθρώπινα αστροκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές σε ιστονικούς δείκτες και εκτεταμένη υπερμεθυλίωση του DNA, αποδεικνύοντας ότι η παρουσία της μετάλλαξης της IDH1 είναι επαρκής για τη δημιουργία υπερμεθυλιωμένου φαινοτύπου [49].

Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις της IDH οδηγούν σε διαταραχή της χρωμοσωμικής τοπολογίας και ρύθμισης, στοιχείο το οποίο επάγει την έκφραση των

ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του ογκογονιδίου των γλοιωμάτων PDGFRA [50].

Προγνωστικοί παράγοντες: Η διάμεση συνολική επιβίωση ασθενών με δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη του πρωτοπαθούς γλοιοβλαστώματος (7,8 μήνες και 4,7 μήνες, αντίστοιχα) [67]. Ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με χειρουργική εκτομή και ακτινοθεραπεία είχαν μέση συνολική επιβίωση 27,1 μήνες στην περίπτωση του δευτεροπαθούς γλοιοβλαστώματος και 11,3 μήνες στην περίπτωση του πρωτοπαθούς [112]. Οι ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία εμφάνισαν μέση συνολική επιβίωση 31 μήνες στην περίπτωση του δευτεροπαθούς γλοιοβλαστώματος και 15 περίπου μήνες στην περίπτωση του πρωτοπαθούς γλοιοβλαστώματος [45].

4. Μοριακή φυσιολογία των ιστονών

4.1. Η σύμπτυξη του DNA στα χρωμοσώματα

Σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν ειδικοί τρόποι με τους οποίους το DNA συμπυκνώνεται στα χρωμοσώματα, ώστε να χωρέσει στον πυρήνα. Για παράδειγμα, εάν τα 48 εκατομμύρια ζευγών νουκλεοτιδίων του DNA στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 22 μπορούσαν να αποτεθούν ως μια μακρά διπλή έλικα, το μόριο θα είχε μήκος περίπου 1,5 cm. Ωστόσο, το χρωμόσωμα 22 έχει μήκος μόνο περίπου 2 μm κατά τη μίτωση, αναλογία η οποία αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε σύμπτυξη κατά 7000 φορές. Η αξιοσημείωτη αυτή δυναμική σύμπτυξης επιτελείται από πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες το DNA περιτυλίσσεται και αναδιπλώνεται σε υψηλότερες δομές οργάνωσης. Παρόλο που το DNA είναι λιγότερο συμπυκμένο κατά τη μεσόφαση σε σχέση με τα μιτωτικά χρωμοσώματα, ο βαθμός σύμπτυξής του δεν είναι μικρός.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η χρωμοσωμική δομή είναι δυναμική. Τα χρωμοσώματα συμπύσσονται στο μέγιστο βαθμό κατά την φάση M του κυτταρικού κύκλου. Αν και δεν είναι εξίσου ορατές, συγκεκριμένες περιοχές των μεσοφασικών χρωμοσωμάτων εκπύσσονται, ώστε DNA αλληλουχίες να καταστούν προσβάσιμες για τη γονιδιακή έκφραση, την επιδιόρθωση του DNA και την αντιγραφή του, γεγονός το οποίο παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον και ιδιαίτερη σημασία. Ακολούθως, οι περιοχές συμπύσσονται ξανά όταν οι προαναφερθείσες διεργασίες ολοκληρωθούν. Συνεπώς, η σύμπτυξη των χρωμοσωμάτων είναι διεργασία, η οποία πραγματοποιείται με τρόπο ο οποίος επιτρέπει γρήγορη, εντοπισμένη και σύμφωνη με τις ανάγκες του κυττάρου πρόσβαση στο DNA [118].

4.2. Ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη

Είναι γνωστό ότι το γενετικό υλικό στον πυρήνα διακρίνεται σε δύο γενικές κατηγορίες: την ευχρωματίνη, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή πυκνότητα DNA και υψηλό ρυθμό μεταγραφής του DNA και την ετεροχρωματίνη, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλη πυκνότητα DNA και χαμηλό ρυθμό μεταγραφής του DNA. Η ετεροχρωματίνη αρχικά είχε διακριθεί κυτταρολογικά από την ένταση της σκούρας χρώσης με χρωστικές του DNA. Η συμπυκνωμένη φύση των ετεροχρωματινικών περιοχών, η αυξημένη τους αντίσταση στις νουκλεάσες [119] και οι συμπαγείς τους ιδιότητες στις βιοφυσικές δοκιμασίες [120,121] έχουν μηχανικά συνδεθεί με τη γονιδιακή σίγαση, δεδομένου ότι η σύμπτυξη καθιστά το DNA λιγότερο προσβάσιμο από το μηχανισμό μεταγραφής. Η ετεροχρωματίνη έχει επίσης την ιδιότητα να εξαπλώνεται κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, η οποία καθίσταται εμφανής κατά τη σύμπτυξη και σίγαση των διαγονιδίων τα οποία ενσωματώνονται πλησίον ενδογενών ετεροχρωματινικών περιοχών [119,122].

Μεγάλο τμήμα των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων καταλαμβάνεται από αλληλουχίες πλούσιες σε επαναλήψεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τις δορυφορικές αλληλουχίες διαδοχικών επαναλήψεων (tandem-repeat satellites) κοντά στα κεντρομερίδια και τα τελομερή, τα ρετροτρανσποζόνια και ενδογενείς ρετροϊούς, οι οποίοι θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα του γονιδιώματος μέσω της δυνατότητάς τους για επιβλαβή ανασυνδυασμό και αναδιπλασιασμό. Συνεπώς, σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, είναι προφανής η χρησιμότητα να διατηρηθούν τέτοιες περιοχές φυσικά μη προσβάσιμες και μεταγραφικά ανενεργές, με σύμπτυξή τους σε συμπυκνωμένη ετεροχρωματίνη. Οι πλούσιες σε επαναλήψεις περιοχές αυτές ταξινομούνται ως «ιδιοσυστασιακή» (constitutive) ετεροχρωματίνη και η σίγασή τους είναι καθολική στις αναπτυξιακές σειρές [123]. Αντιθέτως, η «προαιρετική» (facultative) ετεροχρωματίνη αναφέρεται σε περιοχές των οποίων η σύμπτυξη και η

σίγαση είναι δυναμική κατά την ανάπτυξη, όπως σε γονίδια και ενισχυτές που είναι ειδικοί για συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους [124].

4.3. Τα νουκλεοσώματα ως βασική χρωμοσωμική δομή

Οι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με το DNA, ώστε να σχηματιστούν τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα, διακρίνονται στις ιστόνες και τις μη ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες. Έκαστη κατηγορία συνεισφέρει στη μάζα ενός χρωμοσώματος σε ποσότητα περίπου ίση με τη μάζα του DNA. Το σύμπλοκο αμφότερων των κατηγοριών με το πυρηνικό DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι γνωστό ως χρωματίνη (**Εικόνα 1**).

Οι ιστόνες είναι υπεύθυνες για τον πρώτο και πιο βασικό βαθμό σύμπτυξης των χρωμοσωμάτων, που είναι γνωστός ως νουκλεόσωμα. Τα νουκλεοσώματα είναι σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA και ανακαλύφθηκαν το 1974. Όταν οι μεσοφασικοί πυρήνες ανοιχθούν και το περιεχόμενό τους εξεταστεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η χρωματίνη κατά κανόνα εμφανίζεται με τη μορφή ίνας διαμέτρου περίπου 30 nm. Εάν η χρωματίνη υποβληθεί σε επεξεργασία η οποία επάγει το μερικό ξετύλιγμά της, η μορφολογία της στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι κομβολογοειδής. Το νήμα αντιστοιχεί στο DNA και τα σφαιρίδια αντιστοιχούν στα «πυρηνικά σωμάτια των νουκλεοσωμάτων» (nucleosome core particles), τα οποία αποτελούνται από DNA περιτυλιγμένο γύρω από τον ιστονικό πυρήνα.

Η δομική οργάνωση των νουκλεοσωμάτων προσδιορίστηκε μετά την απομόνωσή τους, η οποία πραγματοποιήθηκε από την αποδιατεταγμένη χρωματίνη μετά από την επίδραση συγκεκριμένων ενζύμων πέψης (νουκλεασών) που «κόβουν» το DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα. Μετά την επίδραση αυτών των ενζύμων για μικρό χρόνο, το εκτεθειμένο DNA ανάμεσα στα πυρηνικά σωμάτια των νουκλεοσωμάτων, γνωστό ως συνδετικό DNA (linker DNA) αποκόπτεται και έτσι απομονώνονται τα σωμάτια. Καθένα από τα σωμάτια αποτελείται από σύμπλοκο 8

ιστονών (δύο μόρια καθεμιάς από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4) και διπλή ελικά DNA μήκους 147 ζευγών νουκλεοτιδίων. Το οκταμερές των ιστονών δημιουργεί έναν πρωτεϊνικό πυρήνα, γύρω από τον οποίο τυλίγεται η διπλή έλικα του DNA (**Εικόνα 2**).

Το μήκος του συνδετικού DNA που μεσολαβεί ανάμεσα σε κάθε νουκλεοσωματικό πυρηνικό σωματίο ποικίλλει ανάμεσα σε λίγα ζεύγη νουκλεοτιδίων ως περίπου 80. Ο όρος «νουκλεόσωμα» τεχνικά αναφέρεται σε ένα νουκλεοσωματικό πυρηνικό σωματίο μαζί με ένα από τα παρακείμενα συνδετικά DNA, όμως συχνά χρησιμοποιείται ως συνώνυμο του πυρηνικού σωματίου του νουκλεοσώματος. Συνεπώς, τα νουκλεοσώματα επαναλαμβάνονται σε διαστήματα περίπου 200 ζευγών νουκλεοτιδίων. Για παράδειγμα, ένα διπλοειδές ανθρώπινο κύτταρο με $6,4 \times 10^9$ ζεύγη νουκλεοτιδίων περιέχει περίπου 30 εκατομμύρια νουκλεοσώματα. Ο σχηματισμός των νουκλεοσωμάτων περιορίζει το μήκος ενός νήματος χρωματίνης στο ένα τρίτο του αρχικού.

Η δομή του πυρηνικού σωματίου του νουκλεοσώματος αποσαφηνίστηκε σε υψηλή ανάλυση το 1997. Αποκαλύφθηκε ιστονικός πυρήνας σε σχήμα δίσκου γύρω από τον οποίο τυλίγεται στενά το DNA ως αριστερόστροφο σπείραμα με 1,7 στροφές. Όλες οι ιστόνες που αποτελούν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες (102-135 αμινοξέα) και μοιράζονται δομικό μοτίβο, το οποίο είναι γνωστό ως ιστονική πτυχή. Η ιστονική πτυχή αποτελείται από τρεις α έλικες οι οποίες συνδέονται από δύο θηλιές. Κατά τη συναρμολόγηση του νουκλεοσώματος, οι ιστονικές πτυχές πρώτα συνδέονται η μία με την άλλη, σχηματίζοντας διμερή H3-H4 και H2A-H2B και έπειτα τα H3-H4 διμερή συνδυάζονται για να σχηματίζουν τετραμερή. Στη συνέχεια, ένα H3-H4 τετραμερές συνδυάζεται περαιτέρω με δύο H2A-H2B διμερή για να σχηματίσουν το συμπαγή οκταμερή πυρήνα, γύρω από τον οποίο τυλίσσεται το DNA.

Η επαφή ανάμεσα στο DNA και τις ιστόνες είναι εκτενής: 142 δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στο DNA και τον πυρήνα των ιστονών σε κάθε νουκλεόσωμα. Περίπου οι μισοί από αυτούς τους δεσμούς σχηματίζονται ανάμεσα στη ραχοκοκαλιά των αμινοξέων των ιστονών και τη ραχοκοκαλιά σακχάρου-φωσφορικών του DNA. Πολυάριθμες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί άλατος επίσης συγκρατούν το DNA και τις πρωτεΐνες μαζί στο νουκλεόσωμα. Περισσότερο από το ένα πέμπτο των αμινοξέων στις ιστόνες του πυρηνικού σωματίου είναι λυσίνη ή αργινίνη (δύο αμινοξέα με βασικές πλευρικές ομάδες), των οποίων το θετικό φορτίο μπορεί να εξουδετερώσει αποτελεσματικά το αρνητικό φορτίο της ραχοκοκαλιάς του DNA. Αυτές οι πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις εξηγούν εν μέρει γιατί DNA οποιαδήποτε αλληλουχίας μπορεί να προσδεθεί στον οκταμερή πυρήνα των ιστονών. Η διαδρομή του DNA γύρω από τον ιστονικό πυρήνα δεν είναι ομαλή, αντιθέτως υπάρχουν αρκετά «τσακίσματα», όπως άλλωστε αναμένεται από την ανομοιόμορφη επιφάνεια του πυρήνα. Τα τσακίσματα απαιτούν σημαντική συμπίεση της ελάσσονος αύλακας της DNA έλικας. Ορισμένα δινουκλεοτίδια συμπιέζονται εύκολα στην ελάσσονα αύλακα και κάποιες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες προσδένονται στενότερα στο νουκλεόσωμα σε σχέση με άλλες. Το γεγονός αυτό εξηγεί ορισμένες ασυνήθιστες, εντυπωσιακές περιπτώσεις πολύ ακριβούς τοποθέτησης των νουκλεοσωμάτων σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA. Παρά ταύτα, η προτίμηση των νουκλεοσωμάτων για συγκεκριμένες αλληλουχίες πρέπει να είναι αρκετά ασθενής, ώστε να επιτρέψει σε άλλους παράγοντες να κυριαρχήσουν, δεδομένου ότι τα νουκλεοσώματα μπορούν να καταλάβουν πολλές θέσεις και αλληλουχίες DNA στα περισσότερα χρωμοσώματα.

Εκτός από τις ιστονικές πτυχές, καθεμία από τις ιστόνες του πυρηνικού σωματίου έχει N-τελική αμινοξική «ουρά» η οποία εκτείνεται επί τα εκτός του σωματίου DNA-ιστονών (**Εικόνα 3**). Οι ιστονικές ουρές υφίστανται διάφορους τύπους

ομοιοπολικών τροποποιήσεων, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν κρίσιμες πλευρές της δομής και της λειτουργίας της χρωματίνης.

Δεδομένου του βασικού τους ρόλου στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και τη λειτουργία του DNA, οι ιστόνες είναι από τις περισσότερο συντηρημένες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η αμινοξική αλληλουχία της ιστόνης H4 διαφέρει από εκείνη του μπιζελιού μόνο σε 2 από τα 102 αμινοξέα σε σχέση με την αντίστοιχη ιστόνη στην αγελάδα. Η ισχυρά συντηρημένη δομή υποδεικνύει ότι οι λειτουργίες των ιστονών περιλαμβάνουν σχεδόν όλα τους τα αμινοξέα, με αποτέλεσμα μεταβολή σε οποιαδήποτε θέση να είναι δηλητηριώδης για το κύτταρο. Επιπροσθέτως, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί παράγουν σε μικρότερες ποσότητες εξειδικευμένες παραλλαγές ιστονών (variants), οι οποίες διαφέρουν στην αμινοξική αλληλουχία από τις κύριες ιστόνες. Αυτές οι παραλλαγές, σε συνδυασμό με το μεγάλο αριθμό ομοιοπολικών τροποποιήσεων των νουκλεοσωμικών ιστονών, δημιουργούν ποικίλες δομές χρωματίνης στα κύτταρα [118].

4.4. Η δυναμική φύση των νουκλεοσωμάτων

Για πολλά χρόνια πιστευόταν ότι, ένα νουκλεόσωμα μετά από το σχηματισμό του παρέμενε σε σταθερή θέση DNA, εξαιτίας της πολύ στενής σύνδεσης ανάμεσα στις νουκλεοσωμικές ιστόνες και το DNA. Ωστόσο, αν αυτό ήταν αληθές, θα δημιουργούσε προβλήματα στους μηχανισμούς ανάγνωσης του DNA, οι οποίοι απαιτούν ευχερή πρόσβαση σε πολλές ειδικές αλληλουχίες του DNA. Επίσης, η σταθερότητα θα εμπόδιζε την ταχεία διέλευση των μηχανισμών αντιγραφής και μεταγραφής του DNA κατά μήκος της χρωματίνης. Πειράματα κινητικής έδειξαν ότι το DNA σε απομονωμένα νουκλεοσώματα ξετυλίγεται από κάθε άκρο με ρυθμό περίπου τέσσερις φορές ανά δευτερόλεπτο, παραμένοντας εκτεθειμένο 10 έως 50 χιλιοστά του δευτερολέπτου προτού ξανακλείσει η μερικώς ξετυλιγμένη δομή.

Συνεπώς, η μεγαλύτερη ποσότητα του DNA σε απομονωμένο νουκλεόσωμα είναι διαθέσιμη για την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών.

Είναι εμφανές ότι η χρωματίνη εντός του κυττάρου απαιτεί περαιτέρω χαλάρωση των επαφών, δεδομένου ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν μεγάλη ποικιλία εξαρτώμενων από το ATP συμπλόκων αναδιάταξης της χρωματίνης. Τα σύμπλοκα αυτά περιλαμβάνουν μια υπομονάδα η οποία υδρολύει το ATP (ATPάση η οποία εξελικτικά σχετίζεται με τις DNA ελικάσες). Η υπομονάδα αυτή συνδέεται με τον πρωτεϊνικό πυρήνα του νουκλεοσώματος και με το δίκλωνο DNA που τυλίσσεται γύρω από αυτόν. Χρησιμοποιώντας την ενέργεια της υδρόλυσης του ATP για να μετακινηθεί το DNA σε σχέση με τον ιστονικό πυρήνα, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αλλάζει προσωρινά τη δομή ενός νουκλεοσώματος, καθιστώντας το DNA λιγότερο στενά προσδεδμένο στον πυρήνα των ιστονών. Με επανειλημμένους κύκλους υδρόλυσης του ATP οι οποίοι μετακινούν το νουκλεοσωμικό πυρήνα κατά μήκος της διπλής έλικας του DNA, τα σύμπλοκα αναδιάταξης καταλύουν την ολίσθηση του νουκλεοσώματος. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να επανατοποθετήσουν τα νουκλεοσώματα, ώστε να καταστήσουν προσβάσιμες συγκεκριμένες περιοχές του DNA σε άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, σε συνεργασία με ποικίλες άλλες πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με τις ιστόνες και χρησιμεύουν ως πρωτεΐνες συνοδοί (histone chaperones), ορισμένα σύμπλοκα αναδιάταξης είναι ικανά να απομακρύνουν όλες ή κάποιες από τις νουκλεοσωμικές ιστόνες από ένα νουκλεόσωμα, καταλύοντας είτε την ανταλλαγή των ιστονών H2A–H2B είτε την πλήρη απομάκρυνση του οκταμερούς πυρήνα από το DNA. Ως αποτέλεσμα τέτοιων διεργασιών, μετρήσεις έχουν δείξει ότι ένα τυπικό νουκλεόσωμα αντικαθίσταται κάθε 1-2 ώρες στο DNA εντός του κυττάρου.

Τα κύτταρα περιέχουν δεκάδες διαφορετικά εξαρτώμενα από το ATP σύμπλοκα αναδιάταξης της χρωματίνης, τα οποία εξειδικεύονται σε διαφορετικούς ρόλους. Τα περισσότερα είναι μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία περιέχουν 10

ή περισσότερες υπομονάδες, ορισμένες εκ των οποίων προσδένονται σε συγκεκριμένες τροποποιήσεις στις ιστόνες. Η δραστηριότητα αυτών των συμπλόκων τελεί υπό προσεκτικό έλεγχο σε κυτταρικό επίπεδο. Καθώς η μεταγραφή των γονιδίων ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται, τα σύμπλοκα αναδιάταξης της χρωματίνης δρουν τοπικά σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, όπου μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης. Παρόλο που ορισμένες αλληλουχίες DNA συνδέονται σταθερότερα από άλλες στο νουκλεοσωμικό πυρήνα, ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει την τοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων φαίνεται να είναι η παρουσία άλλων σταθερά προσδεδμένων πρωτεϊνών στο DNA. Ορισμένες προσδεδμένες πρωτεΐνες ευνοούν το σχηματισμό παρακείμενου νουκλεοσώματος, ενώ άλλες εμποδίζουν τα νουκλεοσώματα να μετακινηθούν σε άλλη περιοχή. Συνεπώς, οι ακριβείς θέσεις των νουκλεοσωμάτων στο DNA εξαρτώνται από την παρουσία και τη φύση άλλων πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται με το DNA. Η διάταξη των νουκλεοσωμάτων στο DNA είναι ιδιαίτερα δυναμική και μεταβάλλεται ταχέως ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου [118].

4.5. Η διάταξη των νουκλεοσωμάτων στη χρωματίνη – η ιστόνη H1

Η χρωματίνη στα ζωντανά κύτταρα μόνο σπάνια εμφανίζει την κομβολογιοειδή μορφολογία που περιγράφηκε ανωτέρω. Αντίθετα, τα νουκλεοσώματα τοποθετούνται το ένα επάνω στο άλλο, σχηματίζοντας διατάξεις στις οποίες το DNA είναι ακόμα περισσότερο συμπυκνόμενο. Για παράδειγμα, όταν οι πυρήνες λύονται ήπια και εξετάζονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η παρατηρούμενη χρωματίνη έχει τη μορφή ινών διαμέτρου περίπου 30 nm, η οποία είναι σημαντικά φαρδύτερη από τη μορφολογία του κομβολογίου. Ο τρόπος με τον οποίο τα νουκλεοσώματα οργανώνονται σε συμπυκνμένες διατάξεις είναι ασαφής. Η δομή ενός τετρανουκλεοσώματος (συμπλόκου τεσσάρων νουκλεοσωμάτων) αναδείχθηκε από

τη μελέτη αναδιαμορφωμένης χρωματίνης με κρυσταλλογραφία με τη χρήση ακτίνων Χ και με ηλεκτρονική μικροσκόπηση υψηλής ανάλυσης. Η τετρανουκλεοσωμική δομή έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο zigzag για τον τρόπο με τον οποίο στοιβάζονται τα νουκλεοσώματα σε ίνες πάχους 30 nm (**Εικόνα 4**). Εντούτοις, η κρυστοηλεκτρονική μικροσκόπηση ειδικά παρασκευασμένων πυρήνων έχει δείξει ότι οι περισσότερες περιοχές της χρωματίνης έχουν λιγότερο τακτική δομή.

Η διάταξη των νουκλεοσωμάτων σε στίβες περιλαμβάνει συνδέσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων που περιλαμβάνουν τις ουρές των ιστονών, κυρίως την ουρά της ιστόνης H4 (**Εικόνα 5**). Άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η ύπαρξη επιπρόσθετης ιστόνης η οποία συχνά είναι παρούσα σε αναλογία 1 προς 1 ως προς τους πυρήνες των νουκλεοσωμάτων και είναι γνωστή ως ιστόνη H1. Η ιστόνη H1 είναι γνωστή ως συνδετική ιστόνη, είναι μεγαλύτερη από της ιστόνες των πυρηνικών σωματίων των νουκλεοσωμάτων και είναι λιγότερο συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Ένα μόριο ιστόνης H1 συνδέεται με κάθε νουκλεόσωμα, ερχόμενο σε επαφή με το DNA και τις πρωτεΐνες, αλλάζοντας τη διαδρομή του DNA καθώς εξέρχεται από το νουκλεόσωμα. Η αλλαγή στη διαδρομή εξόδου του DNA θεωρείται ότι συνεισφέρει στη σύμπτυξη του νουκλεοσωμικού DNA (**Εικόνα 6**).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ιστονών H1 στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η τριμερής τους δομή, με τις βασικές N-τελικές και C-τελικές ουρές στα πλάγια και την κεντρική, σφαιρική, υδρόφοβη περιοχή. Η σφαιρική περιοχή είναι εξελικτικά συντηρημένη, ενώ οι N- και C-τελικές ουρές ποικίλλουν, τόσο σε μήκος όσο και σε αμινοξική σύσταση ανάμεσα στους οργανισμούς, καθώς επίσης ανάμεσα στους υπότυπους του ίδιου οργανισμού [125].

Οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί παράγουν διάφορους τύπους ιστόνης H1, οι οποίες έχουν παρόμοιες, αλλά διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες. Η παρουσία πολλών άλλων πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA, καθώς επίσης

πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται απευθείας με τις ιστόνες, προσθέτει σημαντικά χαρακτηριστικά σε κάθε συστοιχία νουκλεοσωμάτων [67].

4.6. Ομοιοπολικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμικών ιστονών

Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων των τεσσάρων ιστονών στον πυρήνα του νουκλεοσώματος υπόκεινται σε αξιοσημείωτη ποικιλία ομοιοπολικών τροποποιήσεων, που περιλαμβάνουν την ακετυλίωση των λυσινών, τη μόνο-, δι- και τριμεθυλίωση των λυσινών και τη φωσφορυλίωση των σερινών (**Εικόνα 7**). Μεγάλος αριθμός αυτών των τροποποιήσεων των πλευρικών ομάδων συμβαίνουν στις οκτώ N-τελικές «ιστονικές ουρές», οι οποίες εκτείνονται επί τα εκτός του νουκλεοσώματος (**Εικόνα 8**). Ωστόσο, υπάρχουν περισσότερες από 20 ειδικές τροποποιήσεις πλευρικών ομάδων στο σφαιρικό πυρήνα του νουκλεοσώματος.

Όλοι οι ανωτέρω τύποι τροποποιήσεων είναι αναστρέψιμοι. Ένα ένζυμο χρησιμεύει για συγκεκριμένο τύπο τροποποίησης, ενώ άλλο ένζυμο τον απομακρύνει. Τα ένζυμα αυτά είναι εξαιρετικά εξειδικευμένα, π.χ. οι ακετυλομάδες προστίθενται στις λυσίνες από διαφορετικές ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (histone acetyl transferases, HATs) και απομακρύνονται από διάφορα σύμπλοκα αποακετυλασών των ιστονών (histone deacetylase complexes, HDACs). Ομοίως, οι μεθυλομάδες προστίθεται στις πλευρικές ομάδες λυσινών από διάφορες μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών και απομακρύνονται από διαφορετικές απομεθυλάσες των ιστονών. Κάθε ένζυμο επιστρατεύεται σε συγκεκριμένες θέσεις της χρωματίνης σε καθορισμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια ζωής ενός κυττάρου. Κατά κύριο λόγο, αρχικά η δράση του ενζύμου εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι παράγονται σε διαφορετικούς χρόνους και εντοπίσεις κατά τη ζωή ενός οργανισμού, καθορίζοντας επομένως πότε και πού τα ένζυμα που τροποποιούν τη χρωματίνη θα δράσουν. Με αυτόν τον τρόπο, η

αλληλουχία του DNA τελικά καθορίζει το πώς οι ιστόνες θα τροποποιηθούν. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων μπορούν να παραμείνουν παρούσες για αρκετό καιρό μετά την εξαφάνιση των μεταγραφικών παραγόντων, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο στο κύτταρο μνήμη της αναπτυξιακής του ιστορίας. Αυτή η μνήμη μπορεί μάλιστα να μεταβιβαστεί από μία γενιά στην επόμενη.

Διαφορετικά πρότυπα ομοιοπολικών τροποποιήσεων ανευρίσκονται σε διαφορετικές ομάδες νουκλεοσωμάτων, με βάση την ακριβή θέση των τελευταίων στο γονιδίωμα αλλά και το ιστορικό του κυττάρου. Οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζονται με προσοχή και έχουν σημαντικές συνέπειες. Η ακετυλίωση των λυσινών στις N-τελικές ουρές χαλαρώνει τη δομή της χρωματίνης, εν μέρει διότι η προσθήκη μιας ακετυλομάδας στη λυσίνη αναιρεί το θετικό της φορτίο, με αποτέλεσμα να ελαττώνει την έλξη των ιστονικών ουρών προς τα παρακείμενα νουκλεοσώματα. Ωστόσο, οι σημαντικότερες επιδράσεις των τροποποιήσεων των ιστονών συνίστανται στη δυνατότητά τους να προσελκύουν άλλες πρωτεΐνες στην τροποποιημένη θέση της χρωματίνης. Η τριμεθυλίωση μιας συγκεκριμένης λυσίνης στην ουρά της ιστόνης H3, για παράδειγμα, προσελκύει την πρωτεΐνη HP1 (heterochromatin-specific protein 1) και συνεισφέρει στη δημιουργία και επέκταση της ετεροχρωματίνης. Γενικότερα, οι πρωτεΐνες που προσελκύνονται αλληλεπιδρούν με τις ιστόνες και καθορίζουν το πώς και πότε τα γονίδια θα εκφραστούν, ενώ επίσης συμμετέχουν και σε άλλες χρωμοσωμικές λειτουργίες. Με αυτόν τον τρόπο, η ακριβής δομή κάθε περιοχής της χρωματίνης ρυθμίζει την ανάγνωση της γενετικής πληροφορίας που περιέχει και συνεπώς τη δομή και τη λειτουργία του ευκαρυωτικού κυττάρου.

