

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

<< ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ-ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ >>

**Μελέτη της μεθυλίωσης των ιστονών σε παιδιατρικά
γλοιώματα**

ΚΑΡΑΧΟΥΣΟΥ- ΣΠΗΛΙΩΤΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΑΝΑΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ- ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ. Πιπέρη (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Κ. Τρούγκος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μ. Καραμούζης, Αναπληρωτής Καθηγητής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: Καραχούσου-Σπηλιωτακοπούλου

ΟΝΟΜΑ: Δανάη

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 21/02/1992

ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Αθήνα

e-mail: danai.spiliotak@gmail.com

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6974274341

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

- 09/2016-01/2020** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα από το πρόγραμμα «Μοριακή Μικροβιολογία- Βιοπαθολογία», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα
- 10/2016-06/2017** Πρόγραμμα Εξειδικευμένης Επιμόρφωσης με αντικείμενο «Εργαστηριακή και Κλινική Ιατρική Γενετική», Κέντρο Δια Βίου Μάθησης Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Βαθμός: 88%
- 09/2010-04/2016** Πτυχίο από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, Βαθμός: 7.24/10

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ/ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 02/2018-Σήμερα** Βιολόγος στα κεντρικά εργαστήρια του Νοσοκομείου Metropolitan. Στις αρμοδιότητες μου έγκειται ο χειρισμός Αιματολογικών, Βιοχημικών και Ανοσολογικών αναλυτών.
- 01/2018-01/2019** Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας , Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Διπλωματική Εργασία για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Μοριακή Μικροβιολογία-Βιοπαθολογία» με τίτλο «Μελέτη της μεθυλίωσης των ιστονών σε παιδιατρικά γλοιώματα» .
Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής εκπαιδεύτηκα και χρησιμοποιώ μοριακές τεχνικές, όπως Western Blot και ανοσοϊστοχημεία.
- 09/2017-02/2018** Πρακτική Άσκηση για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Μοριακή Μικροβιολογία-Βιοπαθολογία» σε εργαστήρια (rotation) της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α
- 04/2017** Genoma Lab, Χαλάνδρι, Αττική Πρακτική Άσκηση για το εξ' αποστάσεως μεταπτυχιακό δίπλωμα «Εργαστηριακή και Κλινική Ιατρική» . Κατά τη διάρκεια της πρακτικής άσκησης εκπαιδεύτηκα στις μοριακές τεχνικές PCR, qPCR, RT-PCR, DNA sequencing (Sanger και NGS) και microarrays.

- 09/2014-02/2016** Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
Πτυχιακή Εργασία με τίτλο «Βιοενεργητικός σχεδιασμός βιοσύνθεσης ουδέτερων λιπιδίων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*». Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής εκπαιδεύτηκα και χρησιμοποίησα επιτυχώς τεχνικές ανάπτυξης μικροοργανισμών, εκχύλισης λιπιδίων, ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης λιπιδίων (Nile red, Gas Chromatography)
- 07/2013-08/2013** Κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης «Ευγονία», Αθήνα, Ελλάδα
Πρακτική Άσκηση του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ/ΗΜΕΡΙΔΕΣ

- 8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 2017
- 7ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Μυκητολογίας, Αθήνα, 2016
- 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΠΕΒ «Βιοεπιστήμονες στον 21ο Αιώνα», Αθήνα, 2016
- Παρουσίαση poster στο 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Greek Lipid Forum: Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των Λιπιδίων με τίτλο «Παραγωγή ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* Δ. Σπηλιωτακοπούλου., Χ. Παπαεμμανουήλ, Π. Καταπόδης, Α. Τζάκος, Α. Πολύδερα, Ι. Γεροθανάσης, Χ. Σταμάτης», Αθήνα, 2015
- Παρουσίαση poster στο 6ο Συνεδριό Επιστημονικής Εταιρείας ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ με τίτλο «Επίδραση νιτρικών και φωσφορικών ιόντων στην παραγωγή λιπιδίων κατά την αύξηση του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε μπλε μονοχρωματική ακτινοβολία Σπηλιωτακοπούλου Δ., Παπαεμμανουήλ Χ., Καταπόδης Π., Τζάκος Α., Πολύδερα Α., Γεροθανάσης Ι., Σταμάτης Χ.», Αθήνα, 2015.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά με κριτές

- Chromatin remodeling defects in pediatric brain tumors, Klonou A, Spiliotakopoulou D, Themistocleous MS, Papavassiliou AG, In Annals of translational medicine, 2018, 12:248, doi: [10.21037/atm.2018.04.08](https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.08)

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ελληνική, Άριστη γνώση, Μητρική γλώσσα
- Αγγλική, Καλή γνώση (B2) University of Cambridge
- Γερμανική, καλή γνώση (Zertifikat) Goethe Institut



ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητῶν, καὶ Ἄσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν,
καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστωρας ποιεύμενος, ἐπιτελεᾶ ποιήσειν
κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τῆσδε.
ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν
ἐμοῖσι, καὶ βίῳ κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι,
καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν
τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρήσῃσι μαθητέειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς,
παραγγελίης τε καὶ ἄκροῦσις καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσις μετάδοσιν
ποιήσασθαι γίῳσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι
συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκειμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.
Διαιτήμασι τε χρῆσσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ
κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ ἀναΐσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρσειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ
φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην
τοῖσδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεισὼν φθορίον δώσω. Ἄγνων δὲ καὶ
ὄσις διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ
οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκκορήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήσις τῆσδε. Ἐς
οἰκίας δὲ ὀκόσας ὄν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς
ἔων πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφορδισίων
ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ
δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης
κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ κρὴ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔχω, σιγήσομαι,
ἄρρητα ἠγεγμένους εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεᾶ
ποιέοντι, καὶ μὴ συγκέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίῳ καὶ τέχνῃς
ἀσχεζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ
καὶ ἐπιορκούντι, τάναντία τουτίων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Μορφολειτουργικού Τομέα του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Γ. Παπαβασιλείου, διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας που με δέχτηκε και προσέφερε την υλικοτεχνική υποστήριξη της μελέτης αυτής.

Ιδιαίτερως, θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χριστίνα Πιπέρη, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας. Η επιστημονική της γνώση και εμπειρία στην βασική έρευνα αλλά και ο προσωπικός χρόνος που κατέβαλε ήταν καθοριστικά για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Πηνελόπη Κορκολοπούλου που έκανε την παθολοανατομική εκτίμηση καθώς και στον Δρ. Γκίκα Μαγιορκίνη που έκανε τη στατιστική ανάλυση.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου και ιδιαίτερως την Αλεξία Κλώνου, για την βοήθεια που μου προσέφεραν προκειμένου να εκτελέσω το ερευνητικό πρωτόκολλο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
2. ABSTRACT.....	12
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
3.1. Καρκίνος	14
3.1.1. Καρκινογένεση	15
3.2.1. Όγκοι εγκεφάλου - γλοιώματα	17
3.2.2. Ταξινόμηση των γλοιωμάτων	18
3.2.3. Τύποι αστροκυττωμάτων	21
3.2.4. Μοριακή προσέγγιση των γλοιωμάτων	27
3.2.4.1. Συνήθεις διαγνωστικοί βιοδείκτες.....	27
3.2.4.2. Ιστονικές μεταλλάξεις.....	29
3.2.5. Συμπτώματα του παιδικού γλοιώματος.....	31
3.2.6. Διάγνωση	31
3.2.7. Θεραπεία	33
3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί.....	36
3.3.1. Μεθυλίωση του DNA.....	37
3.3.2. Μη κωδικοποιούντα RNAs (non-coding RNAs).....	39
3.3.3. Δομή του νουκλεοσώματος και της χρωματίνης.....	40
3.3.4. Χημικές τροποποιήσεις ιστονών	43
3.3.5. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2.....	47
3.3.6. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2	49
3.3.7. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1	52
3.4. Σκοπός της πειραματικής εργασίας.....	55
4.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ	55

4.1. Ασθενείς.....	55
4.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών.....	56
4.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.....	56
4.4. Αποτύπωση Western (Western Blot).....	58
4.5. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση.....	64
4.6. Ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση.....	69
4.7. Στατιστική ανάλυση.....	69
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
5.1. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2 και της τροποποίησης H3K36me3 σε παιδιατρικά αστροκυττώματα.....	71
5.1.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση.....	71
5.1.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της SETD2 με Western Blotting... ..	76
5.2. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2 και της τροποποίησης H3K4me3	78
5.2.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση.....	78
5.2.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της MLL2 με Western Blotting.....	82
5.3. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1 και της τροποποίησης H3K9me3.....	85
5.3.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση.....	85
5.3.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της SUV39H1 με Western Blotting.....	91
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η συχνότητα έκφρασης επιγενετικών ενζύμων στα παιδιατρικά γλοιώματα, το συνηθέστερο τύπο πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου. Ο βαθμός κακοήθειας των πρωτοπαθών γλοιωμάτων ποικίλει από καλά διαφοροποιημένους μη διηθητικούς όγκους, έως υψηλού βαθμού κακοήθειας διηθητικούς όγκους που δύσκολα απαντούν στις υπάρχουσες θεραπευτικές μεθόδους. Στην αιτιοπαθογένειά τους περιλαμβάνονται περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, καθώς επίσης και επιγενετικές τροποποιήσεις. Η επιγενετική αφορά την μελέτη των αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων που εμφανίζονται χωρίς κάποια αλλαγή στην αλληλουχία του πυρηνικού DNA. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και η παρουσία miRNAs. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στη διερεύνηση της έκφρασης των ενζύμων που προκαλούν τις χημικές τροποποιήσεις των ιστονών, των πρωτεϊνών που αποτελούν το νουκλεόσωμα, τη βασική δομική μονάδα της χρωματίνης. Οι ιστόνες (H2A, H2B, H3 και H4) είναι υπεύθυνες για την άρτια δομή της χρωματίνης και εμπλέκονται σε μηχανισμούς αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA, ελέγχοντας την έκφραση σημαντικών γονιδίων. Υπόκεινται σε επιγενετικές χημικές τροποποιήσεις, οι οποίες προκαλούν μετα-μεταγραφικές αλλαγές γονιδίων και εμπλέκονται στην ανάπτυξη νόσων, μεταξύ των οποίων και οι όγκοι εγκεφάλου.

Η μεθυλίωση των ιστονών και συγκεκριμένα η προσθήκη μεθυλομάδων σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης στα N-τελικά άκρα τους έχει συσχετισθεί με μηχανισμούς ογκογένεσης. Την μεθυλίωση των ιστονών επιτελούν ειδικά ένζυμα που καλούνται μεθυλοτρανσφεράσες. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών **SETD2**, **SUV39H1** και **MLL2** που καταλύουν την τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στην λυσίνη 36 (H3K36me3), την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9me3) και την τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στην λυσίνη 4 (H3K4me3) αντίστοιχα, σε παιδιατρικούς όγκους εγκεφάλου σε σχέση με τον φυσιολογικό εγκέφαλο.

Τα επίπεδα έκφρασης των μεθυλοτρανσφερασών, αλλά και των αντίστοιχων τροποποιήσεων διερευνήθηκαν στη συνέχεια σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοϊστοχημείας και συσχετίστηκαν με

κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της **SETD2** είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε παθολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, ενώ η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα σε σχέση με υψηλόβαθμα γλοιοβλαστώματα, ενώ και η έκφραση της τροποποίησης H3K36me3, την οποία επιτελεί αποκλειστικά η μεθυλοτρανσφεράση SETD2 είναι πολύ υψηλή στο σύνολο των δειγμάτων παιδιατρικών αστροκυττωμάτων διαφόρων βαθμών κακοήθειας. Τα επίπεδα έκφρασης της **MLL2** κυμαίνονται σε μέτρια επίπεδα, ενώ αυξημένη είναι η έκφραση της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3 σε παθολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Αντίθετα, η έκφραση της **SUV39H1** δεν εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των εγκεφαλικών όγκων και του φυσιολογικού εγκεφάλου. Ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης της τροποποίησης H3K9me3 σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς εγκεφάλου και σε ιστούς γλοιομάτων εμφανίζουν διαφοροποίηση, και πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι σε αστροκυττώματα βαθμού κακοήθειας II και IV η έκφραση ήταν αυξημένη σε σχέση με τον φυσιολογικό εγκέφαλο.

Συμπερασματικά, η μεθυλοτρανσφεράση SETD2 και η μεθυλίωση της ιστόνης 3 στις λυσίνες 4 και 9 φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση των γλοιομάτων και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Η πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που παίζουν ρόλο στις επιγενετικές αλλαγές κατά την ανάπτυξη των παιδιατρικών εγκεφαλικών όγκων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων και ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τους ασθενείς.

2. ABSTRACT

This study investigates the expression frequency of epigenetic enzymes in pediatric gliomas, the most common type of primary brain tumors. The degree of malignancy of primary gliomas varies from well-differentiated non-invasive tumors to a high degree of malignant invasive tumors that are difficult to respond to existing therapeutic methods. Their pathogenesis includes environmental and genetic factors, as well as epigenetic modifications. Epigenetics refer to the study of reversible hereditary changes in the function of genes that occur without any change in the sequence of nuclear DNA. The main epigenetic mechanisms are DNA methylation, changes in chromatin structure and the presence of miRNAs. The present study investigates the expression of enzymes that cause chemical modifications of histones that make up the nucleosome, the basic constituent of chromatin. Histones (H2A, H2B, H3, and H4) are responsible for the proper structure of chromatin and are involved in DNA replication and repair mechanisms, controlling the expression of important genes. They are subject to epigenetic chemical modifications, which cause post-transcriptional changes of genes and are involved in the development of diseases, including brain tumors.

Histone methylation at arginine and lysine residues of their N-terminus has been associated with oncogenic mechanisms. Methylation of histones is carried out by specific enzymes called methyltransferases. The present study investigated the expression of methyltransferases SETD2, SUV39H1 and MLL2 that catalyze trimethylation of histone 3 on lysine 36 (H3K36me3), trimethylation of histone 3 on lysine 9 (H3K9me3) and trimethylation of histone 3 on lysine 4 (H3K4me3) respectively, in pediatric brain tumors compared to normal brain.

The expression levels of methyltransferases and their corresponding modifications were then investigated at protein level by Western blotting and immunohistochemistry techniques and were correlated with clinicopathological features. In particular, the expression of SETD2 was found to be significantly increased in abnormal brain tissue relative to normal tissue, whereas the highest expression was observed in low-grade

malignant pilocytic astrocytes in relation to high-grade glioblastomas, while the expression of H3K36me3 modification, which is exclusively performed by methyltransferase SETD2, is also very high in all pediatric astrocyte samples of varying degrees of malignancy. MLL2 expression was found at moderate levels, with increased expression of lysine 4 trimethylation in histone 3 in abnormal brain tissue relative to normal. In contrast, the expression of SUV39H1 shows no significant differentiation between brain tumors and normal brain. However, the expression levels of H3K9me3 modification in human normal brain and glioma tissues were differentiated, and more specifically it was found that in grade II and IV malignant astrocytes the expression was increased relative to normal brain tissue.

In conclusion, methyltransferase SETD2 and methylation of histone 3 in lysine 4 and 9 were shown to be involved in glioma pathogenesis and need further investigation. Elucidation of the mechanisms that participate to the epigenetic changes associated with the development of pediatric brain tumors could lead to the identification of new therapeutic targets and the design of new therapeutic approaches for patients.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1. Καρκίνος

Με τον όρο καρκίνος, αναφερόμαστε σε μία γενετική ασθένεια, η οποία οφείλεται σε αλλαγές έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Τις περισσότερες φορές δεν θεωρείται κληρονομική ασθένεια καθότι η γενετική αλλαγή στις κληρονομικές ασθένειες υπάρχει στα χρωμοσώματα των γεννητικών κυττάρων και συνεπώς μεταβιβάζεται στους απογόνους. Αντίθετα, οι γενετικές αλλαγές που οδηγούν στους περισσότερους καρκίνους, προέρχονται από αλλαγές στο DNA των σωματικών κυττάρων. Λόγω των γενετικών αλλαγών τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ανεξέλεγκτο ρυθμό. Αρχικά δημιουργούν μία μάζα και αργότερα έναν όγκο (tumor) ή νεόπλασμα (neoplasm), που αυξάνεται χωρίς όρια, τα οποία μερικές φορές διεισδύουν στους υγιείς γειτονικούς ιστούς. Μερικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποσπαστούν και με την βοήθεια της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου, να μεταφερθούν σε άλλους ιστούς και όργανα, όπου εκεί συνεχίζουν την ανεξέλεγκτη διαίρεσή τους. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μετάσταση (metastasis) και οι όγκοι που έχουν την ικανότητα μετάστασης ονομάζονται κακοήθεις (malignant).



Εικόνα 3.1. : Καρκινικό κύτταρο του κεντρικού νευρικού συστήματος (πράσινο χρώμα).
(mediadrumworld.com n.d.)

Αν δεν υπάρξει έγκαιρη διάγνωση και η σχετική θεραπεία οι κακοήθεις όγκοι είναι συνήθως θανατηφόροι και αυτό οφείλεται στην απώλεια ζωτικών λειτουργιών που προκαλούν στα φυσιολογικά κύτταρα. Δηλαδή, τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφουν τα φυσιολογικά κύτταρα διότι διεισδύοντας σε αυτά, τα πιέζουν, τα τραυματίζουν, τους μειώνουν την παροχή οξυγόνου ή τα διαλύουν. Καθώς ο όγκος αυξάνεται τα καρκινικά κύτταρα στερούν από τα φυσιολογικά τα θρεπτικά τους υλικά, οδηγώντας έτσι τον οργανισμό σε δυσλειτουργία, μυϊκή αδυναμία, κόπωση και απώλεια βάρους.

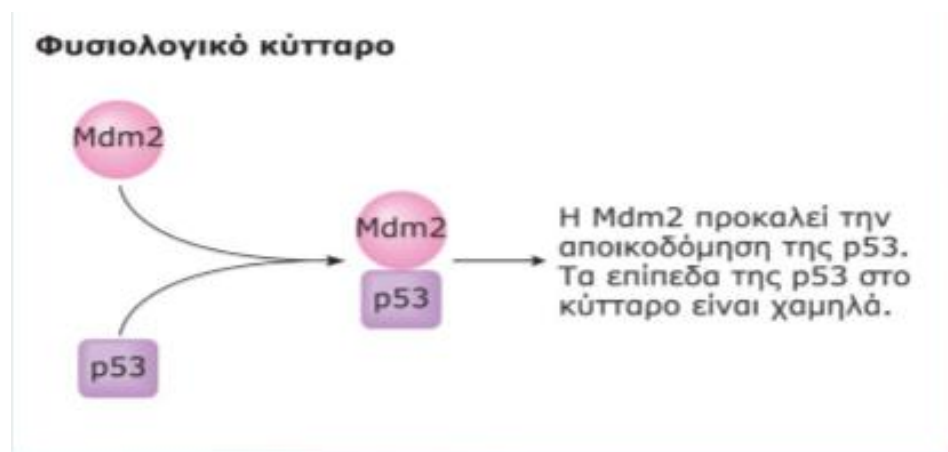
Μελέτη καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργειες που προέρχονται από απομόνωση όγκων, αναδεικνύει ανωμαλίες στα καρκινικά κύτταρα κυρίως στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό τους, την διαφοροποίηση και την επιβίωση. Δεν είναι αναγκαίο ότι όλοι οι τύποι καρκινικών κυττάρων εμφανίζουν τις ίδιες ιδιότητες. Κάποιες από αυτές είναι η δυνατότητα να: α) Πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που έχουν περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων, β) έχουν χάσει την ικανότητα αναστολής εξ' επαφής (contact inhibition), με αποτέλεσμα τη συνεχή μετακίνησή τους και την δημιουργία πολύστιβων συσσωμάτων, γ) έχουν χάσει την ικανότητα να αναγνωρίζουν μόνον ομοειδή κύτταρα, δ) έχουν χάσει την ικανότητα της απόπτωσης με αποτέλεσμα την συνεχή ανάπτυξη του όγκου, ε) πολλά καρκινικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται κανονικά και συνήθως σταματούν σε κάποιο πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης που οδηγεί σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό, ζ) συχνά εμφανίζουν μια μη φυσιολογική ποικιλότητα στο μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, η) εμφανίζουν συχνά αλλαγές στη δομή και στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, μία κατάσταση γνωστή ως ανευπλοειδία, θ) ο κυτταροσκελετός τους είναι αποδιοργανωμένος, ι) εμφανίζουν αλλαγές στην κυτταρική επιφάνεια όπως αυξημένη ρευστότητα των μεμβρανών ή μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης, ια) εκκρίνουν διάφορες πρωτεάσες, ιβ) παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό γλυκόλυσης.

3.1.1. Καρκινογένεση

Ο έλεγχος της σχετικής κυτταρικής διαίρεσης εξαρτάται τόσο από τα ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση και λέγονται ογκοκατασταλτικά, όσο και από γονίδια που παρακινούν τη φυσιολογική διαίρεση και λέγονται πρωτο-

ογκογονίδια. Τα πρώτα όπως και τα δεύτερα προκαλούν ανεξέλεγκτες διαιρέσεις του κυττάρου που οδηγούν σε όγκο. Η μετατροπή των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια γίνεται με τρεις μηχανισμούς: α) τις σημειακές αλλαγές, β) την υπερέκφραση τους και γ) τις χρωμοσωματικές μετατοπίσεις. Σε μερικές περιπτώσεις η μετατροπή οφείλεται σε απλή μετάλλαξη λόγω της επίδρασης κάποιου μεταλλαξιογόνου παράγοντα και έτσι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονίδιο είναι τροποποιημένη. Σε άλλες περιπτώσεις η ενεργοποίηση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ένα πρωτοογκογονίδιο μπορεί να βρεθεί σε έντονα μεταγραφικό περιβάλλον.

Η απόπτωση (apoptosis) που ελέγχεται μέσω μιας οδού συσχετίζεται με τα ογκογονίδια και προκαλεί βλάβη στο DNA. Μια τέτοια οδό ανοίγει ο φύλακας του γονιδιώματος, το γονίδιο *p53* το οποίο ελέγχει πάνω από ένα γεγονότα-κλειδιά πολλαπλασιασμού όλων των τύπων κυττάρων. Η ενεργοποίηση της φυσιολογικής πρωτεΐνης *p53* εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, στον έλεγχο ανάπτυξης του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση (κυτταρικός θάνατος). Η πρωτεΐνη *p53* δρα ως ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί σειρά γονιδίων στόχων για τις παραπάνω διαδικασίες που σχετίζονται με την αναχαίτιση και την καταστολή του όγκου, για αυτό και θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

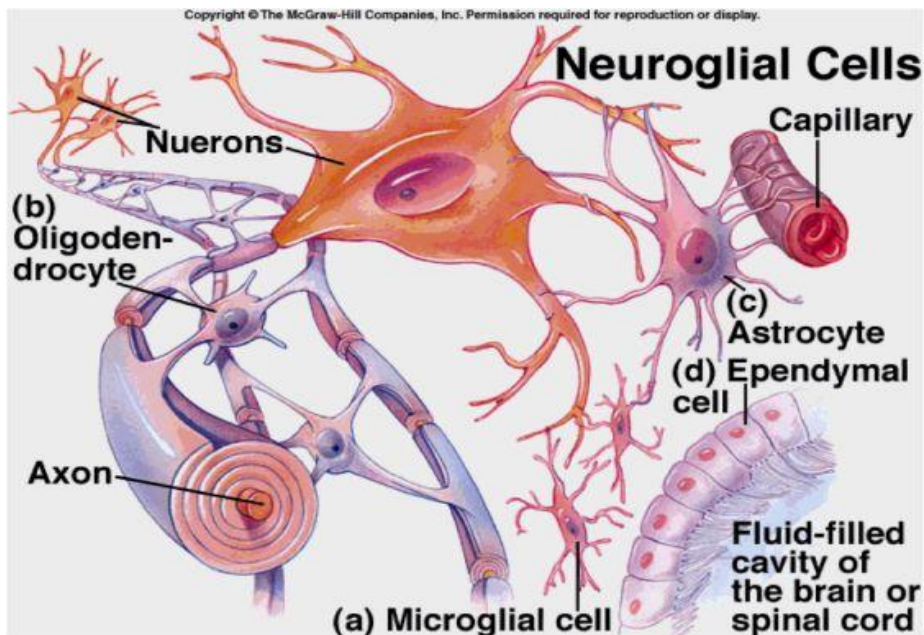


Εικόνα 3.2: Η δράση της *p53* κατά τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου

(Igenetics ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ 2009)

3.2.1. Όγκοι εγκεφάλου - γλοιώματα

Το ΚΝΣ περιλαμβάνει τον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και το υγρό που περιβάλλει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, το οποίο ονομάζεται εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τα βασικά κύτταρα του εγκεφάλου είναι οι νευρώνες που σχηματίζουν τις συνάψεις. Γύρω από τους νευρώνες υπάρχουν άλλα κύτταρα, που στηρίζουν τους νευρώνες, τους παρέχουν μεταξύ άλλων θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο και συμμετέχουν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αναπνοή (Gourine et al, 2010). Τα δομικά αυτά κύτταρα λέγονται νευρογλοιακά ή γλοιακά (glial cells) (Jessen et al, 1980). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), τα νευρογλοιακά κύτταρα περιλαμβάνουν ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocytes), αστροκύτταρα (astrocytes), επενδυτικά κύτταρα (ependymal cells) και τη μικρογλοία.



Εικόνα 3.3. : Νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου.

Οι όγκοι του εγκεφάλου παρατηρούνται σε οποιοδήποτε μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ/CNS), εμφανίζουν ωστόσο συχνότερη εντόπιση στον εγκέφαλο. Οι όγκοι που αναπτύσσονται από τα νευρογλοιακά κύτταρα καλούνται γλοιώματα. Τα γλοιώματα είναι οι συχνότεροι συμπαγείς όγκοι της παιδικής ηλικίας και προσβάλλουν παιδιά από την βρεφική ηλικία μέχρι την εφηβεία, ενώ απαντώνται σε ποσοστό 20%

(Rachel Tobias Baldwin et al, 2004). Συνολικά, οι περιπτώσεις των όγκων του εγκεφάλου είναι 4,84 περιπτώσεις ανά 100.000 παιδιά ανά έτος (Diwanji et al, 2017).