4.7. Ο ρόλος των ιστονικών παραλλαγών (variants), η αλληλεπίδρασή τους με τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις και ο κώδικας των ιστονών

Εκτός από τις τέσσερις υψηλά συντηρημένες νουκλεοσωμικές ιστόνες, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ιστονικές παραλλαγές (variants) που επίσης μπορούν να συναρμολογηθούν στα νουκλεοσώματα. Αυτές οι ιστόνες είναι παρούσες σε πολύ μικρότερες ποσότητες σε σχέση με τις κύριες ιστόνες και είναι λιγότερο συντηρημένες κατά τη μακρά περίοδο της εξέλιξης. Παραλλαγές έχουν αναγνωριστεί για καθεμία από τις νουκλεοσωμικές ιστόνες με εξαίρεση την ιστόνη H4 (**Εικόνα 9**).

Οι κύριες ιστόνες συντίθενται πρωτίστως κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου και συναρμολογούνται σε νουκλεοσώματα στις θυγατρικές DNA έλικες πίσω από την αγκύλη αντιγραφής. Αντιθέτως, οι περισσότερες ιστονικές παραλλαγές συντίθενται κατά τη διάρκεια της μεσόφασης. Συχνά εισάγονται σε ήδη σχηματισμένη χρωματίνη και η διαδικασία ανταλλαγής των ιστονών καταλύεται από εξαρτώμενα από το ATP σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τα σύμπλοκα αυτά περιέχουν υπομονάδες οι οποίες τους επιτρέπουν να προσδένονται τόσο σε συγκεκριμένες θέσεις στη χρωματίνη όσο και σε πρωτεΐνες συνοδούς των ιστονών που μεταφέρουν συγκεκριμένη ιστονική παραλλαγή. Ως αποτέλεσμα, κάθε ιστονική παραλλαγή εισάγεται στη χρωματίνη με εξαιρετικά εκλεκτικό τρόπο.

Ο αριθμός των πιθανών διακριτών σημάνσεων πάνω σε ένα νουκλεόσωμα είναι εξαιρετικά μεγάλος και η πιθανότητα για ποικιλομορφία είναι ακόμα μεγαλύτερη όταν στα νουκλεοσώματα περιλαμβάνονται επίσης ιστονικές παραλλαγές. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών παρατηρούνται ως συντονισμένα σύνολα. Περισσότερα από 15 τέτοια σύνολα μπορούν να ταυτοποιηθούν στα

κύτταρα των θηλαστικών, ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστό πόσο διαφορετικοί τύποι χρωματίνης έχουν λειτουργική σημασία στα κύτταρα.

Ορισμένοι συνδυασμοί έχουν συγκεκριμένη σημασία για το κύτταρο, με την έννοια ότι καθορίζουν πότε και πώς θα αποκτηθεί πρόσβαση στο συμπυκνόμενο DNA των νουκλεοσωμάτων, ώστε να συμβούν διεργασίες σε αυτό. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ιδέα του «κώδικα των ιστονών». Για παράδειγμα, ένας τύπος σημάτων δηλώνει ότι μια περιοχή της χρωματίνης έχει αντιγραφεί πρόσφατα, άλλες σημάσεις δηλώνουν ότι το DNA σε συγκεκριμένη περιοχή έχει υποστεί βλάβη και χρήζει επιδιόρθωσης, ενώ άλλες σημάσεις υποδεικνύουν πότε και πώς η γονιδιακή έκφραση πρέπει να λάβει χώρα.

Αρκετές ρυθμιστικές πρωτεΐνες περιέχουν μικρές περιοχές που προσδένονται σε συγκεκριμένες σημάσεις, αναγνωρίζοντας, για παράδειγμα, μια τριμεθυλιωμένη λυσίνη 4 στην ιστόνη H3 (**Εικόνα 10**). Οι περιοχές αυτές σε μεγάλες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα αναγνωρίζουν συγκεκριμένο συνδυασμό τροποποιήσεων των ιστονών. Το αποτέλεσμα είναι ένα σύμπλοκο ανάγνωσης, το οποίο επιτρέπει σε συγκεκριμένους συνδυασμούς σημάτων της χρωματίνης να προσελκύουν επιπρόσθετες πρωτεΐνες, ώστε να εκτελεστούν οι κατάλληλες βιολογικές λειτουργίες κατά την κατάλληλη χρονική στιγμή.

Οι σημάσεις στα νουκλεοσώματα λόγω των ομοιοπολικών τροποποιήσεων είναι δυναμικές και συνεχώς απομακρύνονται ή προστίθεται με ρυθμό που εξαρτάται από την εντόπισή τους στα χρωμοσώματα. Επειδή οι ιστονικές ουρές εκτείνονται επί τα εκτός του νουκλεοσωμικού πυρήνα και μπορούν να είναι προσβάσιμες ακόμα και όταν η χρωματίνη είναι συμπυκνόμενη, θα μπορούσαν να είναι ένας εξαιρετικά κατάλληλος τρόπος δημιουργίας σημάτων, ο οποίος μπορεί να μεταβληθεί όταν ένα κύτταρο χρειάζεται αλλαγές. Παρόλο που πολλά σημεία ακόμα απομένουν να διερευνηθούν, παραδείγματα πληροφοριών που κωδικοποιούνται στην ουρά της ιστόνης H3 παρατίθενται στην **Εικόνα 11**, συμπεριλαμβανομένης της τριμεθυλίωσης

της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 (H3K9me3) [118], η οποία εξετάζεται ενδελεχώς στην παρούσα διατριβή.

4.8. Οι μεθυλοτρανσφεράσες SETDB1 και SUV39H1

Στους οργανισμούς, από το ζυμομύκητα *Schizosaccharomyces pombe* ως και τον άνθρωπο, η πλούσια σε επαναλήψεις, ιδιοσυστασιακή ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από τη δι- και τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9 (H3K9me2 και H3K9me3, αντίστοιχα) [126-128]. Αυτές οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις καταλύονται από μία οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών που φέρουν την περιοχή SET. Στα θηλαστικά στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται πέντε μέλη: η SETDB1 και τα σχετικά ένζυμα SUV39H1 και SUV39H2 συνεισφέρουν στο σχηματισμό των H3K9me2 και H3K9me3 [126,129], ενώ οι GLP και G9a (γνωστές επίσης ως EHMT1 και EHMT2, αντίστοιχα) καταλύουν το σχηματισμό των H3K9me1 και H3K9me2 [130-132].

Οι μεθυλοτρανσφεράσες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των H3K9me2 και H3K9me3 απαιτούνται επίσης για τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε CpG δινουκλεοτίδια και τα χαμηλά επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών, που αποτελούν δύο σημαντικά γνωρίσματα της ετεροχρωματίνης [133,134]. Αντιθέτως, η ειδική για τον κυτταρικό τύπο αναστολή πολλών γονιδίων απαιτεί την τριμεθυλίωση διαφορετικού υπολείμματος λυσίνης στην ιστόνη H3, δηλαδή της λυσίνης 27 (H3K27me3), η οποία καταλύεται από το σύμπλοκο Polycomb repressive complex 2 (PRC2) [135-138]. Αυτός ο τρόπος «προαιρετικής» σίγασης απαντάται συχνά σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων που καθορίζουν την κυτταρική σειρά, όπως τα ομοιωτικά γονίδια της οικογένειας HOX [139,140].

4.9. Μοριακή φυσιολογία της H3K9me3

Οι H3K9me2/me3 συνδέονται με την αντίστοιχη περιοχή (chromodomain) της πρωτεΐνης HP1 (heterochromatin-specific protein 1), επάγοντας ένα επεκτεινόμενο κύμα περαιτέρω τριμεθυλιώσεων στη λυσίνη 9 και περαιτέρω πρόσδεση της πρωτεΐνης HP1 σύμφωνα με το γενικό σχήμα της **Εικόνας 12** [118]. Η HP1 σχηματίζει ομο-ολιγομερή και προσελκύει ανασταλτικούς τροποποιητές των ιστονών, με τελικό αποτέλεσμα τη σύμπτυξη και επέκταση της ετεροχρωματίνης. Σημειώνεται ότι ανιχνεύονται τρεις ισομορφές της HP1 στα θηλαστικά [141-143]. Ωστόσο, επίσης σημαντική στη διαδικασία αυτή είναι η συνεργική τριμεθυλίωση της N-τελικής ουράς της ιστόνης H4 στη λυσίνη 20 (H4K20me3) [118].

Η παρουσία της H3K27me3 στους υποκινητές των γονιδίων συσχετίζεται στενά με την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης [139,144], όμως έχειδειχθεί ότι οι σηματοδοτούμενοι με H3K27me3 υποκινητές παραμένουν προσβάσιμοι για την πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων αλλά της RNA πολυμεράσης που διατελεί σε παύση [145,146]. Αντιθέτως, η παρουσία της H3K9me3 στη χρωματίνη αποκλείει τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, σε διάφορες περιοχές πρόσδεσης στο DNA [147]. Φαίνεται λοιπόν ότι η σίγαση που επάγεται από την H3K9me3 είναι μηχανιστικά διαφορετική σε σχέση με εκείνη που επιφέρει η H3K27me3, βάσει της δυνατότητας πρόσβασης άλλων παραγόντων στη χρωματίνη [148].

Η ελάττωση της μη προσβάσιμης σεσημασμένης με H3K9me3 ετεροχρωματίνης όχι μόνο επιταχύνει τη μετατροπή στην πολυδύναμη κατάσταση ευοδώνοντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, αλλά επίσης φαίνεται να είναι σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της πολυδύναμης κατάστασης. Με τη χρήση ηλεκτρονικής φασματοσκοπικής απεικόνισης, έχουν αναγνωριστεί αξιοσημείωτες διαφορές στη σύμπτυξη της χρωματίνης ανάμεσα στα εμβρυονικά επιβλαστικά κύτταρα και τα ακόλουθα στάδια ανάπτυξης, τα οποία έχουν πλέον

περιοριστεί σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (πρωταρχικό ενδόδερμα και τροφοεξώδερμα): τα πρώτα χαρακτηρίζονται από διασκορπισμένο δίκτυο ινιδίων 10 nm ενώ τα δεύτερα από δομές έντονα συμπυκνόμενης χρωματίνης [149,150]. Αντίστοιχα, στα εμβρυονικά πολυδύναμα κύτταρα του ποντικού, παρατηρείται ελάττωση του αριθμού των πυρηνικών τόπων που χρωματίζονται θετικά για την H3K9me3 [151].

Παρόλο που η H3K9me3 έχει κυρίως μελετηθεί στα πλαίσια της ιδιοσυστασιακής ετεροχρωματίνης, μελέτες χαρτογράφησης σε ολόκληρο το γονιδίωμα έχουν καταστήσει σαφή επίσης το ρόλο της στην ειδική για τον κυτταρικό τύπο ρύθμιση της προαιρετικής ετεροχρωματίνης [144,152-154]. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα του ανθρώπου, η H3K9me3 σχηματίζει μεγάλες, συνεχόμενες περιοχές, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται ανάμεσα σε κλίμακες kilobase έως megabase [144,147,152]. Αυτές οι περιοχές επεκτείνονται κατά τη μετάβαση από την πολυδύναμη στη διαφοροποιημένη κατάσταση και περιλαμβάνουν πολυάριθμα γονίδια των οποίων η έκφραση αναστέλλεται με τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό τύπο [144]. Ειδικότερα, παρατηρείται εμπλουτισμός για την H3K9me3 σε συγκεκριμένες συστοιχίες γονιδιακών οικογενειών, όπως εκείνη των μεταγραφικών παραγόντων δακτύλων ψευδαργύρου, των οσφρητικών υποδοχέων και γονιδίων που σχετίζονται με τους οσφρητικούς υποδοχείς (σε μη νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους) [144,152,153]. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει ότι η H3K9me3 προστατεύει τις επαναλαμβανόμενες γονιδιακές συστοιχίες από μη επιτρεπτό αναδιπλασιασμό που προσομοιάζει με τις μη κωδικοποιούσες επαναλήψεις, ενώ παράλληλα αναστέλλει τη γονιδιακή μεταγραφή. Οι περιοχές H3K9me3 είναι σε μεγάλο βαθμό αμοιβαίως αποκλειόμενες με τις περιοχές H3K27me3, οι οποίες επίσης επεκτείνονται κατά την ανάπτυξη [144,155,156], γεγονός το οποίο υποδεικνύει τις διαφορετικές λειτουργίες των δύο αυτών δεικτών, παρόλο που

ορισμένοι αναπτυξιακοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να υποστούν και τις δύο τροποποιήσεις [144].

Η σχετική ανασταλτική διμεθυλίωση, η H3K9me2 επίσης σχηματίζει περιοχές μεγέθους μεγαβάσεων (megabase) οι οποίες εμπεριέχουν γονίδια. Οι εν λόγω περιοχές ονομάζονται LOCKs (Large Organized Chromatin K9-modifications) [157]. Σημειώνεται ότι θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα CTCF ανιχνεύθηκαν στα όρια αυτών των μεγάλων περιοχών, εύρημα που υποδηλώνει ότι η παρουσία αυτών των περιοχών σχετίζεται με δομές χρωματίνης υψηλότερης τάξεως οι οποίες συντηρούνται από τον CTCF [157]. Στη βιβλιογραφία υπάρχει διχογνωμία σχετικά με το κατά πόσον τα όρια των περιοχών H3K9me2 επεκτείνονται κατά τη μετάβαση από την πολυδύναμη στη διαφοροποιημένη κατάσταση [157-159]. Ορισμένες ομάδες προτείνουν ένα μοντέλο κυρίως αμετάβλητων περιοχών κατά την ανάπτυξη, υποστηρίζοντας τοπική ενίσχυση της H3K9me2 μόνο σε συγκεκριμένα γονίδια [159]. Ωστόσο, η σήμανση διμεθυλίωσης είναι σημαντική για τη σίγαση γονιδίων που δεν αρμόζουν στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά κατά τη διαφοροποίηση [157,159,160] και μελέτες ποσοτικοποίησης με φασματομετρία μάζας έχουν δείξει αύξηση των H3K9me3 και H3K9me2 σε ινοβλάστες του ποντικίου σε σχέση με τα πολυδύναμα κύτταρα [161]. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το πρότυπο της H3K9me2/3 ποικίλλει ανάλογα με την κυτταρική ταυτότητα και πρέπει να επαναρυθμιστεί, όταν το κύτταρο ακολουθεί νέες πορείες διαφοροποίησης.

4.10. Μοριακή φυσιολογία της H4K20me3

Η μεθυλίωση της ιστόνης H4 ήταν μία από τις πρώτες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών που ανακαλύφθηκαν, περίπου μισό αιώνα πριν, όμως τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση ανακαλύφθηκαν πρόσφατα [162-164]. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η μεθυλίωση της ιστόνης H4 κυρίως ανιχνεύεται στη λυσίνη 20 της N-τελικής ουράς (H4K20). Η εν λόγω μεθυλίωση είναι εξελικτικά συντηρημένη

από το ζυμομύκητα ως τον άνθρωπο [164,165] και περιλαμβάνει τρία διακριτά επίπεδα, ήτοι τη μόνο-, δι- και τριμεθυλίωση. Καθένα από τα επίπεδα έχει διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Η μόνο- (H4K20me1) και διμεθυλιωμένη H4K20 (H4K20me2) εμπλέκονται στην αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA, ενώ η τριμεθυλιωμένη H4K20 (H4K20me3) είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των περιοχών ετεροχρωματίνης που έχουν υποστεί σίγαση. Στα θηλαστικά, τα διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης της H4K20 προκύπτουν από διακριτά ένζυμα. Υπάρχει μόνο μία γνωστή μονο-μεθυλοτρανσφεράση, η SET8 (επίσης γνωστή ως PR-SET7 ή SETD8) [162,163] και διάφορες δι- και τρι-μεθυλοτρανσφεράσες, εκ των οποίων οι SUV4-20H1 και SUV4-20H2 καταλύουν κατά κύριο λόγο τις τελευταίες δύο τροποποιήσεις [164,166].

Οι μελέτες φασματομετρίας μάζας σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα έχουν δείξει ότι η H4K20me2 είναι η πλέον επικρατούσα μεθυλίωση στην ιστόνη H4, ευρισκόμενη σε περίπου 80% του συνόλου των μορίων της [166,167]. Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, μόνο ελάχιστη ποσότητα της H4K20me1 και me3 είναι παρούσες, καθώς επίσης μικρή ποσότητα μη τροποποιημένης ιστόνης H4. Οι μετρήσεις αυτές αντικατοπτρίζουν τη συμμετοχή της ιστόνης H4 στη δυναμική κατάσταση ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταβολές στα επίπεδα της H4K20me1 είναι εξαιρετικά έντονες. Τα επίπεδά της ελαττώνονται κατά τη διάρκεια της φάσης G1, με αποτέλεσμα η ποσότητα της H4K20me1 να είναι πολύ χαμηλή στην αρχή της φάσης S. Στη συνέχεια, η H4K20me1 συσσωρεύεται κατά τις φάσεις S και G2, εμφανίζοντας τα μέγιστα επίπεδά της στη φάση M [167,168]. Αυτή η εξαρτώμενη από τον κυτταρικό κύκλο ρύθμιση αντανακλάται στη διαθεσιμότητα του ενζύμου SET8. Στις φάσεις G1 και S, η πρωτεολυτική αποδόμηση διατηρεί τη SET8 σε χαμηλά επίπεδα, ενώ το ένζυμο σταθεροποιείται στις φάσεις G2 και M, με αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα της H4K20me1 [168-173].

Οι H4K20me2 και me3 δεν εμφανίζουν θεαματικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και παραμένουν παρούσες καθ' όλη τη διάρκεια αυτού [167]. Στις εμβρυονικές ινοβλάστες του ποντικίου, η SUV4-20H1 φαίνεται να έχει την προτίμηση να επάγει την H4K20me2, ενώ η SUV4-20H2 κυρίως είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της H4K20me3. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι αμφότερα τα ένζυμα προτιμούν την H4K20me1 ως υπόστρωμα και ότι τα SUV4-20H ένζυμα μπορούν, in vivo, να μετατρέψουν τη διαμεσολαβούμενη από την SET8 H4K20me1 σε H4K20me2 και me3. Συνεπώς, η απώλεια αμφοτέρων των SUV4-20H ενζύμων οδηγεί σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα της H4K20me1 [166,174].

Η διαφορετική εντόπιση των H4K20me2 και me3 υποδεικνύει ότι αυτά τα δύο επίπεδα μεθυλίωσης έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Η H4K20me3 είναι εξαιρετικά πλούσια στην περικεντρική ετεροχρωματίνη, τα τελομερή, τις περιοχές γενετικής αποτύπωσης και τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, γεγονός που υποδεικνύει ότι η τροποποίηση αυτή συμμετέχει στη μεταγραφική σίγαση [164,175,176] Αντιθέτως, η H4K20me2, κατανέμεται ευρέως κατά μήκος του γονιδιώματος [164]. Παρόλο που τα πρότυπα της ανοσοκαθίζησης χρωματίνης με μαζική παράλληλη DNA αλληλούχιση (διαδικασία γνωστή ως ChIP-seq) δεν είναι διαθέσιμα, η αφθονία της H4K20me2 σε μεγάλο μέρος της χρωματίνης υποδεικνύει ότι αυτή η τροποποίηση δεν εμπλέκεται ειδικά στη ρύθμιση της μεταγραφής, αλλά σε γενικότερες διαδικασίες που εμπλέκουν τη χρωματίνη [174].

Η ακριβής διαδικασία αλληλοδιαδοχής των επιπέδων μεθυλίωσης της H4K20 κατά τον κυτταρικό κύκλο δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, όμως φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο της **Εικόνας 13**. Τα μιτωτικά χρωμοσώματα δεν είναι μόνο εμπλουτισμένα σε H4K20me1 κατά μήκος των χρωμοσωμικών βραχιόνων, αλλά περιέχουν επίσης H4K20me2. Τα H4K20me3 νουκλεοσώματα εντοπίζονται εκλεκτικά στην περικεντρική χρωματίνη των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Μετά τη μίτωση, τα επίπεδα της H4K20me1 ελαττώνονται, πιθανόν εξαιτίας της μετατροπής σε

H4K20me2 and H4K20me3 από τα ένζυμα SUV4-20H. Στην ετεροχρωματίνη, η πρωτεΐνη HP1 είναι παράγοντας στόχευσης της SUV4-20H2 για το σχηματισμό H4K20me3. Είναι προς το παρόν ασαφές αν υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί στόχευσης για την SUV4-20H1, οι οποίοι θα μετέφεραν αυτό το ένζυμο σε ευχρωματινικές περιοχές. Νωρίς κατά τη φάση G1, η πλειονότητα της H4K20me1 χάνεται λόγω της προοδευτικής της μεθυλίωσης σε H4K20me2 και H4K20me3, όμως ένα μικρό ποσοστό αυτής της τροποποίησης φαίνεται να προστατεύεται από τη μετατροπή. Κατά τη φάση S, η SET8 διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα και συνεπώς οι νεοσχηματιζόμενες ιστόνες έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης της H4K20. Κατά την όψιμη S/G2 φάση, όταν τα επίπεδα της SET8 αυξάνουν, η μη τροποποιημένη H4K20 υφίσταται μονομεθυλίωση από τη SET8. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η νέα μεθυλίωση προστατεύεται από περαιτέρω τροποποιήσεις διαμεσολαβούμενες από τα ένζυμα SUV4-20H, ωστόσο τα κύτταρα περάσουν τη μίτωση. Καθώς τα ένζυμα SUV4-20H δεν πρωτεολύονται κατά τη διάρκεια της G2/M φάσης, έχει υποτεθεί ότι πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί οι οποίοι προστατεύουν την H4K20me1 από τα ένζυμα SUV4-20H. Σημαντική πρωτεΐνη στο πλαίσιο αυτό φαίνεται να είναι η HCF1 (host cell factor 1), δεδομένου ότι η εξουδετέρωσή της (knockdown) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της H4K20me2 στα μιτωτικά χρωμοσώματα [177]. Εντούτοις ο τρόπος με τον οποίο η HCF1 προστατεύει τη H4K20me1 από περαιτέρω μετατροπή μέσω των ενζύμων SUV4-20H ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί. Επιπροσθέτως, η ενζυμική δραστηριότητα της SUV4-20H θα μπορούσε να ανασταλεί κατά τη φάση G2/M, π.χ. μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όμως αυτός ο ανασταλτικός μηχανισμός δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί και πρέπει μελλοντικά να διερευνηθεί περαιτέρω [174].

Η μεθυλίωση είναι σχετικά σταθερή τροποποίηση με χαμηλότερο ρυθμό απομάκρυνσης, σε σχέση με την ακετυλίωση ή τη φωσφορυλίωση. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστός τρόπος ενεργητικής απομάκρυνσης των H4K20me2 και

H4K20me₃, αντιθέτως η H4K20me₁ μπορεί να απομακρυνθεί την ιστονική απομεθυλάση PHF8 [178]. Μια λειτουργία της απομάκρυνσης της ανασταλτικής H4K20me₁ σε υποσύνολο υποκινητών γονιδίων που ρυθμίζονται μέσω του παράγοντα E2F1 είναι η στήριξη της μετάβασης του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S [179] και απομένουν να διερευνηθούν δράσεις της σε ποικιλία φυσιολογικών καταστάσεων. Εναλλακτικός τρόπος «απομάκρυνσης» της H4K20me₁ είναι η μετατροπή της σε υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [174].

4.11. Η ιστονική παραλλαγή H1x

Η χρωματίνη στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους διαφέρει στον αριθμό και στη σύνθεση των υποτύπων της συνδετικής ιστόνης H1. Έχει υποτεθεί ότι οι διαφορετικοί υπότυποι της ιστόνης H1 επιτελούν διακριτές λειτουργίες, οι οποίες όμως δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί [180-182].

Έχει αναγνωριστεί ποικιλία H1 υποτύπων στα θηλαστικά, πέντε εκ των οποίων είναι οι κύριοι υπότυποι. Οι H1.2, H1.3, H1.4 και H1.5 εντοπίζονται σε όλα τα σωματικά κύτταρα, ενώ ο πέμπτος, γνωστός ως H1.1, περιορίζεται στο θύμο, τον όρχι και το σπλήνα, καθώς επίσης πιθανώς σε λεμφοκύτταρα και νευρικά κύτταρα [183-185]. Αυτοί οι κύριοι υπότυποι εκφράζονται με τρόπο εξαρτώμενο από την αντιγραφή του DNA [181,182]. Άλλος υπότυπος είναι ο υπότυπος αντικατάστασης H1.0, του οποίου η έκφραση είναι ανεξάρτητη της αντιγραφής και κυρίως εντοπίζεται σε κύτταρα τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται ή είναι τελικά διαφοροποιημένα [186-188].

Εκτός από τους ανωτέρω σωματικούς υποτύπους, υπάρχουν ιστοειδικοί και ειδικοί για τη γεννητική σειρά υπότυποι [189,190]. Αυτοί είναι οι ειδικοί για τα γεννητικά κύτταρα του άρρενος H1t και H1T2 [188,191], η ειδική για τις σπερματίδες

H1-like πρωτεΐνη HILS1 [192] και ο υπότυπος H1Foo, ο οποίος εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο, το ζυγωτό και το πολύ πρώιμο έμβρυο [193,194].

Το cDNA για την παραλλαγή (υπότυπο) H1x κλωνοποιήθηκε το 1996. Το mRNA του είναι πολυαδενυλιωμένο, εύρημα το οποίο υποδεικνύει ότι είναι υπότυπος ανεξάρτητος της αντιγραφής του DNA. Επιπροσθέτως, η αποτύπωση κατά Northern έδειξε ότι η H1x εκφραζόταν σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν [195,196]. Το γονίδιο H1x στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3, στη ζώνη 3q13.1-q13.2 [197], γεγονός το οποίο δείχνει ότι, κατ' αναλογία με το γονίδιο αντικατάστασης H1.0, το γονίδιο της H1x δεν εκφράζεται στο πλαίσιο της συστάδας των κύριων ιστονών που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και η οποία περιέχει τους πέντε σωματικούς υποτύπους της H1 και τον ειδικό για τον όρχι υπότυπο H1t. Όμως η ρύθμιση των γονιδίων H1x και H1.0 δεν γίνεται με τον ίδιο τρόπο [196].

Η κατανομή της H1x εντός του πυρήνα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο κατά τη φάση G1, ενώ κατανέμεται ομοιόμορφα στον πυρήνα κατά τις φάσεις S και G2 [198]. Η ανοσοκυτταροχημική ανάλυση της ενδοπυρηνισκικής H1x έχει δείξει ότι η H1x εντοπίζεται κυρίως στη συμπυκνωμένη πυρηνισκική χρωματίνη. Έχει συνεπώς υποτεθεί ότι η διαφορεική εντόπιση της H1x, δηλαδή η μετακίνησή της σε διαφορετικά πυρηνικά διαμερίσματα, επιτρέπει τη ρύθμιση της δραστηριότητας της H1x, αντί για ρύθμιση της αποδόμησης της πρωτεΐνης [198,199]. Σημειώνεται ότι η συνολική ποσότητα της H1x πρωτεΐνης παραμένει σχεδόν αμετάβλητη κατά την πρόοδο της φάσης S, γεγονός που έρχεται σε αντιδιαστολή με τους υποτύπους οι οποίοι εξαρτώνται από την αντιγραφή του DNA [198]. Κατά τη μίτωση σημειώνεται εντόπιση της H1x στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων, ενώ η εξουδετέρωση (knockdown) της H1x οδηγεί σε διαταραχές ευθυγράμμισης και αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση [189,200].

Ο ρόλος της ιστονικής παραλλαγής H1x παραμένει υπό διερεύνηση. Έχει βρεθεί η υψηλή της έκφραση στα νευροενδοκρινή κύτταρα και τους νευροενδοκρινείς όγκους στον άνθρωπο [201]. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές έχουν υποστηρίξει τη σημασία της κατά τις διεργασίες διαφοροποίησης στο έμβρυο [202]. Πρόσφατες μελέτες έχουν παρατηρήσει τη συσχέτιση της H1x με περιοχές κωδικοποιούσες, πλούσιες σε RNA πολυμεράση II και υπομεθυλιωμένες νησίδες CpG, υπογραμμίζοντας την πιθανή συμμετοχή της H1x στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [203].

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή - Σκοπός

Τα γλοιώματα είναι έντονα διηθητικά και αγγειοβριθή νεοπλάσματα, τα οποία αποτελούν περισσότερο από το 70% του συνόλου των όγκων του εγκεφάλου. Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις στη χειρουργική αντιμετώπιση, την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία, η επιβίωση των ασθενών με γλοιώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας παραμένει πενιχρή [204]. Η έλλειψη αποτελεσματικών θεραπευτικών επιλογών έχει προωθήσει την αναζήτηση δεικτών που θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν ομάδες ασθενών οι οποίες δυνητικά θα ωφεληθούν από μοριακά στοχευμένες θεραπείες. Έχει αναγνωριστεί η αλληλεπίδραση γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών κατά την παθογένεση και την εξέλιξη των γλοιωμάτων [205].