Τα εγκεφαλικά νεοπλάσματα διακρίνονται σε πρωτοπαθή και μεταστατικά. Με τον όρο 'πρωτοπαθής όγκος' αναφερόμαστε στην αρχική ανατομική εντόπιση των εξαλλαγμένων κυττάρων, ενώ με τον όρο 'μεταστατικός ή δευτεροπαθής' εννοούμε την μετανάστευση των κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου σε κάποια άλλη ανατομική θέση (Masui et al, 2014). Οι δευτεροπαθείς εντοπίσεις στο ΚΝΣ είναι πιο συχνές από τα πρωτοπαθή νεοπλάσματα, στο 80% εντοπίζονται υπερακτινιδιακά και προέρχονται από καρκίνο του πνεύμονα σε ποσοστό 40-60%, του μαστού 15-20%, του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ ένα ποσοστό της τάξεως του 10-20% των δευτεροπαθών όγκων εγκεφάλου, προέρχονται από μελάνωμα (Coleman et al, 2006), (Gurney and Kadan-Lottick, 2001).

3.2.2. Ταξινόμηση των γλοιωμάτων

Η κατάταξη των γλοιωμάτων έχει εξελιχθεί με την πάροδο του χρόνου, ξεκινώντας από το 1926 με ένα σύστημα που επινοήθηκε από τον Bailey και το Cushing και αργότερα αναθεωρήθηκε από τον Kernohan, Ringertz και άλλους. Η σύγχρονη ταξινόμηση των γλοιωμάτων βασίζεται στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και την ταξινόμηση των όγκων του ΚΝΣ, που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 1979 και αναθεωρήθηκε τέσσερις φορές από τότε, πιο πρόσφατα το 2016 (Louis et al, 2014).

Από την έκδοση του 2016, τα γλοιώματα ταξινομούνται με βάση όχι μόνο τα ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και τις καθιερωμένες μοριακές παραμέτρους. Η ενσωμάτωση των μοριακών χαρακτηριστικών έχει επηρεάσει κυρίως την ταξινόμηση των αστροκυτταρικών και των ολιγοδενδροκυτταρικών όγκων, οι οποίοι πλέον ομαδοποιούνται ως διάχυτα γλοιώματα, με βάση το μοτίβο ανάπτυξης, τη συμπεριφορά και τη γενετική τους κατάσταση. Η δημιουργία προφίλ μεθυλίου (methylome), μια ισχυρή μέθοδος για την αξιολόγηση μιας πτυχής του επιγενετικού τοπίου των όγκων του εγκεφάλου, μπορεί να προστεθεί στις ιστολογικές και τυποποιημένες γενετικές προσεγγίσεις για την ταξινόμηση των όγκων του εγκεφάλου,

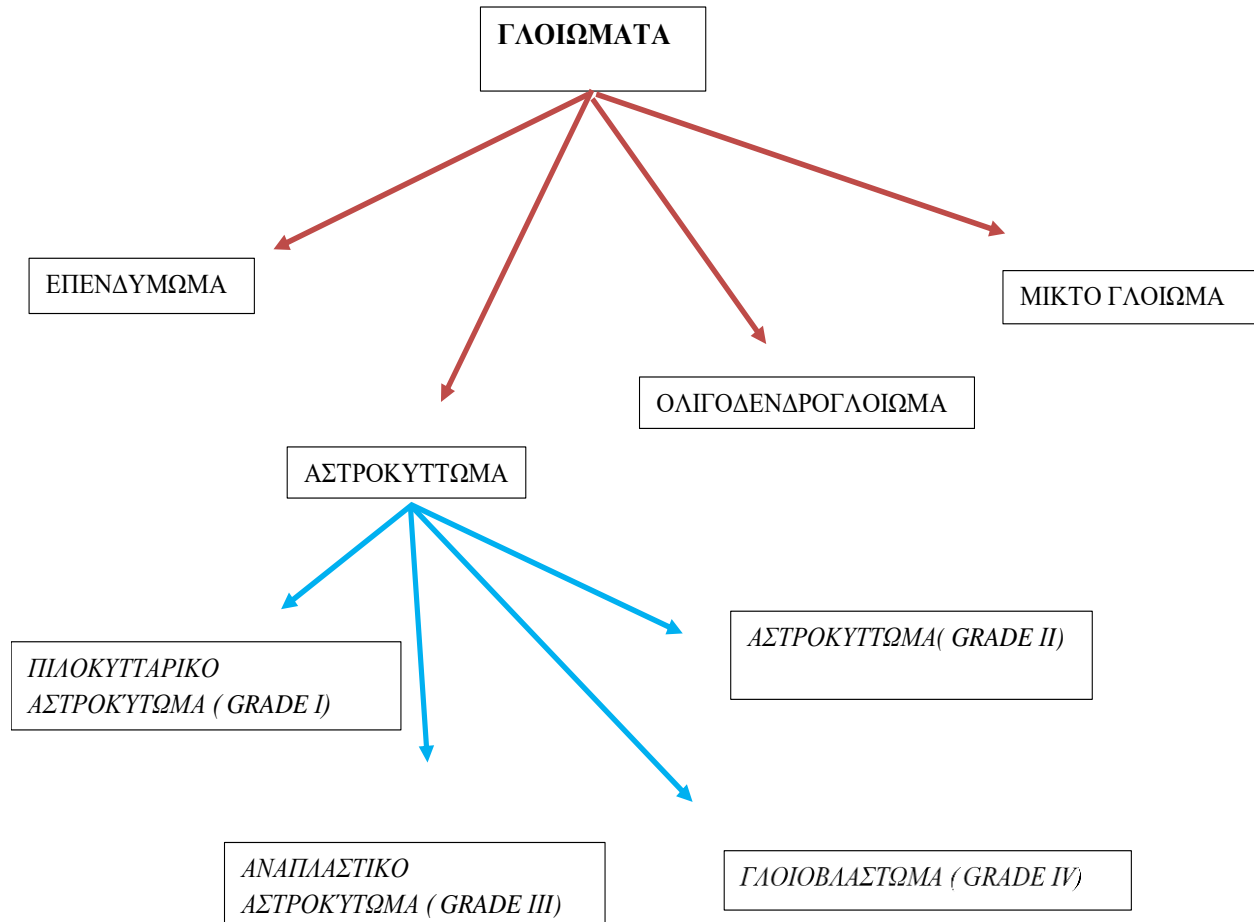
εξελίσσοντας πιθανώς τον τρόπο που οι όγκοι του εγκεφάλου ταξινομούνται στο μέλλον (Louis et al, 2016).

Τα γλοιώματα κατηγοριοποιούνται είτε βάσει των κυττάρων που προσβάλλονται, είτε βάσει του βαθμού κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων.

Βάσει του τύπου των κυττάρων:

Τα γλοιώματα ονομάζονται σύμφωνα με τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρου με τον οποίο μοιράζονται ιστολογικά χαρακτηριστικά, αλλά όχι απαραίτητα από τα οποία προέρχονται. Οι κύριοι τύποι γλοιωμάτων είναι:

- Επενδύμμα: προέρχονται από κύτταρα του επενδύματος, τη λεπτή νευροεπιθηλιακή επένδυση του κοιλιακού συστήματος του εγκεφάλου και του κεντρικού καναλιού του νωτιαίου μυελού (Götz and Huttner, 2005). Τα επενδυμάτα αποτελούν περίπου το 5% των ενδοκρανιακών γλοιωμάτων ενηλίκων και έως 10% των παιδικών όγκων του ΚΝΣ. Η εμφάνισή τους φαίνεται να κορυφώνεται σε ηλικία 5 ετών και στη συνέχεια και πάλι στην ηλικία των 35 ετών (Goel & Gaillard et al, 2014). Συνήθως, σε παιδιατρικές περιπτώσεις η θέση του όγκου είναι ενδοκρανιακή, ενώ στους ενήλικες είναι σπονδυλική.
- Μικτό γλοιώμα: προέρχονται από κύτταρα γλοίας, που ανήκουν σε περισσότερους από έναν τύπο.
- Ολιγοδενδρογλοιώμα : προέρχονται από κύτταρα του υποστηρικτικού ιστού του εγκεφάλου, που καλούνται ολιγοδενδροκύτταρα (Baumann Nicole et al, 2001). Εμφανίζονται κυρίως σε ενήλικες (9,4% όλων των πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου και του ΚΝΣ) αλλά εντοπίζονται επίσης και σε παιδιά (4% όλων των πρωτοπαθών όγκων στον εγκέφαλο). Η μέση ηλικία στη διάγνωση είναι 35 έτη.
- Γλοιώμα οπτικού νεύρου : αναπτύσσονται στο οπτικό νεύρο ή γύρω από αυτό και είναι συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας.
- Αστροκύττωμα: προέρχονται από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού του εγκεφάλου, που ονομάζονται αστροκύτταρα.



Διάγραμμα 3.1.: Ταξινόμηση των γλοιωμάτων βάση των προσβαλλόμενων κυττάρων και των αστροκυττωμάτων ως προς το βαθμό κακοήθειας.

Βάσει του βαθμού κακοήθειας :

Τα γλοιώματα κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ανάλογα με το βαθμό κακοήθειάς τους, ο οποίος καθορίζεται από την ιστοπαθολογική εξέταση του όγκου. Από τα πολυάριθμα συστήματα ταξινόμησης των γλοιωμάτων, το πιο κοινό σύστημα ταξινόμησης για γλοιώματα είναι της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ), σύμφωνα με το οποίο οι όγκοι ταξινομούνται ως:

- Χαμηλού βαθμού κακοήθειας, που περιλαμβάνει γλοιώματα grade I και II. Τα χαμηλού βαθμού γλοιώματα [βαθμός II της ΠΟΥ] είναι καλά διαφοροποιημένα

(όχι αναπλαστικά). Είναι βραδέως αναπτυσσόμενοι όγκοι και τείνουν να παρουσιάζουν καλοήθεις τάσεις καθώς και μια καλύτερη πρόγνωση για τον ασθενή (Sievert and Fisher, 2009). Ωστόσο, έχουν ένα ομοιόμορφο ποσοστό υποτροπής και αύξηση σε βαθμό κακοήθειας με την πάροδο του χρόνου, όπου και χαρακτηρίζεται ως κακοήθης (Ali et al, 2014).

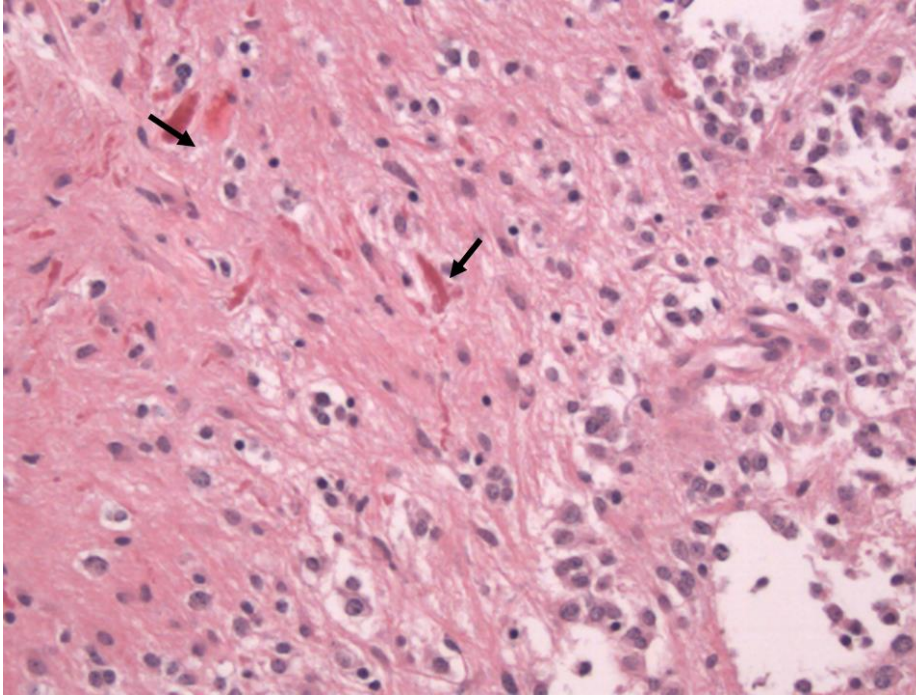
- Υψηλού βαθμού κακοήθειας . Στην κατηγορία αυτή ανήκουν γλοιώματα grade III και IV. Τα γλοιώματα υψηλού βαθμού [βαθμοί III-IV WHO] είναι αδιαφοροποίητα ή αναπλαστικά. Αυτά είναι κακοήθη, ιδιαίτερα επιθετικά και έχουν χειρότερη πρόγνωση (Warren et al, 2012).

Οι βαθμοί κακοήθειας αντικατοπτρίζουν πρακτικά την επιθετικότητα των όγκων αυτών. Ο βαθμός κακοήθειας του όγκου σχετίζεται δηλαδή με το πόσο γρήγορα μεγαλώνει ο όγκος και επηρεάζει την πρόγνωση των ασθενών.

3.2.3. Τύποι αστροκυτωμάτων

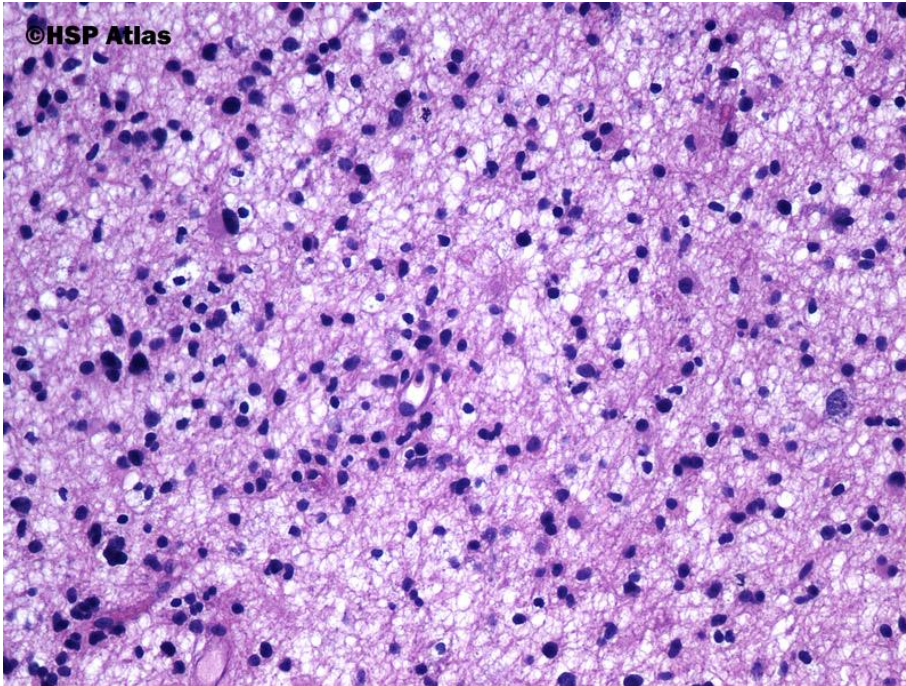
Τα κριτήρια ταξινόμησης των γλοιωμάτων που τροποποιήθηκαν το 2016 οδήγησαν στην τροποποίηση της ταξινόμησης των αστροκυτωμάτων ως εξής:

- 1) Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα: ο πιο κοινός τύπος χαμηλόβαθμου γλοιώματος, που εμφανίζεται συχνότερα στην παρεγκεφαλίδα, με ποσοστό 68% (Παρεγκεφαλιδικά Πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα), αν και μπορούν να απαντηθούν σε οποιοδήποτε μέρος του ΚΝΣ, όπως στο οπτικό χίασμα (28%), στον υποθάλαμο κ.α. Ο πιο κοινός τύπος πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος είναι το νεανικό πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα, το οποίο αποτελεί το 20% των παιδιατρικών εγκεφαλικών όγκων. Αυτός ο τύπος συνήθως μεγαλώνει αργά και δεν εντοπίζεται μέχρι να αποκτήσει μεγάλο μέγεθος και να προκαλέσει συμπτώματα. Από ιστολογικής άποψης στα πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα, τα κύτταρα παρουσιάζουν ατρακτοειδή μορφή με κυματιστές, ινώδεις αποφύσεις, ενώ συχνά υπάρχουν ίνες Rosenthal, ηωσινόφιλα και κοκκιώδη σωματίδια.



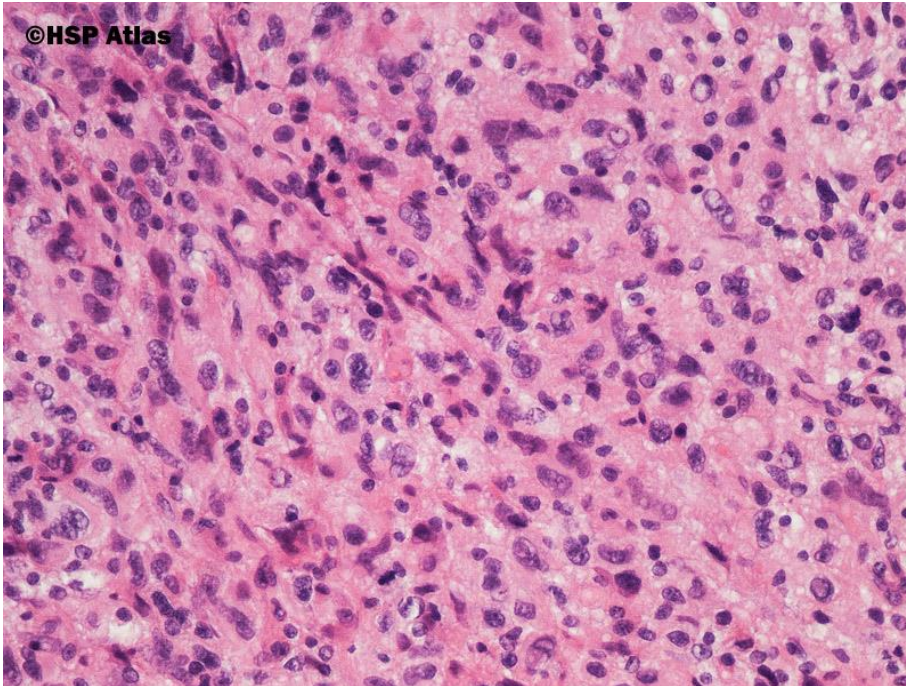
Εικόνα 3.4.: Ιστολογική αξιολόγηση πιλοκυτταρικού αστροκυτώματος σε μεγέθυνση 20x. Με βέλος σημαίνονται οι ίνες Rosenthal, χαρακτηριστικές δομές που παρατηρούνται σε πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα.

- 2) Αστροκύττωμα χαμηλής κακοήθειας (grade II): Εντοπίζεται σε ποσοστό 40% στο μετωπιαίο λοβό, 20% στον κροταφικό λοβό, ενώ σπάνια εντοπίζεται στο θάλαμο ή τη γέφυρα. Η ιστολογική εικόνα αυτού του τύπου αστροκυττωμάτων εμφανίζει ήπια υπερκυτταρικότητα, οι πυρήνες είναι ευμεγέθεις, χωρίς ιδιαίτερο πλειομορφισμό, ενώ δεν παρατηρείται αγγειακή υπερπλασία ή νέκρωση. Μέση ηλικία εμφάνισης του τύπου αυτού είναι τα 35 με 45 έτη.



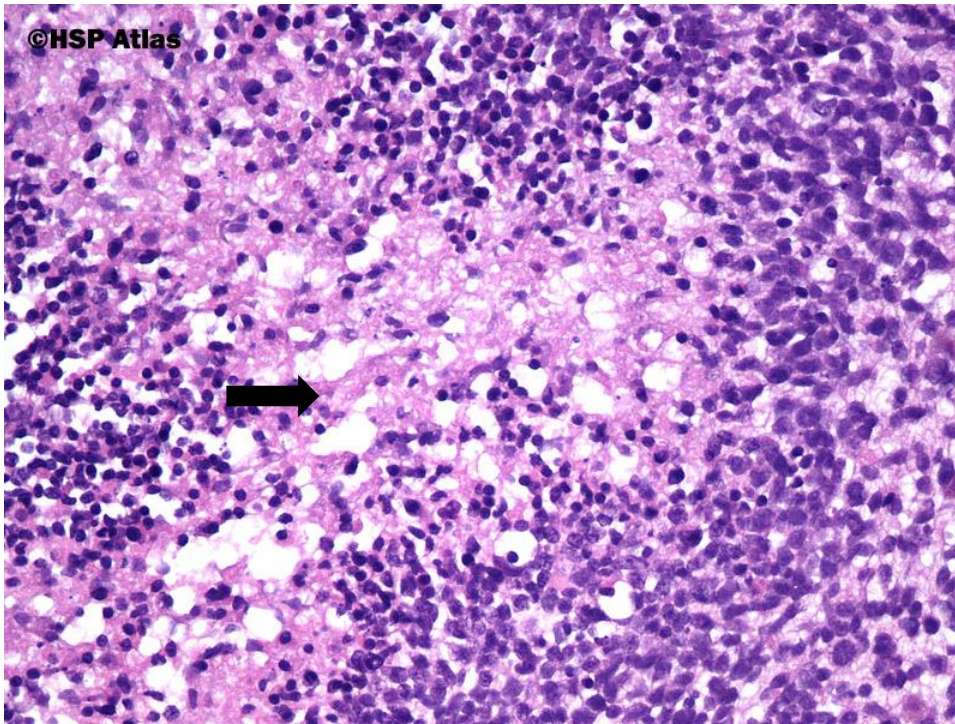
Εικόνα 3.5.: Ιστολογική αξιολόγηση αστροκυτώματος βαθμού κακοήθειας II σε μεγέθυνση 20x. (Histopathology Atlas)

- 3) Αναπλαστικό αστροκύτωμα: όγκος υψηλού βαθμού κακοήθειας. Καλείται αναπλαστικό επειδή τα κύτταρα του όγκου δεν έχουν τη δομή των φυσιολογικών κυττάρων του εγκεφάλου. Οι όγκοι αυτοί αναπτύσσονται ταχύτερα από τα χαμηλού βαθμού γλοιώματα, μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε μέρος του ΚΝΣ, και είναι πιθανότερο να επανεμφανιστούν μετά τη θεραπεία. Συνήθως δεν εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του ΚΝΣ. Από ιστολογικής άποψης το αναπλαστικό αστροκύτωμα εμφανίζει μέτρια υπερκυτταρικήτητα και πλειομορφισμό κυττάρων και πυρήνων, εστιακές αναπλαστικές αλλαγές και νέκρωση του ιστού.



Εικόνα 3.6.: Ιστολογική αξιολόγηση αναπλαστικού αστροκυτώματος σε μεγέθυνση 20x. (Histopathology Atlas)

- 4) Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: όγκος υψηλής κακοήθειας. Αυτοί οι όγκοι μπορούν να εμφανιστούν οπουδήποτε στον εγκέφαλο ή στο νωτιαίο μυελό, με συχνότερη εντόπιση στο 40% στο μετωπιαίο λοβό (40%), 25% στο κροταφικό, και 25% στο βρεγματικό λοβό. Σπάνια ανευρίσκονται στο στέλεχος. Ενώ οι όγκοι μπορούν να ξεκινήσουν σε ένα μέρος του εγκεφάλου, μερικές φορές εξαπλώνονται σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ. Είναι επιθετικοί όγκοι, μεγαλώνουν ταχύτερα από τα χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα, και μπορούν επίσης να επανεμφανιστούν μετά τη θεραπεία. Η ιστολογική εικόνα παρουσιάζει υπερκυτταρικότητα και πλειομορφισμό πυρήνων. Συχνά παρατηρείται αγγειακή υπερπλασία του ενδοθηλίου και νέκρωση του ιστού.



Εικόνα 3.7.: Ιστολογική αξιολόγηση γλοιοβλαστώματος σε μεγέθυνση 20x. Με βέλος σημαίνεται η νέκρωση του ιστού, χαρακτηριστική αυτού του βαθμού κακοήθειας. (Histopathology Atlas)

Πίνακας 3.1: Επίπτωση στο γενικό πληθυσμό των διαφόρων βαθμών κακοήθειας αστροκυτωμάτων.

	Βαθμός κακοήθειας κατά WHO	Επίπτωση
Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα	Αστροκύτωμα grade I	2%
Αστροκύτωμα	Αστροκύτωμα grade II	5-25%
Αναπλαστικό αστροκύτωμα	Αστροκύτωμα grade III	10-15%
Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα	Αστροκύτωμα grade IV	45-50%

Οι βαθμοί αντικατοπτρίζουν πρακτικά την επιθετικότητα των όγκων αυτών. Ενώ το πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα δεν έχει την προδιάθεση να εξελίσσεται επιθετικά και η πλήρης εξαίρεσή του συνεπάγεται και πλήρη ίαση, δε συμβαίνει το ίδιο στους βαθμούς II-IV. Οι όγκοι βαθμού II χαρακτηρίζονται ως χαμηλής κακοήθειας αστροκυτώματα. Σε βάθος χρόνου όμως εξελίσσονται στις πιο κακοήθεις μορφές III και IV. Ο μέσος όρος επιβίωσης εξαρτάται από την ηλικία, το μέγεθος και την εντόπιση του όγκου και κυμαίνεται από 5-15 έτη. Το αναπλαστικό αστροκύτωμα III, αναπτύσσεται σαφώς πιο επιθετικά και σε συντομότερο χρονικό διάστημα, με μέσο όρο επιβίωσης από 0,5 έως 3 έτη. Το γλοιοβλάστωμα, που είναι και η συχνότερη μορφή γλοιώματος, έχει ταχύτατη εξέλιξη και τον χαμηλότερο μέσο όρο επιβίωσης (0,5-1 έτος). Μέση επιβίωση όταν πραγματοποιηθεί μόνο χειρουργική αφαίρεση είναι οι 4 μήνες, με το χρόνο να ανεβαίνει στο διπλάσιο όταν γίνει συνδυαστικά με ακτινοθεραπεία και αγγίζει τους 10 μήνες όταν ακολουθηθεί ο συνδυασμός χειρουργείου, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας.

Πίνακας 3.2: Η θεραπευτική προσέγγιση και η πρόγνωση των διαφόρων βαθμών αστροκυτωμάτων.

	Θεραπεία	Πρόγνωση (Μέση επιβίωση)
Πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα WHO I	Χειρουργική αφαίρεση	Ολική αφαίρεση → ίαση Μερική εκτομή /Ακτινοθεραπεία 10ετής επιβίωση: 81% 20ετής επιβίωση: 54%
Αστροκύτωμα WHO II	Χειρουργική αφαίρεση	>5-7 χρόνια
Αναπλαστικό αστροκύτωμα WHO III	Χειρουργική αφαίρεση + Ακτινοθεραπεία + Χημειοθεραπεία	2ετής επιβίωση: 40-50% 5ετής επιβίωση: 18%
Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα	Χειρουργική αφαίρεση + Ακτινοθεραπεία + Χημειοθεραπεία	2ετής επιβίωση: 10% 5ετής επιβίωση: 5,5%

3.2.4. Μοριακή προσέγγιση των γλοιωμάτων

Κατά την τελευταία δεκαετία μελέτες του μοριακού προφίλ του γενετικού γονιδιώματος αποκάλυψαν χαρακτηριστικές γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους γλοιωμάτων. Τα μοριακά αυτά χαρακτηριστικά μπορούν σήμερα να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την ταξινόμηση των γλοιωμάτων, να οδηγήσουν σε εξατομικευμένη θεραπεία και να βελτιώσουν την πρόγνωση του ασθενούς. Έτσι, η ταξινόμηση των όγκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) για το ΚΝΣ αναθεωρήθηκε το 2016 για να ενσωματώσει μοριακούς βιοδείκτες με τα κλασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά σε μια ολοκληρωμένη διάγνωση, προκειμένου να προσδιοριστούν οι τύποι των γλοιωμάτων όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Με την τακτική αυτή αναθεωρείται το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης και δημιουργούνται νέες κατηγορίες γλοιωμάτων με κοινά γενετικά χαρακτηριστικά.

3.2.4.1. Συνήθεις διαγνωστικοί βιοδείκτες

Η μετάλλαξη του γονιδίου ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH1/IDH2) που κωδικοποιεί την ανθρώπινη κυτοσολική NADPH-εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Ως ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA που προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από καρκινογόνα, αφαιρώντας αλκυλομάδες από το DNA και αποτελεί διαγνωστικό δείκτη για τα διάχυτα αστροκυτώματα βαθμού κακοήθειας II, III κατά Π.Ο.Υ. (WHO grade II), καθώς και τα δευτεροπαθή (που έχουν εξελιχθεί από χαμηλότερης κακοήθειας γλοιώματα) γλοιοβλαστώματα και αποτελεί καλό προγνωστικό δείκτη, καθώς γλοιώματα με τέτοιες μεταλλάξεις έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Stupp et al, 2014), (Sturm et al, 2012).

Η απώλεια 1p/19q (διπλή διαγραφή των χρωμοσωματικών σκελών 1p και 19q) ανευρίσκεται σε πάνω από 80% των ολιγοδενδρογλοιωμάτων βαθμού κακοήθειας II κατά Π.Ο.Υ. και σε περίπου 60% των αναπλαστικών ολιγοδενδρογλοιωμάτων βαθμού

κακοήθειας III κατά Π.Ο.Υ. Σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση και καλύτερη ανταπόκριση σε συγκεκριμένη χημειοθεραπεία (σχήμα PCV) (Jenkins RB et al, 2006).

Η υπερμεθυλίωση του ενζύμου επιδιόρθωσης Ο6-μεθυλογουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράσης (MGMT), η οποία αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου αυτού, καθιστά τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος ή του αναπλαστικού ολιγοδενδρογλιώματος εξαιρετικά ευαίσθητα στη θεραπεία με τον ακυλιωτικό παράγοντα τεμοζολομίδη.

Η πλειοψηφία των παιδιατρικών γλοιωμάτων χαμηλού βαθμού κακοήθειας (LGGs) παρουσιάζει αλλοιώσεις στην οδό κινάσης RAS / MAP (Klonou et al, 2018). Η πιο συχνή αλλαγή είναι η σύντηξη του πρωτοογκογονιδίου *B-Raf (BRAF)* με την KIAA1549, η οποία προκαλεί σταθερή ενεργοποίηση της περιοχής BRAF κινάσης με αποτέλεσμα την ενίσχυση της οδού κινάσης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) (Zhang, 2013). Σε ένα μικρό ποσοστό των pLGGs, έχει αναγνωριστεί μια missense μετάλλαξη του BRAFV600E (Fangusaro, 2012) και συνδέεται με χαμηλότερη μέση επιβίωση (Blionas A. et al, 2018). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη των pLGGs περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο μονοπάτι 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) / στόχου της ραπαμυκίνης θηλαστικών (mTOR), επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων (Meel et al, 2018), (Dasgupta et al, 2013). Αρκετά συστατικά αυτής της οδού υπερεκφράζονται σε pLGGs και έχουν συνδεθεί με κακή πρόγνωση (Bavle et al, 2017).

Άλλα συχνά τροποποιημένα γονίδια περιλαμβάνουν τον υποδοχέα 1 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR1), την πρωτεΐνη p53 του όγκου (TP53) και τη νευροϊνωμάτωση 1 (NF1) και ανιχνεύθηκαν σε 17,6% , 5,6% και 8,8% των υποθέσεων, αντίστοιχα (Taylor et al, 2012). Οι μεταλλάξεις στο NF1 προκαλούν ενεργοποίηση του μονοπατιού του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) που οδηγεί στην ογκογένεση (Rudà et al, 2012). Στα διάχυτα αστροκυττώματα βαθμού κακοήθειας III συχνά εντοπίζονται αναδιατάξεις γονιδίων *MYB* και *MYBL1* (πρωτεΐνη πρωτονιογόνου Myb) που παίζουν ρόλο στη συμπεριφορά κακοήθους γλιώματος διείδυσης.

Πίνακας 3.3. : Γονίδια που εμπλέκονται σε παιδιατρικά γλοιώματα και τη λειτουργία τους (Blionas et al, 2018).

<i>BRAF</i>	Το ομόλογο ογκογονικού ιού που εμπλέκεται στην οδό MAP, οι συντήξεις και οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF έχουν συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση για το LGG.
<i>FGFR</i>	Επιφανειακοί υποδοχείς μεταγωγής σήματος, μεταβολές που εντοπίζονται σε διάχυτα LGG, σχετικότητα στην πρόγνωση που δεν έχει ακόμη καθοριστεί.
<i>MYB</i> / <i>MYBL1</i>	Ανθρώπινο ανάλογο ογκογονιδίων, παρόν σε ποσοστό 25% της κατηγορίας II LGG. Η σχέση με την πρόγνωση δεν έχει καθοριστεί ακόμη.
<i>IDH 1/2</i>	Δεν είναι συχνές στον παιδιατρικό πληθυσμό. Έχει συνδεθεί άμεσα με την πρόγνωση σε ενήλικες. Η μετάλλαξη σε αυτά τα γονίδια μπορεί να αλλάξει την ταξινόμηση βαθμού γλοιώματος.
<i>TP53</i>	Ένα από τα σημαντικότερα γονίδια ογκοκαταστολής. Η σχέση με την πρόγνωση δεν έχει καθοριστεί ακόμη.

3.2.4.2. Ιστονικές μεταλλάξεις

Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρξαν αναφορές μεταλλάξεων ιστόνης σε καμία ανθρώπινη ασθένεια. Τον Ιανουάριο του 2012, δύο μελέτες ανέφεραν ταυτόχρονα τις πρώτες ιστονικές μεταλλάξεις σε παιδιατρικούς ασθενείς με όγκο εγκεφάλου. Και οι δύο ομάδες ανέφεραν επαναλαμβανόμενες σωματικές ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την παραλλαγή ιστόνης H3.3 (δηλ. H3F3A), σε ασθενείς που διαγνώστηκαν με παιδιατρικά γλοιοβλαστώματα (Schwartzentruber et al, 2012), και διάχυτα γλοιώματα ενδογενών πόντιων (DIPG) (Wu et al, 2012). Οι παραλλαγές ιστόνης H3.1 και H3.3 είναι δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες που διαφέρουν μόνο σε πέντε θέσεις αμινοξέων. Η H3.1 ονομάζεται ιστόνη εξαρτώμενη από την αντιγραφή, επειδή εκφράζεται και ενσωματώνεται σε νουκλεοσώματα κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αντιστρόφως, η H3.3 είναι ανεξάρτητη από την αντιγραφή καθώς εκφράζεται σε

όλο τον κυτταρικό κύκλο και αντικαθιστά τις υπάρχουσες παραλλαγές νουκλεοσωματικής ιστόνης H3 σε μια ποικιλία τόπων κατά μήκος του γονιδιώματος (Henikoff and Smith, 2014). Αμοιβαία αποκλειόμενες μεταλλάξεις στην ιστόνη H3 οδηγούν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων σε δύο ειδικές θέσεις στις πρωτεΐνες: υποκαταστάσεις λυσίνης προς μεθειονίνη στη θέση 27 (K27M) και στις δύο H3.1 και H3.3 και είτε μια γλυκίνη προς αργινίνη είτε αντικατάσταση γλυκίνης σε βαλίνη στη θέση 34 (G34R, G34V) στην H3.3.

Η λυσίνη 27 της ιστόνης H3 (H3K27) είναι ένα κρίσιμο κατάλοιπο το οποίο, όταν τριμεθυλιωθεί (me₃), εμπλέκεται στην καταστολή της μεταγραφής μέσω των κατασταλτικών συμπλοκών Polycomb 1 και 2. Η τροποποίηση H3K27me₃ ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με δέσμευση γενετικού υλικού, κυτταρική διαφοροποίηση (Faria et al, 2011, Grossniklaus and Paro, 2014). Έτσι, η H3K27 έχει ένα ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου.

Η λειτουργική σημασία της μετάλλαξης G34R / V είναι λιγότερο εύκολη στην ερμηνεία. Η γλυκίνη 34 της ιστόνης H3 (H3G34) βρίσκεται σε μικρή απόσταση από την λυσίνη 36 (H3K36), ένα υπόλειμμα που ρυθμίζει την μεταγραφική επιμήκυνση. Στην πραγματικότητα, τα μεταλλαγμένα νουκλεοσώματα H3G34R / V δείχνουν μειωμένη μεθυλίωση της H3K36 από το SETD2, τη μόνη ανθρώπινη μεθυλοτρανσφεράση που είναι ειδική για την H3K36 (Lewis et al, 2013). Αυτό υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη H3G34R / V επηρεάζει την ικανότητα των συμπλόκων που τροποποιούν την ιστόνη να μεθυλιώνουν την H3K36, μεταβάλλοντας έτσι τη μεταγραφή αρκετών γονιδίων-στόχων. Οι αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψαν πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που ήταν διαφορετικά σε δείγματα με τη μετάλλαξη H3K27M έναντι δειγμάτων με τη μετάλλαξη H3G34R / V, και τα δύο διαφέρουν από τον κανονικό εγκέφαλο. Αυτές οι αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη μεταγραφή ογκογονιδίων ή μικροRNAs με ογκογονικές λειτουργίες καθώς επίσης και στην πρόληψη της έκφρασης γονιδίων καταστολέων όγκων, προωθώντας την ανάπτυξη των αντίστοιχων όγκων.

3.2.5. Συμπτώματα του παιδικού γλοιώματος

Όταν τα γλοιώματα μεγαλώνουν, πιέζουν τα φυσιολογικά μέρη του εγκεφάλου τροποποιώντας τη φυσιολογική λειτουργία. Τα σημεία και τα συμπτώματα ενός όγκου του εγκεφάλου εξαρτώνται από τη θέση του όγκου. Τα γλοιώματα μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε μέρος του ΚΝΣ. Συνήθως δεν μπορούν να καθοριστούν με σαφήνεια τα συμπτώματα, καθώς η διαφορετική μορφή προκαλεί διαφορετικά συμπτώματα. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα είναι οι πονοκέφαλοι και ο έμετος. Πονοκέφαλοι που ξυπνούν τα παιδιά το πρωί ή πονοκέφαλοι που βελτιώνονται με έμετο σχετίζονται συχνά με έναν όγκο στον εγκέφαλο. Σοβαρός και συχνός έμετος που δεν φαίνεται να είναι μέρος ενός γαστρεντερικού προβλήματος είναι επίσης σχετικός με γλοιώματα. Άλλα συμπτώματα ενός γλοιώματος είναι αλλαγές στην όραση, όπως διπλή όραση ή θολή όραση, ακοή ή ομιλία. Εάν ο όγκος είναι στην οπτική οδό, είναι πιο συνηθισμένο να έχει απώλεια όρασης ή μια διογκωμένη εμφάνιση στο μάτι (γνωστή ως πρόπτωση) (Robison et al, 2014).

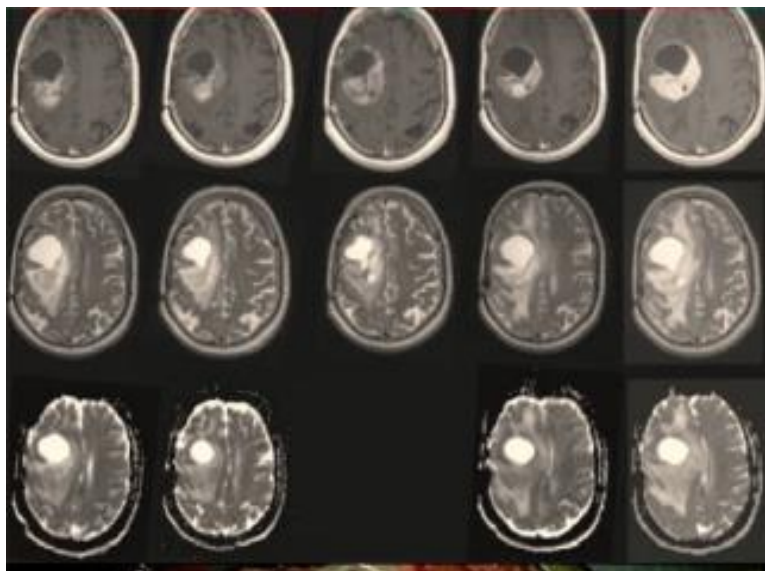
Τα παιδιά με όγκους του εγκεφάλου μπορεί να γίνουν λιγότερο σταθερά ενώ περπατούν ή έχουν δυσκολία με την ισορροπία. Αυτό είναι ιδιαίτερα συνηθισμένο σε ασθενείς με αστροκύτωμα επειδή συχνά εμφανίζονται στο υπόκεντρο του εγκεφάλου. Τα παιδιά μπορεί να γίνουν αδέξια ή να έχουν πρόβλημα να κρατούν αντικείμενα ή να γράφουν. Τα παιδιά μπορεί να είναι μπερδεμένα ή να είναι πιο νυσταγμένα από το κανονικό. Η συμπεριφορά ενός παιδιού μπορεί να αλλάξει εάν έχει όγκο στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένου του ευερέθιστου, και ορισμένα μικρά παιδιά δεν πληρούν τα αναπτυξιακά τους ορόσημα. Σε μερικές περιπτώσεις, το πρώτο σημάδι ενός όγκου του εγκεφάλου είναι μια κρίση. Σε βρέφη, μερικές φορές το κεφάλι θα πάρει ορατά μεγαλύτερο μέγεθος αν ένα μωρό αναπτύξει έναν όγκο στον εγκέφαλο. Τα παιδιά με υψηλού βαθμού γλοιώματα τείνουν να έχουν συμπτώματα για μικρότερο χρονικό διάστημα, επειδή αυτοί οι όγκοι μεγαλώνουν ταχύτερα (Fontanilla et al, 2012).

3.2.6. Διάγνωση

Ιστορικό και σωματική εξέταση: το πρώτο βήμα για τη διάγνωση ενός όγκου του εγκεφάλου είναι η αξιολόγηση. Οι γιατροί κάνουν πολλές ερωτήσεις σχετικά με τις

αλλαγές στο παιδί και σχετικά με όλα τα σημεία και τα συμπτώματα που συζητήθηκαν παραπάνω. Θα ρωτήσουν αν κάποια άλλα μέλη της οικογένειας είχαν όγκο στον εγκέφαλο ή οποιοδήποτε άλλο καρκίνο, επειδή υπάρχουν μερικοί τύποι καρκίνου με κληρονομική προδιάθεση. Ο θεράπων ιατρός εκτελεί μια πλήρη σωματική εξέταση, συμπεριλαμβανομένης μιας εμπειριστατωμένης νευρολογικής εξέτασης. Η νευρολογική εξέταση αξιολογεί τη λειτουργία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού για αναζήτηση τυχόν ανωμαλιών. Η νευρολογική εξέταση θα περιλαμβάνει τον έλεγχο της ψυχικής κατάστασης ενός παιδιού, τον συντονισμό, τις αισθήσεις και τα αντανακλαστικά. Εάν ένα παιδί είναι αρκετά μεγάλο για να περπατήσει, ο εξεταστής θα ελέγξει αν το παιδί περπατάει κανονικά (Fritschi et al, 2013).

Απεικόνιση: οι όγκοι του εγκεφάλου διαγιγνώσκονται με απεικονιστικό έλεγχο του εγκεφάλου. Τα δύο κύρια είδη απεικόνισης είναι η αξονική τομογραφία (CT) και η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (μαγνητική τομογραφία). Οι αξονικές τομογραφίες χρησιμοποιούν ακτινογραφίες για να πάρουν μια σειρά από εικόνες του εγκεφάλου από διαφορετικές γωνίες. Μια αξονική τομογραφία αποτελεί συχνά το πρώτο τύπο απεικόνισης που εκτελείται, επειδή χρειάζεται λιγότερος χρόνος για να γίνει η δοκιμή. Αν μια αξονική τομογραφία δείξει έναν όγκο στον εγκέφαλο, ένας ασθενής θα υποβληθεί στη συνέχεια μια μαγνητική τομογραφία (Greenop et al, 2013).



Εικόνα 3.8. : Απεικόνιση γλοιοβλαστώματος με MRI.

Βιοψία: ο καλύτερος τρόπος για να γίνει μια τελική διάγνωση σχετικά με τον τύπο του όγκου του εγκεφάλου είναι μελετώντας τα νεοπλασματικά κύτταρα σε ένα οπτικό μικροσκόπιο. Για να γίνει αυτό, πρέπει να γίνει χειρουργική επέμβαση για να ληφθεί ένα μέρος του όγκου από τον εγκέφαλο. Συχνά η διάγνωση γίνεται όταν αφαιρείται ολόκληρος ο όγκος κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης αντί ξεχωριστής βιοψία. Μερικές φορές η θέση ενός όγκου μπορεί να μην επιτρέπει τη χειρουργική επέμβαση και η διάγνωση γίνεται με βάση τα αποτελέσματα της μαγνητικής τομογραφίας ενώ η θεραπεία προγραμματίζεται με βάση αυτή την απεικόνιση (Ward et al, 2014).

Οσφυϊκή παρακέντηση: τα παιδιά με υψηλού βαθμού κακοήθειας γλοιώματα μπορεί να χρειαστούν οσφυϊκή παρακέντηση για να αναζητηθεί η εξάπλωση του όγκου στο νωτιαίο υγρό (Ward et al, 2014).

3.2.7. Θεραπεία

Οι Παιδιατρικοί ογκολόγοι συνεργάζονται με κάθε ασθενή για να αναπτύξουν ένα εξατομικευμένο σχέδιο για τη θεραπεία του όγκου. Οι γιατροί χρησιμοποιούν την ιστολογική αξιολόγηση και τη θέση του όγκου για να καθορίσουν τη συγκεκριμένη θεραπεία. Οι Παιδιατρικοί ογκολόγοι χρησιμοποιούν πληροφορίες βασισμένες σε αποτελέσματα ερευνητικών δοκιμών στοχευόμενης θεραπείας του καρκίνου στα παιδιά. Οι γιατροί εργάζονται με οικογένειες χρησιμοποιώντας αυτή τη γνώση σε συνδυασμό με τους στόχους και τις επιθυμίες κάθε ασθενούς και της οικογένειάς του, έτσι ώστε να καθορίσουν ένα εξατομικευμένο σχέδιο θεραπείας για κάθε ασθενή. Οι κύριες επιλογές για τη θεραπεία των γλοιωμάτων περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση για την απομάκρυνση του όγκου, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Εάν ένα παιδί δεν έχει συμπτώματα από έναν όγκο που είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας, μερικές φορές ο ασθενής θα παρακολουθείται στενά και δεν θα υποβληθεί σε θεραπεία (Robison et al, 2014).

Αναλυτικά:

1) Χειρουργική επέμβαση: Εάν οι γιατροί πιστεύουν ότι μια μάζα που βρίσκεται στον εγκέφαλο σε αξονική ή μαγνητική τομογραφία είναι ένα γλοιώμα, ένας χειρουργός θα κάνει μια βιοψία ή χειρουργική επέμβαση για να αφαιρέσει τον όγκο. Η κύρια θεραπεία τόσο για τα υψηλού όσο και για τα χαμηλού βαθμού γλοιώματα είναι η χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση όσο μεγαλύτερου μέρους του όγκου μπορεί να αφαιρεθεί με ασφάλεια.

Μια ολική εκτομή αναφέρεται στην ολική αφαίρεση του όγκου κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης χωρίς εντοπισμό υπολειμμάτων κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης ή στη μαγνητική τομογραφία. Μια σχεδόν ολική εκτομή αναφέρεται στην αφαίρεση του 90% του όγκου κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Μια υπο-ολική εκτομή αφορά την αφαίρεση του 51-90% του όγκου κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Μια μερική εκτομή αφορά την αφαίρεση του 10-50% του όγκου κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης.

2) Ακτινοθεραπεία: Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί ακτίνες χ ή σωματίδια υψηλής ενέργειας που κατευθύνονται σε έναν όγκο για να σκοτώνουν τα μη φυσιολογικά κύτταρα. Η δόση της ακτινοβολίας θα εξαρτηθεί από τον τύπο του όγκου, τη θέση του όγκου και την ηλικία του παιδιού. Η ακτινοβολία μπορεί να έχει παρενέργειες, προκαλώντας μακροχρόνια μείωση στην ανάπτυξη σε πολύ μικρά παιδιά. Η ακτινοθεραπεία συχνά καθυστερεί όσο το δυνατόν περισσότερο στα μικρότερα παιδιά για να τους δώσει την ευκαιρία να αναπτυχθούν όσο το δυνατόν περισσότερο πριν από τη λήψη ακτινοβολίας.

3) Χημειοθεραπεία: Υπάρχουν πολυάριθμα σχήματα χημειοθεραπείας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για χαμηλού (LGGs), υψηλού βαθμού κακοήθειας (HGGs) και υποτροπιάζοντα γλοιώματα. Η χημειοθεραπεία, όταν πραγματοποιείται μόνη της, φαίνεται να είναι η λιγότερο αποτελεσματική μέθοδος, προσφέροντας μια μόνο μικρή αύξηση επιβίωσης (Kline et al, 2018). Ωστόσο, χρησιμοποιείται λόγω της σωρευτικής επίδρασής της όταν συνδυάζεται με άλλες στρατηγικές διαχείρισης, αποτέλεσμα που μπορεί να προσφέρει ιδιαίτερα μεγάλη αύξηση στην επιβίωση έως και τριπλάσιο (El-Ayadi et al, 2018).

Η CCNU (χλωροαιθυλο- κυκλοεξυλο νιτροζουρία) και η βινκριστίνη είναι μερικοί από τους κύριους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται με μεγάλη επίδραση σε διάφορες κλινικές δοκιμές, καθώς και PCV (προκαρβαζίνη, λομουστίνη και βινκριστίνη) που έχει επίσης αναφερθεί ότι βελτιώνει την επιβίωση σε περιπτώσεις παιδιατρικών γλοιωμάτων. Η τεμοζολομίδη (TMZ) είναι μια τυπική χημειοθεραπευτική μέθοδος που φαίνεται να αυξάνει τη μέση επιβίωση για περίπου 2 μήνες στους ενήλικες, αλλά οι δοκιμές σε παιδιά δεν απέδειξαν κανένα όφελος επιβίωσης (Diwanji et al, 2017). Η χημειοθεραπεία με τη μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων είναι μια νέα μέθοδος για τη θεραπεία των γλοιωμάτων υψηλού βαθμού, παρότι η ανωτερότητα της σε άλλους τρόπους θεραπείας δεν έχει τεκμηριωθεί (Durando et al, 2003).

- 4) Μοριακή στόχευση: Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την παιδιατρική θεραπεία όγκων εγκεφάλου με βάση το συγκεκριμένο γενετικό ιστορικό τους αποκάλυψαν αρκετούς αποτελεσματικούς μοριακούς στόχους. Για παράδειγμα, σε όγκους υποεπενδυματικών γιγαντιαίων κυττάρων που σχετίζονται με τη σκλήρυνση κατά του σωληναρίου, ο παρεμποδιστής μονοπατιού mTOR έχει ελεγχθεί με ευεργετικό αποτέλεσμα θεραπείας (Krueger et al, 2013) και επί του παρόντος αξιολογείται περαιτέρω σε LGGs (Gajjar et al, 2015). Άλλοι μοριακοί στόχοι, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων BRAF V600E και MEK, όπως η βεμουραφενίμπη, η δαμπραφενίμπη και η τραμετινίμπη, μπορούν να επιτρέψουν τη διαχείριση των εγκεφαλικών όγκων. Αυτοί οι αναστολείς φαίνεται να έχουν βελτιωμένη διείσδυση στον εγκέφαλο και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε συρρίκνωση όγκων του εγκεφάλου (Gajjar et al, 2015). Ωστόσο, η μελέτη του Sievert και των συνεργατών του έδειξαν ότι αναστολείς BRAF όπως το Dabrafenib και το PLX4720, μπορεί να προκαλέσουν παράδοξη διέγερση της σηματοδότησης MAPK σε άλλες μεταλλάξεις BRAF, όπως το γονίδιο BRAF / KIAA1549 σύντηξης (Sievert et al, 2013). Το Selumetinib, ένας αποτελεσματικός αναστολέας της οδού κινάσης MAP (αναστολείς MEK), θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρόσθετη επιλογή για τους ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας γλοιώματα (Kolb et al, 2010).