Οι επιγενετικές μεταβολές, σε αντίθεση με τις γενετικές, ορίζονται ως κληρονομικές αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης, οι οποίες δεν χαρακτηρίζονται από μεταβολή της αλληλουχίας του DNA. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την ομοιοπολική τροποποίηση των ιστονών, τη δυναμική αναδιάταξη των ιστονών και τα microRNAs [206]. Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται στενά με το μόριο του DNA [207]. Έρευνες κατά την τελευταία δεκαετία έχουν αποκαλύψει ότι ο ρόλος των ιστονών υπερβαίνει τη διατήρηση της δομής του DNA και περιλαμβάνει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της μεταβολής της σύμπτυξης του DNA [208]. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί πέντε οικογένειες ιστονών, οι H1, H2A, H2B, H3 και H4 [207]. Η οικογένεια H1 αντιστοιχεί στις συνδετικές ιστόνες, η οποίες είναι προσδεδωμένες στο συνδετικό DNA ανάμεσα στους πυρήνες των νουκλεοσωμάτων [209,210]. Η εν λόγω οικογένεια περιλαμβάνει 11 υποτύπους πρωτεϊνών πλούσιων σε λυσίνη, των οποίων η λειτουργία εξασφαλίζει την ακεραιότητα του γονιδιώματος και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στις διαδικασίες της γήρανσης, της επιδιόρθωσης του DNA, της

μεθυλίωσης του DNA, της γονιδιακής αποτύπωσης και της απόπτωσης [211,212]. Οι ιστόνες H3 και H4, καθώς επίσης οι H2A και H2B, ανήκουν στην ομάδα των νουκλεοσωμικών ιστονών και σχηματίζουν οκταμερή, γύρω από τα οποία τυλίγεται το DNA, σχηματίζοντας το νουκλεόσωμα [213]. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του αμινοτελικού άκρου των ιστονών αυτών (HPTMs) αποτελούν τον κώδικα των ιστονών, με σημαντική επίδραση στη στερεοδιαμόρφωση της χρωματίνης, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [214]. Μεταξύ των διάφορων τύπων ομοιοπολικών τροποποιήσεων των αμινοξέων στα άκρα των ιστονών, που περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, τη μεθυλίωση, τη φωσφορυλίωση, την ουβικιτίνωση και την SUMOύλίωση, η μεθυλίωση της λυσίνης (K) προεξάρχει, με τη δυνατότητα να ενεργοποιεί ή να αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων, ανάλογα με το ποιο υπόλειμμα αμινοξέος στην ιστόνη είναι μεθυλιωμένο [215]. Συγκεκριμένα, η τριμεθυλίωση των H3K9 και H4K20 σχετίζεται με τη σίγαση της μεταγραφής, προάγοντας την αλληλεπίδραση των τροποποιημένων ιστονών με την πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης-1 [213,216,217]. Η μεθυλίωση της λυσίνης των ιστονών ρυθμίζεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες λυσίνης των ιστονών (histone lysine methyltransferases, HKMTs) και τις απομεθυλάσες (HKDMs) [205]. Οι HKMTs οι οποίες καταλύουν την τριμεθυλίωση της H3K9 (H3K9me3) περιλαμβάνουν την οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών που φέρουν την περιοχή SET, μεταξύ των οποίων οι HKMTs, SETDB1 και SUV39H1, καθώς επίσης η G9A.

Η SETDB1 (SET domain bifurcated 1) είναι η μόνη μεθυλοτρανσφεράση ευχρωματινικής προέλευσης η οποία επίσης μπορεί να διαμεσολαβήσει την τριμεθυλίωση της H3K9. Συνδέεται στενά με τη μεθυλίωση του DNA [218] και η άρτια λειτουργία της θεωρείται αναγκαία για τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου των ποντικών [219]. Επιπρόσθετα, η καλύτερα χαρακτηρισμένη SUV39H1 και η ομόλογή της SUV39H2 απαιτούνται για το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης. Η διαμεσολαβούμενη από τη SUV39H1 μεθυλίωση της H3K9 έχει

συνδεθεί με τη σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, ενώ η φυσιολογική λειτουργία της είναι η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος μέσω του περιορισμού της οξείας ενεργοποίησης ογκογονιδίων [220]. Η απορρύθμιση της SUV39H1 έχει συσχετισθεί με τον ογκογόνο φαινότυπο σε αρκετές ανθρώπινες κακοήθειες [205]. Η αναστρέψιμη φύση της μεθυλίωσης των ιστονών από χημικούς αναστολείς ή απομεθυλιωτικά ένζυμα αποτελεί ελκυστική θεραπευτική προσέγγιση για σειρά σοβαρών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ο ειδικός αναστολέας της SUV39H1, chaetocin έχει αναφερθεί ότι ελαττώνει τη μεθυλίωση της H3K9, επιφέρει οξειδωτικό stress και δρα ως ισχυρός αντιμυελωματικός παράγοντας *in vitro* και *in vivo* [221].

Μέχρι σήμερα υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία αναφορικά με το ρόλο των μεθυλοτρανσφερασών και της μεθυλίωσης λυσίνης των ιστονών στην παθογένεση των αστροκυτταρικών όγκων. Σε πρόσφατη μελέτη 284 γλοιωμάτων, τριμεθυλίωση της H3K9 βρέθηκε σε όλους τους βαθμούς κακοήθειας των αστροκυτταρικών όγκων [215]. Επιπροσθέτως, οι Spygoroulou et al. [222] βρήκαν αυξημένη έκφραση των SETDB1 και SUV39H1 σε 15 ιστούς γλοιωμάτων σε σύγκριση με το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό. Η πιθανή σημασία της H1.0 ιστονικής παραλλαγής έχει προταθεί μόλις πρόσφατα βάσει των ευρημάτων μικρής σειράς ασθενών με αστροκύτωμα [223]. Η έλλειψη πληροφοριών από αυτήν την άποψη μας ώθησε να διεξαγάγουμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση των H1x, H3K9me3, H4K20me3, SETDB1 και SUV39H1 σε μεγάλη σειρά αστροκυτταρικών όγκων, ώστε να διερευνήσουμε τις συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης αυτών των μορίων και την πιθανή τους σημασία στην ανάπτυξη των γλοιωμάτων. Η επαλήθευση των ευρημάτων της ανοσοϊστοχημείας για τις H3K9me3, H4K20me3 και H1x πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό και ιστό γλοιωμάτων, καθώς επίσης στην αστρογλοιακή κυτταρική σειρά SVG p12 και την κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος T98G. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση της

αναστολής της SUV39H1 από τη chaetocin, ως προς τον πολλαπλασιασμό, το σχηματισμό αποικιών και τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων T98G. Επίσης τα ανωτέρω μόρια αναλύθηκαν ως προς τη σχέση τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την επιβίωση των ασθενών.

2. Υλικό και Μέθοδος

2.1. Περιγραφή των ασθενών

Στη μελέτη περιελήφθησαν 101 ενήλικοι ασθενείς με υπερσκληνίδια διάχυτα διηθητικά αστροκυτώματα (βαθμού κακοήθειας II ως IV) για τους οποίους ήταν διαθέσιμο αρχεϊακό υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο κατά τη διάγνωση, πριν την ακτινο/χημειοθεραπεία. Οι ασθενείς προέρχονταν από τα Νοσοκομεία «Ευαγγελισμός», «Ασκληπιείο» και «Metropolitan» και διαγνώστηκαν μεταξύ 2003 και 2009. Τα ιστικά δείγματα των εν λόγω ασθενών εξετάστηκαν και ανασκοπήθηκαν στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Νοσοκομείο «Λαϊκό», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σε όλα τα περιστατικά οι διαγνώσεις και η εκτίμηση του βαθμού κακοήθειας αναθεωρήθηκαν βάσει των αρχών της τρέχουσας ταξινόμησης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO) [5]. Η διάκριση μεταξύ πρωτοπαθών (59 περιστατικά) και δευτεροπαθών (19 περιστατικά) γλοιοβλαστωμάτων βασίστηκε στα κριτήρια της WHO και την έκφραση της IDH1-R132H [5]. Γραπτή ενήμερη συγκατάθεση ελήφθη από όλους τους ασθενείς και η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (17/2/2012, αριθμός πρωτοκόλλου 5105). Πληροφορίες κατά την παρακολούθηση (follow-up) ήταν διαθέσιμες για 99 ασθενείς. Η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία αποτελούνταν από συνολική δόση 60 Gy σε 30 ως 33 μέρη-κλάσματα. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα θεραπευτικά πρωτόκολλα, χημειοθεραπεία δεν χορηγήθηκε στα περιστατικά που διαγνώστηκαν πριν το 2007. Ο Πίνακας 2 συνοψίζει τα δημογραφικά δεδομένα των ασθενών.

2.2. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών γλοιωμάτων και εφαρμογή chaetocin

Η SVG p12 (CRL-8621) ανθρώπινη αστρογλοιακή κυτταρική σειρά ελήφθη από το ATCC και η T98G ανθρώπινη Καυκάσια κυτταρική σειρά γλοιβλαστώματος (Cat. No: 92090213) ελήφθη από το ECACC. Αμφότερες οι κυτταρικές σειρές παραχωρήθηκαν ευγενώς από τον Robert W. Lea, Department of Biological Sciences, University of Central Lancashire, Preston, UK [205]. Τα κύτταρα SVG p12 καλλιεργήθηκαν στο υλικό Eagle's Minimum Essential Medium (Gibco, Life Technologies), το οποίο συμπληρώθηκε με 10% εμβρυικό βόειο ορό - FBS (Gibco, Life Technologies): 1% μείγμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 U/ml πενικιλίνης και 10.000 μg/ml στρεπτομυκίνης Gibco, Life Technologies): και 0,1% αντιμυκητιασικό fungizone (250 μg/ml Gibco, Life Technologies). Τα κύτταρα του γλοιώματος καλλιεργήθηκαν στο υλικό RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco, Life Technologies), το οποίο συμπληρώθηκε με 10% εμβρυικό βόειο ορό - FBS (Gibco, Life Technologies): 1% μείγμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 U/ml πενικιλίνης και 10.000 μg/ml στρεπτομυκίνης Gibco, Life Technologies): και 0,1% αντιμυκητιασικό fungizone (250 μg/ml Gibco, Life Technologies). Οι κυτταρικές σειρές φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 37°C σε υγρατοποιημένη ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂ - 95% αέρα.

Για την αναστολή της δραστηριότητας της SUV39H1, τα κύτταρα T98G καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία δώδεκα θέσεων και σε 70-80% συρροή/πληρότητα επώαστηκαν στην παρουσία ή την απουσία 200 nM και 400 nM chaetocin (Enzo lifesciences, GR-349-0200 ανασυντεθειμένου σε DMSO) για 12 και 24 ώρες σε 37°C σε 5% CO₂ υγραποιημένο αέρα. Κατά την επίτευξη των αντίστοιχων χρονικών σημείων, τα κύτταρα ελήφθησαν για εξαγωγή των πρωτεϊνών.

2.3. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε τομές παραφίνης πάχους 4 μm νεοπλασματικού ιστού μονιμοποιημένου σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεΰδης. Εν συντομία, έπειτα από αποπαραφίνωση και ενυδάτωση, στις τομές εφαρμόστηκε 3% H₂O₂ για 30 λεπτά, ώστε να εξουδετερωθεί η ενδογενής υπεροξειδάση και ύστερα ορός αναστολής. Η ανάκτηση του αντιγόνου πραγματοποιήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων στα 750W και στη συνέχεια τα πρωτογενή αντισώματα εφαρμόστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Λεπτομέρειες σχετικά με τις μεθόδους ανάκτησης και με τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (πηγή, αραιώσεις) παρατίθενται στον **Πίνακα 3**. Ακολούθως, εφαρμόστηκε σε δύο στάδια η τεχνική που βασίζεται σε πολυμερές συζευγμένο με την υπεροξειδάση (two-step peroxidase conjugated polymer technique) (DAKO inVISION kit K5007, DAKO, Carpinteria, CA) για 30 λεπτά. Προκειμένου να καταστεί ορατή η ανοσοδραστικότητα, χρησιμοποιήθηκε 3,3'-διαμινοβενιδίνη (DAB) ως υπόστρωμα ωσότου προκύψει η επιθυμητή ένταση σήματος. Η αιματοξυλίνη χρησιμοποιήθηκε ως αντίχρωση. Αρνητικοί μάρτυρες (τομές στις οποίες το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε από μη άνοσο ορό) επίσης χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε γύρο χρώσης. Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημείας τελέστηκε από τρεις παθολογοανατόμους (PK, GL, AS) χωρίς γνώση των κλινικών πληροφοριών. Η πυρηνική και κυτταροπλασματική ανοσοδραστικότητα βαθμολογήθηκαν χωριστά. Υπολογίστηκε ένα Histo-score (H-score) βάσει του ποσοστού ανοσοθετικών νεοπλασματικών κυττάρων (labelling index-LI) πολλαπλασιασμένου με την ένταση της χρώσης.

2.4. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η εξαγωγή των πρωτεϊνών από φυσιολογικό ιστό εγκεφάλου (3 δείγματα) και ιστούς γλοιωμάτων διάφορων βαθμών κακοήθειας (3 δείγματα από βαθμό κακοήθειας II και IV αντίστοιχα), την SVG p12 αστρογλοιακή κυτταρική σειρά και την T98G κυτταρική σειρά γλοιώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση RIPA ρυθμιστικού διαλύματος σε θερμοκρασία πάγου (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) και μείγματος αναστολέων πρωτεασών (Thermo Scientific). Η δοκιμασία κατά Bradford (Bio-Rad) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση πρωτεΐνης στα εκχυλίσματα. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Porablot NCP, Macherey-Nagel). Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1h σε θερμοκρασία δωματίου σε PBST (Phosphate Buffered Saline Tween-20) με 5% γάλα ελεύθερο λιπαρών. Ακολούθως, οι μεμβράνες επώαστηκαν ολονύχτια στους 4°C με τα παρακάτω πρωτογενή αντισώματα: anti-H1x, anti-H3K9me3, anti-H4K20me3 ή anti-Actin (MAB-1501, Millipore, Bedford, MA, USA). Τα αντισώματα έναντι στις H1x, H3K9me3 και H4K20me3 αραιώθηκαν 1:500 σε PBST που περιείχε 1% γάλα ελεύθερο λιπαρών, ενώ το αντίσωμα αντι-ακτίνης αραιώθηκε 1:5000 στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι μεμβράνες έπειτα επώαστηκαν με τα HRP-συζευγμένα δευτερογενή αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα αιγός αντι-κονίκλου IgG-HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) και αιγός αντι-ποντικού IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα 1:2500. Η ανίχνευση των ανοσοδραστικών ζωνών πραγματοποιήθηκε με το SuperSignal WestPico Chemiluminescent HRP Substrate kit (Thermo Scientific).

Οι σχετικές ποσότητες των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν με πυκνομετρική ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού Image J (La Jolla, CA, USA) και κανονικοποιήθηκαν στα αντίστοιχα επίπεδα ακτίνης. Όλα τα πειράματα τελέστηκαν τουλάχιστον 3 φορές και παρατίθενται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ενός πειράματος.

2.5. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Η αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού των T98G κυττάρων στην παρουσία ή την απουσία της chaetocin πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]. 12 ώρες και 24 ώρες μετά την εφαρμογή της ουσίας, τα κύτταρα T98G συνελέγησαν και επιστρώθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων εις τριπλούν όπου και διατηρήθηκαν ολονύχτια. Την επόμενη ημέρα, το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από το MTT (Sigma-Aldrich, Athens, Greece) αραιωμένο σε ελεύθερο ορού, ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης υλικό σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml, και τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον 3 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Μετά την επώαση με το αντιδραστήριο MTT, το προϊόν MTT-φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκε επιμελώς σε ισοπροπανόλη και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm με μήκος κύματος υποβάθρου στα 690 nm. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2.6. Δοκιμασία κλωνικής έκπτυξης

Τα T98G κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin (200 nM και 400 nM) για 12h τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 12 θέσεων σε πυκνότητα περίπου 500 κυττάρων ανά θέση και αφέθηκαν να σχηματίσουν αποικίες για 10-15 ημέρες. Τα κύτταρα έπειτα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα που περιείχε 25% οξικό οξύ και 75% μεθανόλη και ακολούθησε χρώση με αιματοξυλίνη για 20 λεπτά. Οι αποικίες μετρήθηκαν με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου (inverted microscope) και ακριβούς ηλεκτρονικού μετρητή.

2.7. Δοκιμασία μεταναστευτικής ικανότητας

Τα T98G κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 12 θέσεων (σε πυκνότητα 10×10^4 κυττάρων ανά θέση) και διατηρήθηκαν σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα 5% CO₂-95% αέρα στους 37°C. 20 ώρες μετά την εφαρμογή της chaetocin (200nM και 400nM), η μονοστιβάδα των κυττάρων «γδάρθηκε» με στείρο ρύγχος πιπέτας 200-μL (σημείο της μηδενικής μεταναστευτικής ικανότητας). Φρέσκο καλλιεργητικό υλικό προστέθηκε στα τρυβλία τα οποία επέστρεψαν στον επωαστήρα για επιπλέον 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση των 20 ωρών επώασης, τα δείγματα εκπλύθηκαν δύο φορές πολύ απαλά με PBS, pH 7,2. Κάθε διαμέρισμα-θέση φωτογραφήθηκε σε μεγεθύνσεις $\times 4$ και $\times 20$ με τη χρήση μικροσκοπίου υποβοηθούμενου από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Εικόνες αντίθεσης φάσης ελήφθησαν στην αρχή (0h) και μετά 20h επώασης για την ίδια περιοχή αρχικής εκδοράς. Οι εικόνες αναλύθηκαν με το λογισμικό WimScratch (Wimasis image analysis platform). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά περιοχών γδαρμένων (scratched) και καλυμμένων από κύτταρα.

2.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από βιοστατιστικό M.Sc. (GL). Κατά τη βασική στατιστική ανάλυση η έκφραση των H1x, SETDB1, H4K20me3, H3K9me3 και SUV39H1 αντιμετωπίστηκαν ως συνεχείς μεταβλητές. Οι συσχετίσεις των υπό εξέταση μορίων με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ελέγχθηκαν με χρήση μη παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών με διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις (Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U-test, Fisher's exact test και Spearman's rank correlation coefficient).

Η ανάλυση επιβίωσης τελέστηκε χρησιμοποιώντας το θάνατο από τη νόσο ως καταληκτικό σημείο. Η επίδραση διάφορων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (ηλικία, φύλο, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, έκταση χειρουργικής

εξαίρεσης και ιστολογικός βαθμός κακοήθειας) καθώς επίσης της ανοσοδραστικότητας των H1x, SETDB1, H4K20me3, H3K9me3 και SUV39H1 στο κλινικό καταληκτικό σημείο αξιολογήθηκε με χάραξη των καμπυλών επιβίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Kaplan-Meier και σύγκριση των ομάδων με τη δοκιμασία log-rank test. Οι αριθμητικές μεταβλητές κατηγοριοποιήθηκαν βάσει τιμών κατωφλίου που παρείχαν οι καμπύλες ROC. Πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης με τη χρήση του μοντέλου αναλογικών κινδύνων κατά Cox πραγματοποιήθηκε για τις παραμέτρους εκείνες που αποδείχθηκαν σημαντικές κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση, ώστε να αξιολογηθεί η προβλεπτική σημασία κάθε παραμέτρου ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού ελλειπουσών τιμών, η χημειοθεραπεία εξαιρέθηκε από την πολυπαραγοντική ανάλυση για το σύνολο της κοόρτης, όμως η πιθανή της επίδραση σε σχέση με τις σημαντικές παραμέτρους που προέκυψαν από την πολυπαραγοντική ανάλυση εξετάστηκε στην υποομάδα των ασθενών για τους οποίους αυτή η πληροφορία ήταν διαθέσιμη. Προκειμένου να αποφευχθούν καθοδηγούμενες από τα δεδομένα (“data-driven”) κατηγοριοποιήσεις, οι αριθμητικές μεταβλητές (ήτοι τα H-scores των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν) εισήχθησαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση ως συνεχείς

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό STATA 11.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA) για τα Windows. Οι υπολογισμοί ισχύος τελέστηκαν με το λογισμικό NCSS 8.0 για τα Windows. Όλα τα αποτελέσματα με αμφίπλευρο (two-sided) επίπεδο $p \leq 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά.

2.9. Δείγμα επαλήθευσης (validation cohort)

Ένα ανεξάρτητο σύνολο ασθενών με αστροκυτταρικά γλοιώματα χρησιμοποιήθηκε για την επαλήθευση των επιλεγέντων τιμών κατωφλίου για την έκφραση της H1x κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης για την έκφραση της H1x στο αρχικό δείγμα

ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί ο απαιτούμενος αριθμός ασθενών στο δείγμα επαλήθευσης, ώστε να επιτευχθεί η επαρκής στατιστική ισχύς (80%). Προκειμένου να ανιχνευθεί διαφορά 0.29410 ανάμεσα στα 0.11250 και 0.40660, που αντιστοιχούν στην αναλογία των ασθενών που επιβιώνουν στις ομάδες χαμηλής και υψηλής έκφρασης H1x (H-score), όπως υπολογίστηκε από το δείγμα των ασθενών με τη χρήση αμφίπλευρης δοκιμασίας log-rank, για να επιτευχθεί 80% στατιστική ισχύς σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05, θα απαιτούνταν 38 ασθενείς [224]. Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων (για να ανιχνευθεί διαφορά 0.32560 ανάμεσα στο 0.71660 και το 0.39100 που παρατηρήθηκαν στο δείγμα ασθενών), θα απαιτούνταν 48 ασθενείς [224]. Το δείγμα επαλήθευσης το οποίο χρησιμοποιήσαμε συμπεριέλαβε 66 ασθενείς (53 ασθενείς με γλοιοβλαστώματα και 13 με διάχυτα αστροκυτώματα), οι οποίοι διαγνώστηκαν και έλαβαν θεραπεία στο Νοσοκομείο «Ερυθρός Σταυρός» ανάμεσα στα έτη 2007 και 2011. Τα δημογραφικά δεδομένα αυτής της κοόρτης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

3. Αποτελέσματα

Μετά από στατιστική ανάλυση των δεδομένων προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

3.1. Έκφραση των δεικτών H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1 σε αστροκυτώματα και φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό

Η ανοσοθετικότητα στο δείκτη H1x ήταν πυρηνική και παρατηρήθηκε σε 97 από τις 98 περιπτώσεις (98%) του κύριου δείγματος ασθενών καθώς και σε όλες τις περιπτώσεις του δείγματος επαλήθευσης με H-score κυμαινόμενο από 0,5 έως 300 (**Εικόνα 14B,C**). Ανοσοθετικότητα παρατηρήθηκε στις περινεκρωτικές περιοχές, ενώ τα ευρισκόμενα σε μίτωση κύτταρα εμφάνιζαν κυτταροπλασματική θετικότητα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν σταθερά θετικά και χρησίμευσαν ως θετικός εσωτερικός μάρτυρας σε κάθε περίπτωση. Πυρηνική ανοσοθετικότητα στους δείκτες H4K20me3 και H3K9me3 παρατηρήθηκε στο 99% (94/99) και 94% (94/100) των περιπτώσεων με H-score κυμαινόμενο από 0,5 έως 300 και από 2 έως 300 αντίστοιχα (**Εικόνα 14E,F,H,I**). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν σταθερά θετικά για τους δείκτες H3K9me3 και H4K20me3 ενώ τα ευρισκόμενα σε μίτωση κύτταρα ήταν σταθερά αρνητικά. Τα αποτελέσματα αναφορικά με την έκφραση (H-score) των H1x, SETDB1, H4K20me3, H3K9me3 και SUV39H1 ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας παρουσιάζονται περιληπτικά στον **Πίνακα 4**.

Πυρηνική ανοσοθετικότητα στο δείκτη SETDB1 σημειώθηκε στο 98% των περιπτώσεων με H-score κυμαινόμενο από 1 έως 294 (**Εικόνα 14K,L**). Μόνο 14 από τις 98 εξετασθείσες περιπτώσεις (14,2%) εμφάνιζαν και κυτταροπλασματική θετικότητα. Οι νευρώνες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν θετικά στο δείκτη SETDB1 και χρησίμευσαν ως θετικός εσωτερικός μάρτυρας στις αρνητικές περιπτώσεις.

Η ανοσοέκφραση του δείκτη SUV39H1 ήταν πυρηνική σε 56 από τις 100 και κυτταροπλασματική σε 87 από τις 100 εξετασθείσες περιπτώσεις (**Εικόνα 14N,O**). Το H-score για την πυρηνική έκφραση του δείκτη SUV39H1 κυμάνθηκε από 1 έως 140 ενώ για την κυτταροπλασματική από 0,5 έως 285. Στα περισσότερα ενθοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική ανοσοθετικότητα.

Ο παρακείμενος φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός εμφάνιζε χαμηλότερα H-scores για τους δείκτες SETDB1 και SUV39H1 (πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση) και υψηλότερο H-score για το δείκτη H3K9me3 σε σύγκριση με το νεοπλασματικό ιστό (SETDB1 - 34 περιπτώσεις, $p < 0,0001$, SUV39H1 - 32 περιπτώσεις, πυρηνική ανοσοέκφραση $p = 0,0003$ και κυτταροπλασματική ανοσοέκφραση $p < 0,0001$ και H3K9me3 26 περιπτώσεις, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test, **Εικόνα 14G,J,M, Εικόνα 15C-F**).

Σχετικά με το δείκτη H3K9me3, η ανοσοθετικότητα του φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτή των grade 3 ($p = 0,0039$) και 4 ($p = 0,0001$) νεοπλασμάτων αλλά δε διέφερε σημαντικά από αυτή των grade 2 ($p > 0,10$). Αντιθέτως η ανοσοθετικότητα του φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού για τους δείκτες H1x και H4K20me3 δε διέφερε σημαντικά από εκείνη που παρατηρήθηκε στα grade 3 ($p = 0,9882$ και $p = 0,2121$ αντίστοιχα) και 4 ($p = 0,2846$ και $p = 0,8520$ αντίστοιχα) νεοπλάσματα, ενώ ήταν χαμηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στα grade 2 ($p = 0,0013$ και $p = 0,0034$ αντίστοιχα, **Εικόνα 14A,D, Εικόνα 15A,B**).

Η έκφραση των δεικτών H1x, H3K9me3 και H4K20me3 που παρατηρήθηκε με τη μέθοδο Western blot μετά από ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό αλλά και από ιστούς γλοιωμάτων διαφόρων grades (**Εικόνα 16**), ήταν αυξημένη για τους δείκτες H1x και H4K20me3 στους grade 2 όγκους, αν και η αύξηση του δείκτη H1x δεν ήταν τόσο έντονη

πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο Western blot.

3.2. Συσχετίσεις μεταξύ H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1

Το H-score του δείκτη H1x βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με εκείνα των δεικτών H4K20me3 ($R=0,3754$, $p=0,0002$) και H3K9me3 ($R=0,3417$, $p=0,0007$). Αυτές οι συσχετίσεις παρέμειναν στατιστικά σημαντικές μετά τον έλεγχο με πολυπαραγοντικό μοντέλο στο οποίο εισήχθη ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας (**Πίνακας 5**). Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ του H3K9me3 και του SETDB1 ($R=0,2088$, $p=0,0423$) καθώς και αρνητική συσχέτιση μεταξύ πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης του SUV39H1 ($R=-0,4579$, $p<0,0001$).

3.3. Σχέση των δεικτών H1x, H4K20me3, H3K9me3, SETDB1 και SUV39H1 με την IDH1-R132H και κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Μεταξύ των H-scores των δεικτών H1x, H4K20me3, πυρηνικού SUV39H1 και του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας αναδείχθηκε αρνητική συσχέτιση (Kruskal-Wallis ANOVA, $p=0,0184$, $p=0,0064$, $p=0,0022$ αντίστοιχα, **Πίνακας 5, Εικόνα 15A,B,E**). Αντίθετα, τα H-scores των SETDB1 και κυτταροπλασματικού SUV39H1 εμφάνιζαν θετική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (Mann-Whitney U test II/III vs IV $p=0,0271$ για την πρώτη σχέση, Kruskal-Wallis ANOVA 2 vs 3 vs 4 $p=0,0001$ για τη δεύτερη σχέση, **Πίνακας 5, Εικόνα 15A,D,F**).