3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί

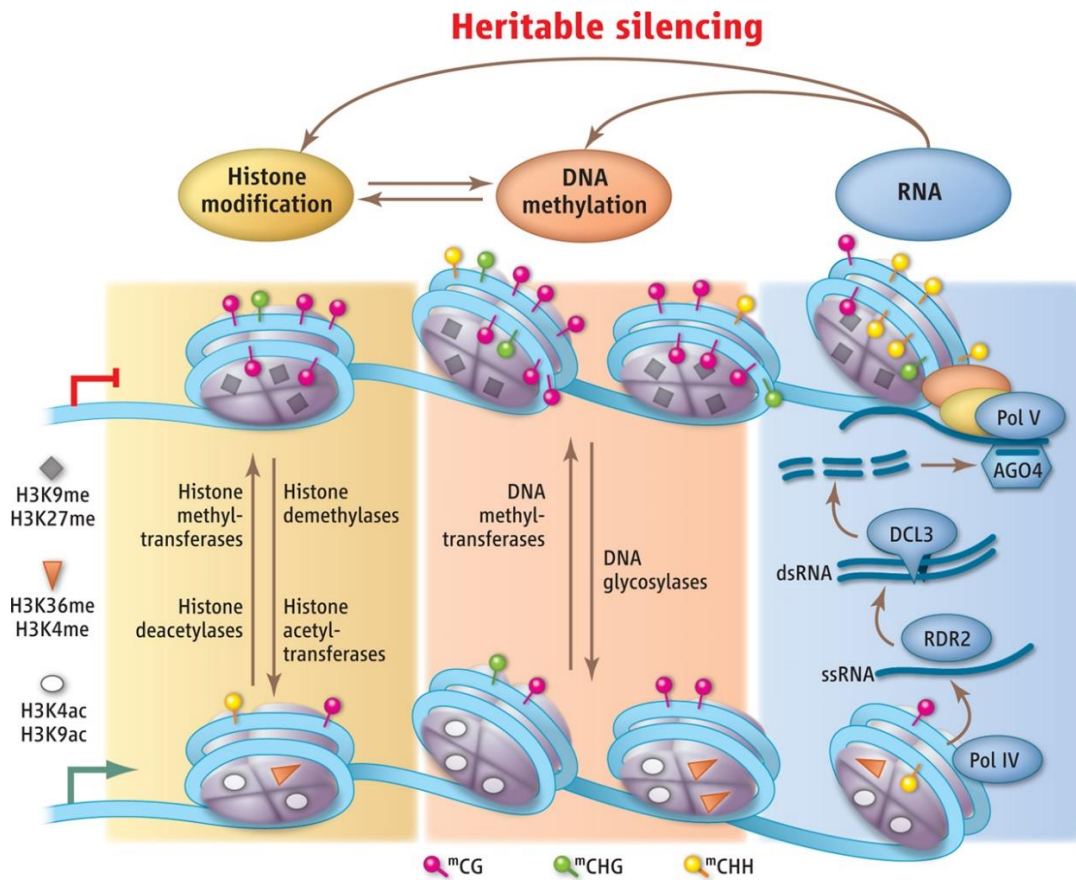
Η επιγενετική αναφέρεται στη μελέτη των αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων, που εμφανίζονται χωρίς κάποια αλλαγή στην αλληλουχία του πυρηνικού DNA (Jaenisch et al, 2003).

Η επιγενετική αποτελεί μια σύνδεση μεταξύ του γονότυπου και του φαινότυπου, καθώς μέσω επιγενετικών μηχανισμών, τροποποιείται το τελικό προϊόν του γονιδίου, επηρεασμένο από πληθώρα ερεθισμάτων ή περιβαλλοντικών παραγόντων.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διαδικασιών, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικού υλικού και πρωτεϊνών, η εμβρυογένεση κ.α. Αλλοιώσεις ωστόσο, στο επιγονιδίωμα συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Ellis et al, 2009).

Εξαιτίας της επιγενετικής πλαστικότητας, της δυνατότητας δηλαδή αναστροφής των επιγενετικών αλλαγών, τα τελευταία χρόνια αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για διάφορες ασθένειες (Nagarajan et al, 2009).

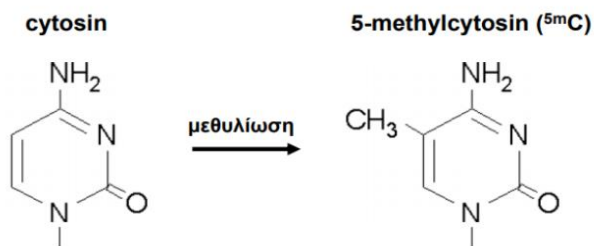
Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, τα μη-κωδικοποιούντα RNA (Non-coding RNA) και οι χημικές τροποποιήσεις των ιστονών.



Εικόνα 3.9.: Απεικόνιση των κυριότερων επιγενετικών μηχανισμών.

3.3.1. Μεθυλίωση του DNA

Η προσθήκη μεθυλομάδας στον άνθρακα της θέσης 5' του δακτυλίου της κυτοσίνης (5^mC) του DNA.



Εικόνα 3.10.: προσθήκη μεθυλομάδας στον 5' C της κυτοσίνης.

Η προσθήκη μεθυλομάδας συμβαίνει στις κυτοσίνες του γονιδιώματος που βρίσκονται σε πλαίσια νησιδίων CpG. Η τροποποίηση αυτή είναι συμμετρική, εμφανίζεται δηλαδή και στις δύο αλυσίδες του DNA, εφόσον τα δινουκλεοτίδια CpG είναι παλίνδρομα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μεθυλομάδες να προεκβάλλουν από τη μεγάλη αύλακα του DNA. (Engel et al, 1978).

Η συγκεκριμένη τοπολογία εμποδίζει την πρόσβαση πρωτεϊνών που αλληλοεπιδρούν με το DNA (όπως μεταγραφικοί παράγοντες) και στρατολογεί συμπλέγματα, όπως ιστονικές μεθυλοτρανσφεράσες (SUV39H1) και αποακετυλάσες (HDAC 1, HDAC 2) που τροποποιούν τοπικά τη δομή της χρωματίνης, οδηγώντας σε μεταγραφική απενεργοποίηση και κατά συνέπεια σε γονιδιακή αποσιώπηση. Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται ενζυμικά από τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNMTs) με τη συνεισφορά του μορίου της S- Αδενοσυλική Μεθειονίνη (SAM) που δρα ως δότης μεθυλομάδας (Ramsahoye et al, 2009).

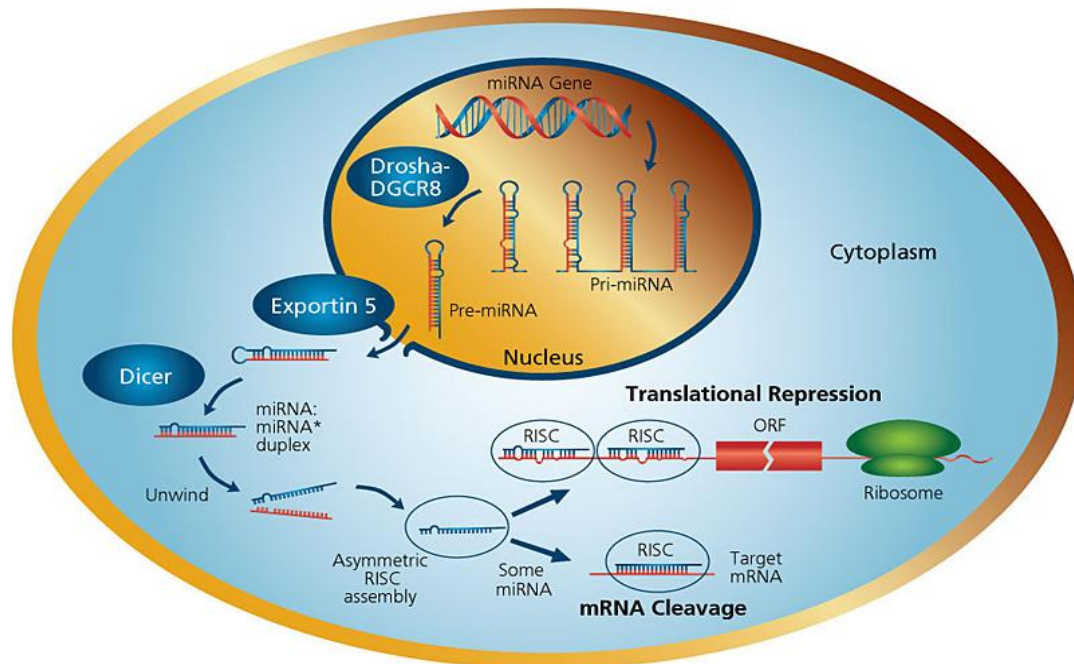
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις μεθυλοτρανσφεράσες, η DNMT1, η DNMT3a και η DNMT3b. Η πρώτη είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης, αδυνατεί όμως να εισάγει μεθυλομάδες εκεί που δεν υπάρχουν ήδη στη μία εκ των δύο αλυσίδων. Το πρόβλημα αυτό επιλύουν οι άλλες δύο μεθυλοτρανσφεράσες, οι οποίες επιτελούν μεθυλίωση 'εκ νέου' (de novo) (Okano et al, 1999).

Αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης έχουν συσχετιστεί με ανάπτυξη νεοπλασίας από το 1983, καθώς παρατηρήθηκε πως το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων είναι υπομεθυλιωμένο σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Goelz et al, 1985).

Η μαζική απώλεια μεθυλίωσης έχει σημαντικές συνέπειες στα κύτταρα, όπως χρωμοσωμική αστάθεια, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απώλεια γενωμικών εντυπωμάτων. Σε αντίθεση με την καθολική υπομεθυλίωση συγκεκριμένες νησίδες CpG εμφανίζουν υπερμεθυλίωση. Η υπερμεθυλίωση αυτή συμβαίνει σε υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων και έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των γονιδίων αυτών. Οι υπερμεθυλιωμένοι αυτοί υποκινητές έχουν προταθεί και ως βιοδείκτες νέας γενεάς από τον Kelly και τους συνεργάτες του (Kelly et al, 2010).

3.3.2. Μη κωδικοποιούντα RNAs (non-coding RNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσης σε μια μη κωδική περιοχή των mRNA-στόχων που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Με αυτόν το μηχανισμό, τα miRNAs ρυθμίζουν την αυτο-ανανέωση, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση των κυττάρων, μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγησης των γονιδίων.



Εικόνα 3.11. : Βιοσύνθεση των miRNAs

Η βιογένεση των miRNAs είναι επίσης πολύ εξειδικευμένη διαδικασία, αφού εξαρτάται από το εκάστοτε miRNA που εκφράζεται. Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των βλαστοκυττάρων, καθώς και σε διάφορες νόσους (με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο).

Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων RNAs (mRNAs). Παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs ρυθμίζουν περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό

υποδεικνύει όχι μόνο τη σημασία τους σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια, αλλά και το δυναμικό τους για χειρισμό των λειτουργιών του κυττάρου. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον καρκίνο, τα miRNAs έχει παρατηρηθεί να δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια όσο και ως ογκογονίδια, τα οποία αναστέλλουν και επάγουν-προάγουν την ανάπτυξη όγκου, αντίστοιχα. Επί πλέον, μια συνολική υποέκφραση των miRNAs παρατηρείται σε πολλούς καρκινικούς ιστούς, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Επομένως, μια πιθανή θεραπευτική χρήση των miRNAs αφορά στη διόρθωση των απορυθμισμένων επιπέδων μετάφρασης γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, και ιδιαίτερα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα που πρωτίστως ευθύνονται για την καρκινογένεση και τις μεταστάσεις.

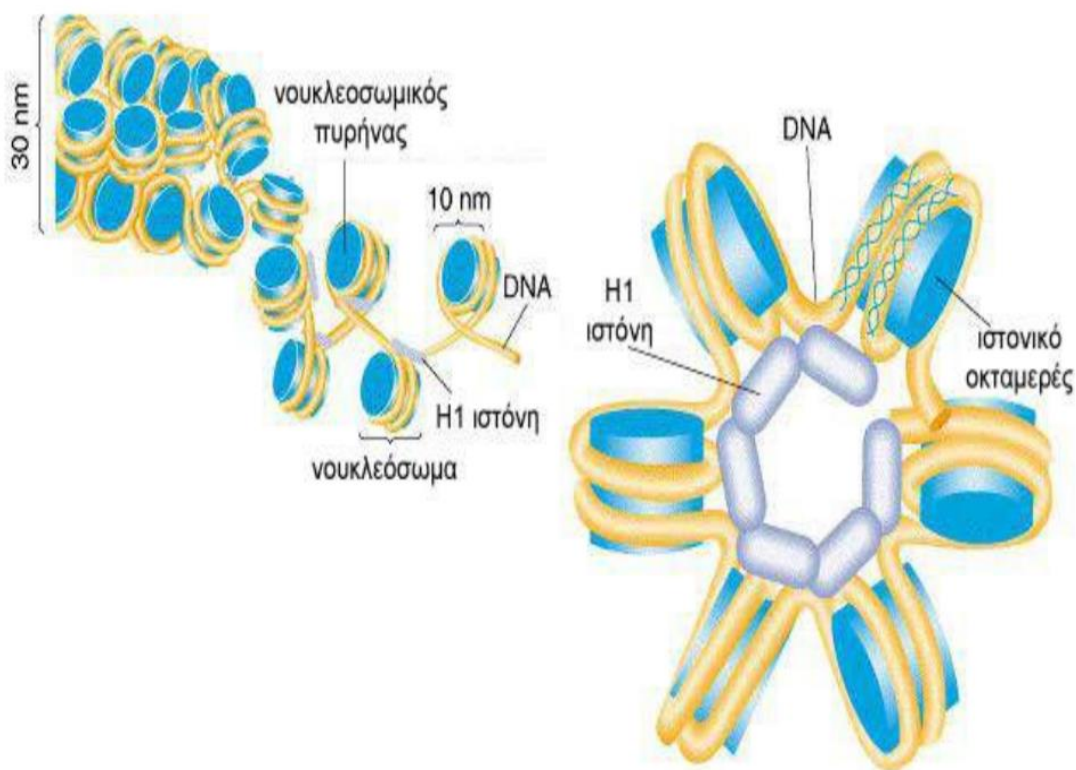
3.3.3. Δομή του νουκλεοσώματος και της χρωματίνης

Η δομή της χρωματίνης αποτελεί πεδίο έρευνας εδώ και τρεις περίπου δεκαετίες. Αρχικά, πιστευόταν πως είναι μια στατική δομή, όπου οι ιστόνες και οι λοιπές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες έχουν ως λειτουργία τη συμπύκνωση του DNA. Καθώς οι έρευνες συνεχίζονταν, έγινε κατανοητό πως η δομή της χρωματίνης εκτός από το πακετάρισμα του γενετικού υλικού, έχει επίσης καταλυτικό ρόλο στη ρύθμιση διαδικασιών που συμβαίνουν στον πυρήνα των κυττάρων, όπως η μεταγραφή γονιδίων (Pruss et al, 1995).

Το 80% του DNA των ευκαριωτικών οργανισμών βρίσκεται οργανωμένο στο νουκλεόσωμα (Lagst et al, 2004). Το νουκλεόσωμα αποτελείται από DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων και από οκτώ μόρια πρωτεϊνών, που ονομάζονται **ιστόνες**. Το οκταμερές των ιστονών συνίσταται από δύο υπομονάδες από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος αποτελείται από ένα τετραμερές H3₂/ H4₂ συνδεδεμένο με δύο διμερή H2A/H2B.

Στην αριστερόστροφη, ελικοειδή δομή του οκταμερούς, περιελίσσονται 146bp DNA, δημιουργώντας δύο 19 υπερελικοειδείς βρόγχους, που μαζί με το οκταμερές των ιστονών αποτελούν τον νουκλεοσωμικό πυρήνα (Wolffe et al, 2000). Μεταξύ δύο

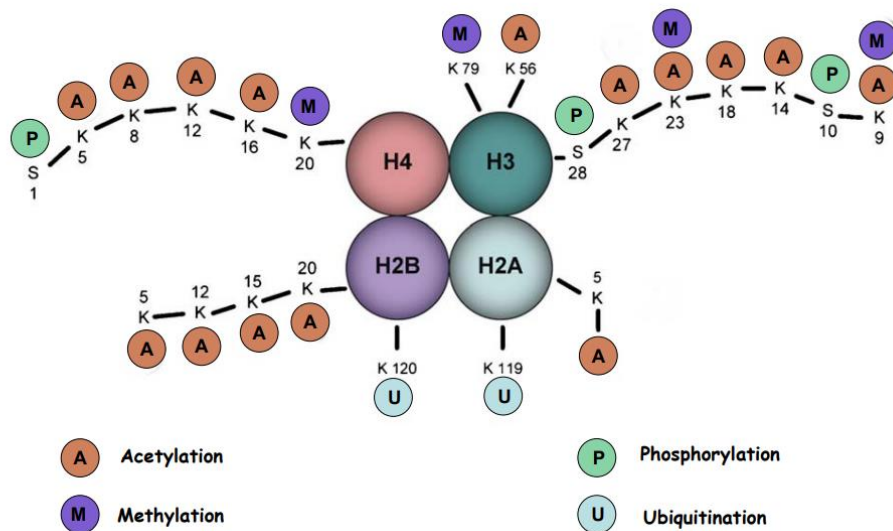
διαδοχικών νουκλεοσωμάτων υπάρχει ένα τμήμα DNA, που ονομάζεται συνδετικό DNA και στο οποίο προσδένεται η συνδετική ιστόνη H1, η οποία συμβάλλει στη δημιουργία και τη σταθερότητα των ανώτερων επιπέδων οργάνωσης της χρωματίνης (Kowalski et al, 2013). Η σημαντικότερη απ' αυτές είναι το ινίδιο των 30nm ή σωληνοειδές, μία σπειροειδής δομή που κυριαρχεί στη μεσοφασική χρωματίνη και αποτελεί το υπόστρωμα για όλες τις διαδικασίες που σχετίζονται με το DNA.



Εικόνα 3.12. : Η συμπύκνωση της χρωματίνης. Απεικόνιση του πρώτου μοντέλου που έχει προταθεί για το σχηματισμό του ινιδίου των 30 nm, κατά το οποίο μια σειρά νουκλεοσωμάτων που συνδέονται μέσω της H1, σχηματίζουν μια σπειροειδή δομή.

Στην «εξωτερική» πλευρά του νουκλεοσώματος εκτείνονται οι περιοχές των άκρων των ιστονών, γνωστές και ως «ουρές» των ιστονών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 25% περίπου της ολικής μάζας του οκταμερούς. Οι περιοχές αυτές, που αποτελούν συνέχεια των αμινοτελικών περιοχών όλων των νουκλεοσωμικών ιστονών καθώς και της

καρβοξυτελικής περιοχής της H2A, προεξέχουν από την επιφάνεια του νουκλεοσώματος και προβάλλουν πίσω από τις υπερελικοειδείς περιστροφές του DNA (Wolffe et al, 1999). Μελέτες με ακολουθίες νουκλεοσωμάτων απουσία της συνδετικής ιστόνης H1 έδειξαν ότι οι περιοχές των άκρων των ιστονών ρυθμίζουν τις επαφές μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων και συμμετέχουν στη σχηματισμό των ανώτερων δομών της χρωματίνης. Τέλος, στις περιοχές των άκρων υπάρχουν οι θέσεις όπου συμβαίνουν οι διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή, όσο και τη λειτουργία της χρωματίνης (Wolffe et al, 2000).



Εικόνα 3.13.: Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών προεξέχουν επιδεχόμενες διάφορες τροποποιήσεις.

Η κατανομή της χρωματίνης δεν είναι ομοιόμορφη αντανακλώντας το διαφορετικό βαθμό αποσυμπύκνωσης, που αντιστοιχεί στο βαθμό της μεταγραφικής δραστηριότητας. Η ευχρωματίνη σχηματίζει αραιοχρωματικές περιοχές, που αντιστοιχούν στο ενεργά μεταγραφόμενο DNA του κυττάρου. Η ετεροχρωματίνη

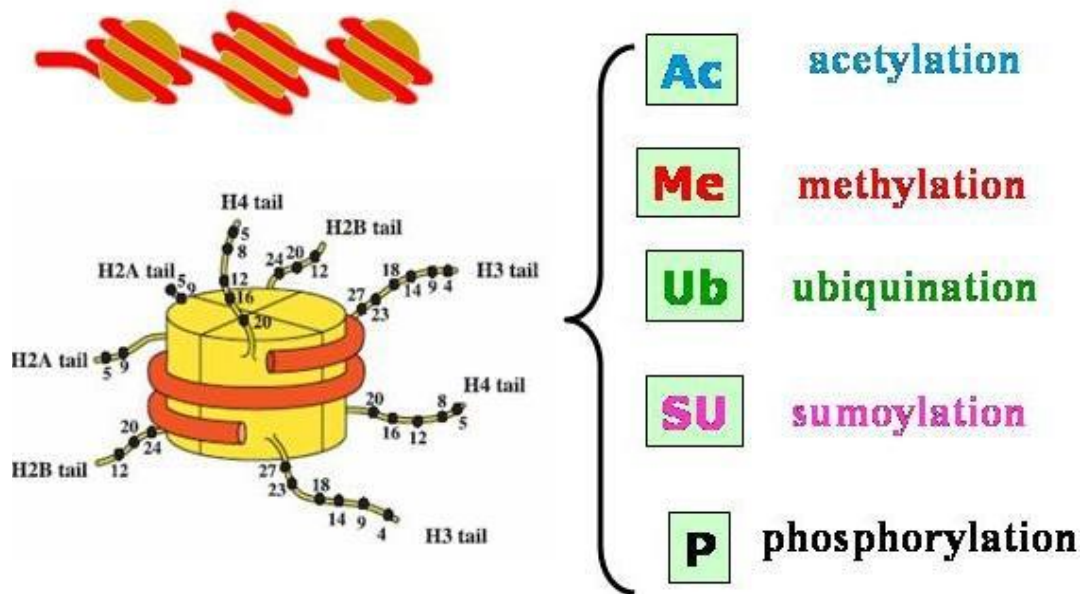
σχηματίζει πυκνοχρωματικές περιοχές, συχνά εφαιπτόμενες με την πυρηνική μεμβράνη, εμφανίζει υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και αφορά μεταγραφικά ανενεργό DNA.

3.3.4. Χημικές τροποποιήσεις ιστονών

Τα μόρια των ιστονών των νουκλεοσωμάτων υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, καθώς πραγματοποιείται πρόσδεση επιπλέον μορίων σε συγκεκριμένες ομάδες, συγκεκριμένων αμινοξέων όλων των ιστονών. Πιο συγκεκριμένα οι θέσεις που λαμβάνουν χώρα αυτές οι τροποποιήσεις είναι οι ουρές των ιστονών που προεξέχουν από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος.

Οι σημαντικότερες τροποποιήσεις των ιστονών είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικιτίνωση και σουμοϋλίωση (Berger, 2003). Οι παραπάνω τροποποιήσεις δημιουργούν ένα επιπλέον επίπεδο ετερογένειας των ιστονών και παράλληλα επιτελούν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της χρωματίνης.

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα για να εξηγηθεί ο μηχανισμός δράσης των τροποποιήσεων των ιστονών. Σύμφωνα με το πρώτο, η μεταβολή του ηλεκτρικού φορτίου των ιστονών μειώνει τις αλληλεπιδράσεις τους με το DNA, δημιουργεί μία πιο «χαλαρή» δομή της χρωματίνης και μ'αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο εκμαγείο του DNA (Spencer et al, 1999). Σύμφωνα με το δεύτερο, το οποίο είναι γνωστό ως «υπόθεση του ιστονικού κώδικα», οι διαφορετικοί συνδυασμοί τροποποιήσεων στο αμινοτελικό άκρο μίας ιστόνης δημιουργούν συγκεκριμένα μοτίβα, που πιθανόν να αποτελούν σημεία αναγνώρισης, πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης των διαφόρων παραγόντων που είναι απαραίτητοι για τις λειτουργίες της χρωματίνης.

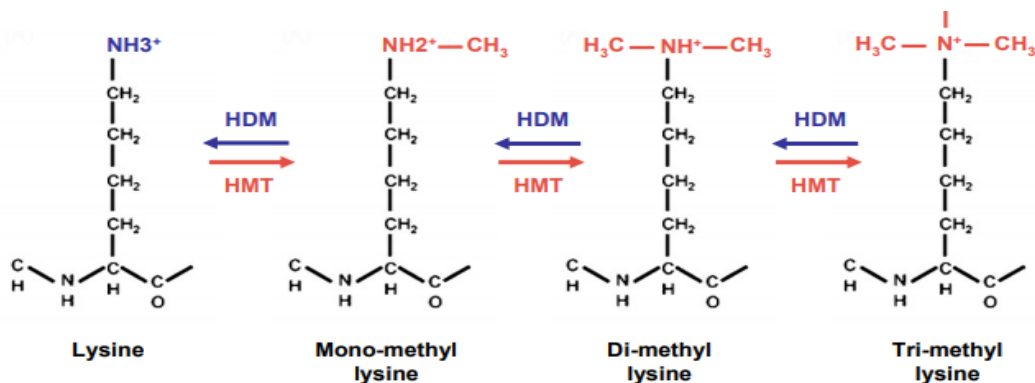


Εικόνα 3.14.: Χημικές τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στις ιστόνες του νουκλεοσώματος.

Ακετυλίωση: Πραγματοποιείται με τη μεταφορά μιας ακετυλομάδας στην ε-αμινομάδα κατάλοιπων λυσίνης στα N-τελικά άκρα των ιστονών. Η ακετυλομάδα προέρχεται από το ακέτυλο-συνένζυμο A και η τροποποίηση αυτή λαμβάνει χώρα από συγκεκριμένα ένζυμα, τις ακετυλοτρανφεράσες (Histone acetyltransferases, HATs). Η τροποποίηση αυτή συνδέεται με ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων, καθώς η ακετυλομάδα που δεσμεύεται στο κατάλοιπο της λυσίνης, έχει αρνητικό φορτίο και εξουδετερώνει το θετικό πρόσημο της λυσίνης. Ακολούθως εξασθενεί η σύνδεση μεταξύ της λιγότερο, πλέον, θετικά φορτισμένης ιστόνης και του αρνητικά φορτισμένου σκελετού του DNA. Με αυτόν τον τρόπο ‘χαλαρώνει’ η δομή της χρωματίνης, η οποία καθίσταται προσβάσιμη σε μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, οδηγώντας σε επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Η αντίστροφη διαδικασία πραγματοποιείται από τις αποακετυλάσες (Histone DeAcetylases, HDACs) που απομακρύνουν ακετυλομάδες από τα αμινοτελικά άκρα των ιστονών (Chang and Ming, 2002). Η απομάκρυνση αυτή οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης που έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταγραφικής διαδικασίας. Μεταξύ των δύο διαδικασιών υπάρχει μια δυναμική

ισορροπία, ώστε να εξασφαλίζεται ο σωστός βαθμός ακετυλίωσης των ουρών των ιστονών (Kleff et al,1995).

Μεθυλίωση: Λαμβάνει χώρα σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης των αμινο-τελικών άκρων των ιστονών H3 και H4. Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση της μεθυλίωσης λέγονται μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone Methyl Trasfersases, HMTs). Οι μεθυλομάδες που προστίθενται στα κατάλοιπα των αμινοξέων προέρχονται από την S- αδενοσυλο-μεθειονίνη (SAM). Τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν μέχρι και να τρι-μεθυλιωθούν, ενώ τα κατάλοιπα αργινίνης μπορούν δεχτούν μέχρι δύο μεθυλομάδες.



Εικόνα 3.15.: Τα στάδια μεθυλίωσης της λυσίνης.

Η μεθυλίωση των αμινοξέων λυσίνης των ιστονών καταλύεται από μεθυλοτρανσφεράσες που φέρουν στο μόριό τους μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή 130 αμινοξέων, την περιοχή SET. Το μοτίβο αυτό ταυτοποιήθηκε αρχικά σε τρεις πρωτεΐνες της *Drosophila*, τη Su(var)3-9, την Enhancer of zeste, μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Polycomb και την Trithorax, μέλος της οικογένειας Trithorax. Περισσότερες από 200 πρωτεΐνες, που επιτελούν ποικίλες λειτουργίες και που συναντώνται σε ευρύ φάσμα οργανισμών, βρέθηκε πως περιέχουν την περιοχή SET και έχει προταθεί ότι ο κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η Dot1L που μεθυλιώνει το H3K79 είναι μόνη γνωστή μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης που δεν φέρει περιοχή SET (Chakravarty et al, 2014).

Η αντίθετη διαδικασία επιτελείται επίσης από ειδικά ένζυμα που καλούνται απομεθυλάσες των ιστονών (Histone Demethylases, HDMs). Η συγκεκριμένη τροποποίηση είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς σε αντίθεση με την ακετυλίωση, η προσθήκη μεθυλομάδας άλλοτε επάγει τη μεταγραφεί και άλλοτε την καταστέλλει, ανάλογα με το κατάλοιπο που τροποποιείται την εκάστοτε φορά. (Spygroulou et al, 2013). Πιο συγκεκριμένα, μεθυλίωση των λυσινών 4, 36 και 79 της ιστόνης H3 σχετίζεται με ενεργοποίηση της μεταγραφής, ενώ μεθυλίωση των 9, 20 και 29 λυσινών οδηγεί σε απενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων (Jasencakova et al, 2003).

Η προσθήκη μεθυλομάδων στις ουρές των ιστονών δεν αλλάζει το τελικό φορτίο των πρωτεϊνών αυτών, ωστόσο φαίνεται πως αλλάζουν οι αλληλεπιδράσεις του νουκλεοσώματος με πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται στις ιστόνες. Ακόμα η μεθυλίωση αποτελεί σήμα προσέλκυσης διαφόρων μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της μεταγραφής (Greer and Shi, 2012).

Λόγω του γεγονότος ότι η μεθυλίωση των ιστονών ρυθμίζει μεγάλο μέρος των μεταγραφόμενων γονιδίων, ακόμη και μικρές αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης μπορεί να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στον οργανισμό. Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται να αυξάνουν και να μειώνουν τη μεθυλίωση έχουν μεγάλες αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων. Σημαντικό ρόλο φαίνεται επίσης να διαδραματίζουν και μεταλλάξεις που μπορεί να επηρεάζουν τη δομή και τη δραστικότητα των μεθυλοτρανσφερασών, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε μια ποικιλία καρκίνων, γλοιωμάτων και λευχαιμιών, ανάλογα με τα κύτταρα στα οποία εμφανίζεται η μετάλλαξη (Esteller, 2006) (Lu et al, 2012).

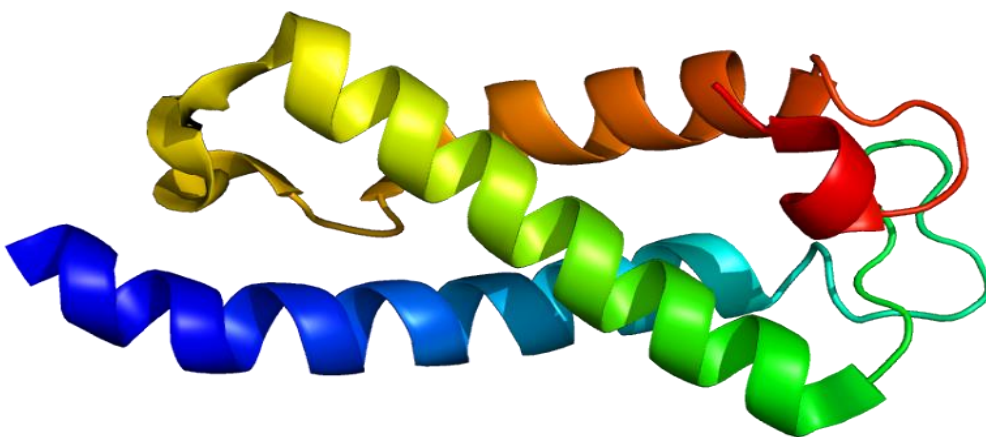
Φωσφορυλίωση: Συμβαίνει κυρίως σε κατάλοιπα σερινών και θρεονινών των ιστονών, σε υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης στην H1 ιστόνη. Η τροποποίηση αυτή συνδέεται με την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων και το σχηματισμό ευχρωματινικών περιοχών (Bártová et al, 2008).

Ουβικιτίνωση: Είναι η αντιστρεπτή ομοιοπολική σύνδεση ουβικιτίνης στο καρβοξυτελικό άκρο, κυρίως των H2A και H2B ιστονών. Η πρόσδεση της μικρής αυτής πρωτεΐνης σχετίζεται με μεταγραφική ενεργότητα και αποδόμηση πρωτεϊνών (Bártová et al, 2008).

Σουμοϋλίωση : Είναι προσθήκη της πρωτεΐνης SUMO. Έχει παρόμοια δράση με την ουμπικουτίνωση και φαίνεται να διαδραματίζει ανασταλτικό ρόλο στη μεταγραφή, καθώς ανταγωνίζεται την ακετυλίωση.

3.3.5. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2

Το γονίδιο *setd2* εδράζεται στον κοντό βραχίονα (p21.31) του χρωμοσώματος 3 και φαίνεται να διαδραματίζει κατασταλτικό ρόλο στη δημιουργία καρκίνου (Sarakbi et al, 2009). Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιεί μια καταλυτικά δραστική θέση που ονομάζεται περιοχή SET (suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax). Η περιοχή SET είναι μια αλληλουχία 130 αμινοξέων που εμπλέκεται στη ρύθμιση των γονιδιακών δραστηριοτήτων. Αυτός ο τομέας έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύεται στην ουρά της ιστόνης και προκαλεί τη μεθυλίωση της (Fiskus et al, 2009).



Εικόνα 3.16. : Δομή της πρωτεΐνης SETD2.

Η SETD2 είναι μια μεθυλοτρασφεράση ιστονών ειδική για την μεθυλίωση της λυσίνης 36 της ιστόνης H3. *In vitro*, SETD2 μπορεί να διεξάγει μονο-, δι- και τρι-μεθυλίωση της H3K36 (Wagner et al, 2012) αλλά δε συμβαίνει το ίδιο και *in vivo*. Παντελής έλλειψη της SETD2 προκαλεί πλήρη απουσία H3K36me3 χωρίς να διαταράσσονται τα επίπεδα των H3K36me1 και H3K36me2 (Edmunds et al, 2008). Με βάση αυτές τις μελέτες, έχει

καταστεί προφανές ότι η SETD2 είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για αυτήν την τροποποίηση. Η καταλυτική τριμεθυλίωση H3K36 θεωρείται τώρα ως η κύρια λειτουργία του SETD2.

Οι αναγνώστες H3K36me3 που προσλαμβάνουν σύμπλοκα πρωτεϊνών για τη διεξαγωγή συγκεκριμένων διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της επιμήκυνσης της μεταγραφής, της επεξεργασίας του RNA και της επιδιόρθωσης του DNA, καθορίζουν τον αντίκτυπο αυτής της τροποποίησης ιστόνης (Li et al, 2016).

Η σημαντικότητα της πρωτεΐνης αυτής διαφαίνεται σε knockout ποντίκια. Τα ποντίκια αυτά οδηγούνται σε εμβρυικό θάνατο λόγω ελαττωμάτων στην αγγειογένεση τόσο στον σάκο, όσο και στον πλακούντα. (Hu et al, 2010). Έτσι, το SETD2 φαίνεται να είναι κρίσιμο για μια σωστή εμβρυϊκή ανάπτυξη, αν και πολλά καρκινικά κύτταρα φαίνονται να λειτουργούν καλά χωρίς το SETD2.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο SETD2 έχουν περιγραφεί σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες (Skucha et al, 2019). Οι πρώτες περιγράφηκαν το 2010, αφορούν ασθενείς με καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων διαφανούς κυττάρου (ccRCC) και είναι μεταλλάξεις απενεργοποίησης του SETD2 (Dalglish et al, 2010). Το 15% των ασθενών με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου εμφανίζουν μεταλλάξεις απενεργοποίησης του SETD2. Μεταβολές του SETD2 εντοπίζονται επίσης στο 30% των παιδιατρικών γλοιωμάτων υψηλού βαθμού (HGG) και του ορθοκολικού καρκίνου (Yuan et al, 2015).

Οι μεταλλάξεις του SETD2 βρέθηκαν επίσης ότι σχετίζονται με αιματοποιητικές κακοήθειες. Σε αυτό τον τύπο καρκίνου εμφανίζονται κυρίως σημειακές μεταλλάξεις (missense), οι οποίες εμφανίζονται σε όλη την αλληλουχία κωδικοποίησης. Στο 10% των ασθενών που πάσχουν από πρόωρη οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία πρόδρομων κυττάρων T εντοπίζονται απαλοιφές του SETD2 (Zhang et al, 2012). Τέλος, οι μεταβολές στο γονίδιο SETD2 εμπλουτίστηκαν σημαντικά σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα παιδιατρική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL), δείχνοντας έναν πιθανό ρόλο των μεταλλάξεων SETD2 στην ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία (Mar et al, 2014). Αυτό επιβεβαιώθηκε πρόσφατα, καθώς η ετερόζυγη απώλεια του SETD2 στη λευχαιμία είχε ως αποτέλεσμα την αντοχή σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA (Mar

et al, 2017). Η μεθυλοτρανσφεράση καταλύει την μεθυλίωση της λυσίνης 36 στην ιστόνη 3 (H3K36).

Μεθυλίωση H3K36: Οι τροποποιήσεις του H3K36 είναι πολύ διαφορετικές και παίζουν ρόλους σε πολλές σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή, ο ομόλογος ανασυνδυασμός και η επιδιόρθωση βλαβών του DNA (Lee et al, 2010).

Τα επίπεδα της δι/και τρι- μεθυλίωσης H3K36 κορυφώνονται στα 3' άκρα ενεργών γονιδίων, γεγονός που πιστεύεται πως υποδεικνύει το ρόλο της στον τερματισμό της μεταγραφής και / ή στην πρώιμη επεξεργασία RNA (Bannister et al, 2005). Η H3K36me3 αναγνωρίζεται από τους αποκαλούμενους αναγνώστες, πρωτεΐνες τελεστές που προσλαμβάνονται από συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστόνης και προσδιορίζουν το λειτουργικό αποτέλεσμα αυτών των τροποποιήσεων.

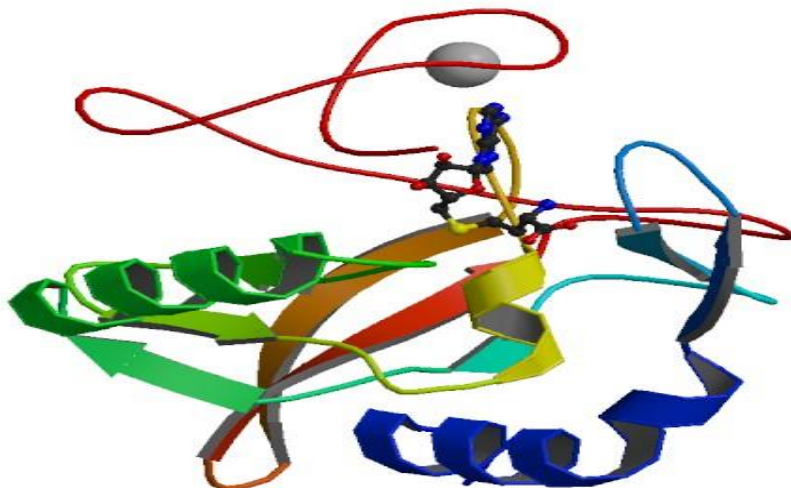
Οι αναγνώστες H3K36me3 που προσλαμβάνουν σύμπλοκα πρωτεϊνών για τη διεξαγωγή συγκεκριμένων διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της επιμήκυνσης της μεταγραφής, της επεξεργασίας του RNA και της επιδιόρθωσης του DNA, καθορίζουν τον αντίκτυπο αυτής της τροποποίησης ιστόνης (Li et al, 2016).

3.3.6. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2

Η MLL2 ή συνηθέστερα αναφερόμενη ως KMT2D (Histone Lysine N-methyltransferase 2D) για τον άνθρωπο ή MLL4 για τα ποντίκια κωδικοποιείται από το γονίδιο KMT2D που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q13.12. Η μεταγραφή του είναι 19.419 ζεύγη βάσεων και περιέχει 54 εξόνια και 53 ιντρόνια.

Η N-μεθυλοτρανσφεράση 2D (KMT2D) είναι μια κύρια μονομεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης 4 ιστόνης H3 (H3K4). Αποτελεί μέλος μιας οικογένειας έξι μεθυλοτρανσφερασών H3K4 τύπου Set1 που περιέχει επίσης την KMT2A (ή MLL1), KMT2B (ή MLL2), KMT2C (ή MLL3), KMT2F (ή SET1A) και KMT2G (ή SET1B). Το KMT2D είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη μεγέθους 5.500 αμινοξέων και εκφράζεται ευρέως σε ενήλικους ιστούς (Prasad et al, 1997).

Η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως τη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη ρύθμιση της μετάπτωσης των κυττάρων, του μεταβολισμού, αλλά και τη καταστολή όγκων (Lee et al, 2013, Zhang et al, 2015, Kim et al, 2015).



Εικόνα 3.17. : Δομή της πρωτεΐνης MLL2.

Η MLL2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε ποντίκια (Kantidakis et al, 2016). Μεταλλάξεις στο KMT2D έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Kabuki (ποσοστό άνω του 50% των ασθενών εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό) (Böggershausen et al, 2013). Η συγγενής καρδιακή νόσος έχει συσχετιστεί με περίσσεια μεταλλάξεων στα γονίδια που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του H3K4, συμπεριλαμβανομένου του KMT2D, (Zaidi et al, 2013) ενώ σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου που επηρεάζουν κυρίως της SET περιοχής της πρωτεΐνης, οδηγούν σε αστάθεια και εντοπίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στον εγκέφαλο, τους λεμφαδένες, το αίμα, τους πνεύμονες, το παχύ έντερο και το ενδομήτριο (Rao et al, 2015).

Διαγονιδιακά (Knockout) ποντίκια για τη Kmt2d οδηγούνται σε πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο. Στοχευμένο Knockout του Kmt2d σε κύτταρα προδρόμων μυοκυττάρων οδηγεί σε

μειώσεις λιπώδη ιστού και στη μυϊκή μάζα σε ποντίκια, υποδεικνύοντας ότι το KMT2D απαιτείται για ανάπτυξη λιπωδών και μυϊκών ιστών (Lee et al, 2013). Στις καρδιές των ποντικών, ένα μόνο αντίγραφο του Kmt2d γονιδίου είναι αρκετό για την κανονική ανάπτυξη της καρδιάς (Ang et al, 2016).

Η KMT2D μαζί με το NCOA6 δρουν ως συνενεργοποιητές του p53, έναν καθιερωμένο παράγοντα καταστολής και μεταγραφής του όγκου. Knockout ποντίκια για το γονίδιο της KMT2D φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την έκφραση γονιδίων καταστολής όγκων TNFAIP3, SOCS3 και TNFRSF14 (Ortega-Molina et al, 2015).

Αντίθετα, η έλλειψη της KMT2D σε αρκετές κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων μαστού και παχέως εντέρου οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Η αύξηση της KMT2D αποδείχθηκε ότι διευκολύνει το άνοιγμα της χρωματίνης και την πρόσληψη μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), σε ER-θετικά καρκινικά κύτταρα μαστού, ενώ έρευνες δείχνουν πως εμπλέκεται στην καταστολή του όγκου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία και Β λέμφωμα (Zhang et al, 2015) (Ortega-Molina et al, 2015). Έτσι, η μεθυλοτρανσφεράση KMT2D μπορεί να έχει διαφορετικές επιδράσεις στην καταστολή όγκων σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Toska et al, 2017). Η μεθυλοτρανσφεράση KMT2D καταλύει την μεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3.

Μεθυλίωση H3K4: η προσθήκη μεθυλομάδας στο 4^ο κατάλοιπο λυσίνης στην ιστόνη H3 συνδέεται με ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η H3K4me3, παρότι δεν αποτελεί μια από τις πιο συνήθεις τροποποιήσεις ιστονών, βρίσκεται σε πληθώρα σε ενεργούς προαγωγούς κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής (TSS) και σχετίζεται θετικά με τη μεταγραφή γι' αυτό και η ανίχνευση της τροποποίησης αυτής χρησιμεύει στην ταυτοποίηση ενεργών προαγωγών γονιδίων (Liang et al, 2004). Σε αντίθεση με την ακετυλίωση της ιστόνης, η μεθυλίωση δεν αλλάζει το φορτίο, αλλά ρυθμίζει τη μεταγραφή προωθώντας θετικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Η H3K4me3 προάγει τη γονιδιακή ενεργοποίηση μέσω της δράσης του συμπλόκου NURF, ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που δρα μέσω του μοτίβου πρωτεΐνης δακτύλων PHD για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Wysocka et al, 2006). Επίσης

τη συγκεκριμένη τροποποίηση επιστρατεύει τους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης CHD1 (Flanagan et al, 2005) και BPTF (Li et al, 2006) που ανοίγουν τη χρωματίνη, αποτρέποντας παράλληλα τη σύνδεση του κατασταλτικού NuRD (Nishioka et al, 2002).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τρι-μεθυλίωσης της H3K4 παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της τύχης των βλαστικών κυττάρων και στην πρόωρη ανάπτυξη εμβρύου, καθώς η συγκεκριμένη τροποποίηση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των HOX γονιδίων κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Joel et al, 2010).

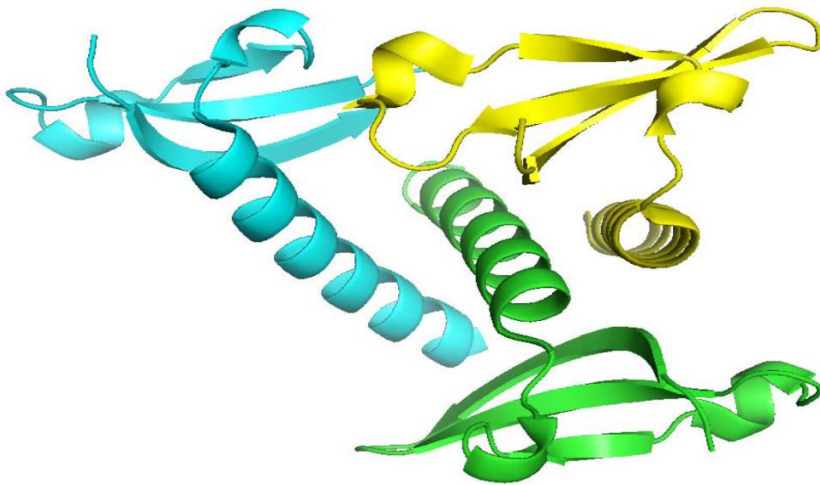
Όσον αφορά την ανάπτυξη καρκίνου αποδεικνύεται πως αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης οδηγούν σε καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα, επαγωγή της μεθυλίωσης της H3K4 οδηγεί στην έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο, στην μεταγραφή γονιδίων αποδιαφοροποίησης και τελικά συμβάλλει στην εξέλιξη του όγκου (Shiraki et al, 2014). Αρκετές μελέτες επίσης συσχετίζουν τα ποσοστά έκφρασης της τριμεθυλίωσης της H3K4 με κακή πρόγνωση (Seligson et al, 2009). Ειδικότερα ασθενείς με χαμηλά ποσοστά διμεθυλίωσης και υψηλά τριμεθυλίωσης της H3K4 έχουν χαμηλότερο διάμεσο χρόνο επιβίωσης (Liu et al, 2010).

3.3.7. Μεθυλίωση της ιστόνης H3: Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1

Το γονίδιο που ευθύνεται για την έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1 είναι μέλος της οικογένειας suppressor of variegation 3-9 homolog και εδράζεται στον κοντό βραχίονα p11.23 του χρωμοσώματος X. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη και διαθέτει μια περιέχει μια N-τερματική περιοχή chromodomain και μία C-τελική περιοχή SET.

Η SUV39H1, αποτελεί την πρώτη μεθυλοτρανσφεράση ιστονών που περιγράφηκε το 2000 και συμμετέχει στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης και στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων (Rea et al, 2000). Η SUV39H1 κατά τη διάρκεια της προ-μετάφασης

συσσωρεύεται στο κεντρομερές, αλλά αποσυνδέεται από τις κεντρομερικές θέσεις κατά τη μετάβαση από τη μετάφραση στην αναφάση (Aagaard et al, 2000).



Εικόνα 3.18.: Δομή της πρωτεΐνης SUV39H1.

Το ένζυμο αυτό συμμετέχει επίσης σε πληθώρα άλλων κυτταρικών διεργασιών όπως η επιδιόρθωση βλαβών του DNA (Alagoz et al, 2015), η κυτταρική διαφοροποίηση (Amigorena et al, 2012) και η γήρανση (Belmonte et al, 2015). Η συγκεκριμένη μεθυλοτρανσφεράση παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας (Johnson et al, 2017). Μεταλλάξεις που διαταράσσουν τη ικανότητα δέσμωσης της SUV39H1 με νουκλεϊκά οξέα προκαλούν ελαττώματα στον εντοπισμό της στην περικεντρική ετεροχρωματίνη, αποσταθεροποιούν τη σύνδεση της SUV39H1 με τη χρωματίνη και οδηγούν σε γονιδιακή αστάθεια και καρκίνο (Zhu et al, 2011). Η υπερέκφραση του άγριου τύπου SUV39H1, ενεργοποιεί τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε καρκίνο του μαστού και του ορθού (Yokoyama et al, 2013).

Επιπλέον, μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια δείχνουν πως η υπερέκφραση της SUV39H1 οδηγεί σε ογκογένεση στα ζώα, με αποτέλεσμα σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης (Yokoyama et al, 2013), ενώ μη λειτουργική SUV39H1 εμποδίζει την επαγόμενη από την *ras* πρόωρη γήρανση και προωθεί την ανάπτυξη λεμφωμάτων T κυττάρων σε αντίστοιχα διαγονιδιακά ποντίκια (Braig et al, 2005). Μεταλλάξεις του γονιδίου που προκαλούν διακυμάνσεις στην έκφραση του ενζύμου έχουν συσχετιστεί με

ανάπτυξη καρκίνου μαστού (Mo et al, 2016), πνευμόνων (Chen et al, 2018), αλλά και λευχαιμίες (Carvalho et al, 2018, Zhao et al, 2013), ενώ πρόσφατα έχει δείχθει ότι αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος, Rb, για τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της κυκλίνης E (Zeng et al, 2015). Διακυμάνσεις της έκφρασης της πρωτεΐνης σχετίζονται ακόμα με παιδιατρικά γλοιώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας και η έκφραση της σε συνδυασμό με την H1X μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση αυτών των ασθενών (Sepsa et al, 2015). Πειράματα που έγιναν σε καρκινικές σειρές γλοιωμάτων έδειξαν πως μείωση των SUV39H1 και HP1α έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αύξηση της απόπτωσης (Lai et al, 2017).

Η μεθυλοτρανσφεράση SUV39H1 πραγματοποιεί μαζί με την SETDB1 την μεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9me3).

Μεθυλίωση H3K9: σχετίζεται με την αποσιώπηση γονιδίων. Η μεθυλίωση H3K9 σηματοδοτεί την ύπαρξη ετεροχρωματίνης. Η ετεροχρωματίνη είναι η συμπυκνωμένη, μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση της χρωματίνης. Οι μεθυλοτρανσφεράσες της ιστόνης SUV39H1 / 2 καταλύουν την τριμεθυλίωση του H3K9 στην περικεντρική ετεροχρωματίνη και είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA σε αυτές τις περιοχές (Lehnertz et al, 2003).

Το τρι-μεθυλιωμένο κατάλοιπο λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K9me3) συνδέεται την πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 (HP1) μέσω μιας περιοχής που καλείται chromodomain και έχει ως αποτέλεσμα τη συμπύκνωση της χρωματίνης (Lehnertz et al, 2003) και την καταστολή της μεταγραφής, καθώς είναι αδύνατη η πρόσβαση τόσο μεταγραφικών παραγόντων, όσο και της RNA πολυμεράσης. Η HP1 επιστρατεύει επίσης τη μεθυλοτρανσφεράση του DNA 3b (Dnmt3b), παρέχοντας ένα από τα καλύτερα παραδείγματα της αλληλεπίδρασης μεταξύ μεθυλίωσης ιστόνης και μεθυλίωσης DNA. Η δι-μεθυλίωση του H3K9 διαδραματίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στη αποσιώπηση γονιδίων στην ευχρωματίνη και καταλύεται από διακριτές H3K9 μεθυλοτρανσφεράσες, G9a και τη σχετική GLP / Eu-HMTase1 (Tachibana et al, 2011).

Η έκφραση της τροποποίησης επηρεάζεται από την έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης που την επιτελεί. Για παράδειγμα μείωση της έκφρασης της SUV39H1, έχει ως αποτέλεσμα τη συνολική ελάττωση των επιπέδων της H3K9me3 σε περιοχές του DNA με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (π.χ. μικροδορυφορικές περιοχές) με αποτέλεσμα την μεταγραφή αυτών των περιοχών, γεγονός που οδηγεί σε γενωμική αστάθεια (Sidler 2014). Κατ' αντιστοιχία υπερέκφραση της SUV39H1 συνοδεύεται από αυξημένη H3K9me3 και μειωμένη φλεγμονή και απόπτωση (Corinne Sidler et al, 2012).