3.4. Ανάλυση επιβίωσης

Μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των ασθενών αλλά και ξεχωριστά στα γλοιοβλαστώματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Η έκφραση των δεικτών H1x και πυρηνικού SUV39H1 παρατηρήθηκε ότι σχετίζεται με βελτιωμένη συνολική επιβίωση στο συνολικό δείγμα ($p=0,0034$ και $p=0,0004$ αντίστοιχα, **Εικόνα 17A,C**) καθώς και στα γλοιοβλαστώματα ($p=0,0030$ και $p=0,0113$ αντίστοιχα, **Εικόνα 17B,D**). Αυξημένο H-score του SETDB1 βρέθηκε να σχετίζεται οριακά με βελτιωμένη έκβαση στο συνολικό δείγμα ($p=0,0662$) ενώ αυξημένο H-score κυτταροπλασματικού SUV39H1 βρέθηκε να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση ($p=0,0159$, **Εικόνα 17E**) στο συνολικό δείγμα.

Πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης, η οποία συμπεριέλαβε όλες τις παραμέτρους για τους ασθενείς για τους οποίους ήταν διαθέσιμα τα αποτελέσματα των χρώσεων για τα υπό εξέταση μόρια (**Πίνακας 7**). Η έκφραση του δείκτη H1x αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ($HR=0,995$, $p=0,001$), μαζί με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και την ηλικία στο συνολικό δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί πως η προγνωστική σημασία του δείκτη H1x παρέμενε όταν η ανάλυση περιοριζόταν στα γλοιοβλαστώματα ($HR=0,994$, $p=0,001$) καθώς και μετά τον έλεγχο με πολυπαραγοντικό μοντέλο στο οποίο εισήχθη η χορήγηση χημειοθεραπείας ($HR=0,993$, $p=0,013$).

3.5. Ανάλυση επιβίωσης- δείγμα επαλήθευσης

Η συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα που εμφάνιζε χαμηλή έκφραση της H1x σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής έκφρασης της H1x, τόσο στο συνολικό δείγμα (log-rank test, $p<0,0001$, **Εικόνα 18A**) όσο και ξεχωριστά στα γλοιοβλαστώματα (log-rank test, $p=0,0004$, **Εικόνα 18B**). Σε ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο επιβίωσης στα γλοιοβλαστώματα (που συμπεριελάμβανε

την ηλικία των ασθενών, τη χορήγηση ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας) το H-score του δείκτη H1x διατηρούσε την προγνωστική του σημασία (HR=0,258, $p=0,016$) μαζί με την ηλικία των ασθενών.

3.6. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα των γλοιωμάτων

Η έκφραση της ιστόνης H1x καθώς και η παρουσία τροποποιήσεων των ιστονών H3K9me3 και H4K20me3 ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο Western blot στην αστρογλοιακή κυτταρική σειρά SVG p12 καθώς και στην κυτταρική σειρά γλοιωμάτων T98G (**Εικόνα 19A**). Στην πρώτη, η παρουσία της H1x ήταν πιο έντονη σε σχέση με τις H3K9me3 και H4K20me3.

Με σκοπό να εξετάσουμε περαιτέρω τη σημασία της SUV39H1 στην ανάπτυξη των γλοιωμάτων, καταστείλαμε τη δραστηριότητά της χρησιμοποιώντας τη χημική ένωση chaetocin. Στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς T98G εφαρμόστηκε chaetocin (200 nM και 400 nM) για 12 και 24 ώρες. 24 ώρες μετά την επεξεργασία πιστοποιήσαμε την καταστολή της SUV39H1 με τη μέθοδο Western blot. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μερική μείωση των επιπέδων της SUV39H1 στα 200 nM και πλήρης καταστολή της στα 400 nM 24 ώρες μετά την εφαρμογή (**Εικόνα 19B**).

Για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων μετά την καταστολή της SUV39H1, διενεργήθηκε χρωματομετρική ανάλυση MMT στις 12 και 24 ώρες καλλιέργειας. Ο πολλαπλασιασμός των T98G κυττάρων μετά την εφαρμογή της chaetocin ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες ($p<0,05$ και στα δύο χρονικά σημεία ελέγχου, **Εικόνα 19C**).

3.7. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 οδηγεί σε μειωμένη κλωνική έκπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων

Τα T98G κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin επέδειξαν σημαντικά μειωμένη ικανότητα κλωνικής έκπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικόνα 19D**). Συγκεκριμένα τα κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin στα 200 nM δημιούργησαν 31,8% των αποικιών που δημιούργησαν τα κύτταρα-μάρτυρες ενώ αυτά στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin στα 400 nM δημιούργησαν μόνο 18,7% των αποικιών.

3.8. Η καταστολή της δραστηριότητας της SUV39H1 οδηγεί σε μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων

Για να διερευνήσουμε την επίδραση της SUV39H1 στη μεταναστευτική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, διενεργήθηκε δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων μίας στιβάδας με τη δημιουργία εκδοράς (monolayer scratch migration assay) 20 ώρες μετά την εφαρμογή 200 nM και 400 nM chaetocin (**Εικόνα 20A**). Η κυτταρική μετανάστευση στην περιοχή της εκδοράς ήταν μειωμένη κατά 64,8% και 29,6% στα T98G κύτταρα μετά από εφαρμογή chaetocin (**Εικόνα 20B**). Η επούλωση της εκδοράς ήταν 95,3% στα κύτταρα μάρτυρες, 64,7% στα 200 nM και 30,6% στα 400 nM στα T98G κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin ($p < 0,001$ για εφαρμογή 200 nM και 400 nM chaetocin συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, **Εικόνα 20B**). Αυτά τα δεδομένα δηλώνουν πως η καταστολή της SUV39H1 έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μεταναστευτικής ικανότητας των νεοπλασματικών κυττάρων.

4. Συζήτηση

Τα νεότερα επιστημονικά δεδομένα υπογραμμίζουν τη συμμετοχή των επιγενετικών αλλαγών στην παθοφυσιολογία των γλοιωμάτων μέσω της γονιδιακής σίγασης που επιτυγχάνεται με αποκλίνουσα από το φυσιολογικό μεθυλίωση του υποκινητή [225-227]. Ωστόσο άλλοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης, όπως για παράδειγμα οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών και ειδικότερα η διαταραχή της λειτουργίας των αντίστοιχων ρυθμιστικών τους ενζύμων, έχουν μελετηθεί πολύ λιγότερο [205]. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κυρίως με σκοπό να διαλευκανθεί η κλινική σημασία των δύο μεθυλοτρασφερασών της ιστόνης H3K9, SETDB1 και SUV39H1, για τις οποίες νεότερα ερευνητικά δεδομένα υπαινίσσονται πως συμμετέχουν στην παθογένεση των γλοιωμάτων [222]. Δύο από τις πιο συχνές τροποποιήσεις ιστονών στα γλοιώματα, συγκεκριμένα η H3K9me3 και η H4K20me3 μελετήθηκαν παράλληλα [204,215]. Επίσης εστίασαμε στον υπότυπο H1x της συνδετικής ιστόνης H1, λόγω του ότι η πιθανή συμμετοχή της στη γένεση των γλοιωμάτων είναι εν πολλοίς άγνωστη.

Η συνολική συχνότητα θετικότητας της H3K9me3 ήταν υψηλή στις σειρές ασθενών μας, ανεξαρτήτως αστροκυτταρικού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, όπως άλλωστε αναφέρεται και από τον Venneti et al [215]. Η ανοσοθετικότητα ήταν πιο έντονη στον παρακείμενο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό σε σύγκριση με το νεοπλασματικό, διαφορά η οποία προέκυπτε από τα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα αναπλαστικά αστροκυτώματα και στα γλοιοβλαστώματα. Η ανάλυση Western blot ιστών γλοιωμάτων διαφόρων ιστολογικών βαθμών κακοηθείας καθώς και φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού ανέδειξε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης αν και λιγότερο έντονο, προφανώς λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν. Ανάλογα ευρήματα έχουν πρόσφατα δημοσιευθεί αναφορικά με το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως σε σχέση με το φυσιολογικό ουροθήλιο [228]. Τα χαμηλότερα επίπεδα της H3K9me3 στους αστρογλοιακούς όγκους, και ειδικά σε αυτούς που

εμφανίζουν υψηλό ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, πιθανώς αποδίδονται στα καθολικά πρότυπα υπομεθυλίωσης του DNA (global DNA hypomethylation) ,τα οποία επικρατούν στα γλοιώματα υψηλού βαθμού κακοηθείας [229] σε αντίθεση με το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό [230]. Η παρατήρησή μας αυτή επιβεβαιώνεται περαιτέρω από τον πρόσφατα αναφερθέντα εντοπισμό δεικτών ετεροχρωματίνης στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό, όπως οι H3K9me2 και H3K27me3 ,σε αντίθεση με τα γλοιώματα στα οποία εντοπίστηκαν συγκεκριμένοι δείκτες ευχρωματίνης, όπως οι AcH3, AcH4 και H3K4me2 [231]. Αυτές οι διαφορετικές ιστονικές μοριακές υπογραφές στο φυσιολογικό εγκέφαλο και στα γλοιώματα συμβαδίζουν με την υπερέκφραση των DNA μεθυλοτρανσφερασών συντήρησης (DNMT1) στα τελευταία [231]. Συμπερασματικά, όποιος και να είναι ο υποκείμενος μηχανισμός μειωμένης H3K9me3 στα γλοιώματα ιστολογικού βαθμού κακοηθείας III και IV, το εύρημα αυτό υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη επιγενετική αλλαγή λαμβάνει χώρα στα τελικά στάδια της γένεσης των εν λόγω γλοιωμάτων. Ωστόσο το συγκεκριμένο εύρημα έρχεται σε αντίθεση με πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η τριμεθυλίωση της H3K9 συνδέεται με τη γλοιακή διαφοροποίηση, καθώς καλλιέργειες προγονικών νευρικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την H3K9me3 παρουσιάζουν ελαττωμένη GFAP πρωτεΐνη. Η τελευταία επίδραση, παρ' όλα αυτά, μπορεί να εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από την παρουσία της IDH1 μετάλλαξης [48]. Επιπρόσθετα, η μεθυλίωση της H3K9 από τη SETDB1 αναφέρεται πως είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των προγονικών κυττάρων καθώς καταστέλλει την τροφοεξωδερματική διαφοροποίηση [232].

Η μελέτη μας δεν κατάφερε να στοιχειοθετήσει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της H3K9me3 και της παρουσίας της IDH1R132H πρωτεΐνης. Η μεταλλαγμένη IDH1 πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι καταλύει την παραγωγή του ογκομεταβολίτη 2-υδροξυγλουταρικό οξύ (2-HG) από το α-κετογλουταρικό οξύ (α-KG) [47,233,234]. Το 2-HG εμφανίζοντας παρόμοια χημική

δομή με το α -KG παρεμποδίζει τη λειτουργία ορισμένων α -KG εξαρτώμενων διοξυγενασών, συμπεριλαμβανομένης και της Jumohji C οικογένειας ιστονικών απομεθυλασών, και με αυτόν τον τρόπο αιτιολογείται η παρουσία αυξημένων δεικτών ιστονικής μεθυλίωσης *in vitro* [48,235,236]. Ωστόσο *in vivo* η συγκεκριμένη συσχέτιση έχει επιβεβαιωθεί μόνο στα ολιγοδενδρογλοιώματα και στα χαμηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας αστροκυτώματα [215], ενώ ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις δεν έχει παρατηρηθεί ένα προς ένα αντιστοιχία. Προφανώς ο μικρός αριθμός των χαμηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας αστροκυτωμάτων στις σειρές ασθενών μας ευθύνεται ως επί το πλείστον για την αναντιστοιχία μεταξύ της προαναφερθείσας [215] και της παρούσας μελέτης. Συμπερασματικά τα ευρήματά μας υποδηλώνουν πως στα υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας αστροκυτώματα η H3K9 τριμεθυλιώνεται από κάποιον απροσδιόριστο προς το παρόν και IDH1 ανεξάρτητο μηχανισμό, ο οποίος απορρυθμίζει τη σύνθετη δυναμική ισορροπία μεταξύ μεθυλοτρανσφερασών και απομεθυλασών. Εναλλακτικά, η τριμεθυλίωση της H3K9 μπορεί να διαμεσολαβείται από DNA μεθυλοτρανσφεράσες [237-239], από τις οποίες η DNMT1 και η DNMT3 είναι γνωστό ότι υφίστανται απορρύθμιση στο γλοιοβλάστωμα [231,240,241].

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η έκφραση της H3K9me3 δε βρέθηκε να έχει προγνωστική σημασία τόσο στο σύνολο των ασθενών όσο και απομονώνοντας τα γλοιοβλαστώματα. Αντίθετα, η τριμεθυλίωση της H3K9 αποδεδειγμένα συνδέεται με ευμενέστερη πρόγνωση στα ολιγοδενδρογλοιώματα [215]. Η σημαντικότερη αιτία αυτής της διαφοράς πιθανώς είναι οι διαφορετικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε τριμεθυλίωση της H3K9 στους δύο αυτούς τύπους γλοιωμάτων, συγκεκριμένα εξαρτώμενος από τη μετάλλαξη της IDH1 μηχανισμός στα ολιγοδενδρογλοιώματα έναντι IDH1 ανεξάρτητου μηχανισμού στα υψηλόβαθμα αστροκυτταρικά νεοπλασμάτα, με δεδομένο πως οι μεταλλάξεις της IDH1 αποτελούν έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες ευμενούς έκβασης στα γλοιώματα [242,243].

Πρωτότυπο εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι τα επίπεδα της H3K9me3 αυξάνονται παράλληλα με αυτά της SETDB1 και το οποίο υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη μεθυλίωση διαμεσολαβείται από τη SETDB1 και όχι από τη SUV39H1 στους αστροκυτταρικούς όγκους. Ως εκ τούτου είναι πιθανό πως οι δύο αυτές μεθυλοτρανσφεράσες λυσίνης των ιστονών (HKMTs) έχουν διακριτούς ρόλους ως προς τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης στα γλοιώματα. Η τελευταία άποψη ενισχύεται και από το εξής ερευνητικό δεδομένο: η αδρανοποίηση της SETDB1 στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της τριμεθυλίωσης της H3K9 [219].

Στην παρούσα μελέτη, αποδεικνύουμε για πρώτη φορά πως η έκφραση των δύο αυτών HKMTs που οδηγούν σε καταστολή της μεταγραφής είναι αυξημένη στους αστροκυτταρικούς όγκους, με τα γλοιοβλαστώματα να επιδεικνύουν αυξημένη κυτταροπλασματική SUV39H1 και SETDB1 αλλά σημαντικά μειωμένη πυρηνική SUV39H1. Παρόλο που η σημασία της κυτταροπλασματικής SUV39H1 παραμένει προς το παρόν άγνωστη, έχει αναφερθεί στο πλακώδες καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας [244] στο οποίο μόνο η πυρηνική SUV39H1 βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με το στάδιο της νόσου. Με δεδομένη την αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ πυρηνικής και κυτταροπλασματικής SUV39H1, θα πρέπει να υποθέσουμε πως η συγκεκριμένη HKMT μπορεί να παρουσιάζει αντίθετες λειτουργίες που εξαρτώνται από τη θέση της (πυρηνική ή κυτταροπλασματική) εντός του κυττάρου. Με δεδομένα τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους στο φυσιολογικό εγκέφαλο, τα οποία παρατηρήθηκαν τόσο στην παρούσα μελέτη όσο και σε εκείνη των Spygoroulou et al [222], τα περιγραφέντα ευρήματα υποδηλώνουν πως η SETDB1 και η SUV39H1 εμπλέκονται τόσο στη δημιουργία όσο και στην ανάπτυξη των αστροκυτταρικών όγκων. Αυξημένη επίσης έκφραση των HKMTs που εμπεριέχουν την περιοχή SET βρέθηκε σε αθανатоποιημένα επιθηλιακά κύτταρα βρόγχων [245] αλλά και σε καρκινικά κύτταρα μαστού εμφανίζοντας θετική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό

κακοήθειας [222,246]. Ποικίλα *in vitro* πειράματα έχουν πρόσφατα αποπειραθεί να διαλευκάνουν τη βιολογική σημασία των δύο αυτών HKMTs στα αστροκυτώματα. Για παράδειγμα η στοχοποίησή τους με siRNA είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά γλοιωμάτων GOS-3 προκαλώντας απόπτωση καθώς και μειωμένη ικανότητα κυτταρικής μετανάστευσης και κλωνικής έκπτυξης, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η SUV39H1 βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη σημασία στο συγκεκριμένο πείραμα. Επιπρόσθετα, η προς τα κάτω ρύθμιση της SETDB1 σε μοντέλο ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα τη σοβαρά επηρεασμένη νευρογένεση και αστροκυτταρική διαφοροποίηση [219]. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε περαιτέρω ο πιθανός λειτουργικός ρόλος της SUV39H1 και αναδείχθηκε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς γλοιωμάτων T98G όταν σε αυτή εφαρμόστηκε ο ειδικός αναστολέας chaetocin καθώς και μειωμένη ικανότητα κλωνικής έκπτυξης και κυτταρικής μετανάστευσης, υποστηρίζοντας τη σημαντική συμμετοχή της SUV39H1 στην ανάπτυξη των γλοιωμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστολή της λειτουργίας της PRMT5, μίας ιστονικής μεθυλοτρανσφεράσης που στοχεύει σε αμινοξέα αργινίνης είχε παρόμοια επίδραση στην ικανότητα κλωνικής έκπτυξης και στη βιωσιμότητα των νεοπλασματικών κυττάρων των γλοιωμάτων [247].

Κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης αποτελεί η προγνωστική σημασία της έκφρασης της SUV39H1 τόσο στο σύνολο του πληθυσμού όσο και απομονώνοντας τα γλοιοβλαστώματα. Όπως ήταν αναμενόμενο από τη συσχέτιση της SUV39H1 με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, η πυρηνική SUV39H1 εμφάνιζε ευμενή προγνωστική επίδραση σε αντίθεση με την κυτταροπλασματική. Η τελευταία, είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι παρατηρήθηκε μόνο στο σύνολο του πληθυσμού, υπονοώντας πως η συγκεκριμένη επίδραση οφείλεται στη θετική συσχέτιση της κυτταροπλασματικής SUV39H1 με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας. Αντίθετα η SETDB1 αποδείχθηκε μικρότερης σημασίας καθώς εμφάνιζε οριακά στατιστικά

σημαντική ευμενή επίδραση μετά από μονοπαραγοντική ανάλυση στο σύνολο του πληθυσμού. Τα εν λόγω αποτελέσματα είναι εν μέρει μη αναμενόμενα, με δεδομένα τα πειραματικά ευρήματα που αναφέρονται από τους Spyrgoroulou et al. [222] και προσδίδουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στην πυρηνική SUV39H1 αναφορικά με τα αστροκυτώματα. Η τελευταία επίδραση υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι διπλή απενεργοποίηση των SUVH1 και H2 προκαλεί γενωμική αστάθεια, ενώ η SUV39H1 εξαρτώμενη γήρανση αναφέρεται πως έχει προστατευτικό ρόλο στα ποντίκια αναφορικά με το Ras-σχετιζόμενο T λέμφωμα [220]. Αντίθετα οι Patani et al. [246] απέδειξαν πως η έκφραση της SUV39H1 σχετίζεται θετικά με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας ή το TNM στάδιο και αρνητικά με την ελεύθερη νόσου επιβίωση στο καρκίνωμα του μαστού. Πρόσφατα η έκφραση της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης PRMT5 προτάθηκε επίσης ως δυσμενής προγνωστικός παράγοντας στο γλοιοβλάστωμα [248]. Τα παραπάνω αντικρουόμενα ευρήματα υποδηλώνουν την ιδιαίτερα σύνθετη λειτουργία των HKMTs, καθώς οι τελευταίες διαθέτουν πολλαπλά αμινοξέα-στόχους με αποτέλεσμα η λειτουργία τους να οδηγεί ορισμένες φορές σε αντίθετες επιδράσεις εντός του κυττάρου.

Παρατηρήσαμε επίσης σταδιακή μείωση της ανοσοέκφρασης της H4K20me3 ξεκινώντας από τα αστροκυτώματα ιστολογικού βαθμού κακοηθείας II και οδεύοντας προς τα γλοιοβλαστώματα (ιστολογικός βαθμός κακοηθείας IV). Είναι, ως εκ τούτου, λογικό να υποθέσουμε πως η εξάλειψη του συγκεκριμένου ιστονικού δείκτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αστροκυτταρικών νεοπλασμάτων. Επιπρόσθετα, ο παρακείμενος φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός εμφάνιζε σημαντικά επίπεδα H4K20me3. Τα τελευταία ήταν χαμηλότερα από αυτά των αστροκυττωμάτων ιστολογικού βαθμού κακοηθείας II αλλά παρόμοια με αυτά των αστροκυττωμάτων ιστολογικού βαθμού κακοηθείας III και IV. Παρά την περιγραφείσα συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, δε στοιχειοθετήθηκε καμία συσχέτιση με την επιβίωση. Αξίζει να σημειωθεί πως μέχρι σήμερα έχει δημοσιευθεί μία μόνο μελέτη που

διερευνά τα καθολικά πρότυπα H4K20 μεθυλίωσης (global H4K20 methylation levels) στα γλοιώματα [204] και στην οποία δε βρέθηκε συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας αλλά μόνο με την επιβίωση των ασθενών που έπασχαν από δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα. Οι αιτίες που οδηγούν σε διαφορετικά επίπεδα H4K20me3 δεν έχουν συγκεκριμενοποιηθεί καθώς, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει γνωστή απομεθυλάση της H4K20, αφήνοντας να εννοηθεί ότι η μεθυλίωση της H4K20 αποτελεί σταθερό δείκτη. Παρ' όλα αυτά, είναι πολύ πιθανό οι απομεθυλάσες της H4K20 να ανακαλυφθούν στο μέλλον, όπως ακριβώς συνέβη με τις τροποποιήσεις της H3 [249]. Η τριμεθυλίωση της H4K20 οδηγεί σε γονιδιακή σίγαση ευοδώνοντας την αλληλεπίδραση με την ετεροχρωματίνη [217]. Η απώλεια της τριμεθυλίωσης της H4K20, η οποία θεωρείται χαρακτηριστικό γνώρισμα της νεοπλασματικής μετατροπής σε καθολικό επίπεδο, αποδίδεται προς το παρόν στη υπομεθυλίωση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Η τελευταία αποτελεί ευρέως γνωστό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων γενικότερα αλλά και των κυττάρων των γλοιοβλαστωμάτων ειδικότερα και έχει συνδεθεί με τη χρωμοσωμική αστάθεια [250,251]. Η εν λόγω απώλεια της τριμεθυλίωσης της H4K20 φαίνεται πως λειτουργεί αθροιστικά κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, γίνεται εντονότερη οδεύοντας από τα χαμηλού- στα υψηλού βαθμού κακοηθείας νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα πνεύμονα [214], όπως και στην παρούσα μελέτη, καθώς και από τη χαμηλόβαθμη στην υψηλόβαθμη δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου στον πνεύμονα [252]. Η μεθυλίωση της H4K20 μειώνεται όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G2/M [250,253], γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί τα νεοπλασματικά αστροκύτταρα που βρίσκονταν σε μίτωση ήταν αρνητικά στην H4K20me3 στην παρούσα μελέτη. Παρ' όλα αυτά, η αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας από τα χαμηλού- προς τα υψηλού βαθμού κακοηθείας αστροκυτώματα δε μπορεί να ευθύνεται αποκλειστικά για τη μείωση των επιπέδων H4K20me3. Και αυτό διότι τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένα

επίπεδα H4K20me3 σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα ακόμη κι όταν βρίσκονται στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου [250]. Ο προγνωστικός ρόλος της μεθυλίωσης της H4K20 στα νεοπλάσματα είναι προς το παρόν αμφιλεγόμενος καθώς χαμηλά επίπεδα H4K20me3 έχουν συνδεθεί με ευμενή έκβαση στο μυοδιηθητικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως [249] αλλά με δυσμενή έκβαση στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σταδίου I [252] και στο καρκίνωμα του μαστού [254]. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των τροποποιητικών ενζύμων των ιστονών (π.χ. KMT5A, KMT5B και KMT5C) στα διάφορα είδη νεοπλασμάτων [249].

Ίσως τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετίζονται με το πρότυπο της έκφρασης της H1x, η οποία αποτελεί μέλος της οικογενείας των συνδετικών ιστονών. Παρά το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι συνδετικές ιστόνες στη διατήρηση της ανώτερης τάξης δομής της χρωματίνης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τη σημασία των τροποποιήσεων της H1 στην παθογένεση των νεοπλασμάτων. Μέχρι σήμερα το επιστημονικό ενδιαφέρον ως προς την H1 ήταν μειωμένο λόγω των αρκετά χαμηλότερων επιπέδων εξελικτικής διατήρησής της σε σύγκριση με τις νουκλεοσωμικές ιστόνες, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στην υπόθεση πως οι συνδετικές ιστόνες σχετίζονται λιγότερο με τη βιολογία της χρωματίνης [255]. Στην παρούσα δημοσίευση περιγράφουμε για πρώτη φορά σε ένα μεγάλο σύνολο αστροκυτταρικών όγκων ότι η συνδετική ιστόνη H1x εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό, και μειώνεται σημαντικά ξεκινώντας από τα αστροκυτώματα χαμηλού βαθμού κακοηθείας και οδεύοντας προς τα γλοιοβλαστώματα, η εν λόγω μείωση δε, αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Το σημαντικότερο είναι ότι η εν λόγω ευμενής προγνωστική επίδραση διατηρείται στην πολυπαραγοντική ανάλυση και επιβεβαιώνεται σε ένα ανεξάρτητο σύνολο ασθενών. Ένας διαφορετικός υπότυπος της ιστόνης H1, η H1.0, η οποία

απομονώθηκε από ιστούς γλοιωμάτων, απεδείχθη να σχετίζεται επίσης με ευμενέστερη πρόγνωση, αν και το εύρημα αυτό προέκυψε από την ανάλυση 29 μόνο ασθενών [223]. Τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν ότι στα υψηλής κακοηθείας γλοιώματα, βλάπτεται η ανώτερης τάξης δομή της χρωματίνης. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με αυτά που πρόσφατα προέκυψαν αναφορικά με τους επιθηλιακούς όγκους των ωοθηκών, στους οποίους τα επίπεδα του mRNA της H1x (μαζί με τις H1.1, H1.4 και H1α) ήταν σημαντικά ελαττωμένα στα αδενοκαρκινώματα συγκριτικά με τα αδενώματα [256]. Έχει άλλωστε διατυπωθεί πως ο βαθμός συμπίκνωσης της χρωματίνης, ο οποίος επηρεάζεται από τα επίπεδα συγκεκριμένων H1 υποτύπων σχετίζεται με την επιδιόρθωση βλαβών του DNA, την κυτταρική μετανάστευση και την ικανότητα νεοπλασματικής διήθησης [257,258], αν και αυτή η επίδραση είναι πολύπλευρη και εξαρτώμενη από το συγκεκριμένο υπότυπο και το γενικότερο βιοχημικό πλαίσιο [256].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη μας αποκάλυψε θετική συσχέτιση της έκφρασης της H1x με τις H4K20me3 και H3K9me3, υποδεικνύοντας ότι μεταβολές στα επίπεδα των συνδετικών ιστονών δυνητικά συνεισφέρουν στη διατήρηση ή την παγίωση συγκεκριμένων προτύπων μεθυλίωσης στις ιστόνες H3 και H4. Παρόλο που δεν υπάρχει σχετική παρατήρηση στο πλαίσιο των όγκων, μελέτες σε εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα ποντικών έδειξαν ελαττωμένα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης της H3K27 όταν η έκφραση της H1 ελαττώνεται κατά 50% [259]. Επιπρόσθετα, σε πειράματα με ανασυσταθέντα νουκλεοσώματα και ενζυμικά σύμπλοκα, έχει βρεθεί ότι η H1 επηρεάζει τη μεθυλίωση της H3, καθορίζοντας την προτίμηση του EZH2 συμπλόκου μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών για συγκεκριμένα υποστρώματα [260]. Τα ευρήματά μας αυτά είναι δυνατόν να αποτελέσουν κίνητρο να εξερευνηθεί η σημασία των υπόλοιπων υποτύπων της ιστόνης H1 στους αστροκυτταρικούς όγκους και να προχωρήσουν σε περαιτέρω

πειραματικές μελέτες με σκοπό να επιβεβαιώσουν τη συμμετοχή των αλλοιώσεων της ιστόνης H1 στην παθογένεση των γλοιωμάτων.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει τη συμμετοχή του επιγενετικού φαινοτύπου στην παθογένεση των διάχυτων αστροκυτταρικών όγκων, και ειδικότερα της τριμεθυλίωσης της H4 στη θέση Lys20. Παρόλο που η τριμεθυλίωση της H3K9 φαίνεται να έχει δευτερεύουσα βιολογική σημασία στο εν λόγω πλαίσιο, τα ευρήματά μας υπογραμμίζουν το ρόλο των αντίστοιχων μεθυλοτρασφερασών SUV39H1 και SETDB1 στην εξέλιξη των όγκων και την απόκτηση ενός περισσότερο επιθετικού φαινοτύπου, με δεδομένη τη συσχέτισή τους με το βαθμό κακοήθειας και, αναφορικά με την SUV39H1, με την επιβίωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συσχετίσεις της SUV39H1 με την επιβίωση και το βαθμό κακοήθειας είναι συνάρτηση της θέσης της πρωτεΐνης εντός του κυττάρου. Επιπλέον, η απορρύθμιση του H1x υποτύπου προτείνεται ως μηχανισμός παρών κατά τα όψιμα στάδια της γένεσης των γλοιωμάτων και ως ευνοϊκός προγνωστικός βιοδείκτης, ανεξάρτητος των κλασσικών προγνωστικών παραγόντων. Το πρωτότυπο αυτό εύρημα μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την αποσαφήνιση των υποκείμενων μηχανισμών και της πιθανής συμμετοχής άλλων H1 υποτύπων στην παθοβιολογία των αστροκυτταρικών όγκων.