Διαταραχές στην έκφραση της H3K9me3 φαίνεται πως σχετίζεται με πληθώρα παθήσεων, όπως λευχαιμία (Zhao Tet al, 2013), ο καρκίνος του στομάχου (Matsuura et al, 2013) καθώς και του παχέος εντέρου (Lu C et al, 2018).

3.4. Σκοπός της πειραματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των χημικών τροποποιήσεων της δομής της χρωματίνης που σχετίζονται με την ανάπτυξη των όγκων εγκεφάλου στα παιδιά. Συγκεκριμένα, σε παιδιατρικά αστροκυτώματα διαφορετικού βαθμού κακοήθειας (GRADE I-IV) μελετήθηκε η έκφραση τριών μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών, της SETD2, της MLL2 και της SUV39H1 και των αντίστοιχων τροποποιήσεων που αυτές επιτελούν, των τριμεθυλιώσεων H3K36, H3K4 και H3K9 αντίστοιχα.

4.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 38 παιδιατρικοί ασθενείς ηλικίας από 3 μηνών έως 15 ετών. Οι 25 από τους ασθενείς έπασχαν από πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I, 8 από αστροκύττωμα διάχυτου τύπου με βαθμό κακοήθειας II, 5 ασθενείς έπασχαν από γλοιοβλάστωμα βαθμού IV και 2 ασθενείς από

αναπλαστικό αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας II. Η μελέτη έγινε σε συνεργασία με το Νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία (Τμήματα Ν/Χ και Ογκολογικό «ΕΛΠΙΔΑ») και όλοι υπέγραψαν έντυπο συναίνεσης εγκεκριμένο από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής. Οι ληφθέντες ιστοί όγκων κατατάχθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια κατηγοριοποίησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2007).

4.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Υλικά

Ιστός εγκεφάλου

Cell lysis 2x

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για να επιτευχθεί η εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών από τον ιστό πραγματοποιείται ζύγιση του δείγματος σε πάγο. Για κάθε 100 mg ιστού προστίθενται 250 μl cell lysis 2x και 1% PMSF επί του τελικού όγκου διαλύματος. Ακολουθεί ομογενοποίηση του ιστού και φυγοκέντρηση στου διαλύματος σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4 °C) για 25' στις 14.000 στροφές ανά λεπτό (rpm). Στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών.

4.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Το αντιδραστήριο της Bradford χρησιμοποιείται για την εύκολη και με ακρίβεια ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διάλυμα. Το αντιδραστήριο εμπεριέχει χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινο διάλυμα όπου έχει μέγιστη απορρόφηση στα 450nm. Το χρώμα της ουσίας αυτής αλλάζει διαδοχικά μετά την προσθήκη διαδοχικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm.

Υλικά

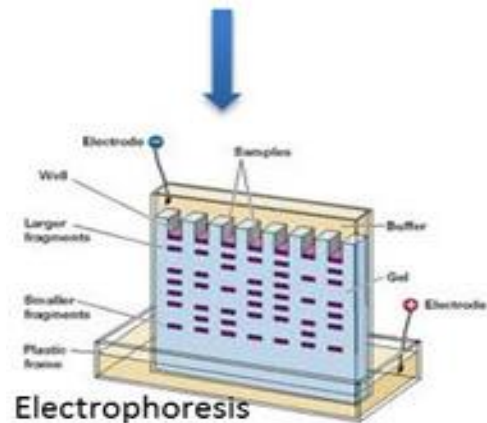
- Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 1mg/ml

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για να γίνει η ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έτσι για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται διαλύματα του 1ml με 100μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml και 1mg/ml BSA σε dH₂O. Σε 20μl των παραπάνω αραιώσεων προστίθενται από 980μl Biorad protein assay αραιωμένο 5 φορές με dH₂O και μετράται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 595nm. Παράλληλα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία και για το άγνωστο δείγμα. Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BSA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε mg/ml.

4.4. Αποτύπωση Western (Western Blot)

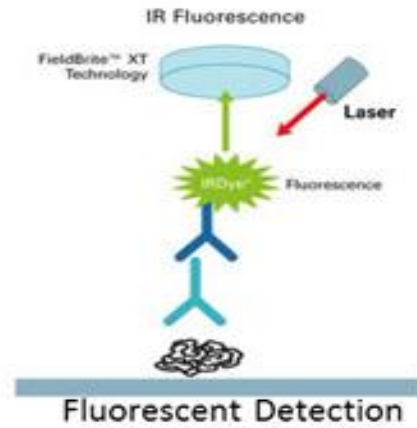
Sample Preparation



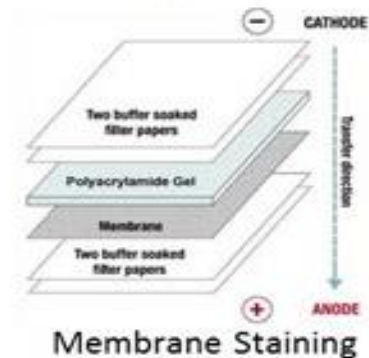
Electrophoresis



Transfer



Fluorescent Detection



Membrane Staining

Εικόνα 4.1. : Συνοπτική απεικόνιση των βημάτων της τεχνικής Western Blot.

A. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

Κατά την τεχνική αυτή η διαφορετική θέση μετανάστευσης της κάθε πρωτεΐνης από το σημείο εκκίνησης, με τελικό αποτέλεσμα το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών, οφείλεται κυρίως στο μοριακό μέγεθος της κάθε πρωτεΐνης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συνδέουν ένα σταθερό ποσό SDS στο κάθε αμινοξύ με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται οι διαφορές ως προς το ηλεκτρικό φορτίο της κάθε πρωτεΐνης και να παραμένουν

διαφορές μόνο ως προς τα μέγεθος τους. Έτσι το μοριακό μέγεθος είναι ο κύριος συντελεστής διαχωρισμού του μίγματος των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE.

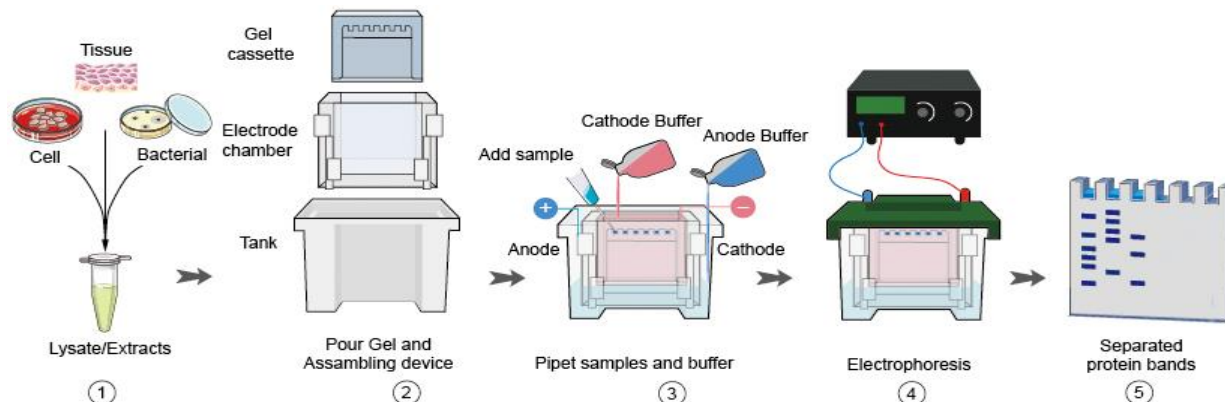
Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου-δισακρυλαμιδίου 30%w/v (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1,5M pH 8,8 54
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη (TEMED) (Sigma)
- Υπερθειικό αμμώνιο (AmmoniumPerSulfate-APS) 0,1g/ml
- Διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v
- Αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5x (150mM Tris, 6% SDS, 0.3% μπλε της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη και 15% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης :

- 25mM Tris 192mM
- γλυκίνη
- 1% SDS

Περιγραφή μεθοδολογίας



Εικόνα 4.2.: Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η συσκευή και όλα τα εξαρτήματα που πρόκειται να έρθουν σε επαφή με το πήκτωμα πλένονται με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια καθαρίζονται με 70% αιθανόλη. Κατασκευάζεται γυάλινη μήτρα με τις πλάκες για την τοποθέτηση των πηκτωμάτων. Η μια πλάκα τοποθετείται πάνω στην άλλη με τη βοήθεια πλαστικών ελασμάτων πάχους 1.5mm και έτσι δημιουργείται η μήτρα στην οποία θα τοποθετηθεί το διάλυμα του ακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού με τελευταία την προσθήκη του APS και TEMED και τοποθετείται προσεκτικά στη γυάλινη μήτρα. Το πήκτωμα πολυμερίζεται για 30 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν παρασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης το οποίο προστίθεται πάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού και έχει ύψος περίπου 2cm. Αμέσως μετά τοποθετείται ειδική οδοντωτή κτένα με 10-12 εσοχές που θα σχηματίσουν τις θέσεις για την τοποθέτηση των δειγμάτων. Μετά το πολυμερισμό και του πηκτώματος συμπίεσης, με προσοχή, αφαιρείται η οδοντωτή κτένα έτσι ώστε να παραμείνουν οι θέσεις εναποθέτησης των δειγμάτων. Στη συνέχεια προσαρμόζονται οι γυάλινες πλάκες με το πήκτωμα στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται 500ml διαλύματος ηλεκτροδίων. Απομακρύνονται οι φυσαλίδες αέρα από την κάτω επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού. Όγκος δείγματος που περιέχει περί τα 50μg πρωτεΐνης αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος δείγματος (1 x Sample Buffer) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 90°C για 5 λεπτά για να αποδιαταχθούν τα μόρια πρωτεΐνης (σπάσουν οι

δισουλφιδικοί δεσμοί). Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια του 55 πηκτώματος. Στην ακρινή θέση του πηκτώματος τοποθετούμε πρότυπο διάλυμα δεικτών μοριακού βάρους. Η συσκευή συνδέεται με πηγή συνεχούς ρεύματος σταθερής έντασης 120 volt. Τα δείγματα διατρέχουν κατακόρυφα το πήκτωμα και η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν η μπλε χρωστική των δειγμάτων φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.

B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το 1979, ο Towbin και συνεργάτες περιέγραψαν μια μέθοδο μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Μετά τον διαχωρισμό του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με SDS-PAGE, είναι δυνατό να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες έναντι των οποίων έχουμε ειδικά αντισώματα. Μια μέθοδος εμφάνισης είναι απαραίτητη για να μπορέσουμε να δούμε το σύμπλοκο πρωτεΐνης αντισώματος που ψάχνουμε. Η μέθοδος που ευρέως χρησιμοποιείται είναι η μέθοδος της χημειοφωταύγειας και είναι η χημική αντίδραση που λαμβάνει μέρος 56 μεταξύ ενός ενζύμου (π.χ. HRP, AP) και ενός αντίστοιχου υποστρώματος, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell της BIORAD και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες όπως περιγράφονται από τους κατασκευαστές.

Υλικά

Πρωτογενή Αντισώματα: antibodies GADD153 (F-168): sc-575 Santa Cruz (1:50), Anti Actin, clone C4 MAB1501 Millipore (1:2000), Bip Antibody (# 3183) Cell Signaling (1:1000)

Δευτερογενή αντισώματα : goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2030)

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST pH 7,5 :

20mM Tris (Sigma) 150 mM NaCl 0,05% Tween - 20 Διάλυμα μεταφοράς 25mM Tris (Sigma) 192mM γλυκίνη (Sigma) 20% μεθανόλη (Sigma)

Διάλυμα γάλακτος : γάλα (0% λιπαρά) 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα ECL Kit (Pierce): Χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την υπεροξειδάση, με το οποίο εμποτίζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε αναλογία 125μl ανά 1cm² μεμβράνης. Παρασκευάζεται με την ανάμιξη ίσων όγκων (1ml) σταθερού διαλύματος υπεροξειδάσης και διαλύματος ενίσχυσης. 57

Διαλύματα εμφάνισης (developer) και μονιμοποίησης (fixer) φωτογραφικού φιλμ (Sigma) Φωτογραφικό φιλμ (KODAK)

Περιγραφή μεθοδολογίας

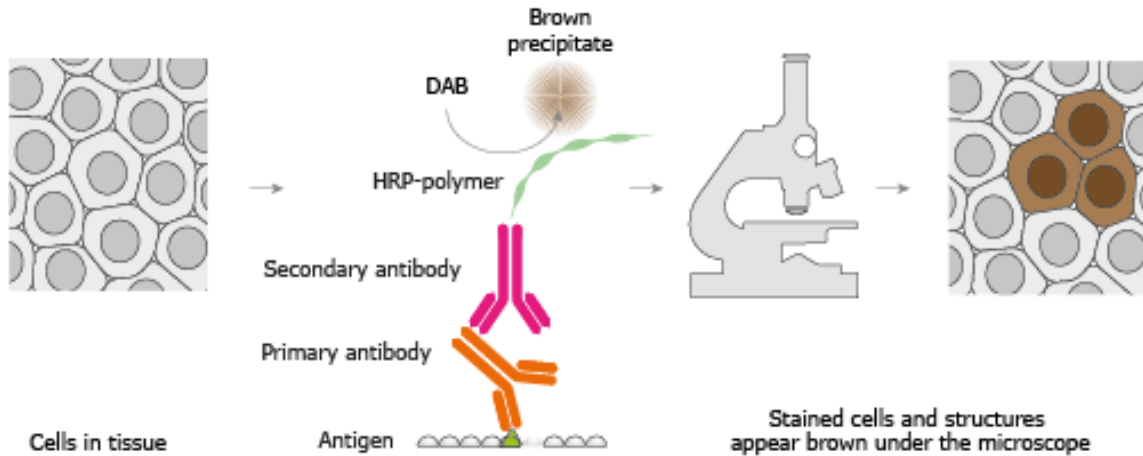
Μετά τον διαχωρισμό σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου των πρωτεϊνών, ετοιμάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς το οποίο και ψύχουμε μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε. Στη συνέχεια κόβουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης καθώς και 4 κομμάτια διηθητικού χάρτου Whattman No3 στις διαστάσεις του πηκτώματος και εξισορροπούμε με επώαση σε διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά με ήπια ανακίνηση. Κατόπιν στοιβάζουμε με τη σειρά (sandwich) τα ακόλουθα στην πλευρά της καθόδου της κασέτας μεταφοράς: α. Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς, β. 2 χαρτιά Whattman No3, γ. Πήκτωμα (gel), δ. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ε. 2 χαρτιά Whattman No3, ζ. Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς. Αφού αφαιρέσουμε τυχόν φυσαλίδες, κλείνουμε την κασέτα μεταφοράς και την τοποθετούμε μέσα στο ειδικό δοχείο με το διάλυμα που θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Στη συνέχεια τοποθετούμε τη συσκευή στους 4°C όπου και εφαρμόζουμε ρεύμα σταθερής έντασης 100 Volt (360mA) για 90 λεπτά. Μετά το πέρας της μεταφοράς βάζουμε το πήκτωμα και τη νιτροκυτταρίνη με ειδικά αντιδραστήρια-διαλύματα για να επιβεβαιώσουμε την επιτυχή μεταφορά. Χρώση νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau-S για έλεγχο επιτυχούς μεταφοράς πρωτεϊνών [Διάλυμα χρώσης (500ml): 475ml d. H₂O 58 0.5gr Ponceau-S dye]. Μετά την παρασκευή του το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε γυάλινο σκεύος σε θερμοκρασία δωματίου. Διάλυμα αποχρωματισμού: Χρησιμοποιείται διάλυμα φωσφορικών (PBS). Σε γυάλινο δοχείο τοποθετούνται περίπου 100ml διαλύματος Ponceau-S και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ήπια ανακίνηση για 15 second σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μαζεύουμε το διάλυμα και εφόσον εμφανιστούν πρωτεϊνικές ζώνες- επάρματα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

ξεπλένουμε με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης. Η ένταση της χρώσης των ζωνών είναι ενδεικτικά ανάλογη με το ποσό της πρωτεΐνης που έχει αποτυπωθεί στη μεμβράνη. Οι μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης μετά τον πλήρη αποχρωματισμό τους μπορούν να φυλαχτούν στους 40°C. Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα (Immunodetection). Εφόσον η μεταφορά έχει επιτευχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, συνεχίζουμε με το στάδιο της ανοσοανίχνευσης με ειδικά αντισώματα. Καλύπτουμε τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης του αντισώματος επωάζοντας με διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε δύο φορές με περίσσεια TBS/Tween20 0.1% για 10 λεπτά με ήπια ανάδευση.

Επωάζουμε με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου στην επιθυμητή συγκέντρωση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια απομακρύνουμε την περίσσεια αντισώματος που δεν συνδέθηκε με την πρωτεΐνη στόχο πλένοντας όπως προηγουμένως. Επωάζουμε με 2ο αντίσωμα ειδικό έναντι του 1ου, συνδεδεμένο με ένζυμο HRP και επωάζουμε όπως και προηγουμένως. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο της πλύσης και ετοιμάζουμε τα αντιδραστήρια της χημειοφωταύγειας που θα μας βοηθήσουν να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη μας. Χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit της ECL Pierce και ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρίας δουλεύουμε ως ακολούθως: Επωάζουμε τη νιτροκυτταρίνη για 1 λεπτό με τα εμφανιστικά διαλύματα χωρίς ανάδευση. Στεγνώνουμε την περίσσεια των διαλυμάτων ακουμπώντας τη νιτροκυτταρίνη σε απορροφητικό χαρτί και την τυλίγουμε 59 σε διάφανη ζελατίνα και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού .

4.5. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Η τεχνική επιλέχθηκε ανάμεσα σε εννέα διαφορετικές τεχνικές ανοσοϊστοχημείας που εφαρμόστηκαν για την έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών SETD2, MLL2 και SUVH39H1 σε τομές ανθρώπινου όγκου εγκεφάλου .



Εικόνα 4.3.: Συνοπτική απεικόνιση των βημάτων της τεχνικής ανοσοϊστοχημείας. (<https://www.proteinatlas.>)

Αποπαραφίνωση

- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε καλαθάκι χρώσεων.
- Τοποθετείται σε ξηρό κλίβανο, στους 37°C για 18 ώρες.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία στους 59°C και αφού ο κλίβανος φτάσει σ' αυτή (χρειάζεται 15 min), αφήνουμε τις τομές να θερμανθούν για 30 min. Η παραφίνη πρέπει να έχει λιώσει και να κυλάει πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, χωρίς να τη σκουπίζουμε.

Ενυδάτωση

Βυθίζουμε το καλαθάκι διαδοχικά μέσα στα δοχεία χρώσεων εμβαπτίζοντας ολόκληρες τις τομές.

- Ξυλόλη 3 x 3 min

- EtOH 100% 2 x 3 min
- EtOH 96% 2 x 3 min
- EtOH 80%: 3 min
- EtOH 70%: 3 min

Τοποθετούμε τις τομές σε οριζόντιο δοχείο αντικειμενοφόρων 10 θέσεων.

- Πλύση με H₂O 3 x 5 min
- Πλύση με ddH₂O 3 x 3 min

Ανάκτηση αντιγόνων

- Θερμικώς Επαγόμενη μέθοδος Ανάκτησης Επιτόπων (HIER – Heat Induced Epitope Retrieval)
- Τοποθετούμε τις τομές σε κάθετο πλαστικό θερμοάντοχο δοχείο corlin.
- Διάλυμα EDTA pH 8.
- Τοποθετούμε το δοχείο corlin στο φούρνο μικροκυμάτων με 85ml διαλύματος μαζί με τέσσερα δοχεία χρώσεων με H₂O και ένα δεύτερο δοχείο corlin με τα υπόλοιπα 15ml να θερμαίνονται ταυτόχρονα.
- Ρυθμίζουμε στα 700W και θέτουμε σε λειτουργία μέχρι να δούμε να κοχλάζει το διάλυμα (περίπου 6min) και μετά γυρνάμε το διακόπτη στα 280W για 20min. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι 95-97°C.
- Αφήνουμε τις τομές μέσα στο διάλυμα να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (>30 min).
- Πλύση με H₂O 3 x 3 min
- Πλύση με ddH₂O 3 x 3 min

Επώαση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

- Πυκνό H₂O₂ (30%), Panreac, Cat. No 141076 (τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο στους 4°C)
- 100ml διάλυμα 3% (3ml H₂O₂ + 97ml ddH₂O)
- Τοποθετούμε τις τομές με το διάλυμα σε οριζόντιο δοχείο αντικειμενοφόρων σε σκοτεινό σημείο για 30 min.
- ΠΡΟΣΟΧΗ: Μετά την επώαση δεν πρέπει να είναι θολό το πλακάκι και το νερό πρέπει να κυλάει ομαλά πάνω σε αυτό.
- Πλύση με H₂O 3 x 3 min
- Πλύση με ddH₂O 3 x 3 min

Πρώτο αντίσωμα

- TBS (Tris Buffered Saline) pH 7,6: 8,1gr NaCl + 100ml 0,05MTris + 900ml ddH₂O
- 0,05MTris: 1L ddH₂O + 6,057gr Trizma Base (MB: 121,14) pH 7,6.
- Πλύση με TBS 3 x 3 min
- Σκουπίζουμε το TBS με γάζα γύρω από τον ιστό για να αποφύγουμε περαιτέρω αραίωση του αντισώματος.
- SETDB1, SUVH39H1 1:150 σε Antibody Diluent, Dako(s2022)
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε σειρά στο ειδικό κουτί με μικρό κενό μεταξύ τους έτσι ώστε να μην κυλήσει αντίσωμα από τη μία τομή στην άλλη. Ενσταλάζουμε 150-200ml υποβοηθώντας με πιπέτα Pasteur το αντίσωμα να καλύψει όλη την τομή. Στη βάση του κουτιού χύνουμε λίγο ddH₂O για να διατηρηθεί υγρό το περιβάλλον.
- Πάνω σε κάθε τομή τοποθετείται απαλά ένα κομμάτι parafilm για να μη στεγνώσει το αντίσωμα.
- Κλείνουμε το κουτί και το τοποθετούμε στους 4°C για επώαση για 18 ώρες. Προσοχή να τοποθετείται σε σταθερή και ευθεία επιφάνεια (γυαλί).

Δεύτερο αντίσωμα

- Τοποθετώ τις τομές σε οριζόντιο δοχείο αντικειμενοφόρων 10 θέσεων.
- Πλύση με TBS 3 x 3 min
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε σειρά στο ειδικό κουτί
- Dako Real Envision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Cat. No K5007
- Ενστάλαξη του HRP Rabbit/Mouse (ENV) - Bottle A με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur
- Επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου

Ανίχνευση

- Τοποθετώ τις τομές σε οριζόντιο δοχείο αντικειμενοφόρων 10 θέσεων.
- Πλύση με TBS 3 x 3 min
- Πλύση με Tris: 3 min
- 3,3' διαμινοβενζιδίνη(DAB):
- διατήρηση στους -20°C (Applichem)
- 5gr σκόνη διάλυση σε 200ml ddH₂O
- Διήθηση
- aliquots των 2ml (-20°C)
- διάλυμα 2ml DAB + 100ml Tris + 80μl H₂O₂
- Τοποθετούμε τις τομές με το διάλυμα σε οριζόντιο δοχείο αντικειμενοφόρων για 12-15min

Αντίθετη χρώση

- Πλύση με H₂O 3 x 3 min

- Τοποθετούμε τις τομές σε καλαθάκι χρώσεων.
- Διήθηση αιματοξυλίνης
- Αιματοξυλίνη: 1 sec
- H₂O: 1 sec
- H₂O: 10 sec

Αφυδάτωση

- Πλύση με H₂O (3 x 3 min)
- Πλύση με ddH₂O (3 x 3 min)
- EtOH 70%: 3 min
- EtOH 80%: 3 min
- EtOH 96% 2 x 3 min
- EtOH 100% 2x3 min
- Ξυλόλη 3 x 3 min

Επίστρωση

- Επίστρωση με DPX: Ενσταλάζω δύο σταγόνες και με την τοποθέτηση της καλυπτρίδας απλώνεται το DPX σε όλη την τομή.
- Τοποθέτηση καλυπτρίδας

Πιο συγκεκριμένα στα παρόντα πειράματα για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μεθυλοτρανσφεράση SETD2 σε αραιώση 1:300, με διάλυμα ανάκτησης αντιγόνων pH:9 και δείγμα καρκίνου του μαστού ως θετικό control, για την MLL2, έγινε αραιώση 1:500, με διάλυμα ανάκτησης αντιγόνων pH:6 και θετικό μάρτυρα τομή από καρκίνο του παχέως εντέρου. Το αντίσωμα της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1 χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:50, με διάλυμα ανάκτησης αντιγόνων pH:6 και θετικό μάρτυρα τομή από καρκίνο του μαστού.

4.6. Ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση

Η ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση του ιστού περιλαμβάνει 2 παραμέτρους. Την έκφραση και την ένταση της χρώσης. Κατά την εκτίμηση από τον παθολογοανατόμο καταγράφεται το ποσοστό επί τοις 100 της πυρηνικής έκφρασης του αντισώματος και η ένταση με την οποία έχουν χρωματιστεί οι πυρήνες αυτοί. Η ένταση της χρώσης του αντισώματος σημειώνεται με σταυρούς (+) με μέγιστη ένταση τους 3 σταυρούς. Η τελική πρωτεϊνική έκφραση προκύπτει από το γινόμενο του ποσοστού της έκφρασης με την ένταση, το οποίο καλείται H-score. Η μέγιστη τιμή του H-score είναι το 300.

4.7. Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα STATA 11.0 για Windows. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν οι ιστοί από 38 παιδιατρικούς όγκους εγκεφάλου. Τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα από το ιστορικό των ασθενών (φύλο, ηλικία, χειρουργική επέμβαση, θέση όγκου, ιστολογικός τύπος, βαθμός, θεραπεία και ζωτική κατάσταση) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.1. : Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Ηλικία διάγνωσης <=5 ετών >5 ετών	8,5 ετών (3 μηνών – 15 ετών) 7 (18,4%) 31 (81,6%)
Φύλο Άρρεν Θήλυ	24 (63,1%) 14 (36,9%)
Θέση όγκου Παρεγκεφαλίδα / οπίσθιος κρανιακός βόθρος Στέλεχος Ινιακός λοβός Μετωπιαίος λοβός Κροταφικός λοβός Θωρακική μοίρα 3 ^η κοιλία	30 2 1 1 1 2 1

Βαθμός κακοήθειας	
Grade I	22 (57,8%)
Grade II	9 (23,7%)
Grade III	2 (5,2%)
Grade IV	5 (13,1%)
Θεραπεία	
Χειρουργείο	31
Χειρουργείο + χημειοθεραπεία	2
Χειρουργείο + ακτινοθεραπεία + χημειοθεραπεία	5
Ζωτική κατάσταση	
Επιβιώσαντες	24
Καταλήξαντες	14

Στο σύνολο των δειγμάτων ελήφθησαν μπλοκ παραφίνης και εξετάστηκαν από έμπειρους παθολογοανατόμους και κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας. Τομές από τους ιστούς ελέγχθηκαν για την ανοσοθετικότητα στις μεθυλοτρανσφεράσες SETD2, MLL2, SUV39H1 και των τροποποιήσεων των ιστονών H3K36me3, H3K4me3 και H3K9me3.

5.1. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2 και της τροποποίησης H3K36me3 σε παιδιατρικά αστροκυτώματα

5.1.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση του ιστού περιλαμβάνει 2 παραμέτρους. Την έκφραση και την ένταση της χρώσης. Κατά την εκτίμηση από τον παθολογοανατόμο καταγράφεται το ποσοστό επί τοις 100 της πυρηνικής έκφρασης του αντισώματος και η ένταση με την

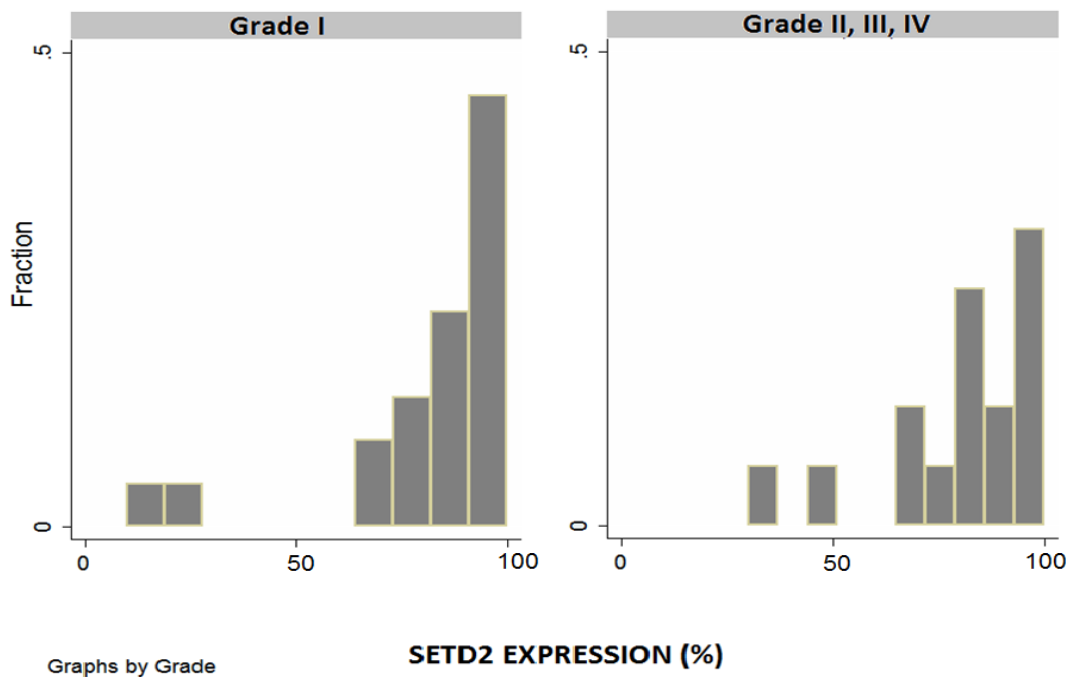
οποία έχουν χρωματιστεί οι πυρήνες αυτοί. Η ένταση της χρώσης του αντισώματος σημειώνεται με σταυρούς (+) με μέγιστη ένταση τους 3 σταυρούς.

Πίνακας 5.1.1. : Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2.

ΑΣΘΕΝΗΣ (N)	GRADE	SETD2 EXPRESSION (%)	SETD2 INTENSITY(+)	H-score
ΑΣΘΕΝΗΣ 1	I	95%	2+	190
ΑΣΘΕΝΗΣ 2	II	70%	1 +	70
ΑΣΘΕΝΗΣ 3	IV	100%	2,5+	250
ΑΣΘΕΝΗΣ 4	III	95%	2+	190
ΑΣΘΕΝΗΣ 5	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 6	I	85%	1+	85
ΑΣΘΕΝΗΣ 7	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 8	II	75%	1+	75
ΑΣΘΕΝΗΣ 9	I	90%	1,5 +	135
ΑΣΘΕΝΗΣ 10	IV	80%	2,5+	200
ΑΣΘΕΝΗΣ 11	II	70%	1+	70
ΑΣΘΕΝΗΣ 12	II	95%	2+	190
ΑΣΘΕΝΗΣ 13	II	80%	1,5+	120
ΑΣΘΕΝΗΣ 14	II	90%	2+	180
ΑΣΘΕΝΗΣ 15	II	95%	2+	190
ΑΣΘΕΝΗΣ 16	III	30%	1+	30
ΑΣΘΕΝΗΣ 17	I	70%	1+	70
ΑΣΘΕΝΗΣ 18	II	80%	1+	80
ΑΣΘΕΝΗΣ 19	I	20%	2+	40
ΑΣΘΕΝΗΣ 20	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 21	I	10%	1+	10
ΑΣΘΕΝΗΣ 22	IV	95%	2+	190
ΑΣΘΕΝΗΣ 23	I	95%	2+	190

ΑΣΘΕΝΗΣ 24	I	75%	2+	150
ΑΣΘΕΝΗΣ 25	I	100%	1,5+	150
ΑΣΘΕΝΗΣ 26	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 27	II	90%	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 28	IV	80%	2,5+	200
ΑΣΘΕΝΗΣ 29	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 30	I	90%	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 31	I	90%	2+	180
ΑΣΘΕΝΗΣ 32	I	100%	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 33	IV	50%	2+	100
ΑΣΘΕΝΗΣ 34	I	70%	2+	140
ΑΣΘΕΝΗΣ 35	I	80%	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 36	I	99%	2+	198
ΑΣΘΕΝΗΣ 37	I	85%	1.5+	127,5
ΑΣΘΕΝΗΣ 38	I	80%	1.5+	120

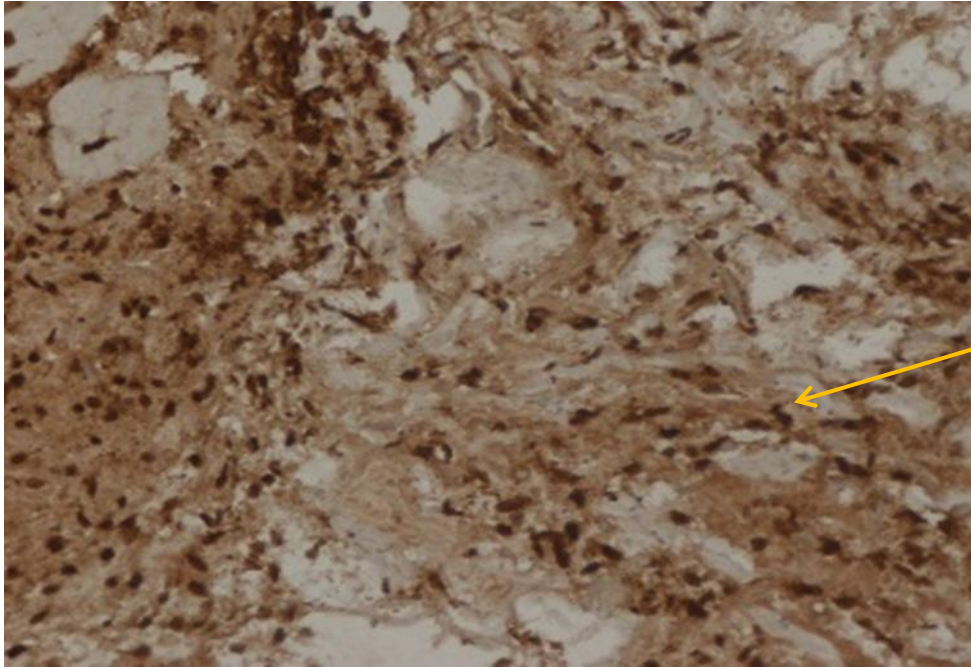
Στη συνέχεια η ένταση με το ποσοστό πολλαπλασιάστηκαν και το γινόμενο είναι το H-score που αντιπροσωπεύει την έκφραση της πρωτεΐνης.



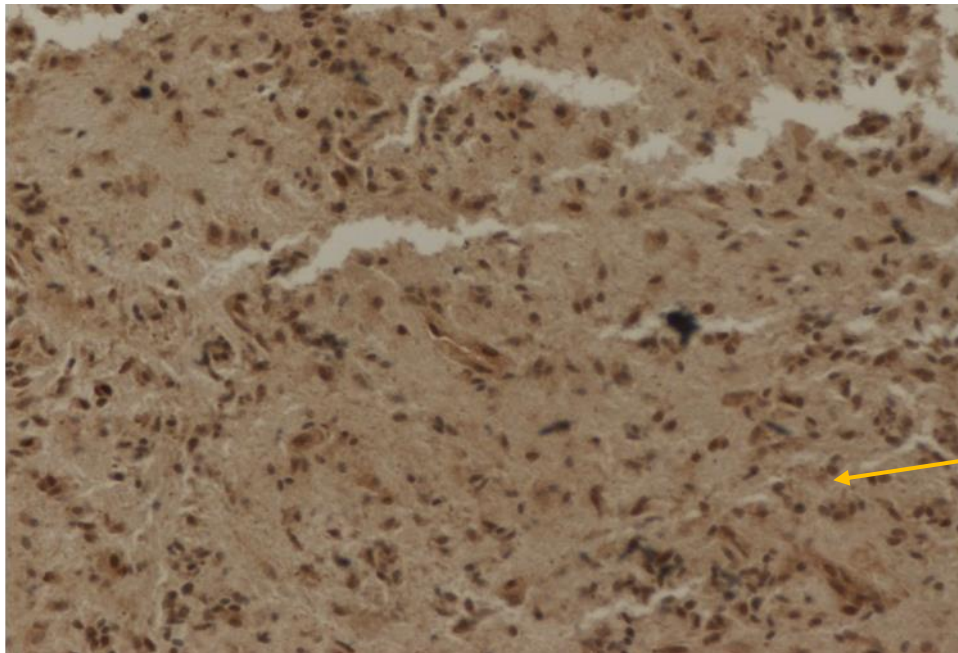
Διάγραμμα 5.1.: Σύγκριση της πυρηνικής έκφρασης της SETD2 σε πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα Grade I και αστροκυττώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας Grade II-IV.

Σε όλα τα δείγματα αστροκυττωμάτων παρατηρήθηκε αυξημένη πυρηνική χρώση για τη SETD2 με διάμεσος βαθμολογία H:180. Υψηλότερη έκφραση του ενζύμου SETD2 ανιχνεύθηκε σε πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα με H score που φτάνει το 196 σε σύγκριση με τα αστροκυττώματα βαθμού κακοήθειας II-IV (διάμεσος H-score: 150).

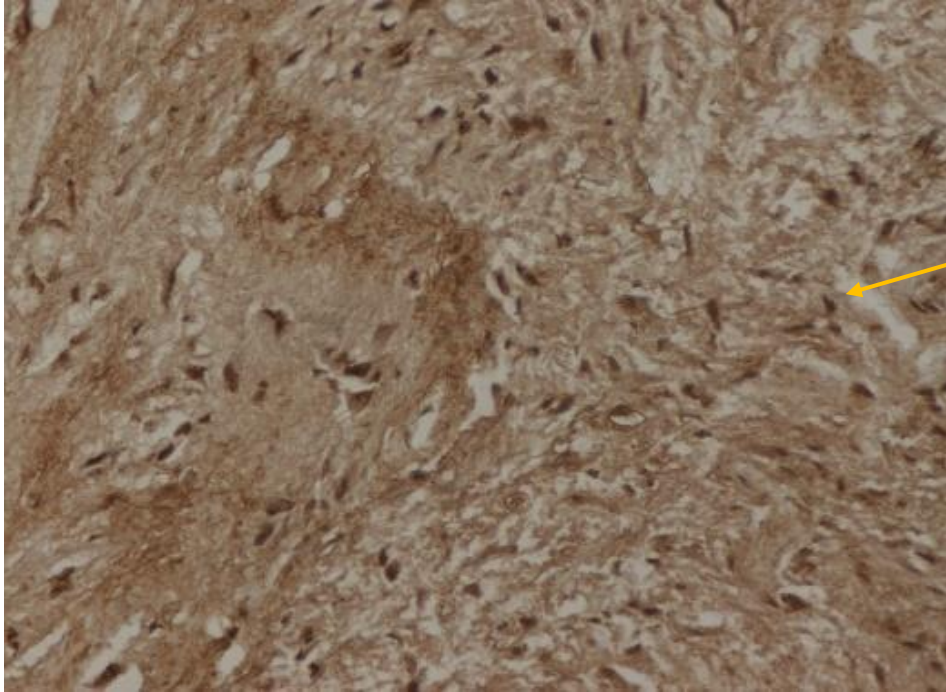
Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες αντιπροσωπευτικές εικόνες πυρηνικών ανοσοχρώσεων για τη μεθυλοτρανσφεράση SETD2 σε ιστούς τριών διαφορετικών βαθμών κακοήθειας (grade I, grade II και grade IV) σε μεγέθυνση 20x.



Εικόνα 5.1.1. : Η θετική έκφραση του ενζύμου SETD2 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, τα αρνητικά για την πρωτεΐνη κύτταρα βάφονται με μωβ χρώμα σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα.



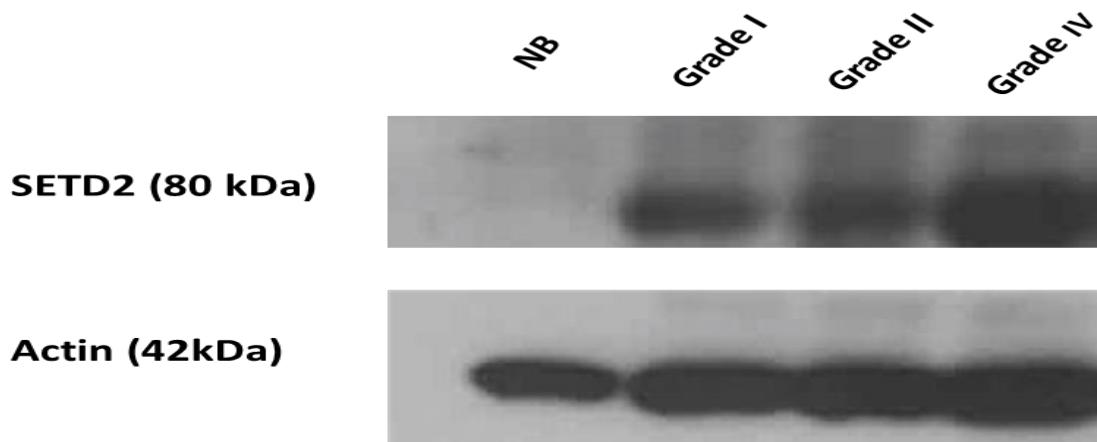
Εικόνα 5.1.2. : Η θετική έκφραση του ενζύμου SETD2 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με αστροκύττωμα Grade II.



Εικόνα 5.1.3. : Θετικά για την έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SETD2 γλοιακά κύτταρα σε αντιπροσωπευτικό ιστό γλοιοβλαστώματος Grade IV.

5.1.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της SETD2 με Western Blotting

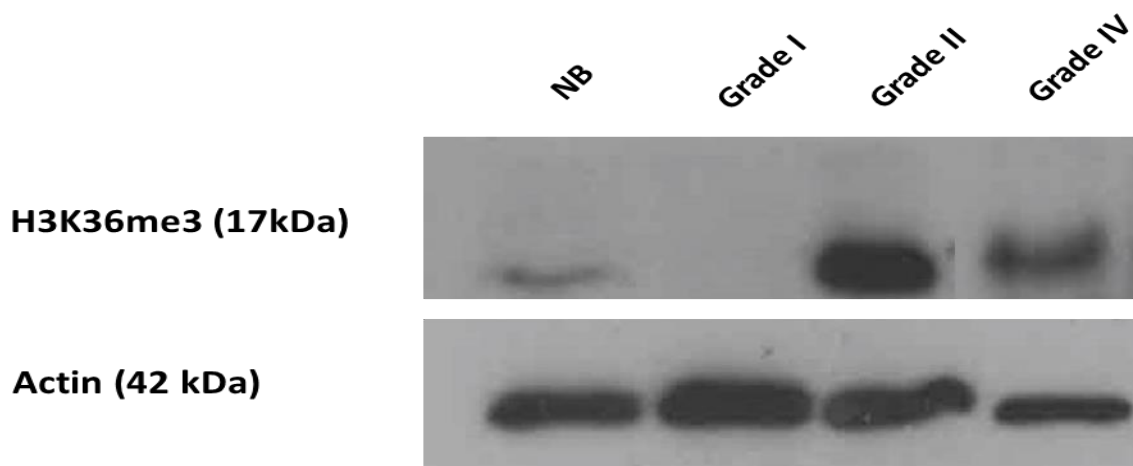
Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης SETD2 παρουσιάστηκαν αυξημένα σε ασθενείς με πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο.



Εικόνα 5.1.5. : Επίπεδα έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών SETD2. Το πρώτο δείγμα S1 είναι δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου, και τα υπόλοιπα 3 δείγματα είναι ιστοί γλοιωμάτων GRADE I, GRADE II και GRADE IV αντίστοιχα.

Η μεθυλοτρανφεράση αυτή είναι μοριακού βάρους περίπου 80 kDa και εμφανίζεται στο film με μία εμφανή διπλή μπάντα. Στο δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου η έκφραση της πρωτεΐνης είναι πολύ μικρή σε αντίθεση με όλα τα δείγματα διαφόρων βαθμών κακοήθειας αστροκυττωμάτων που εξετάστηκαν.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της τροποποίησης H3K36me3 που επιτελείται αποκλειστικά από τη μεθυλοτρανσφεράση SETD2.



Εικόνα 5.1.6. : Επίπεδα έκφρασης της τροποποίησης H3K36me3 σε ανθρώπινο φυσιολογικό ιστό εγκεφάλου και σε ιστούς γλοιωμάτων GRADE I, GRADE II και GRADE IV.

Η τροποποίηση αυτή είναι χαμηλού μοριακού βάρους και επιτελείται in vivo μόνο από τη μεθυλοτρανσφεράση SETD2. Στο 1^ο δείγμα, το οποίο είναι δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου παιδιού η τριμεθυλίωση αυτή εκφράζεται σε χαμηλό βαθμό. Η έκφραση της τριμεθυλίωσης φαίνεται πως είναι υψηλότερη σε στα δείγματα υψηλότερων βαθμών κακοήθειας και πιο συγκεκριμένα σε αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας II.

5.2. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2 και της τροποποίησης H3K4me3

5.2.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

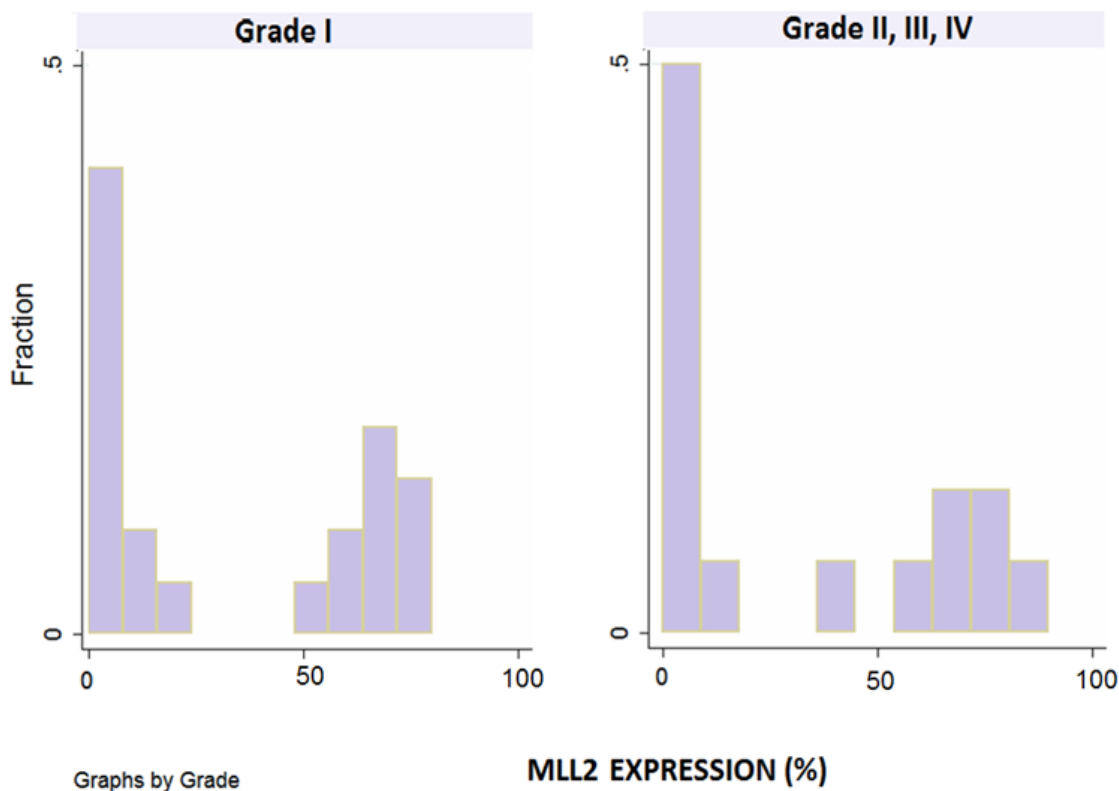
Για την MLL2 έγινε παθολογοανατομική εκτίμηση της έκφρασης σε επίπεδο έντασης έκφρασης από 0,5 έως 3, και σε επίπεδο έκφρασης ποσοστού επί τοις εκατό (%). Στη συνέχεια η ένταση με το ποσοστό πολλαπλασιάστηκαν και το γινόμενο είναι το H-score που αντιπροσωπεύει την έκφραση της πρωτεΐνης.

Πίνακας 5.2.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2

ΑΣΘΕΝΗΣ (N)	GRADE	MLL2 EXPRESSION (%) (N)	MLL2 EXPRESSION (%) (C)	MLL2 INTENSITY (+)	H-SCORE
ΑΣΘΕΝΗΣ 1	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 2	II	15% N	-	1+	15
ΑΣΘΕΝΗΣ 3	IV	-	20% C	3+	60
ΑΣΘΕΝΗΣ 4	III	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 5	I	-	15% C	2+	30
ΑΣΘΕΝΗΣ 6	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 7	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 8	II	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 9	I	50% N	-	1+	50

ΑΣΘΕΝΗΣ 10	IV	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 11	II	2% N	-	2+	4
ΑΣΘΕΝΗΣ 12	II	5% N	-	1+	5
ΑΣΘΕΝΗΣ 13	II	-	70% C	1 +	70
ΑΣΘΕΝΗΣ 14	II	5% N	-	1+	5
ΑΣΘΕΝΗΣ 15	II	60% N	60% C	2+	120
ΑΣΘΕΝΗΣ 16	III	80% N	-	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 17	I	-	1% C	1+	1
ΑΣΘΕΝΗΣ 18	II	70% N	70% C	3+	210
ΑΣΘΕΝΗΣ 19	I	70% N	-	1+	70
ΑΣΘΕΝΗΣ 20	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 21	I	20% N	-	1+	20
ΑΣΘΕΝΗΣ 22	IV	80% N	80% C	1.5+	120
ΑΣΘΕΝΗΣ 23	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 24	I	60% N	-	1+	60
ΑΣΘΕΝΗΣ 25	I	5% N	-	0.5 +	2.5
ΑΣΘΕΝΗΣ 26	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 27	II	90% N	90% C	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 28	IV	70% N	-	3+	210
ΑΣΘΕΝΗΣ 29	I	80% N	80% C	3+	240
ΑΣΘΕΝΗΣ 30	I	80% N	80% C	3+	240
ΑΣΘΕΝΗΣ 31	I	60% N	30% C	2.5 +	150
ΑΣΘΕΝΗΣ 32	I	10% N	10% C	2+	20
ΑΣΘΕΝΗΣ 33	IV	40% N	-	3+	120
ΑΣΘΕΝΗΣ 34	I	70% N	70% C	2+	140
ΑΣΘΕΝΗΣ 35	I	80% N	-	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 36	I	70% N	-	3+	210
ΑΣΘΕΝΗΣ 37	I	70% N	-	2+	140
ΑΣΘΕΝΗΣ 38	I	15% N	-	1+	15

Κατά την ιστολογική αξιολόγηση διαπιστώθηκε πως σε έναν αριθμό δειγμάτων υπήρχε κυτταροπλασματική έκφραση του ενζύμου, η οποία στον πίνακα 5.2.1. συμβολίζεται με MLL2 EXPRESSION (%) (C), εκτός από την αναμενόμενη πυρηνική έκφραση (MLL2 EXPRESSION (%) (N)).