Δ. ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Κατά WHO 2016 βαθμοί κακοήθειας όγκων του ΚΝΣ.

Διάχυτοι αστροκυτταρικοί και ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι	
Διάχυτο αστροκύτωμα, με IDH μετάλλαξη	II
Αναπλαστικό αστροκύτωμα, με IDH μετάλλαξη	III
Γλοιοβλάστωμα, χωρίς IDH μετάλλαξη	IV
Γλοιοβλάστωμα, με IDH μετάλλαξη	IV
Διάχυτο γλοίωμα της μέσης γραμμής, με μετάλλαξη H3 K27M	IV
Ολιγοδενδρογλοίωμα, με IDH μετάλλαξη και απάλειψη 1p/19q	II
Αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα, με IDH μετάλλαξη και απάλειψη 1p/19q	III
Άλλοι αστροκυτταρικοί όγκοι	
Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα	I
Υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύτωμα	I
Πλειόμορφο ξανθοαστροκύτωμα	II
Αναπλαστικό πλειόμορφο ξανθοαστροκύτωμα	III
Επενδυματικοί όγκοι	
Υποεπενδύμωμα	I
Μυξοθηλώθες επενδύμωμα	I
Επενδύμωμα	II
Επενδύμωμα, θετικό για RELA συγχώνευση	II ή III
Αναπλαστικό επενδύμωμα	III
Άλλα γλοιώματα	
Αγγειοκεντρικό γλοίωμα	I
Χορδοειδές γλοίωμα της τρίτης κοιλίας	II
Όγκοι του χοριοειδούς πλέγματος	
Θήλωμα του χοριοειδούς πλέγματος	I
Άτυπο θήλωμα του χοριοειδούς πλέγματος	II
Καρκίνωμα του χοριοειδούς πλέγματος	III

Πίνακας 2. Δημογραφικά δεδομένα του δείγματος των ασθενών και του δείγματος επαλήθευσης

Μεταβλητή	Κοόρτη ασθενών (n = 101)	Κοόρτη επαλήθευσης (n = 66)
	Διάμεσος (εύρος)	Διάμεσος (εύρος)
Ηλικία	59 (19-84) έτη	59 (25–77) έτη
	Αριθμός περιστατικών (%)	Αριθμός περιστατικών (%)
Φύλο		
Ανδρας	58 (57,1%)	23 (34,8%)
Γυναίκα	43 (42,6%)	43 (65,2%)
Βαθμός κακοήθειας		
II	11 (10,9%)	13(19,7%)
III	12 (11,9%)	0 (0%)
IV	78 (77,2%)	53 (80,3%)
Συμβάματα		
Θάνατος	74, περίοδος follow-up: διάμεσος 9 (εύρος 1–39) μήνες	45, περίοδος follow-up: διάμεσος 9 (εύρος 1–86) μήνες
Αποκοπή (censoring)	25, περίοδος follow-up: διάμεσος 18 (εύρος 3–48) μήνες	21, περίοδος follow-up: διάμεσος 11 (εύρος 0.5–36) μήνες
Απώλεια κατά το follow-up	2	-
Χειρουργική αντιμετώπιση		
Μερική	31 (30,7%)	24 (36,4%)
Πλήρης	66 (65,3%)	41 (62,1%)
Μη διαθέσιμη πληροφορία	4 (4%)	1 (1,5%)
Ακτινοθεραπεία		
Ναι*	12 (11,9%)	31 (47%)
Όχι	78 (77,2%)	5 (7,6%)
Μη διαθέσιμη πληροφορία	11 (10,9%)	30 (45,4%)
Χημειοθεραπεία (τεμοζολομίδη)		
Ναι	39 (38,6%)	44 (66,7%)
Όχι	14 (13,9%)	0 (0%)
Μη διαθέσιμη πληροφορία	48 (47,5%)	22 (33,3%)

*μετεγχειρητική χημειοθεραπεία (συνολική δόση 60 Gy σε 30 ως 33 μέρη-κλάσματα)

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Πρωτεΐνη	Κλώνος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου	Ζωικό πρότυπο	Θετικοί μάρτυρες	Αριθμός πλακιδίων στην AIX	Μέθοδος ανάκτησης αντιγόνου	Αραίωση και χρόνος επώασης
H1x	Πολυκλωνικό	Abcam, Cambridge, UK	Ab 31972	Κόνικλος	Καρκίνωμα μαστού ανθρώπου	98	Ρυθμιστικό διάλυμα κίτρικών pH = 6	1:500, ολονύχτια (4°C)
H3K9me3 (τριμεθυλιωμένη στη Lys9)	Μονοκλωνικό	Millipore, Massachusetts, USA	CMA 308	Ποντικός	Καρκίνωμα μαστού ανθρώπου	99	EDTA pH = 9	1:100, ολονύχτια (4°C)
H4K20me3 (τριμεθυλιωμένη στη Lys20)	Μονοκλωνικό	Abcam, Cambridge, UK	Ab 78517	Ποντικός	Καρκίνωμα μαστού ανθρώπου και φυσιολογικό δέρμα ανθρώπου	99	Ρυθμιστικό διάλυμα κίτρικών pH = 6	1:500, ολονύχτια (4°C)
SETDB1	Πολυκλωνικό	Sigma-Aldrich chemie GmbH, Steinheim, Germany	HPA 018142	Κόνικλος	Φυσιολογικό κόλον ανθρώπου	98	EDTA pH = 9	1:100, ολονύχτια (4°C)
SUV39H1	Πολυκλωνικό	Novus Biologicals, Colorado, USA	NBP1 21367	Κόνικλος	Καρκίνωμα μαστού ανθρώπου	100	Ρυθμιστικό διάλυμα κίτρικών pH = 6	1:200, ολονύχτια (4°C)
IDH1-R132H	Μονοκλωνικό	Dianova, Hamburg, Germany	Clone H09	Ποντικός	Αστροκύττωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας	101	Ρυθμιστικό διάλυμα κίτρικών, pH = 6	1:50, ολονύχτια (4°C)

Πίνακας 4. Κατανομή των H1x, SETDB1, H4K20me3, H3K9me3 και SUV39H1 H-score ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

	H1x	H4K20me3	H3K9me3	SETDB1	SUV39H1	
					Πυρηνική	Κυτταροπλασματική
	Διάμεσος (εύρος)					
Σύνολο	85 (0–300)	40 (0–300)	60 (0–300)	98,75 (0–294)	2 (0–140)	30 (0–285)
Βαθμός κακοήθειας						
II	160 (52,5–300)	165 (6–300)	100 (0–300)	100 (5–270)	20 (0–140)	4 (0–110)
III	55 (2–120)	64,5 (4,5–270)	52,5 (2–225)	57,5 (5–245)	12,5 (0–90)	5 (0–180)
IV	75 (0–297)	30 (0–285)	60 (0–285)	105 (2–294)	0 (0–30)	60 (0–285)

Πίνακας 5. Συσχετίσεις ανάμεσα στα H1x, SETDB1, H3K4me3, H3K9me3 και SUV39H1 H-score στη συνολική κοόρτη (αποτελέσματα του συντελεστή συσχέτισης σειράς κατά Spearman). NS: στατιστικά μη σημαντική συσχέτιση.

	H1	H3K9me3	H4K20me3	SETDB1	SUV39H1 πυρηνική
H3K9me3	R = 0,3754, p = 0,0002	NS			
H4K20me3	R = 0,3417, p = 0,0007	NS	NS		
SETDB1	NS	R = 0,2088, p = 0,0423	R=-0,1844, p = 0,0052		
SUV39H1 πυρηνική	R = 0,2188, p = 0,0332	p>0,10	R = 0,3059, p = 0,0026	NS	
SUV39H1 κυτταροπλασματική	NS	NS	NS	NS	R = -0,4579, p<0,0001

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης (log-rank test) για τη συνολική επιβίωση.

	Συνολικό δείγμα	Γλοιοβλαστώματα
Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (II vs III vs IV)	<0,0001	-
Ηλικία (>35 vs <= 35 έτη)	0,0001	0,0089
Φύλο (1: άνδρας, 2: γυναίκα)	0,7425	0,7356
Χειρουργική εξαίρεση (0: μερική, 1: ολική)	0,4729	0,0128
Ακτινοθεραπεία (0: όχι, 1: ναι)	0,1094	<0,0001
Χημειοθεραπεία (0: όχι, 1: ναι)	0,013	<0,0001
H1x H-score (<85 vs ≥85)	0,0034	0,003
H3K9me3 H-score (<60 vs ≥60)	0,1262	0,2558
H4K20me3 H-score (<40 vs ≥40)	0,5666	0,5705
SETDB1 H-score (<98.75 vs ≥98.75)	0,0662	0,2935
SUV39H1 πυρηνικό H-score (<2 vs ≥2)	0,0004	0,0113
SUV39H1 κυτταροπλασματικό H-score (<30 vs ≥30)	0,0159	0,1512
IDH1-R132H (θετικό vs αρνητικό)	0,2891	0,3182

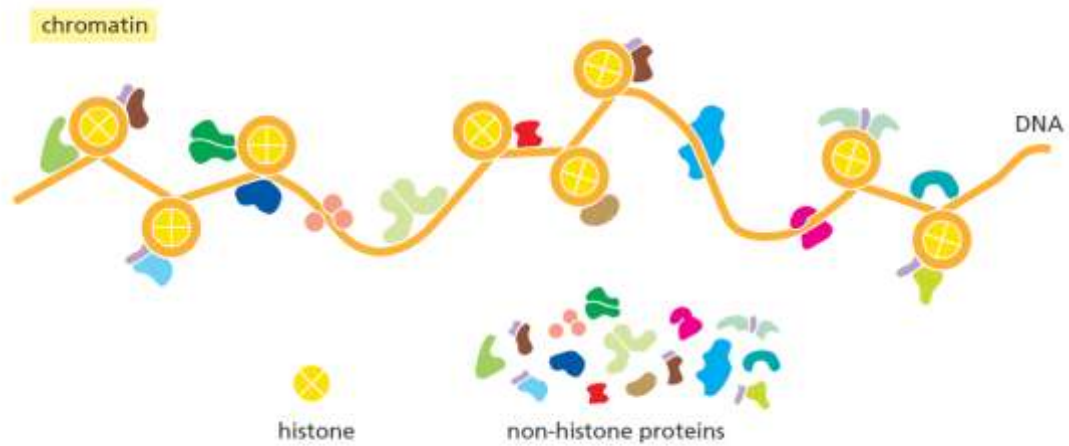
Πίνακας 7. Μοντέλο αναλογικού κινδύνου κατά Cox, το οποίο συμπεριέλαβε όλα τα υπό εξέταση μόρια στο συνολικό δείγμα (n = 99 ασθενείς, μοντέλο A) και στα γλοιοβλαστώματα (n = 76, μοντέλο B).

	Αναλογικός κίνδυνος (Hazard ratio, HR)	p-value	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του HR		
A	H1x H-score	0,995	0,001	0,993	0,998
	SETDB1 H-score	0,997	0,026	0,994	1,000
	SUV39H1 πυρηνικό H-score	1,002	0,272	0,999	1,005
	SUV39H1 κυτταροπλασματικό H-score	1,006	0,481	0,990	1,022
	Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας	2,124	0,032	1,067	4,231
	Ηλικία του ασθενούς	1,041	0,002	1,014	1,069
B	H1x H-score	0,445	0,009	0,242	0,817
	SUV39H1 πυρηνικό H-score	0,589	0,095	0,316	1,097
	Ηλικία του ασθενούς	1,034	0,062	0,998	1,070
	Ακτινοθεραπεία	0,204	0,002	0,076	0,548
	Χειρουργική θεραπεία	0,428	0,009	0,227	0,808

Ε. ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ

Εικόνα 1. Η δομή της χρωματίνης (Εικόνα από Alberts et al. [118])

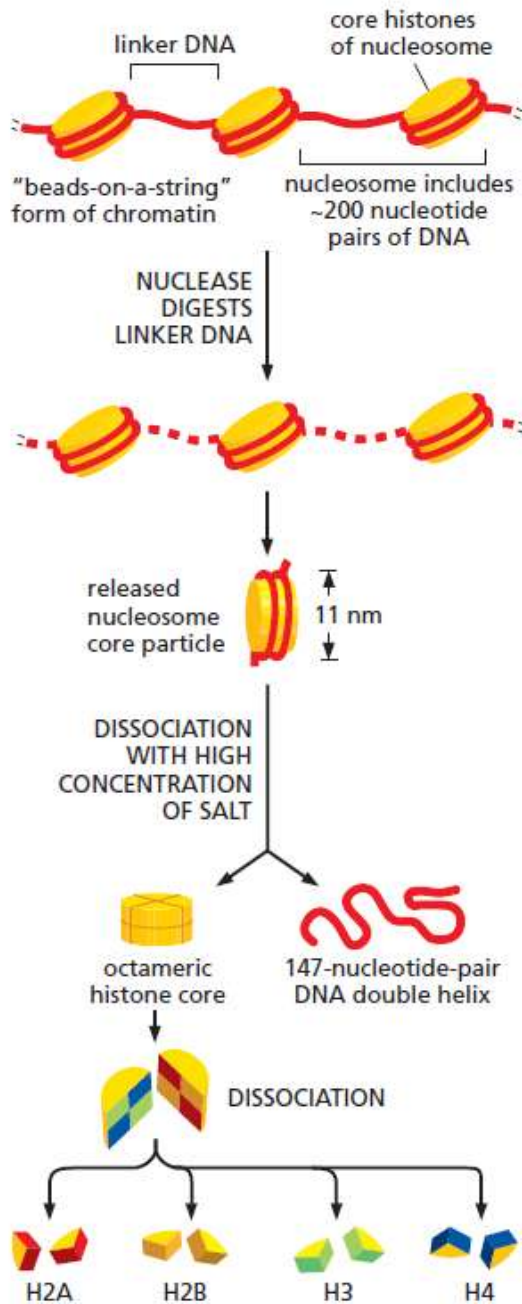
Η χρωματίνη αποτελείται από DNA προσδεμένο στις ιστόνες και τις μη ιστονικές πρωτεΐνες. Η μάζα των ιστονών είναι περίπου ίση με τη μάζα των μη ιστονικών πρωτεϊνών, όμως οι τελευταίες αποτελούνται από μεγάλη ποικιλία διαφορετικών πρωτεϊνών. Συνολικά, η μάζα ενός χρωμοσώματος αποτελείται κατά ένα τρίτο από DNA και δύο τρίτα από πρωτεΐνες.



Εικόνα 2. Δομική οργάνωση του νουκλεοσώματος. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

Το νουκλεόσωμα περιέχει πρωτεϊνικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από οκτώ μόρια ιστονών. Σε βιοχημικά πειράματα, τα πυρηνικά σωμάτια των νουκλεοσωμάτων μπορούν να απελευθερωθούν από την απομονωθείσα χρωματίνη με πέψη του συνδετικού DNA από νουκλεάση, ένζυμο το οποίο αποικοδομεί το εκτεθειμένο συνδετικό DNA αλλά δεν μπορεί να επιδράσει στο DNA το οποίο έχει τυλιχθεί γύρω από το νουκλεοσωμικό πυρήνα.

Μετά το διαχωρισμό του νουκλεοσώματος στον πρωτεϊνικό του πυρήνα και το DNA, προσδιορίζεται το μήκος του DNA που τυλίσσεται γύρω από τον πρωτεϊνικό πυρήνα και βρίσκεται ίσο με 147 ζεύγη νουκλεοτιδίων, τα τοποία τυλίσσονται 1,7 φορές γύρω από τον ιστονικό πυρήνα.



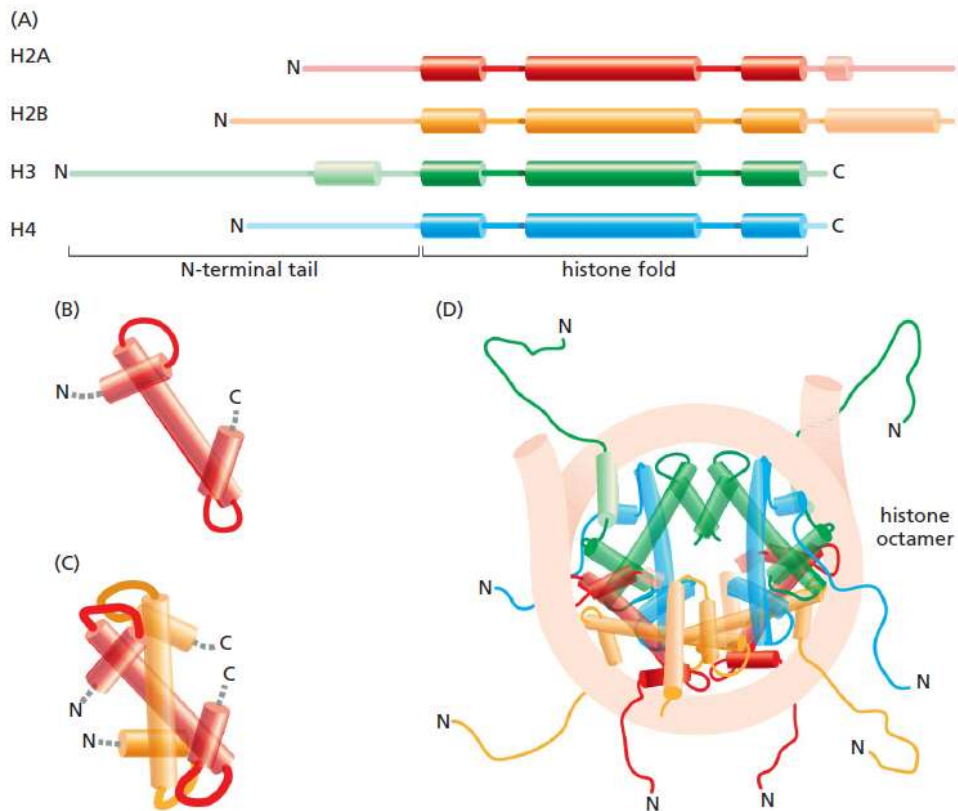
Εικόνα 3. Δομική οργάνωση των ιστονών στον πυρήνα του νουκλεοσώματος.
(Εικόνα από Alberts et al. [118])

(A) Καθεμία από τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος περιέχει N-τελική ουρά, η οποία υφίσταται διάφορες μορφές ομοιοπολικών τροποποιήσεων. Οι ιστόνες περιέχουν επίσης την περιοχή ιστονικής πτυχής

(B) Η δομή της ιστονικής πτυχής, η οποία σχηματίζεται και από τις τέσσερις νουκλεοσωμικές ιστόνες

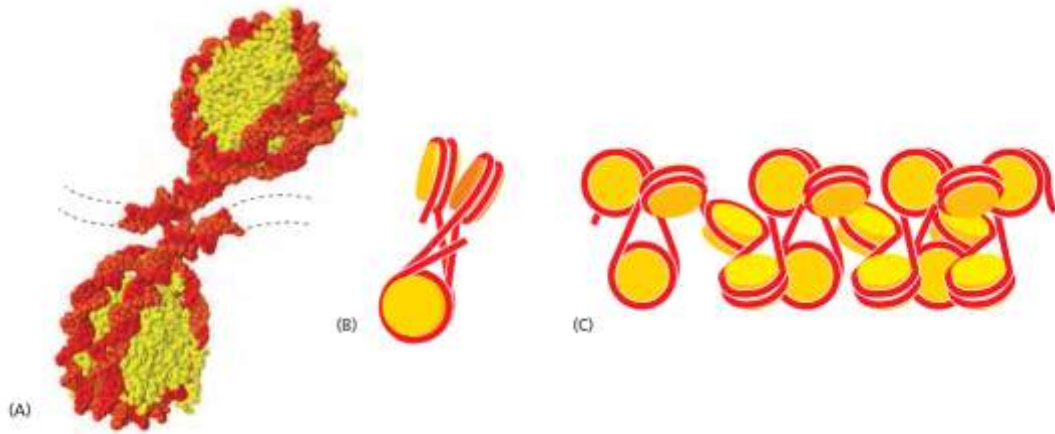
(C) Οι ιστόνες H2A και H2B σχηματίζουν διμερές μέσω αλληλεπίδρασης γνωστής ως «χειραψία». Οι ιστόνες H3 και H4 σχηματίζουν διμερές μέσω αλληλεπίδρασης του ίδιου τύπου.

(D) Το τελικό οκταμερές στο DNA. Και οι οκτώ N-τελικές ουρές των ιστονών εξέρχουν από τη δισκοειδή δομή του ιστονικού πυρήνα. Οι στερεοδιαμορφώσεις τους είναι πολύ εύκαμπτες, καθώς χρησιμεύουν ως θέσεις δέσμευσης άλλων πρωτεϊνών.



Εικόνα 4. Μοντέλο zigzag για την ίνα χρωματίνης 30 nm. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

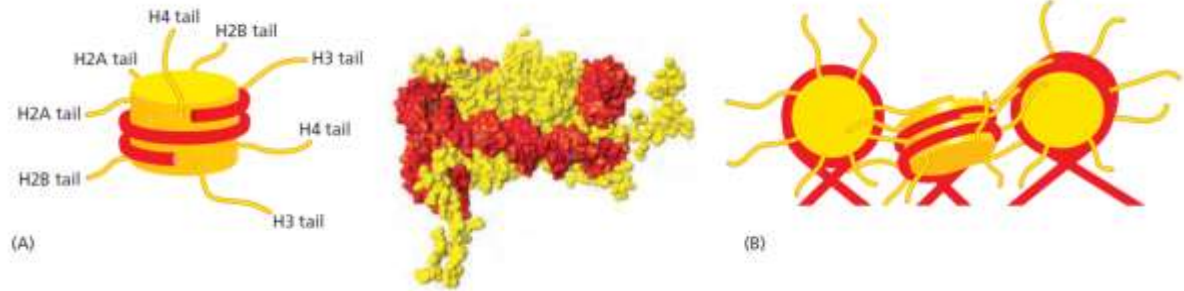
- (A) Η διαμόρφωση των δύο από τα τέσσερα νουκλεοσώματα στο τετρανουκλεόσωμα, σύμφωνα με δομή η οποία αναδείχθηκε από κρυσταλλογραφία με χρήση ακτίνων Χ.
- (B) Σχηματική παράσταση του τετρανουκλεοσώματος. Το τέταρτο νουκλεόσωμα δεν είναι ορατό, ευρισκόμενο πίσω από το κατώτερο νουκλεόσωμα του διαγράμματος.
- (C) Διαγραμματική παράσταση πιθανής δομής zigzag η οποία θα μπορούσε να δημιουργήσει ίνα χρωματίνης 30 nm.



Εικόνα 5. Μοντέλο για τη σημασία των ουρών των ιστονών στη σύμπτυξη της χρωματίνης. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

(A) Σχηματικό διάγραμμα το οποίο απεικονίζει κατά προσέγγιση τα σημεία εξόδου των οκτώ ουρών των ιστονών, μια από κάθε ιστονική πρωτεΐνη, καθώς επεκτείνονται επί τα εκτός κάθε νουκλεοσώματος. Η συνολική δομή απεικονίζεται στα δεξιά. Στην εικόνα υψηλής ευκρίνειας του νουκλεοσώματος, οι ουρές είναι εξαιρετικά ευέλικτες.

(B) Οι ουρές των ιστονών θεωρείται ότι συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα νουκλεοσώματα που βοηθούν στη σύμπτυξή τους στο χώρο.

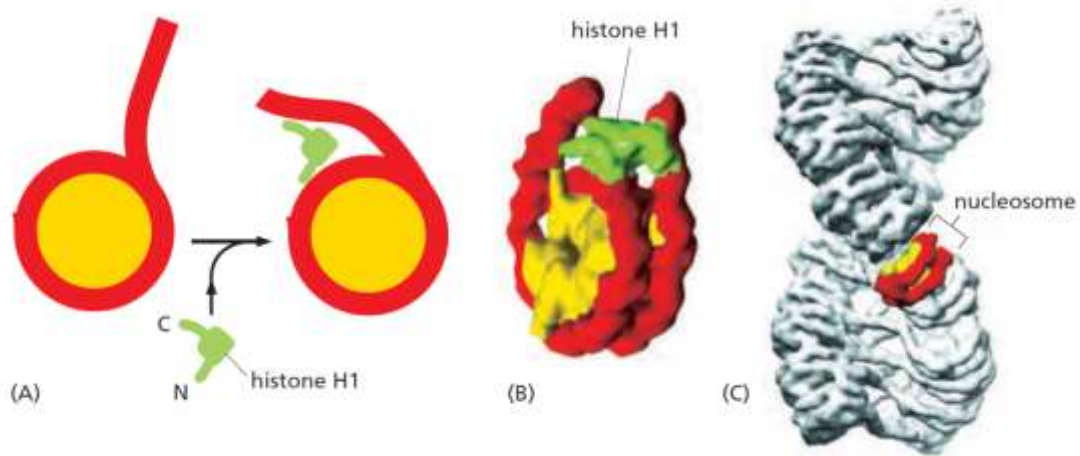


Εικόνα 6. Η σύνδεση της ιστόνης H1 στο νουκλεόσωμα. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

Απεικονίζεται η θέση και η δομή της ιστόνης H1. Η κεντρική περιοχή της δεσμεύει επιπλέον 20 ζεύγη νουκλεοτιδίων του DNA, στο σημείο από το οποίο εκείνο εξέρχεται από το πυρηνικό σωμάτιο του νουκλεοσώματος και είναι σημαντική για τη σύμπτυξη της χρωματίνης.

(A) Σχηματική απεικόνιση και

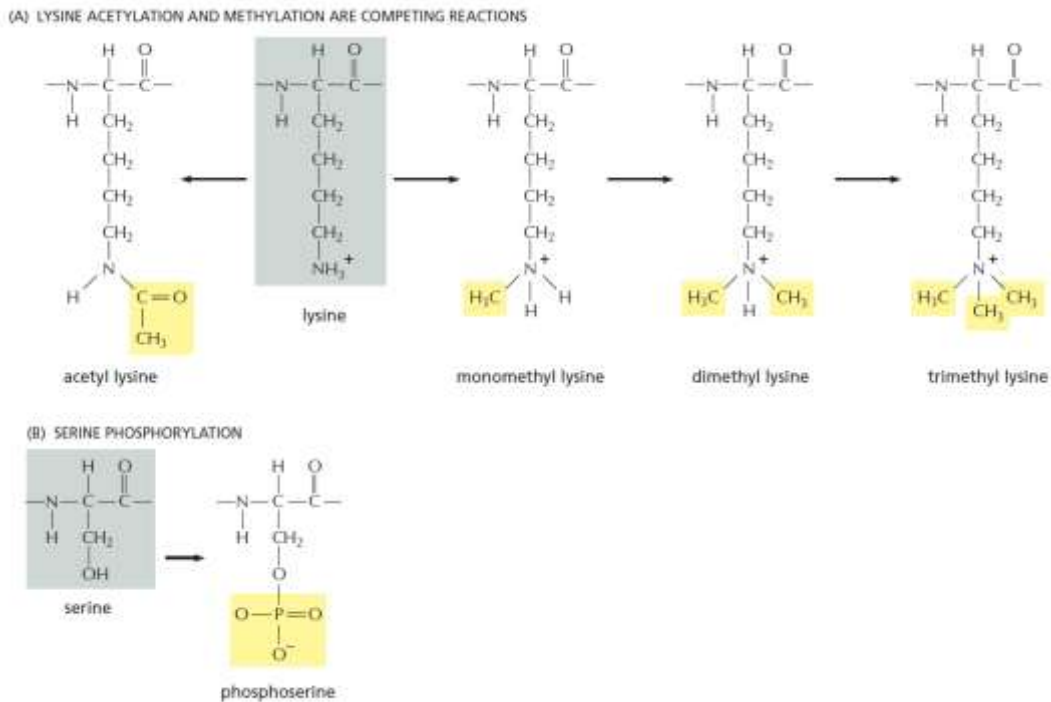
(B) προτεινόμενη δομή για το νουκλεόσωμα σύμφωνα με εικόνα ανασυσταθείσας ίνας χρωματίνης που αποκτήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (C).



Εικόνα 7. Οι σημαντικότεροι τύποι ομοιοπολικών τροποποιήσεων στις οποίες υπόκεινται οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων των νουκλεοσωμικών ιστονών. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

(A) Απεικονίζονται τρία διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης της λυσίνης. Καθένα από αυτά μπορεί να αναγνωριστεί και να συνδεθεί με διαφορετικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να έχει διαφορετική σημασία για το κύτταρο. Σημειώνεται ότι η ακετυλίωση αναιρεί το θετικό φορτίο της λυσίνης και ότι η ακετυλιωμένη λυσίνη δεν μπορεί να μεθυλωθεί, και αντιστρόφως.

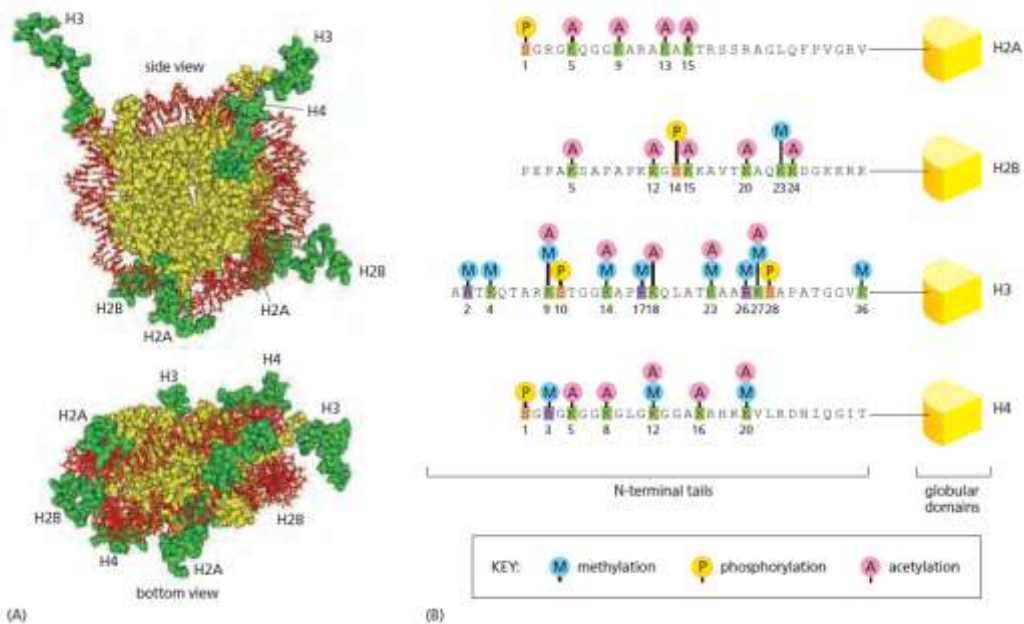
(B) Η φωσφορυλίωση της σερίνης προσθέτει αρνητικό φορτίο στις ιστόνες. Τροποποιήσεις των ιστονών που δεν παρίστανται σε αυτήν την εικόνα περιλαμβάνουν τη μόνο- και διμεθυλίωση της αργινίνης, τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης, την προσθήκη ADP-ριβόζης στο γλουταμινικό οξύ και την προσθήκη ουβικιτυλο- συμούλο- η βιοτινο-ομάδας στη λυσίνη.



Εικόνα 8. Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ουρών των νουκλεοσωμικών ιστονών. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

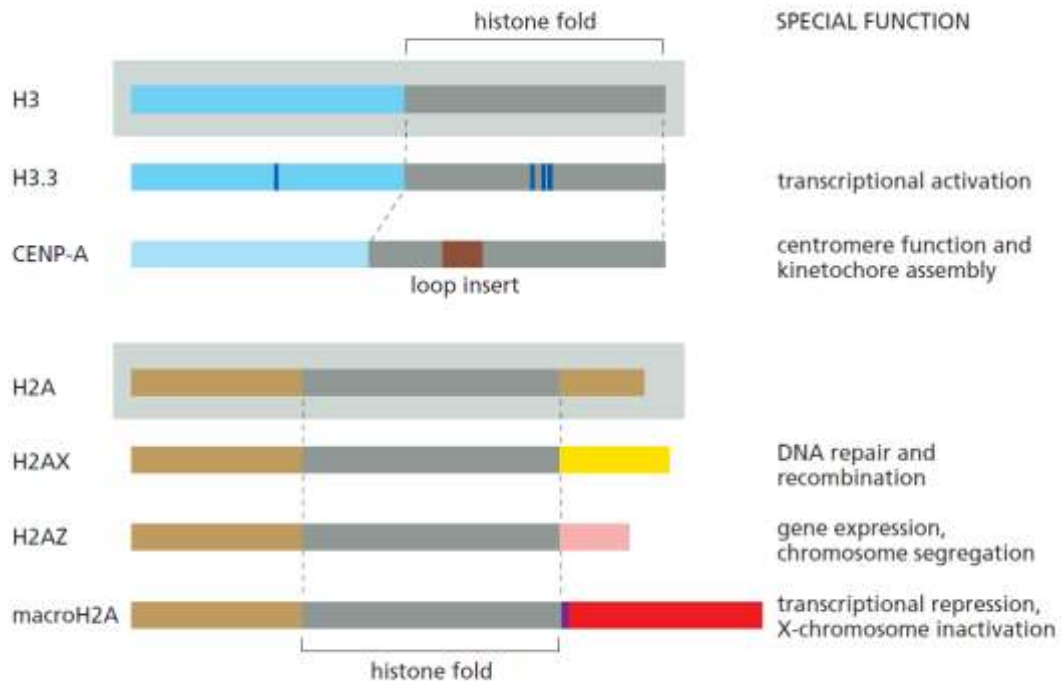
(A) Η δομή του νουκλεοσώματος, στην οποία επισημαίνονται με πράσινο χρώμα τα πρώτα 30 αμινοξέα σε καθεμία από τις οκτώ N-τελικές ιστονικές ουρές. Αυτές οι ουρές είναι ευέλικτες, ευκίνητες και η δομή τους μεταβάλλεται με την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών.

(B) Απεικονίζονται οι αποδεδειγμένες τροποποιήσεις των τεσσάρων νουκλεοσωμικών ιστονών. Παρόλο που ένα σύμβολο εμφανίζεται εδώ για τη μεθυλίωση (M), κάθε λυσίνη (K) ή αργινίνη (R) μπορεί να μεθυλιωθεί με διαφορετικούς τρόπους. Σημειώνεται επίσης ότι ορισμένες θέσεις (π.χ. λυσίνη 9 στην ιστόνη H3) μπορούν να τροποποιηθούν είτε με μεθυλίωση είτε με ακετυλίωση, αλλά όχι και με τους δύο τρόπους. Οι περισσότερες τροποποιήσεις προσθέτουν ένα σχετικά μικρό μόριο στις ουρές των ιστονών, με την εξαίρεση της ουμπικιτίνης, η οποία είναι πρωτεΐνη 76 αμινοξέων η οποία χρησιμοποιείται για άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Στην εικόνα δεν εμφανίζονται οι περισσότερες από 20 πιθανές τροποποιήσεις που εντοπίζονται στο σφαιρικό πυρήνα των ιστονών.



Εικόνα 9. Η δομή των ιστονικών παραλλαγών (variants) σε σύγκριση με τις κύριες ιστόνες, τις οποίες αντικαθιστούν. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

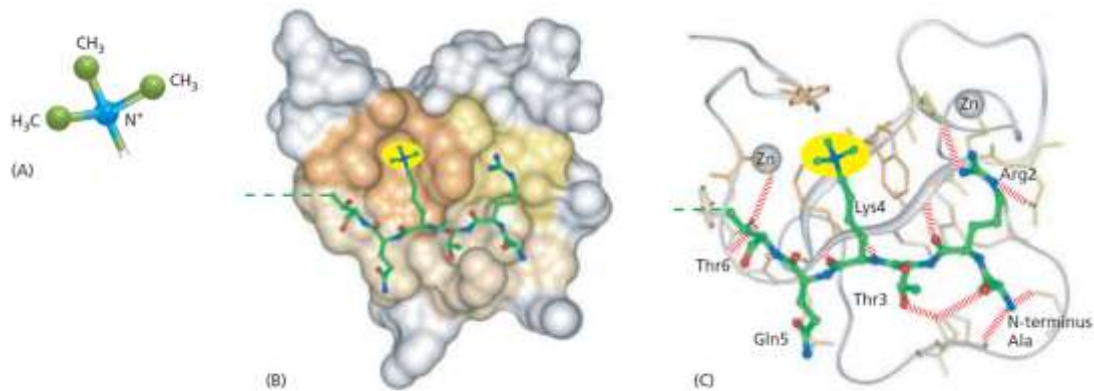
Οι ιστονικές παραλλαγές εισάγονται στα νουκλεοσώματα σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις με εξαρτώμενα από το ATP ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τα οποία δρουν σε συνεργασία με πρωτεΐνες-συνοδούς των ιστονών. Οι αλληλουχίες σε κάθε παραλλαγή που έχουν χρωματιστεί με άλλο χρώμα, σε σύγκριση με την αντίστοιχη κύρια ιστόνη, υποδηλώνουν περιοχές με αμινοξική αλληλουχία διαφορετική σε σχέση με την κύρια ιστόνη.



Εικόνα 10. Ο τρόπος ανάγνωσης των σημάνσεων στα νουκλεοσώματα. (Εικόνα από Alberts et al. [118])

Απεικονίζεται η δομή πρωτεϊνικής περιοχής (γνωστή ως ING PHD περιοχή) η οποία αναγνωρίζει ειδικά την τριμεθυλιωμένη ιστόνη H3 στη λυσίνη 4. (A) Τριμεθυλιωμένη ομάδα. (B) Μοντέλο στο χώρο για την περιοχή ING PHD η οποία έχει προσδεθεί σε ιστονική ουρά (πράσινη, με την τριμεθυλιωμένη ομάδα χρωματισμένη κίτρινη). (C) Μοντέλο που απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζονται τα έξι N-τελικά αμινοξέα στην ουρά της ιστόνης H3. Οι κόκκινες γραμμές αναπαριστούν δεσμούς υδρογόνου.

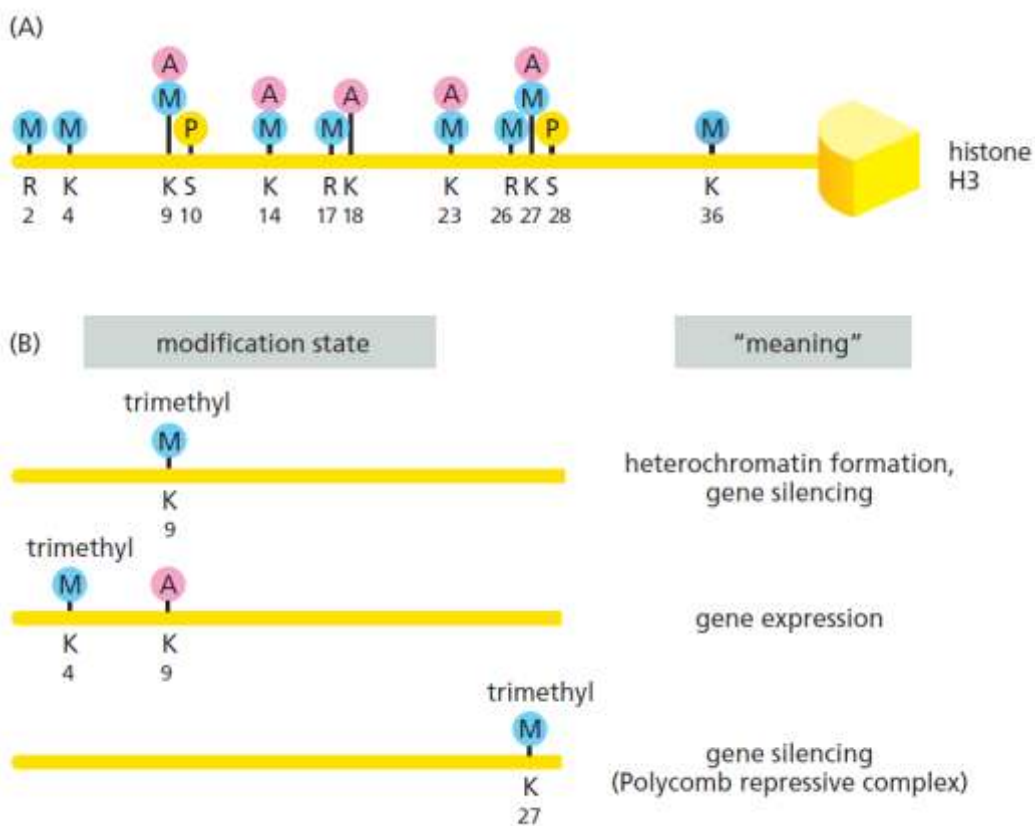
Πρόκειται για μια οικογένεια PHD περιοχών οι οποίες αναγνωρίζουν μεθυλιωμένες λυσίνες στις ιστόνες. Διαφορετικά μέλη της ομάδας προσδένονται ισχυρά σε λυσίνες που εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις και μπορούν να διακρίνουν ανάμεσα στη μονο-, δι-, και τριμεθυλιωμένη λυσίνη. Με παρόμοιο τρόπο, άλλες μικρές πρωτεϊνικές περιοχές αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πλευρικές ομάδες των ιστονών που έχουν σημειωθεί με ακετυλομάδες, φωσφορικές και άλλες ομάδες.



Εικόνα 11. Ο ρόλος των τροποποιήσεων της N-τελικής ουράς της ιστόνης H3. Η σημασία της H3K9me3 (Εικόνα από Alberts et al. [118])

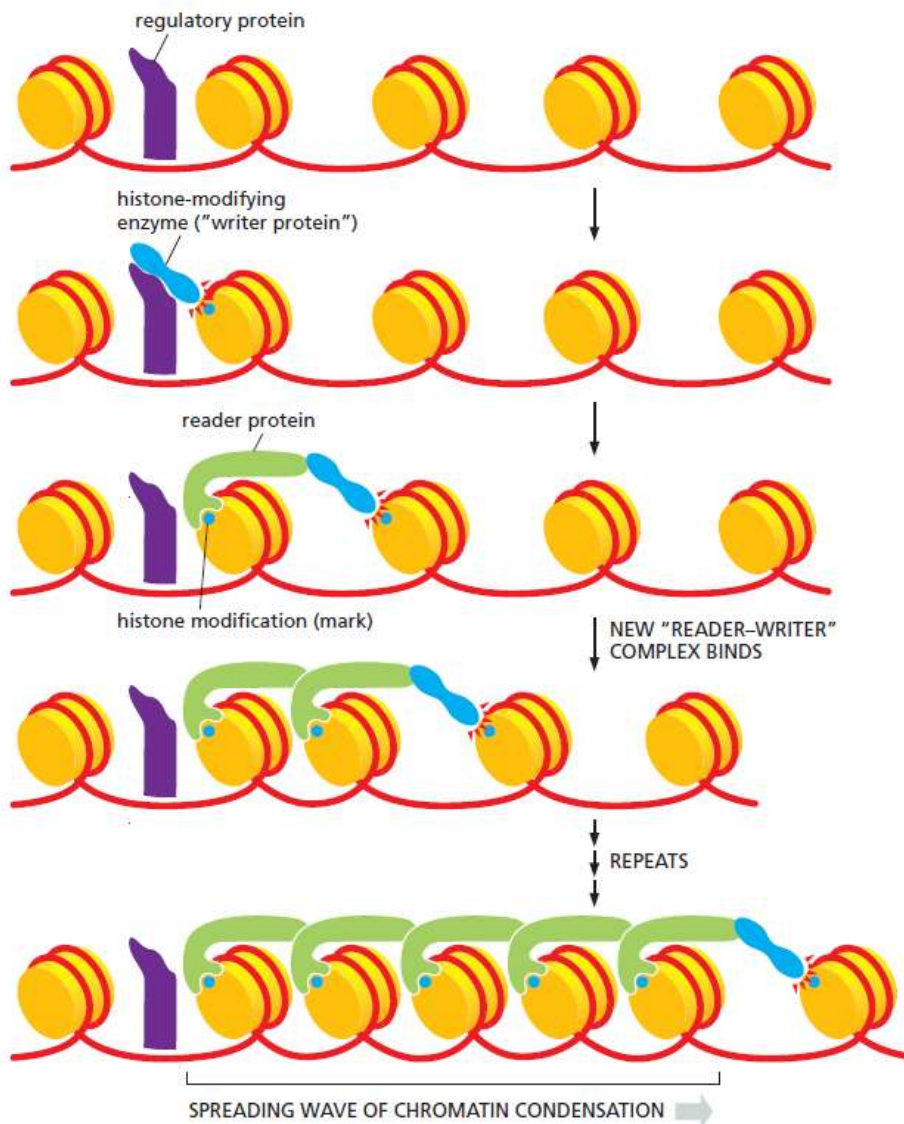
(A) Οι τροποποιήσεις στην N-τελική ουρά της ιστόνης H3

(B) Η ουρά της ιστόνης H3 μπορεί να σημανθεί από διαφορετικά σύνολα τροποποιήσεων, τα οποία δρουν συνδυαστικά, ώστε να μεταφέρουν συγκεκριμένο μήνυμα. Έχει διαλεκανθεί μόνο μικρός αριθμός από τις σημάνσεις, ο οποίος περιλαμβάνει και τα τρία παραδείγματα της εικόνας. Δεν απεικονίζεται το γεγονός ότι η ανάγνωση μίας σήμανσης στις ιστόνες γενικά απαιτεί τη συνολική αναγνώριση σημάνσεων σε άλλες θέσεις του νουκλεοσώματος. Επιπροσθέτως, απαιτούνται συγκεκριμένα επίπεδα μεθυλίωσης (μονο-, δι-, τριμεθυλίωση). Για παράδειγμα, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 (H3K9me3) προσελκύει την πρωτεΐνη HP1 (heterochromatin-specific protein 1), η οποία επάγει ένα επεκτεινόμενο κύμα περαιτέρω τριμεθυλίωσης στη λυσίνη 9 και περαιτέρω πρόσδεση της πρωτεΐνης HP1. Ωστόσο, επίσης σημαντική στη διαδικασία αυτή είναι η συνεργική τριμεθυλίωση της N-τελικής ουράς της ιστόνης H4 στη λυσίνη 20 (H4K20me3).



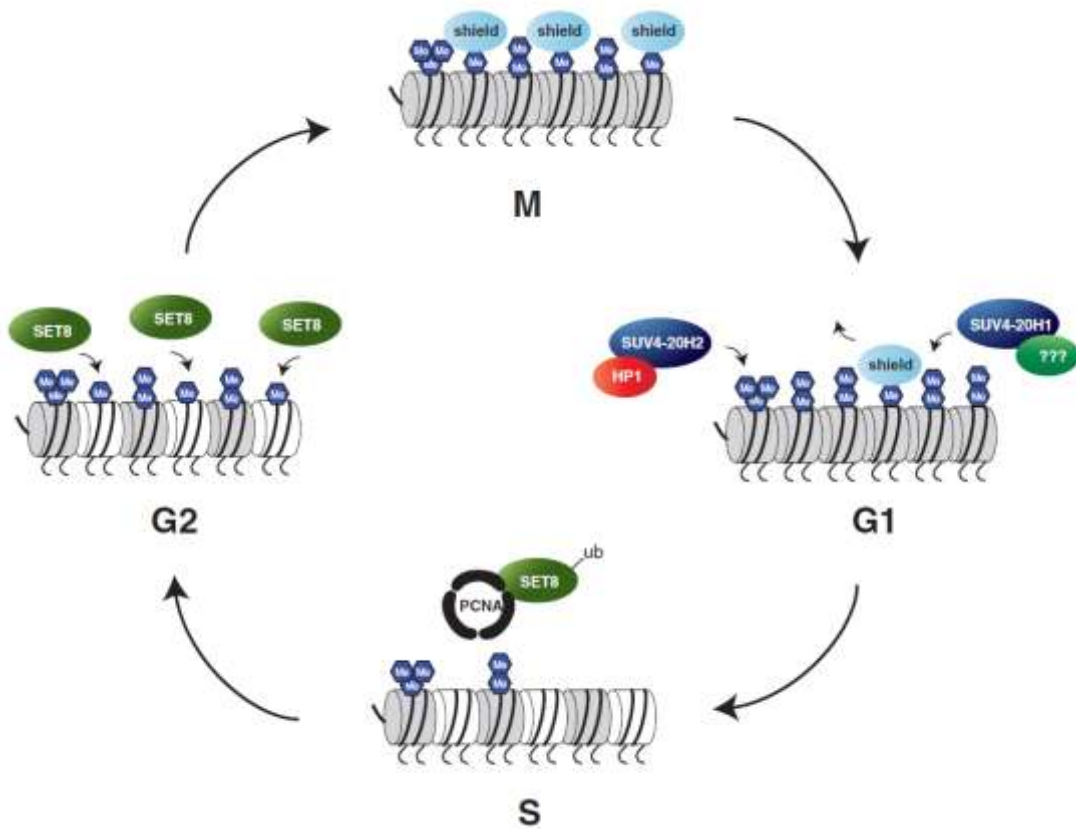
Εικόνα 12. Ο τρόπος με τον οποίο το σύμπλοκο ανάγνωσης-εγγραφής επεκτείνει τις μεταβολές της χρωματίνης κατά μήκος του χρωμοσώματος (Εικόνα από Alberts et al. [118])

Η πρωτεΐνη-εγγραφέας είναι ένζυμο το οποίο καταλύει συγκεκριμένη τροποποίηση σε μία ή περισσότερες από τις τέσσερις νουκλεοσωμικές ιστόνες. Μετά την προσέλευσή της σε συγκεκριμένη θέση, από πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφή, η πρωτεΐνη-εγγραφέας συνεργάζεται με την πρωτεΐνη-αναγνώστη, ώστε να επεκταθεί η σήμανση από νουκλεόσωμα σε νουκλεόσωμα μέσω του συμπλόκου ανάγνωσης-εγγραφής. Προκειμένου να εργαστεί ο μηχανισμός, η πρωτεΐνη-αναγνώστης πρέπει να αναγνωρίσει την ίδια σήμανση τροποποίησης της ιστόνης, την οποία καταλύει η πρωτεΐνη-εγγραφέας. Η σύνδεση της πρωτεΐνης-αναγνώστη φαίνεται ότι ενεργοποιεί τον εγγραφέα. Στο παρακάτω σχηματικό παράδειγμα απεικονίζεται ένα επεκτεινόμενο κύμα συμπύκνωσης της χρωματίνης. Δεν απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που επίσης συμμετέχουν, όπως ένα σύμπλοκο εξαρτώμενης από το ATP αναδιάταξης της χρωματίνης, το οποίο απαιτείται για την επανατοποθέτηση των τροποποιημένων νουκλεοσωμάτων.



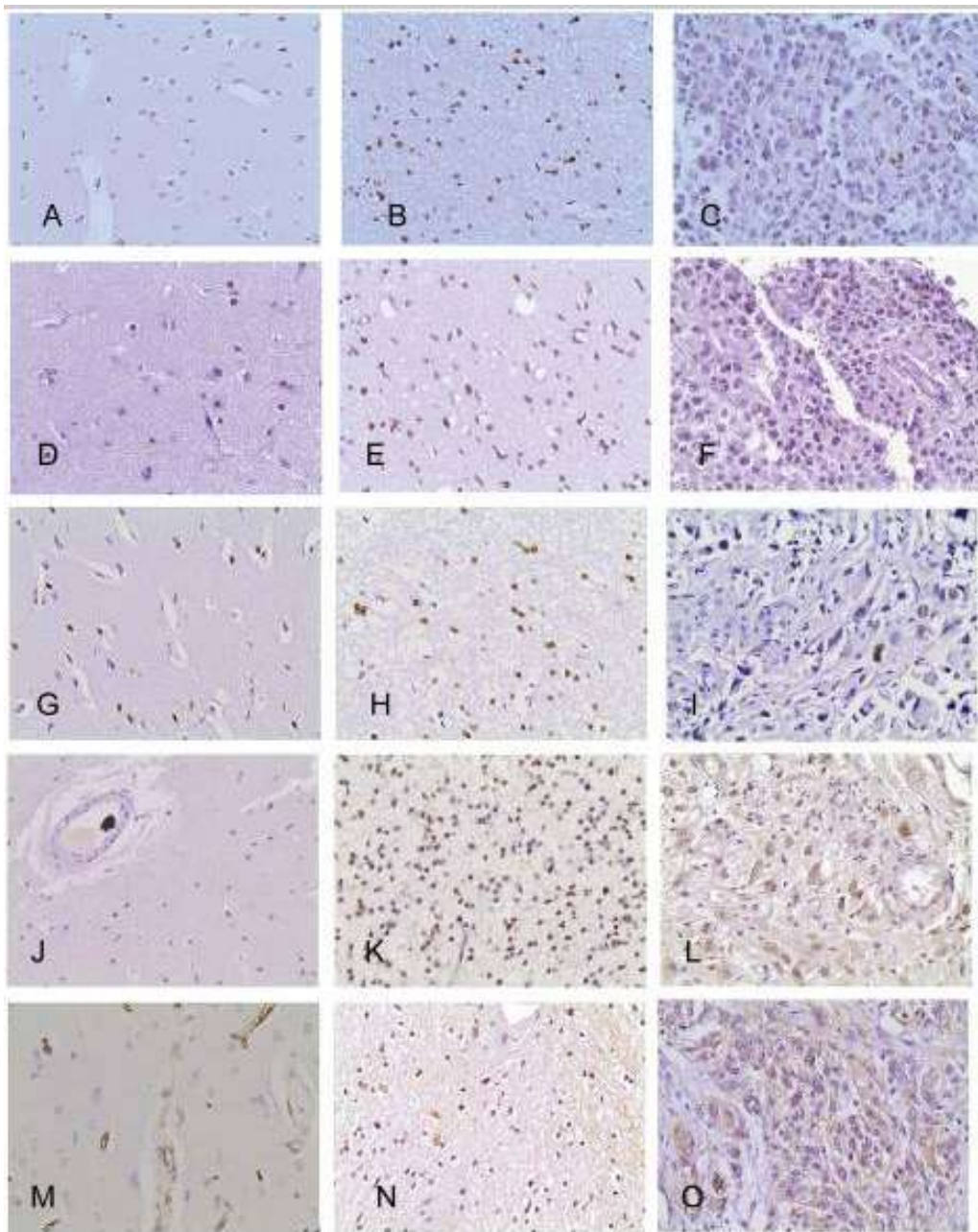
Εικόνα 13. Τα διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης της H4K20 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα από Jorgensen et al. [174])

Τα κύτταρα στη φάση G1 και G0 έχουν υψηλά επίπεδα H4K20me3 σε ετεροχρωματινικές περιοχές και H4K20me2 σε όλο το μήκος του γονιδιώματος. Η H4K20me1 περιορίζεται σε συγκεκριμένα γονίδια. Όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση S, στα χρωμοσώματα ενσωματώνονται νέα μόρια ιστόνης H4, τα οποία δεν περιέχουν μεθυλίωση της H4K20 (σημειώνονται ως λευκού χρώματος). Καθώς η SET8 διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, ελάχιστη H4K20me1 προστίθεται κατά τη διάρκεια της φάσης S. Προς το τέλος της S φάσης και κατά τη φάση G2, η SET8 σταθεροποιείται και σχηματίζεται H4K20me1 σχεδόν σε όλα τα νέα μόρια ιστόνης H4. Τα υψηλά επίπεδα H4K20me1 διατηρούνται κατά τη διάρκεια της μίτωσης και προστατεύονται από τη μετατροπή σε H4K20me2 ή me3 με άγνωστους μηχανισμούς. Αμέσως μετά τη μίτωση, στην αρχή της φάσης G1, το μεγαλύτερο μέρος της H4K20me1 μετατρέπεται σε H4K20me2 και H4K20me3 από τα ένζυμα SUV4-20H.



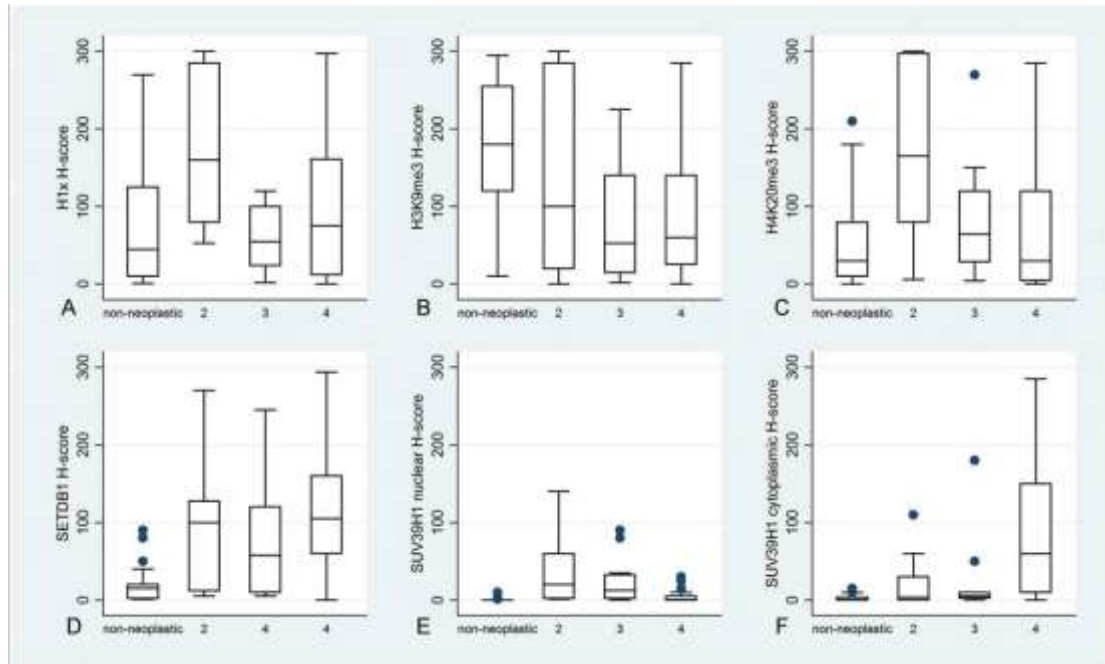
Εικόνα 14. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των H1x (A, B, C), H4K20me3 (D, E, F), H3K9me3 (G, H, I), SETDB1 (J, K, L) και SUV39H1 (M, N, O) στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό (A, D, G, J, M), τα αστροκυτώματα βαθμού κακοήθειας II (B, E, H, K, N) και τα γλοιοβλαστώματα (C, F, I, L, O).

Ο φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός εμφάνισε χαμηλότερη ανοσοθετικότητα για τη SETDB1, κυτταροπλασματική ή πυρηνική SUV39H1 αλλά υψηλότερη H3K9me3 ανοσοθετικότητα σε σχέση με το νεοπλασματικό ιστό. Στους αστροκυτταρικούς όγκους η ανοσοθετικότητα για τις H1x, H4K20me3 και την πυρηνική SUV39H1 ελαττώνονται από τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας II στο βαθμό III και βαθμό IV. Αντιθέτως, η έκφραση της SETDB1 και κυτταροπλασματικής SUV39H1 είναι υψηλότερη στα γλοιοβλαστώματα σε σχέση με τους χαμηλότερους βαθμούς κακοήθειας.



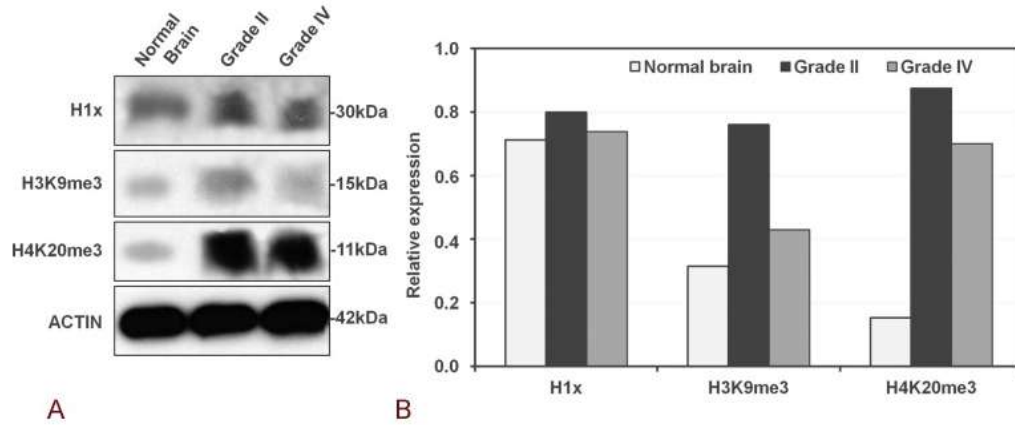
Εικόνα 15. H1x (A): H4K20me3 (B): H3K9me3 (C): SETDB1 (D): και SUV39H1 πυρηνικό (E) και κυτταροπλασματικό (F) H-score στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό και στα αστροκυτώματα, σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

Η έκφραση της H3K9me3 ήταν υψηλότερη στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό, χωρίς να εμφανίζει συσχετίσεις με το βαθμό κακοήθειας, ενώ η έκφραση των H1x και H4K20me3 ήταν σημαντικά αυξημένη στο βαθμό κακοήθειας 2 σε σύγκριση με το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό ή τους υψηλούς βαθμούς κακοήθειας. Τα επίπεδα H1x, H4K20me3 και πυρηνικής SUV39H1 ελαττώνονται στους υψηλότερους βαθμούς κακοήθειας, ενώ τα επίπεδα των SETDB1 και SUV39H1 συσχετίζονται θετικά με το βαθμό κακοήθειας.

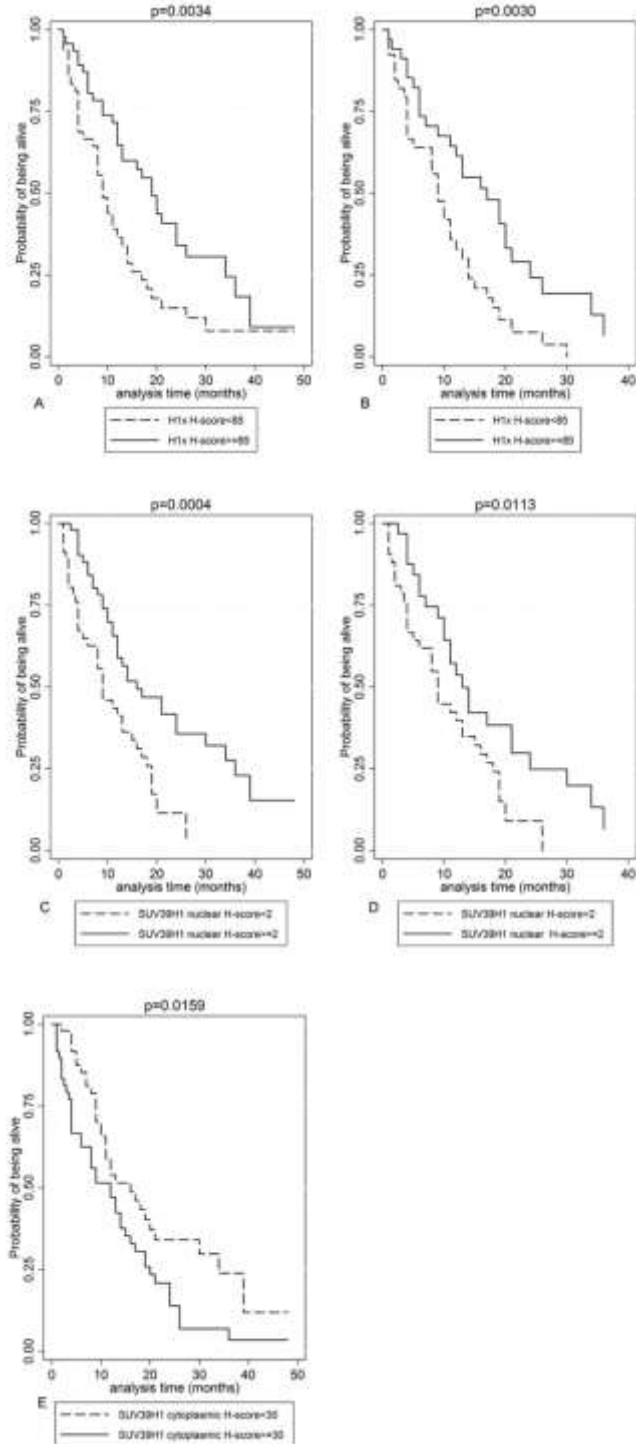


Εικόνα 16. Ανάλυση Western blot των H1x, H3K9me3 και H4K20me3 σε ιστούς γλοιωμάτων και το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό.

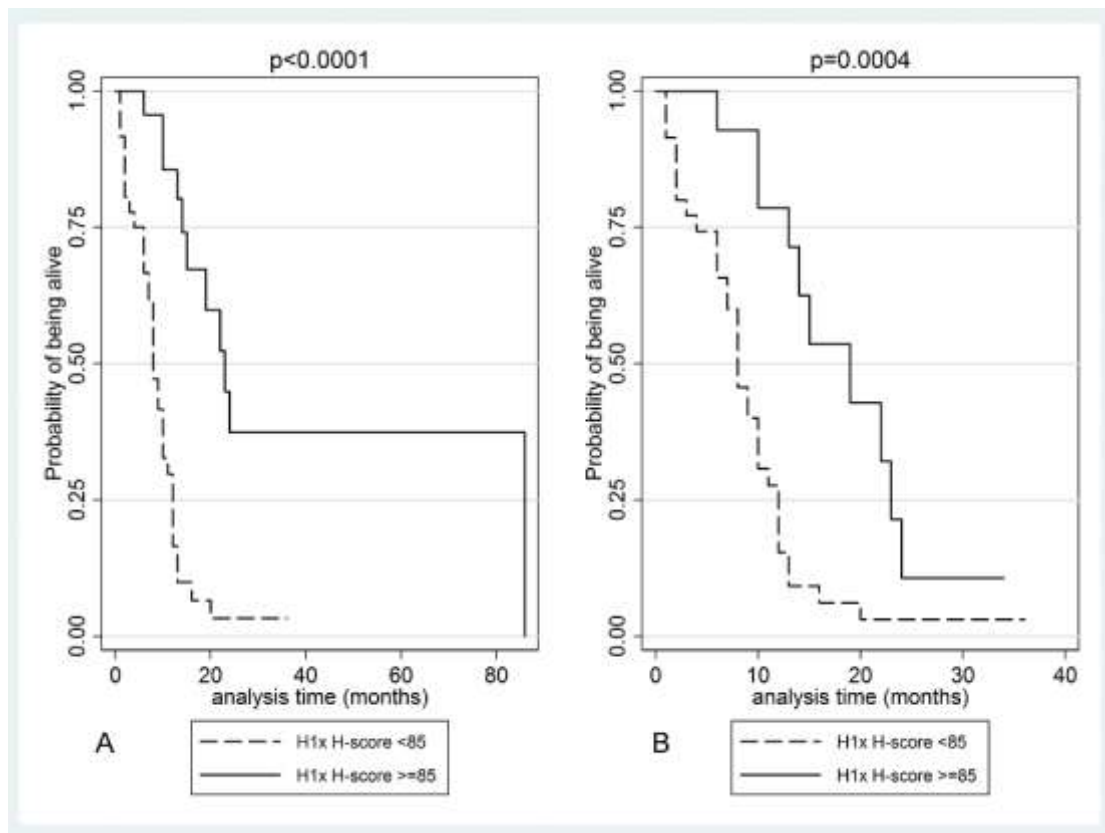
Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης Western blot για την έκφραση των H1x, H3K9me3 και H4K20me3 σε ιστούς γλοιωμάτων διάφορων βαθμών κακοήθειας και σε φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό. Πυκνομετρική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα (κανονικοποιημένα στα επίπεδα ακτίνης). Παρατηρείται τάση αυξημένων επιπέδων H1x και H4K20me3 σε όγκους βαθμού κακοήθειας II, η οποία όμως είναι λιγότερο εμφανής για την H1x, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο Western blot.



Εικόνα 17. Καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανάλογα με την έκφραση της H1x (A, B), πυρηνικής SUV39H1 (C, D) και κυτταροπλασματικής SUV39H1 (E) στο συνολικό δείγμα (A, B, C) και στα γλοιοβλαστώματα (B, D) στο αρχικό δείγμα. Αυξημένη έκφραση της H1x, αυξημένη πυρηνική SUV39H1 και ελαττωμένη κυτταροπλασματική έκφραση SUV39H1 συσχετίστηκαν με βελτιωμένη συνολική επιβίωση.

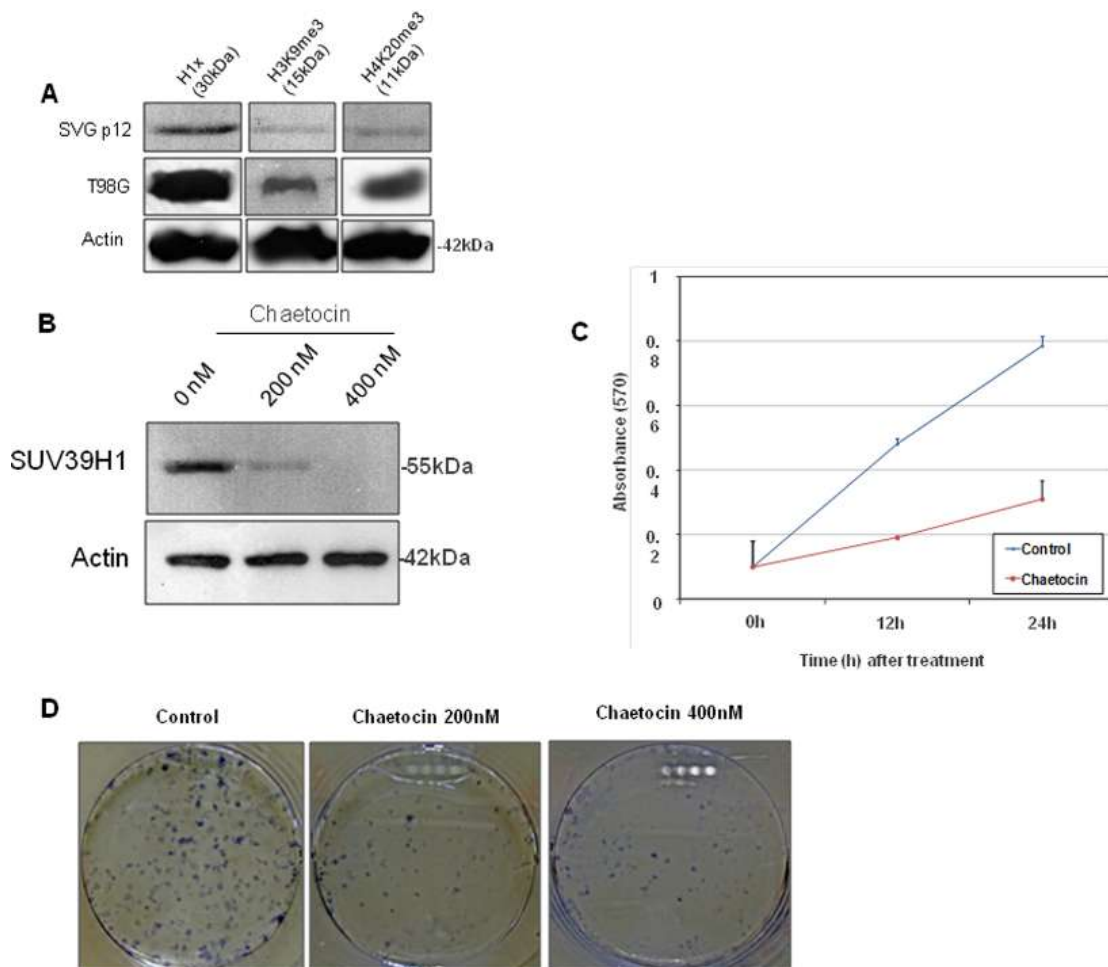


Εικόνα 18. Καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανάλογα με την έκφραση της H1x στο συνολικό δείγμα (A) και στα γλοιοβλαστώματα (B) στο δείγμα επαλήθευσης. Αυξημένη έκφραση της H1x σήμαινε υψηλότερη πιθανότητα επιβίωσης.



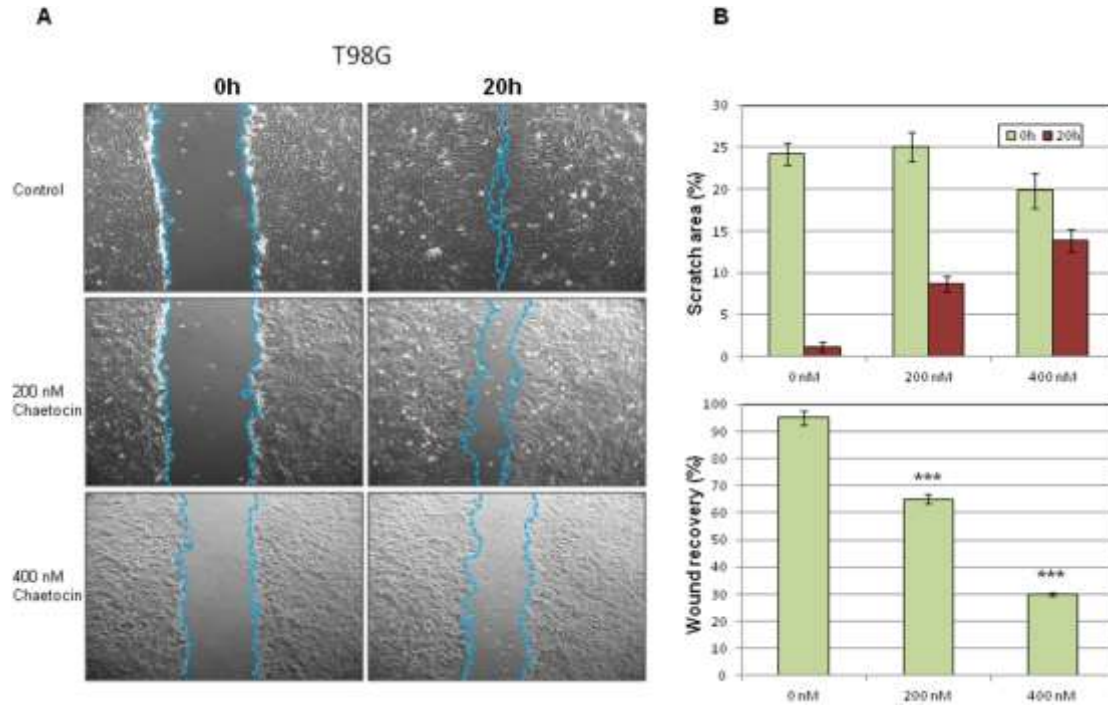
Εικόνα 19. Ανάλυση Western blot για τα επίπεδα έκφρασης των H1x, H3K9me3 και H4K20me3 σε αστρογλοϊκά κύτταρα SVG p12 και στην κυτταρική σειρά γλοιώματος T98G.

(A). Αναστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της SUV39H1 μετά την εφαρμογή 200 nM και 400 nM chaetocin, μέθοδος Western blot (B). MTT δοκιμασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα γλοιώματος 12 ώρες και 24 ώρες μετά την εφαρμογή chaetocin, οι οποίες έδειξαν ελαττωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά την αναστολή της SUV39H1. Όλες οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις τεσσάρων παράλληλων θέσεων (C). Δοκιμασίες κλωνικής έκπτυξης των T98G κυττάρων, που πραγματοποιήθηκαν μετά από 12h εφαρμογή chaetocin (200 nM, 400 nM). Τα ποσοστά αποικιών (%) για τα κύτταρα T98G μετά την εφαρμογή chaetocin αξιολογήθηκαν σε σχέση με μάρτυρες που δεν υπέστησαν επεξεργασία. Οι αποικίες μετρήθηκαν εις τριπλούν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ο σχηματισμός αποικιών και η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων T98G ελαττώθηκαν με την εφαρμογή chaetocin σε σχέση με τους μάρτυρες.



Εικόνα 20. Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων μίας στιβάδας με τη δημιουργία εκδοράς.

(A) Οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή 200 nM και 400 nM chaetocin για 20 ώρες (B) Η κυτταρική μετανάστευση στην περιοχή της εκδοράς υπολογίστηκε για τα κύτταρα T98G στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin. Η επούλωση της εκδοράς αξιολογήθηκε για τα κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε chaetocin σε σχέση με κύτταρα-μάρτυρες στα οποία δεν εφαρμόστηκε chaetocin (***) $p < 0.001$)



ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] The Society For Neuroscience. *Brain Facts* 2008.
- [2] Levy NM, Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy Principles of Physiology. 4th Edition* 2006.
- [3] Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 6th Edition.* 2013.
- [4] Rubin R, Strayer DS, Rubin E. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 6th Edition* 2011.
- [5] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. *WHO Classification of tumours of the central nervous system.* Lyon: IARC 2007.
- [6] Kleihues P, Cavenee WK. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system.* Lyon: IARC 2000.
- [7] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* Lyon: IARC 2016.
- [8] Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120: 707-18.
- [9] Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem

consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014;24: 429-35.

[10] Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, Schweizer L, Korshunov A, Jones DT, Hovestadt V, Mittelbronn M, Schittenhelm J, Herold-Mende C, Unterberg A, Platten M, Weller M, Wick W, Pfister SM, von Deimling A. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2015;129: 133-46.

[11] Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56: 857-65.

[12] Stockhammer F, Misch M, Helms HJ, Lengler U, Prall F, von Deimling A, Hartmann C. IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. *Seizure.* 2012;21: 194-7.

[13] Ostrom QT, de Blank PM, Kruchko C, Petersen CM, Liao P, Finlay JL, Stearns DS, Wolff JE, Wolinsky Y, Letterio JJ, Barnholtz-Sloan JS. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2015;16 Suppl 10: x1-x36.

[14] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014;16 Suppl 4: iv1-63.

[15] Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, Sahm F, Koelsche C, Korshunov A, Olar A, Hartmann C, Reijneveld JC, Wesseling P, Unterberg A, Platten M, Wick W, Herold-Mende C, Aldape K, von Deimling A. IDH

mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015;129: 867-73.

[16] Soffietti R, Baumert BG, Bello L, von Deimling A, Duffau H, Frenay M, Grisold W, Grant R, Graus F, Hoang-Xuan K, Klein M, Melin B, Rees J, Siegal T, Smits A, Stupp R, Wick W, European Federation of Neurological S. Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO Task Force. *Eur J Neurol.* 2010;17: 1124-33.

[17] Tandon A, Schiff D. Therapeutic decision making in patients with newly diagnosed low grade glioma. *Curr Treat Options Oncol.* 2014;15: 529-38.

[18] Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, Kim JC, Cosper AK, Dias-Santagata D, Nutt CL, Iafrate AJ, Louis DN. A sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse astrocytoma from astrocytosis: chromosome 7 gain with mutant isocitrate dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70: 110-5.

[19] Hoshino T, Wilson BC, Ellis WG. Gemistocytic astrocytes in gliomas. An autoradiographic study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1975;34: 263-81.

[20] Kros JM, Schouten WC, Janssen PJ, van der Kwast TH. Proliferation of gemistocytic cells and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive oligodendroglial cells in gliomas: a MIB-1/GFAP double labeling study. *Acta Neuropathol.* 1996;91: 99-103.

[21] Krouwer HG, Davis RL, Silver P, Prados M. Gemistocytic astrocytomas: a reappraisal. *J Neurosurg.* 1991;74: 399-406.

[22] Onda K, Davis RL, Wilson CB, Hoshino T. Regional differences in bromodeoxyuridine uptake, expression of Ki-67 protein, and nucleolar organizer region counts in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 1994;87: 586-93.

- [23] Reis RM, Hara A, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic evidence of the neoplastic nature of gemistocytes in astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2001;102: 422-5.
- [24] Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Leone M, Soffietti R. Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. *Cancer.* 1988;61: 1386-93.
- [25] Burger PC, Scheithauer BW. *Tumors of the Central Nervous System.* Washington: Armed Forces Institute of Pathology 1994.
- [26] Kleihues P, Kiessling M, Janzer RC. Morphological markers in neuro-oncology. *Curr Top Pathol.* 1987;77: 307-38.
- [27] Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 1986;70: 333-9.
- [28] Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol.* 2009;118: 599-601.
- [29] Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D, Ackermann U, Tessmer C, Korshunov A, Zentgraf H, Hartmann C, von Deimling A. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol.* 2010;20: 245-54.
- [30] Haapasalo H, Isola J, Sallinen P, Kalimo H, Helin H, Rantala I. Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am J Pathol.* 1993;142: 1347-51.
- [31] Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53: 11-21.
- [32] Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, Lang FF, Koslow M, Miller DC. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol.* 1993;3: 229-35.

[33] Cardoso C, Lutz Y, Mignon C, Compe E, Depetris D, Mattei MG, Fontes M, Colleaux L. ATR-X mutations cause impaired nuclear location and altered DNA binding properties of the XNP/ATR-X protein. *J Med Genet.* 2000;37: 746-51.

[34] Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, Bettegowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman AH, Riggins GJ, Holdhoff M et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3: 709-22.

[35] Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kastenhuber ER, Heguy A, Petrini JH, Chan TA, Huse JT. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget.* 2012;3: 1194-203.

[36] Coons SW, Johnson PC. Regional heterogeneity in the proliferative activity of human gliomas as measured by the Ki-67 labeling index. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993;52: 609-18.

[37] Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ, Crawford PJ, Kalbag RM, Mendelow AD, Sengupta RP, Pearson AD. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer.* 1992;66: 373-85.

[38] Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol.* 1994;87: 47-54.

[39] Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1990;16: 123-33.

[40] Gorovets D, Kannan K, Shen R, Kastenhuber ER, Islamdoust N, Campos C, Pentsova E, Heguy A, Jhanwar SC, Mellinghoff IK, Chan TA, Huse JT.

IDH mutation and neuroglial developmental features define clinically distinct subclasses of lower grade diffuse astrocytic glioma. *Clin Cancer Res.* 2012;18: 2490-501.

[41] Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19: 764-72.

[42] Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116: 597-602.

[43] Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009;118: 469-74.

[44] Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321: 1807-12.

[45] Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360: 765-73.

[46] Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009;27: 4150-4.

[47] Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462: 739-44.

[48] Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483: 474-8.

[49] Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012;483: 479-83.

[50] Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO, Suva ML, Bernstein BE. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature*. 2016;529: 110-4.

[51] Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 2009;174: 1149-53.

[52] Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schuler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lutolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol*. 2004;108: 49-56.

[53] Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G. Analysis of p53 mutation and

epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55: 822-31.

[54] Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* 1997;3: 523-30.

[55] Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci.* 2013;38: 461-6.

[56] Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettegowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Riggins GJ, Kinzler KW et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 2011;333: 425.

[57] Cancer Genome Atlas Research N, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O, Robertson AG, Noushmehr H, Laird PW, Cherniack AD, Akbani R, Huse JT, Ciriello G, Poisson LM, Barnholtz-Sloan JS et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015;372: 2481-98.

[58] Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372: 2499-508.

[59] Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors

derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 6021-6.

[60] Conte D, Huh M, Goodall E, Delorme M, Parks RJ, Picketts DJ. Loss of Atrx sensitizes cells to DNA damaging agents through p53-mediated death pathways. *PLoS One*. 2012;7: e52167.

[61] Bourne TD, Schiff D. Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. *Nat Rev Neurol*. 2010;6: 695-701.

[62] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64: 479-89.

[63] Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, Afra D, Cornu P, Bolla M, Vecht C, Karim AB, European Organization for R, Treatment of Cancer Brain Tumor Cooperative G, European Organization for R, Treatment of Cancer Radiotherapy Cooperative G. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2002;20: 2076-84.

[64] Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest*. 1997;76: 277-84.

[65] Peraud A, Ansari H, Bise K, Reulen HJ. Clinical outcome of supratentorial astrocytoma WHO grade II. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140: 1213-22.

[66] Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen HJ. Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Clin Cancer Res*. 2002;8: 1117-24.

[67] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64: 6892-9.

[68] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170: 1445-53.

[69] Perilongo G, Carollo C, Salviati L, Murgia A, Pillon M, Basso G, Gardiman M, Laverda A. Diencephalic syndrome and disseminated juvenile pilocytic astrocytomas of the hypothalamic-optic chiasm region. *Cancer.* 1997;80: 142-6.

[70] Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koepfen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009;27: 5874-80.

[71] Killela PJ, Pirozzi CJ, Reitman ZJ, Jones S, Rasheed BA, Lipp E, Friedman H, Friedman AH, He Y, McLendon RE, Bigner DD, Yan H. The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. *Oncotarget.* 2014;5: 1452-7.

[72] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16: 896-913.

[73] Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 2011;29: 4482-90.

[74] Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg.* 1976;44: 442-8.

[75] Vecht CJ, Kerkhof M, Duran-Pena A. Seizure prognosis in brain tumors: new insights and evidence-based management. *Oncologist.* 2014;19: 751-9.

- [76] DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med*. 2001;344: 114-23.
- [77] Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 1988;68: 698-704.
- [78] Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003;21: 1624-36.
- [79] Arita N, Taneda M, Hayakawa T. Leptomeningeal dissemination of malignant gliomas. Incidence, diagnosis and outcome. *Acta Neurochir (Wien)*. 1994;126: 84-92.
- [80] Gheyi V, Hui FK, Doppenberg EM, Todd W, Broaddus WC. Glioblastoma multiforme causing calvarial destruction: an unusual manifestation revisited. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25: 1533-7.
- [81] Hamilton JD, Rapp M, Schneiderhan T, Sabel M, Hayman A, Scherer A, Kropil P, Budach W, Gerber P, Kretschmar U, Prabhu S, Ginsberg LE, Bolke E, Matuschek C. Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape. *J Clin Oncol*. 2014;32: e80-4.
- [82] Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, Oliveira SM, Springer S, Bhere D, Chi AS, Wakimoto H, Rothenberg SM, Sequist LV, Kapur R, Shah K, Iafrate AJ, Curry WT, Loeffler JS, Batchelor TT, Louis DN, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov*. 2014;4: 1299-309.
- [83] Jimshelishvili S, Alshareef AT, Papadimitriou K, Bregy A, Shah AH, Graham RM, Ferraro N, Komotar RJ. Extracranial glioblastoma in transplant recipients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140: 801-7.

[84] Burger PC, Kleihues P. Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer*. 1989;63: 2014-23.

[85] Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*. 1987;59: 1617-25.

[86] Haddad SF, Moore SA, Schelper RL, Goeken JA. Vascular smooth muscle hyperplasia underlies the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992;51: 488-92.

[87] Gutman DA, Cooper LA, Hwang SN, Holder CA, Gao J, Aurora TD, Dunn WD, Jr., Scarpace L, Mikkelsen T, Jain R, Wintermark M, Jilwan M, Raghavan P, Huang E, Clifford RJ, Mongkolwat P, Kleper V, Freymann J, Kirby J, Zinn PO et al. MR imaging predictors of molecular profile and survival: multi-institutional study of the TCGA glioblastoma data set. *Radiology*. 2013;267: 560-9.

[88] Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65: 529-39.

[89] Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. 2000;88: 2606-18.

[90] Ishizawa K, Komori T, Shimada S, Hirose T. Olig2 and CD99 are useful negative markers for the diagnosis of brain tumors. *Clin Neuropathol*. 2008;27: 118-28.

[91] Terada T. Expression of cytokeratins in glioblastoma multiforme. *Pathol Oncol Res*. 2015;21: 817-9.

[92] Brennan C. Genomic profiles of glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011;11: 291-7.

[93] Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, De Neve N, Maris C, Trepant AL, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*. 2012;7: e45475.

[94] Brat DJ, Ryken TC, Kalkanis SN, Olson JJ, Committee ACJG. The role of neuropathology in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*. 2014;118: 461-78.

[95] Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, Horbinski C. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol*. 2012;36: 1186-93.

[96] Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;22: 9-15.

[97] Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*. 1995;10: 2243-6.

[98] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhim R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155: 462-77.

[99] Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res*. 1992;276: 299-306.

[100] Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal

deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89: 4309-13.

[101] Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84: 6899-903.

[102] Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, Liu EM, Reichel J, Porrati P, Pellegatta S, Qiu K, Gao Z, Ceccarelli M, Riccardi R, Brat DJ, Guha A, Aldape K, Golfinos JG, Zagzag D, Mikkelsen T et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*. 2012;337: 1231-5.

[103] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17: 98-110.

[104] Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455: 1061-8.

[105] Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*. 2001;11: 159-68.

[106] Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*. 1993;53: 2736-9.

[107] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012;14 Suppl 5: v1-49.

[108] Reifenberger G, Weber RG, Rieher V, Kaulich K, Willscher E, Wirth H, Gietzelt J, Hentschel B, Westphal M, Simon M, Schackert G, Schramm J, Matschke J, Sabel MC, Gramatzki D, Felsberg J, Hartmann C, Steinbach JP, Schlegel U, Wick W et al. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int J Cancer*. 2014;135: 1822-31.

[109] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10: 459-66.

[110] Barker FG, 2nd, Davis RL, Chang SM, Prados MD. Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer*. 1996;77: 1161-6.

[111] Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65: 846-54.

[112] Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15: 6002-7.

[113] Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010;17: 510-22.

[114] Capper D, Sahm F, Hartmann C, Meyermann R, von Deimling A, Schittenhelm J. Application of mutant IDH1 antibody to differentiate diffuse glioma

from nonneoplastic central nervous system lesions and therapy-induced changes. *Am J Surg Pathol.* 2010;34: 1199-204.

[115] Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM, Platten M, Weller M, Wick W. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol.* 2013;126: 443-51.

[116] Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996;6: 217-23; discussion 23-4.

[117] Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Lowenberg B, Licht JD et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18: 553-67.

[118] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell. 6th Edition.* . New York: Garland Science 2015.

[119] Wallrath LL, Elgin SC. Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 1995;9: 1263-77.

[120] Frenster JH, Allfrey VG, Mirsky AE. Repressed and Active Chromatin Isolated from Interphase Lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963;50: 1026-32.

[121] Gilbert N, Allan J. Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 11949-54.

[122] Elgin SC, Reuter G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5: a017780.

[123] Saksouk N, Simboeck E, Dejardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8: 3.

[124] Trojer P, Reinberg D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*. 2007;28: 1-13.

[125] Kasinsky HE, Lewis JD, Dacks JB, Ausio J. Origin of H1 linker histones. *FASEB J*. 2001;15: 34-42.

[126] Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000;406: 593-9.

[127] Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 2001;292: 110-3.

[128] Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J*. 2005;24: 800-12.

[129] Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*. 2002;16: 919-32.

[130] Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem*. 2001;276: 25309-17.

[131] Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev*. 2002;16: 1779-91.

[132] Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev.* 2005;19: 815-26.

[133] Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 2003;13: 1192-200.

[134] Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda J, Deplus R, Fuks F, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15: 1176-83.

[135] Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 2006;125: 301-13.

[136] Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006;441: 349-53.

[137] Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, Stokes N, Su IH, Hannon G, Tarakhovskiy A, Fuchs E. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell.* 2009;136: 1122-35.

[138] Xu CR, Li LC, Donahue G, Ying L, Zhang YW, Gadue P, Zaret KS. Dynamics of genomic H3K27me3 domains and role of EZH2 during pancreatic endocrine specification. *EMBO J.* 2014;33: 2157-70.

- [139] Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469: 343-9.
- [140] Beisel C, Paro R. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 123-35.
- [141] Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 2001;410: 120-4.
- [142] Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001;410: 116-20.
- [143] Canzio D, Chang EY, Shankar S, Kuchenbecker KM, Simon MD, Madhani HD, Narlikar GJ, Al-Sady B. Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol Cell*. 2011;41: 67-81.
- [144] Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6: 479-91.
- [145] Breiling A, Turner BM, Bianchi ME, Orlando V. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature*. 2001;412: 651-5.
- [146] Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC, Pirrotta V. Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell*. 2004;13: 887-93.
- [147] Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*. 2012;151: 994-1004.

[148] Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet.* 2016;32: 29-41.

[149] Ahmed K, Dehghani H, Rugg-Gunn P, Fussner E, Rossant J, Bazett-Jones DP. Global chromatin architecture reflects pluripotency and lineage commitment in the early mouse embryo. *PLoS One.* 2010;5: e10531.

[150] Hiratani I, Ryba T, Itoh M, Rathjen J, Kulik M, Papp B, Fussner E, Bazett-Jones DP, Plath K, Dalton S, Rathjen PD, Gilbert DM. Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis. *Genome Res.* 2010;20: 155-69.

[151] Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7: 540-6.

[152] Vogel MJ, Guelen L, de Wit E, Peric-Hupkes D, Loden M, Talhout W, Feenstra M, Abbas B, Classen AK, van Steensel B. Human heterochromatin proteins form large domains containing KRAB-ZNF genes. *Genome Res.* 2006;16: 1493-504.

[153] O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, Farnham PJ. Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet.* 2007;3: e89.

[154] Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M, Zhang X, Durham T, Miri M, Deshpande V, De Jager PL, Bennett DA, Houmard JA, Muoio DM, Onder TT, Camahort R, Cowan CA, Meissner A, Epstein CB, Shores N, Bernstein BE. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell.* 2013;152: 642-54.

[155] Pauler FM, Sloane MA, Huang R, Regha K, Koerner MV, Tamir I, Sommer A, Aszodi A, Jenuwein T, Barlow DP. H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome Res.* 2009;19: 221-33.

[156] Chandra T, Kirschner K, Thuret JY, Pope BD, Ryba T, Newman S, Ahmed K, Samarajiwa SA, Salama R, Carroll T, Stark R, Janky R, Narita M, Xue L, Chicas A, Nunez S, Janknecht R, Hayashi-Takanaka Y, Wilson MD, Marshall A et al. Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Mol Cell*. 2012;47: 203-14.

[157] Wen B, Wu H, Shinkai Y, Irizarry RA, Feinberg AP. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2009;41: 246-50.

[158] Fillion GJ, van Steensel B. Reassessing the abundance of H3K9me2 chromatin domains in embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2010;42: 4; author reply 5-6.

[159] Lienert F, Mohn F, Tiwari VK, Baubec T, Roloff TC, Gaidatzis D, Stadler MB, Schubeler D. Genomic prevalence of heterochromatic H3K9me2 and transcription do not discriminate pluripotent from terminally differentiated cells. *PLoS Genet*. 2011;7: e1002090.

[160] Liu N, Zhang Z, Wu H, Jiang Y, Meng L, Xiong J, Zhao Z, Zhou X, Li J, Li H, Zheng Y, Chen S, Cai T, Gao S, Zhu B. Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability. *Genes Dev*. 2015;29: 379-93.

[161] Sridharan R, Gonzales-Cope M, Chronis C, Bonora G, McKee R, Huang C, Patel S, Lopez D, Mishra N, Pellegrini M, Carey M, Garcia BA, Plath K. Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1gamma in reprogramming to pluripotency. *Nat Cell Biol*. 2013;15: 872-82.

[162] Fang J, Feng Q, Ketel CS, Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Simon JA, Zhang Y. Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr Biol*. 2002;12: 1086-99.

[163] Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell*. 2002;9: 1201-13.

[164] Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*. 2004;18: 1251-62.

[165] Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell*. 2004;119: 603-14.

[166] Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callen E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA, Espejo A, Bedford MT, Nussenzweig A, Busslinger M, Jenuwein T. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev*. 2008;22: 2048-61.

[167] Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA. Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2008;28: 468-86.

[168] Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, Torres-Padilla ME, Heard E, Reinberg D. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol*. 2009;29: 2278-95.

[169] Abbas T, Shibata E, Park J, Jha S, Karnani N, Dutta A. CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Mol Cell*. 2010;40: 9-21.

[170] Centore RC, Havens CG, Manning AL, Li JM, Flynn RL, Tse A, Jin J, Dyson NJ, Walter JC, Zou L. CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone

methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Mol Cell*. 2010;40: 22-33.

[171] Jorgensen S, Elvers I, Trelle MB, Menzel T, Eskildsen M, Jensen ON, Helleday T, Helin K, Sorensen CS. The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J Cell Biol*. 2007;179: 1337-45.

[172] Tardat M, Murr R, Herceg Z, Sardet C, Julien E. PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J Cell Biol*. 2007;179: 1413-26.

[173] Wu S, Wang W, Kong X, Congdon LM, Yokomori K, Kirschner MW, Rice JC. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes Dev*. 2010;24: 2531-42.

[174] Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: 2797-806.

[175] Gonzalo S, Garcia-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AH, Cotter SE, Eguia R, Dean DC, Esteller M, Jenuwein T, Blasco MA. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol*. 2005;7: 420-8.

[176] Regha K, Sloane MA, Huang R, Pauler FM, Warczok KE, Melikant B, Radolf M, Martens JH, Schotta G, Jenuwein T, Barlow DP. Active and repressive chromatin are interspersed without spreading in an imprinted gene cluster in the mammalian genome. *Mol Cell*. 2007;27: 353-66.

[177] Julien E, Herr W. A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol Cell*. 2004;14: 713-25.

[178] Qi HH, Sarkissian M, Hu GQ, Wang Z, Bhattacharjee A, Gordon DB, Gonzales M, Lan F, Ongusaha PP, Huarte M, Yaghi NK, Lim H, Garcia BA, Brizuela

L, Zhao K, Roberts TM, Shi Y. Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development. *Nature*. 2010;466: 503-7.

[179] Liu W, Tanasa B, Tyurina OV, Zhou TY, Gassmann R, Liu WT, Ohgi KA, Benner C, Garcia-Bassets I, Aggarwal AK, Desai A, Dorrestein PC, Glass CK, Rosenfeld MG. PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature*. 2010;466: 508-12.

[180] Cole RD. Microheterogeneity in H1 histones and its consequences. *Int J Pept Protein Res*. 1987;30: 433-49.

[181] Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene*. 2001;271: 1-12.

[182] Parseghian MH, Newcomb RL, Hamkalo BA. Distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin II: distribution in human adult fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2001;83: 643-59.

[183] Rasheed BK, Whisenant EC, Ghai RD, Papaioannou VE, Bhatnagar YM. Biochemical and immunocytochemical analysis of a histone H1 variant from the mouse testis. *J Cell Sci*. 1989;94 (Pt 1): 61-71.

[184] Parseghian MH, Harris DA, Rishwain DR, Hamkalo BA. Characterization of a set of antibodies specific for three human histone H1 subtypes. *Chromosoma*. 1994;103: 198-208.

[185] Franke K, Drabent B, Doenecke D. Testicular expression of the mouse histone H1.1 gene. *Histochem Cell Biol*. 1998;109: 383-90.

[186] Khochbin S, Wolffe AP. Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur J Biochem*. 1994;225: 501-10.

[187] Zlatanova J, Doenecke D. Histone H1 zero: a major player in cell differentiation? *FASEB J*. 1994;8: 1260-8.

- [188] Doenecke D, Albig W, Bode C, Drabent B, Franke K, Gavenis K, Witt O. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem Cell Biol.* 1997;107: 1-10.
- [189] Happel N, Doenecke D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene.* 2009;431: 1-12.
- [190] Izzo A, Kamieniarz K, Schneider R. The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol Chem.* 2008;389: 333-43.
- [191] Seyedin SM, Cole RD, Kistler WS. H1 histones from mammalian testes. The widespread occurrence of H1t. *Exp Cell Res.* 1981;136: 399-405.
- [192] Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 10546-51.
- [193] Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development.* 2001;128: 655-64.
- [194] Tanaka M, Kihara M, Hennebold JD, Eppig JJ, Viveiros MM, Emery BR, Carrell DT, Kirkman NJ, Meczekalski B, Zhou J, Bondy CA, Becker M, Schultz RM, Misteli T, De La Fuente R, King GJ, Adashi EY. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. *Biol Reprod.* 2005;72: 135-42.
- [195] Yamamoto T, Horikoshi M. Cloning of the cDNA encoding a novel subtype of histone H1. *Gene.* 1996;173: 281-5.
- [196] Happel N, Schulze E, Doenecke D. Characterisation of human histone H1x. *Biol Chem.* 2005;386: 541-51.
- [197] Sulimova GE, Kutsenko AS, Rakhmanaliev ER, Udina IG, Kompaniytsev AA, Protopopov AI, Moisjak EV, Klimov EA, Muravenko OV, Zelenin AV, Braga EA, Kashuba VI, Zabarovsky ER, Kisselev LL. Human chromosome 3:

integration of 60 NotI clones into a physical and gene map. *Cytogenet Genome Res.* 2002;98: 177-83.

[198] Stoldt S, Wenzel D, Schulze E, Doenecke D, Happel N. G1 phase-dependent nucleolar accumulation of human histone H1x. *Biol Cell.* 2007;99: 541-52.

[199] Okuwaki M, Abe M, Hisaoka M, Nagata K. Regulation of Cellular Dynamics and Chromosomal Binding Site Preference of Linker Histones H1.0 and H1.X. *Mol Cell Biol.* 2016;36: 2681-96.

[200] Takata H, Matsunaga S, Morimoto A, Ono-Maniwa R, Uchiyama S, Fukui K. H1.X with different properties from other linker histones is required for mitotic progression. *FEBS Lett.* 2007;581: 3783-8.

[201] Warneboldt J, Haller F, Horstmann O, Danner BC, Fuzesi L, Doenecke D, Happel N. Histone H1x is highly expressed in human neuroendocrine cells and tumours. *BMC Cancer.* 2008;8: 388.

[202] Shahhoseini M, Favaedi R, Baharvand H, Sharma V, Stunnenberg HG. Evidence for a dynamic role of the linker histone variant H1x during retinoic acid-induced differentiation of NT2 cells. *FEBS Lett.* 2010;584: 4661-4.

[203] Mayor R, Izquierdo-Bouldstridge A, Millan-Arino L, Bustillos A, Sampaio C, Luque N, Jordan A. Genome distribution of replication-independent histone H1 variants shows H1.0 associated with nucleolar domains and H1X associated with RNA polymerase II-enriched regions. *J Biol Chem.* 2015;290: 7474-91.

[204] Liu BL, Cheng JX, Zhang X, Wang R, Zhang W, Lin H, Xiao X, Cai S, Chen XY, Cheng H. Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19: 2888-96.

[205] Spyropoulou A, Piperi C, Adamopoulos C, Papavassiliou AG. Deregulated chromatin remodeling in the pathobiology of brain tumors. *Neuromolecular Med.* 2013;15: 1-24.

- [206] Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238: 163-70.
- [207] Luger K. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res*. 2006;14: 5-16.
- [208] Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15: 172-83.
- [209] Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389: 251-60.
- [210] Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999;98: 285-94.
- [211] Harvey AC, Downs JA. What functions do linker histones provide? *Mol Microbiol*. 2004;53: 771-5.
- [212] McBryant SJ, Lu X, Hansen JC. Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions. *Cell Res*. 2010;20: 519-28.
- [213] Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007;447: 407-12.
- [214] Li F, Ye B, Hong L, Xu H, Fishbein MC. Epigenetic modifications of histone h4 in lung neuroendocrine tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19: 389-94.
- [215] Venneti S, Felicella MM, Coyne T, Phillips JJ, Gorovets D, Huse JT, Kofler J, Lu C, Tihan T, Sullivan LM, Santi M, Judkins AR, Perry A, Thompson CB. Histone 3 lysine 9 trimethylation is differentially associated with isocitrate dehydrogenase mutations in oligodendrogliomas and high-grade astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72: 298-306.
- [216] Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010;10: 457-69.

[217] Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284: 12727-34.

[218] Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*. 2004;15: 595-605.

[219] Tan SL, Nishi M, Ohtsuka T, Matsui T, Takemoto K, Kamio-Miura A, Aburatani H, Shinkai Y, Kageyama R. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development*. 2012;139: 3806-16.

[220] He Y, Korboukh I, Jin J, Huang J. Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;44: 70-9.

[221] Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, Xu R, Timm MM, Bible KC. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*. 2007;109: 2579-88.

[222] Spyropoulou A, Gargalionis A, Dalagiorgou G, Adamopoulos C, Papavassiliou KA, Lea RW, Piperi C, Papavassiliou AG. Role of histone lysine methyltransferases SUV39H1 and SETDB1 in gliomagenesis: modulation of cell proliferation, migration, and colony formation. *Neuromolecular Med*. 2014;16: 70-82.

[223] Gabrovsky N, Georgieva M, Laleva M, Uzunov K, Miloshev G. Histone H1.0--a potential molecular marker with prognostic value for patients with malignant gliomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2013;155: 1437-42.

[224] Lachin JM, Foulkes MA. Evaluation of sample size and power for analyses of survival with allowance for nonuniform patient entry, losses to follow-up, noncompliance, and stratification. *Biometrics*. 1986;42: 507-19.

[225] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8: 286-98.

- [226] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358: 1148-59.
- [227] Seligson DB, Horvath S, McBrián MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdistani SK. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol.* 2009;174: 1619-28.
- [228] Ellinger J, Bachmann A, Goke F, Behbahani TE, Baumann C, Heukamp LC, Rogenhofer S, Müller SC. Alterations of global histone H3K9 and H3K27 methylation levels in bladder cancer. *Urol Int.* 2014;93: 113-8.
- [229] Wang H, Feng Y, Bao Z, Jiang C, Yan W, Wang Y, Zhang C, Liu Y, Zhang Q, Zhang W, Jiang C. Epigenetic silencing of KAZALD1 confers a better prognosis and is associated with malignant transformation/progression in glioma. *Oncol Rep.* 2013;30: 2089-96.
- [230] Saratsis AM, Kambhampati M, Snyder K, Yadavilli S, Devaney JM, Harmon B, Hall J, Raabe EH, An P, Weingart M, Rood BR, Magge SN, MacDonald TJ, Packer RJ, Nazarian J. Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol.* 2014;127: 881-95.
- [231] Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Muzumdar D, Goel A, Shiras A. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. *J Neurooncol.* 2011;104: 483-94.
- [232] Lohmann F, Loureiro J, Su H, Fang Q, Lei H, Lewis T, Yang Y, Labow M, Li E, Chen T, Kadam S. KMT1E mediated H3K9 methylation is required for the maintenance of embryonic stem cells by repressing trophectoderm differentiation. *Stem Cells.* 2010;28: 201-12.
- [233] Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM.

Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2010;465: 966.

[234] Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17: 225-34.

[235] Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, Leung IK, Li XS, Woon EC, Yang M, McDonough MA, King ON, Clifton IJ, Klose RJ, Claridge TD, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Kawamura A. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. 2011;12: 463-9.

[236] Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19: 17-30.

[237] Rai K, Nadauld LD, Chidester S, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Mol Cell Biol*. 2006;26: 7077-85.

[238] Esteve PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev*. 2006;20: 3089-103.

[239] Rai K, Jafri IF, Chidester S, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA. Dnmt3 and G9a cooperate for tissue-specific development in zebrafish. *J Biol Chem*. 2010;285: 4110-21.

[240] Fanelli M, Caprodossi S, Ricci-Vitiani L, Porcellini A, Tomassoni-Ardori F, Amatori S, Andreoni F, Magnani M, De Maria R, Santoni A, Minucci S, Pelicci PG. Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma

is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment. *Oncogene*. 2008;27: 358-65.

[241] Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretzschmar HA, Hinske LC, Kreth FW. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One*. 2011;6: e17156.

[242] Metellus P, Coulibaly B, Colin C, de Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, Barlier A, Boisselier B, Mokhtari K, Wang XW, Loundou A, Chapon F, Pineau S, Ouafik L, Chinot O, Figarella-Branger D. Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol*. 2010;120: 719-29.

[243] Myung JK, Cho HJ, Park CK, Kim SK, Phi JH, Park SH. IDH1 mutation of gliomas with long-term survival analysis. *Oncol Rep*. 2012;28: 1639-44.

[244] Chen JH, Yeh KT, Yang YM, Chang JG, Lee HE, Hung SY. High expressions of histone methylation- and phosphorylation-related proteins are associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma in male population of Taiwan. *Med Oncol*. 2013;30: 513.

[245] Watanabe H, Soejima K, Yasuda H, Kawada I, Nakachi I, Yoda S, Naoki K, Ishizaka A. Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int*. 2008;8: 15.

[246] Patani N, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2011;31: 4115-25.

[247] Han X, Li R, Zhang W, Yang X, Wheeler CG, Friedman GK, Province P, Ding Q, You Z, Fathallah-Shaykh HM, Gillespie GY, Zhao X, King PH, Nabors LB.

Expression of PRMT5 correlates with malignant grade in gliomas and plays a pivotal role in tumor growth in vitro. *J Neurooncol.* 2014;118: 61-72.

[248] Yan F, Alinari L, Lustberg ME, Martin LK, Cordero-Nieves HM, Banasavadi-Siddegowda Y, Virk S, Barnholtz-Sloan J, Bell EH, Wojton J, Jacob NK, Chakravarti A, Nowicki MO, Wu X, Lapalombella R, Datta J, Yu B, Gordon K, Haseley A, Patton JT et al. Genetic validation of the protein arginine methyltransferase PRMT5 as a candidate therapeutic target in glioblastoma. *Cancer Res.* 2014;74: 1752-65.

[249] Schneider AC, Heukamp LC, Rogenhofer S, Fechner G, Bastian PJ, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2011;108: E290-6.

[250] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005;37: 391-400.

[251] Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. *Neurobiol Dis.* 2010;39: 40-6.

[252] Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymin B, Khochbin S, Gazzeri S. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 7237-45.

[253] Sarg B, Koutzamani E, Helliger W, Rundquist I, Lindner HH. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem.* 2002;277: 39195-201.

[254] Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009;69: 3802-9.

[255] Harshman SW, Young NL, Parthun MR, Freitas MA. H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: 9593-609.

[256] Medrzycki M, Zhang Y, McDonald JF, Fan Y. Profiling of linker histone variants in ovarian cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17: 396-406.

[257] Murga M, Jaco I, Fan Y, Soria R, Martinez-Pastor B, Cuadrado M, Yang SM, Blasco MA, Skoultchi AI, Fernandez-Capetillo O. Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J Cell Biol.* 2007;178: 1101-8.

[258] Gerlitz G, Bustin M. Efficient cell migration requires global chromatin condensation. *J Cell Sci.* 2010;123: 2207-17.

[259] Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury TJ, Bhattacharyya R, Bouhassira EE, Stein A, Woodcock CL, Skoultchi AI. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell.* 2005;123: 1199-212.

[260] Savage ML, Olah I, Scott TR. Plasma cell proliferation in the chicken harderian gland. *Cell Prolif.* 1992;25: 337-44.

Z. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Η συμμετοχή των επιγενετικών αλλοιώσεων στην παθογένεση των γλοιωμάτων είναι γνωστή, όμως δεν έχει διαλευκανθεί η πιθανή σημασία που έχουν οι αποκλίνουσες από το φυσιολογικό τροποποιήσεις των ιστονών και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά τους ένζυμα. Πειραματικά δεδομένα έχουν εμπλέξει τις μεθυλοτρανσφεράσες λυσίνης (K) SETDB1 και SUV39H1 της ιστόνης H3 στην παθοβιολογία των γλοιωμάτων, ενώ έχει αναφερθεί ότι η ιστονική παραλλαγή H1.0 και η H4K20me3 πιθανώς επηρεάζουν την πρόγνωση. Μελετήσαμε την έκφραση της H3K9me3 και των μεθυλοτρανσφερασών της, καθώς επίσης την έκφραση των H4K20me3 και H1x σε 101 αστροκυτταρικούς όγκους σε σχέση με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και την επιβίωση των ασθενών. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση της αναστολής της SUV39H1 από τη chaetocin στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το σχηματισμό αποικιών και την ικανότητα για μετανάστευση των T98G κυτάρων. Τα επίπεδα της SETDB1 και της κυτταροπλασματικής SUV39H1 αυξάνονταν από το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό στους όγκους χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας, ενώ η πυρηνική SUV39H1 συσχετιζόταν αντίστροφα με το βαθμό κακοήθειας. Η ανοσοθετικότητα της H3K9me3 ήταν υψηλότερη στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό και δεν έδειξε συσχετίσεις με το βαθμό κακοήθειας, ενώ η έκφραση της H1x και της H4K20me3 ήταν υψηλότερη στο βαθμό κακοήθειας II σε σχέση με το φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό ή τους υψηλούς βαθμούς κακοήθειας. Τα ανωτέρω πρότυπα έκφρασης των H1x, H4K20me3 και H3K9me3 επιβεβαιώθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η εφαρμογή chaetocin σημαντικά ελάττωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κλωνική έκπτυξη και την ικανότητα για μετανάστευση στα κύτταρα T98G. Η ιστόνη H1x ήταν ανεξάρτητος ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας στα γλοιοβλαστώματα, εύρημα το οποίο επαληθεύτηκε από ανεξάρτητο σύνολο 66 ασθενών. Η ελαττωμένη πυρηνική έκφραση της SUV39H1 συσχετιζόταν αρνητικά με την επιβίωση κατά τη μονοπαραγοντική ανάλυση. Συμπερασματικά, οι H4K20me3 και H3K9

μεθυλοτρανσφεράσες συμμετέχουν στην ανάπτυξη των αστρογλοϊακών όγκων. Η απορρύθμιση της H1x αναδύθηκε ως προγνωστικός βιοδείκτης.

H. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (ENGLISH SUMMARY)

Although epigenetic alterations play an essential role in gliomagenesis, the relevance of aberrant histone modifications and the respective enzymes has not been clarified. Experimental data implicates histone H3 lysine (K) methyltransferases SETDB1 and SUV39H1 into glioma pathobiology, whereas linker histone variant H1.0 and H4K20me3 reportedly affect prognosis. We investigated the expression of H3K9me3 and its methyltransferases along with H4K20me3 and H1x in 101 astrocytic tumors with regard to clinicopathological characteristics and survival. The effect of SUV39H1 inhibition by chaetocin on the proliferation, colony formation and migration of T98G cells was also examined. SETDB1 and cytoplasmic SUV39H1 levels increased from normal brain through low-grade to high-grade tumors, nuclear SUV39H1 correlating inversely with grade. H3K9me3 immunoreactivity was higher in normal brain showing no association with grade, whereas H1x and H4K20me3 expression was higher in grade 2 than in normal brain or high grades. These expression patterns of H1x, H4K20me3 and H3K9me3 were verified by Western immunoblotting. Chaetocin treatment significantly reduced proliferation, clonogenic potential and migratory ability of T98G cells. H1x was an independent favorable prognosticator in glioblastomas, this effect being validated in an independent set of 66 patients. Diminished nuclear SUV39H1 expression adversely affected survival in univariate analysis. In conclusion, H4K20me3 and H3K9 methyltransferases are differentially implicated in astroglial tumor progression. Deregulation of H1x emerges as a prognostic biomarker.