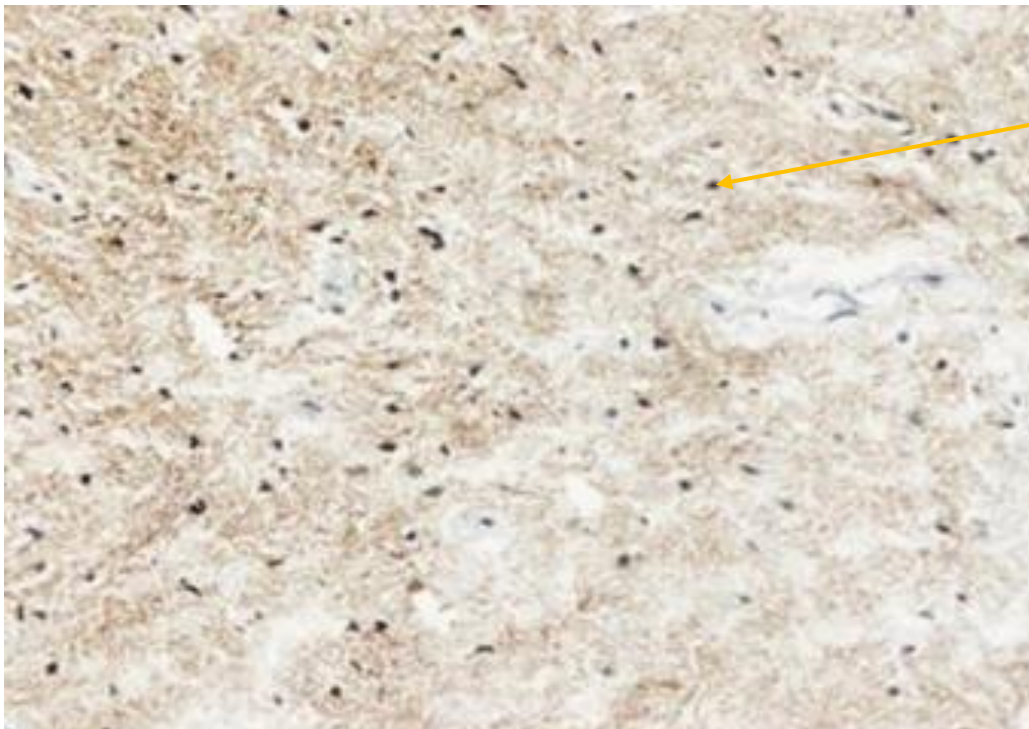
Διάγραμμα 5.2.1.: Σύγκριση της πυρηνικής έκφρασης της MLL2 σε πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα Grade I και αστροκυττώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας.

Στο σύνολο των δειγμάτων αστροκυττωμάτων παρατηρήθηκε μέτρια πυρηνική χρώση της MLL2 με διάμεση βαθμολογία H: 70, υψηλότερη σε βαθμό II-IV σε σύγκριση με τα πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα I (διάμεσος βαθμολογία H: 77, 69 αντίστοιχα).

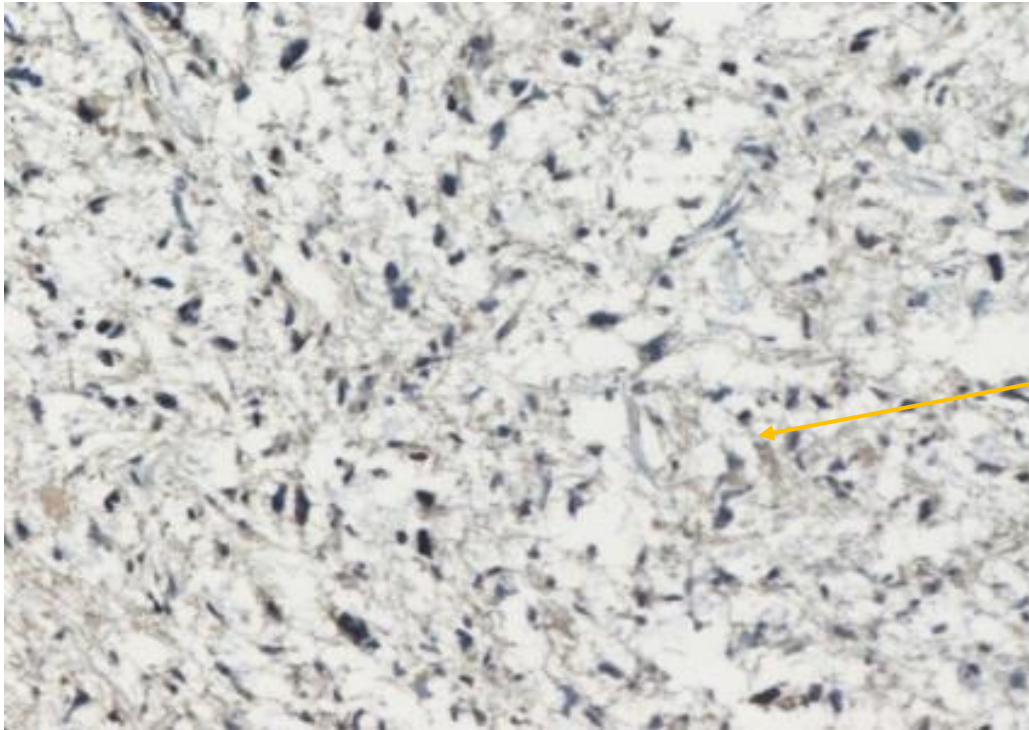
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες ανοσοχρώσης για τη μεθυλοτρανσφεράση αυτή σε ιστούς διαφορετικών βαθμών κακοήθειας σε μεγέθυνση 20x.



Εικόνα 5.2.1. : Η θετική έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης MLL2 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, ενώ τα αρνητικά για το ένζυμο κύτταρα βάφονται με μωβ χρώμα σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα Grade I.



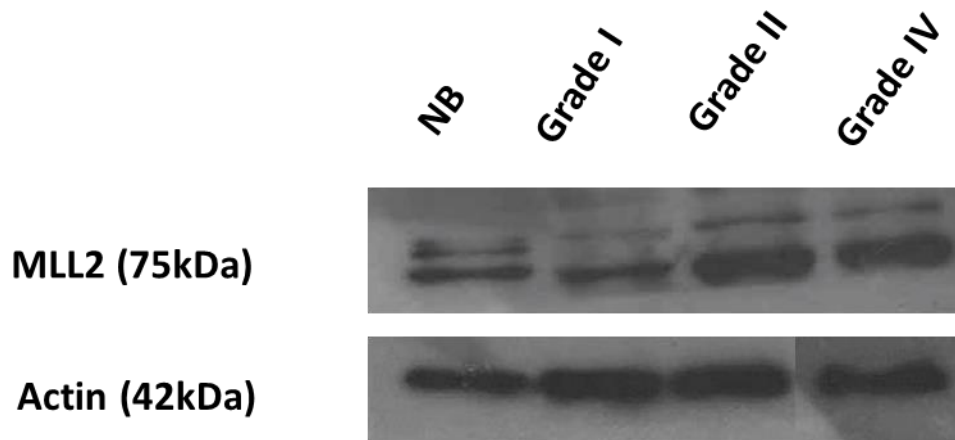
Εικόνα 5.2.2. : Η θετική έκφραση του ενζύμου MLL2 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με αστροκύττωμα Grade II.



Εικόνα 5.2.3 : Θετικά για την έκφραση ενζύμου MLL2 γλοιακά κύτταρα αποδίδονται με καφέ χρώμα σε αντιπροσωπευτικό ιστό γλοιοβλαστώματος Grade IV.

5.2.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της MLL2 με Western Blotting

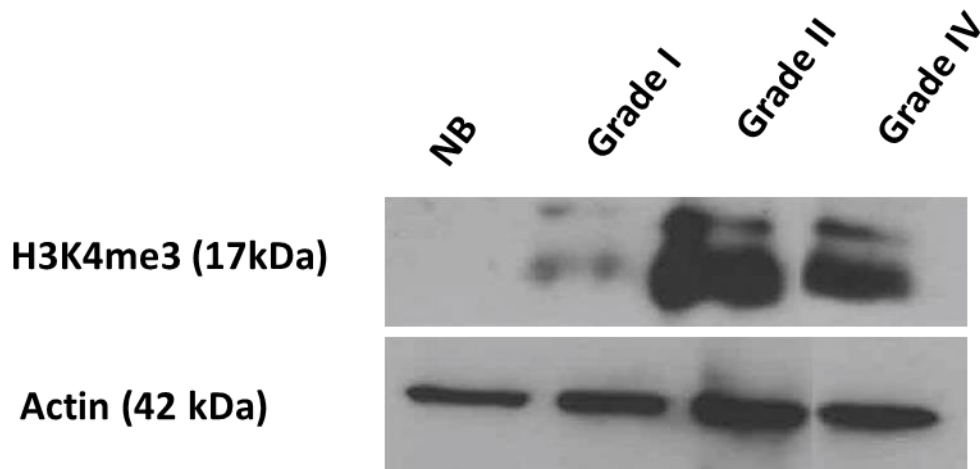
Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MLL2 παρουσιάστηκαν αυξημένα σε ασθενείς με πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο.



Εικόνα 5.2.5. : Αντιπροσωπευτικά στυπώματα κατά Western της πρωτεΐνης MLL2 και της ακτίνης σε ιστό φυσιολογικού εγκεφάλου (Normal Brain-N.B.) και σε εγκεφαλικό ιστό 3 ασθενών με αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I, II και IV αντίστοιχα.

Η μεθυλοτρανσφεράση υπο διερεύνηση εμφανίζεται εμφανώς σε ‘μπάντα’ που αντιστοιχεί στα περίπου 75 kDa. Η ακτίνη εμφανίζεται στα 42 kDa σε όλα τα δείγματα που φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Η έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης δε φαίνεται να σημειώνει ιδιαίτερα μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ του δείγματος φυσιολογικού εγκεφάλου και των υπολοίπων δειγμάτων που αντιστοιχούν σε αστροκυτώματα βαθμών κακοήθειας I, II και IV.

Στην συνέχεια διερευνήθηκε η έκφραση της τροποποίησης H3K4me3 που επιτελείται από τη μεθυλοτρανσφεράση MLL2.



Εικόνα 5.2.6.: Επίπεδα έκφρασης της τροποποίησης H3K4me3 σε δείγματα αστροκυττωμάτων. Το πρώτο δείγμα πρόκειται για δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου, ενώ τα υπόλοιπα προέρχονται από εγκεφαλικό ιστό 3 ασθενών με αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I, II και IV αντίστοιχα.

Η συγκεκριμένη τροποποίηση είναι πολύ μικρού μοριακού βάρους και εμφανίζεται περίπου στα 17 kDa με μία διπλή μπάντα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα παραπάνω σε φυσιολογικό ιστό εγκεφάλου η έκφραση της συγκεκριμένης τροποποίησης είναι μηδενική. Η έκφραση της συγκεκριμένης τροποποίησης φαίνεται πως είναι υψηλότερη στο δείγμα grade II. Η ακτίνη (πρωτεΐνη αναφοράς) εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα.

5.3. Έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1 και της τροποποίησης H3K9me3

5.3.1. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

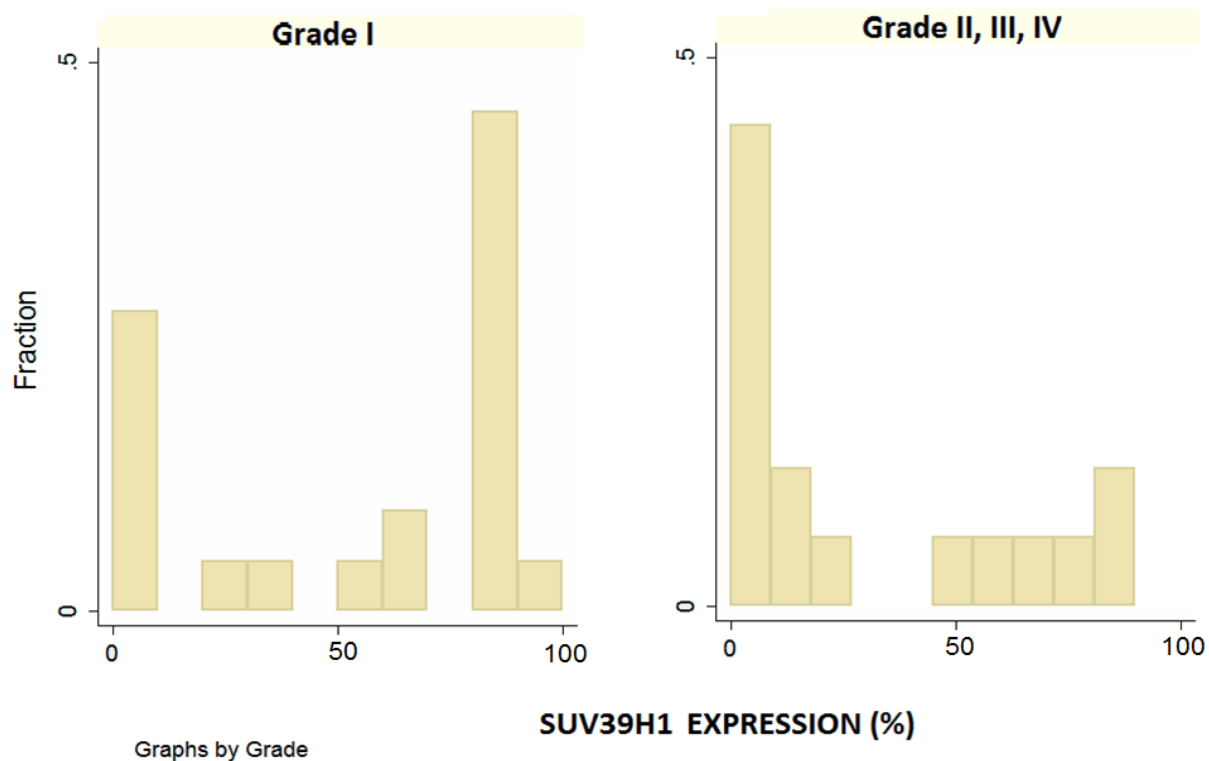
Για την SUV39H1 έγινε παθολογοανατομική εκτίμηση της έκφρασης σε επίπεδο έντασης έκφρασης από 0,5 έως 3, και σε επίπεδο έκφρασης ποσοστού επί τοις εκατό (%). Στη συνέχεια η ένταση με το ποσοστό πολλαπλασιάστηκαν και το γινόμενο είναι το H-score που αντιπροσωπεύει την έκφραση της πρωτεΐνης.

Πίνακας 5.3.1.: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1.

ΑΣΘΕΝΗΣ (N)	GRADE	SUV39H1 EXPRESSION (%)(N)	SUV39H1 EXPRESSION (%)(C)	SUV39H1 INTENSITY (+)	H- SCORE
ΑΣΘΕΝΗΣ 1	I	-	50% C	1.5+	75
ΑΣΘΕΝΗΣ 2	II	50% N	-	1+	50
ΑΣΘΕΝΗΣ 3	IV	90% N	90% C	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 4	III	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 5	I	70% N	-	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 6	I	-	-		
ΑΣΘΕΝΗΣ 7	I	50% N	-	0.5+	25
ΑΣΘΕΝΗΣ 8	II	80% N	-	3+	240
ΑΣΘΕΝΗΣ 9	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 10	IV	-	15% C	1+	15
ΑΣΘΕΝΗΣ 11	II	70% N	80% C	2+	140
ΑΣΘΕΝΗΣ 12	II	-	80% C	1.5+	120
ΑΣΘΕΝΗΣ 13	II	-	50% C	1+	50
ΑΣΘΕΝΗΣ 14	II	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 15	II	15% N	15% C	1 +	15
ΑΣΘΕΝΗΣ 16	III	15% N	80% C	2+	30
ΑΣΘΕΝΗΣ 17	I	20% N	-	1.5+	30
ΑΣΘΕΝΗΣ 18	II	90% N	90% C	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 19	I	80% N	-	1+	80
ΑΣΘΕΝΗΣ 20	I	90% N	-	3 +	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 21	I	60% N	-	1.5+	90

ΑΣΘΕΝΗΣ 22	IV	60% N	100% C	2.5+	150
ΑΣΘΕΝΗΣ 23	I	-	-	-	-
ΑΣΘΕΝΗΣ 24	I	80% N	80% C	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 25	I	100% N	-	1+	100
ΑΣΘΕΝΗΣ 26	I	-	100% C	3+	300
ΑΣΘΕΝΗΣ 27	II	5% N	5% C	2+	10
ΑΣΘΕΝΗΣ 28	IV	20% N	-	3+	60
ΑΣΘΕΝΗΣ 29	I	80% N	80% C	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 30	I	80% N	80% C	3+	240
ΑΣΘΕΝΗΣ 31	I	30% N	30% C	1+	30
ΑΣΘΕΝΗΣ 32	I	90% N	90% C	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 33	IV	2% N	-	1+	2
ΑΣΘΕΝΗΣ 34	I	5% N	-	2+	10
ΑΣΘΕΝΗΣ 35	I	80% N	-	2+	160
ΑΣΘΕΝΗΣ 36	I	90% N	90% C	3+	270
ΑΣΘΕΝΗΣ 37	I	90% N	-	1.5+	135
ΑΣΘΕΝΗΣ 38	I	80% N	-	2+	160

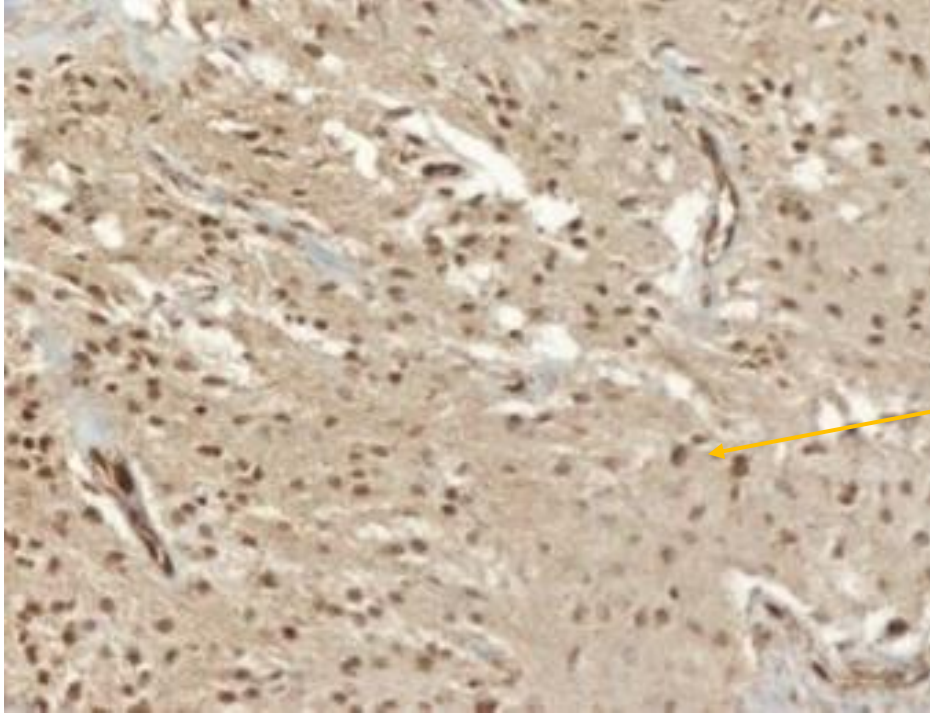
Κατά την ιστολογική αξιολόγηση διαπιστώθηκε πως σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων υπήρχε κυτταροπλασματική έκφραση του ενζύμου, η οποία στον πίνακα 4.3.1. συμβολίζεται με SUV39H1 EXPRESSION (%) (C), εκτός από την αναμενόμενη πυρηνική έκφραση SUV39H1 EXPRESSION (%) (N)).



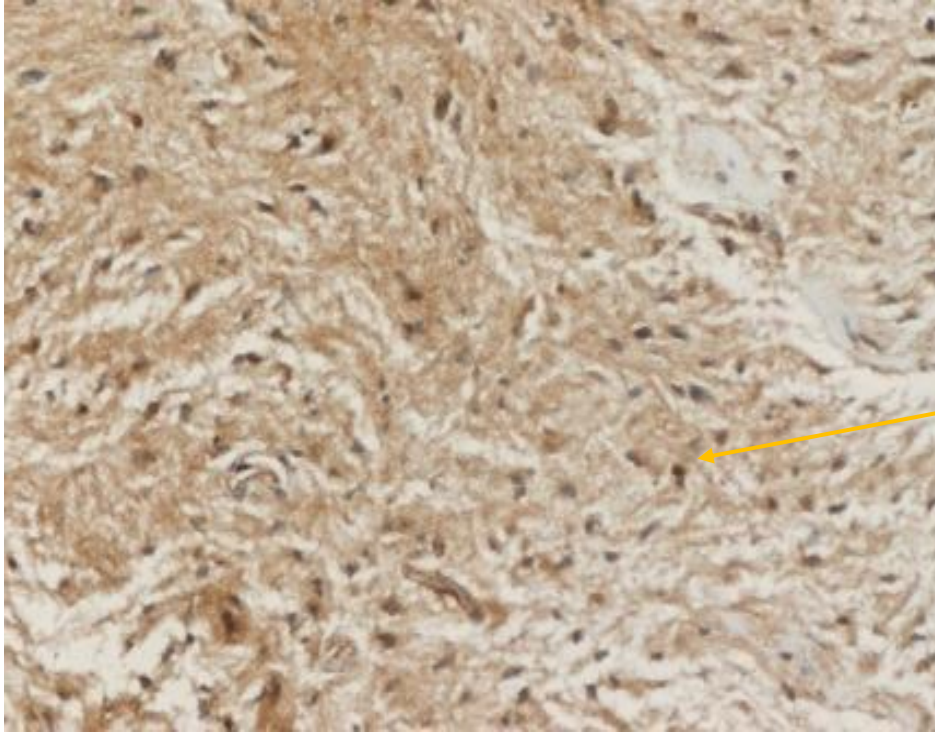
Διάγραμμα 5.3.1.: Σύγκριση της πυρηνικής έκφρασης της SUV39H1 σε πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα Grade I και αστροκυττώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας

Η πυρηνική έκφραση της SUV39H1 δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή με χαμηλότερη πυρηνική έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης να ανιχνεύεται σε ιστούς υψηλού βαθμού II-IV (διάμεσος βαθμολογία H: 77) σε σύγκριση με ιστούς πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων (διάμεσος βαθμολογία H: 110).

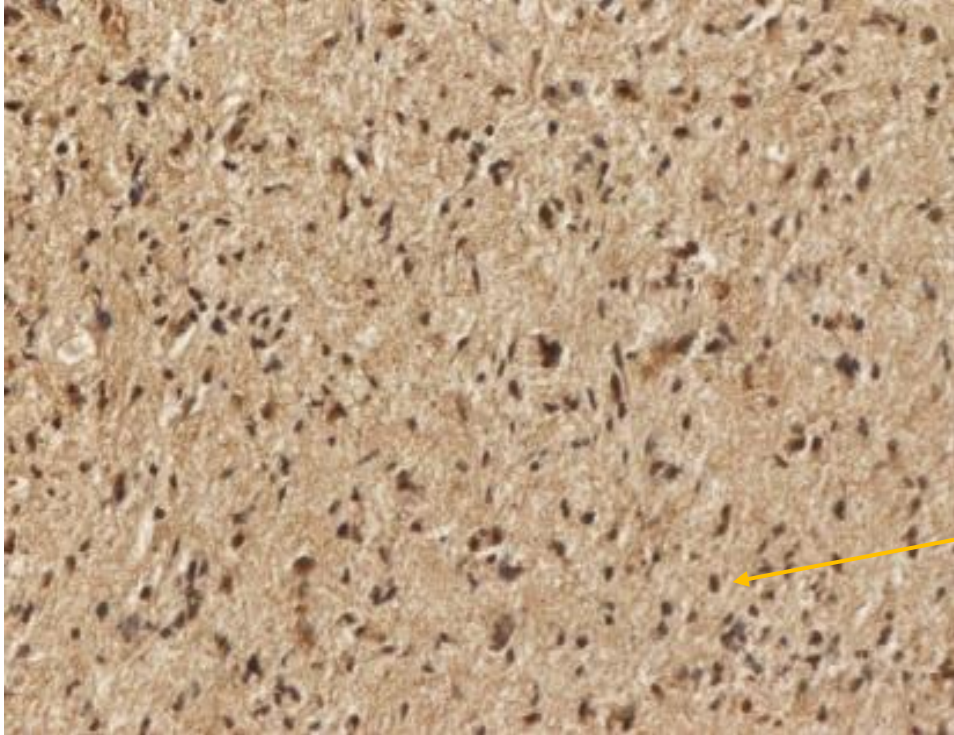
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες ανοσοχρώσης για τη μεθυλοτρανσφεράση SUV39H1 σε ιστούς πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων βαθμού κακοήθειας I (grade I) και υψηλού βαθμού κακοήθειας γλοιοβλαστωμάτων (grade IV) σε μεγέθυνση 20x.



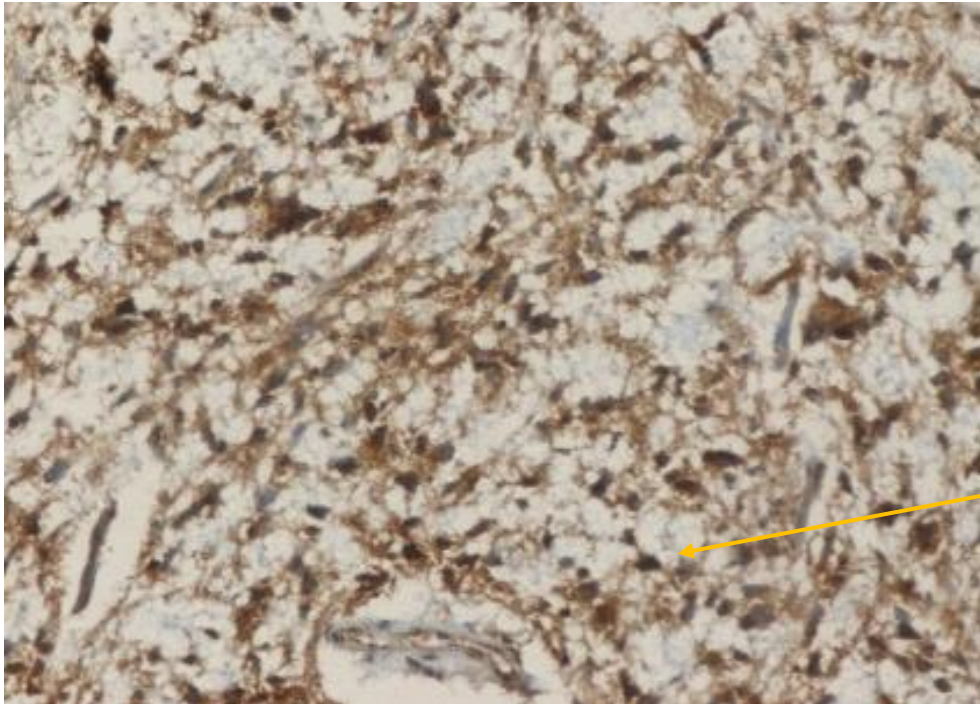
Εικόνα 5.3.1.: Η θετική έκφραση του ενζύμου SUV39H1 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, τα αρνητικά για την πρωτεΐνη κύτταρα βάφονται με μωβ χρώμα σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα Grade I.



Εικόνα 5.3.2.: Η θετική έκφραση του ενζύμου SUV39H1 αποδίδεται με καφέ χρώμα στα νεοπλασματικά κύτταρα της γλοίας, τα αρνητικά για την πρωτεΐνη κύτταρα βάφονται με μωβ χρώμα σε έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα Grade II.

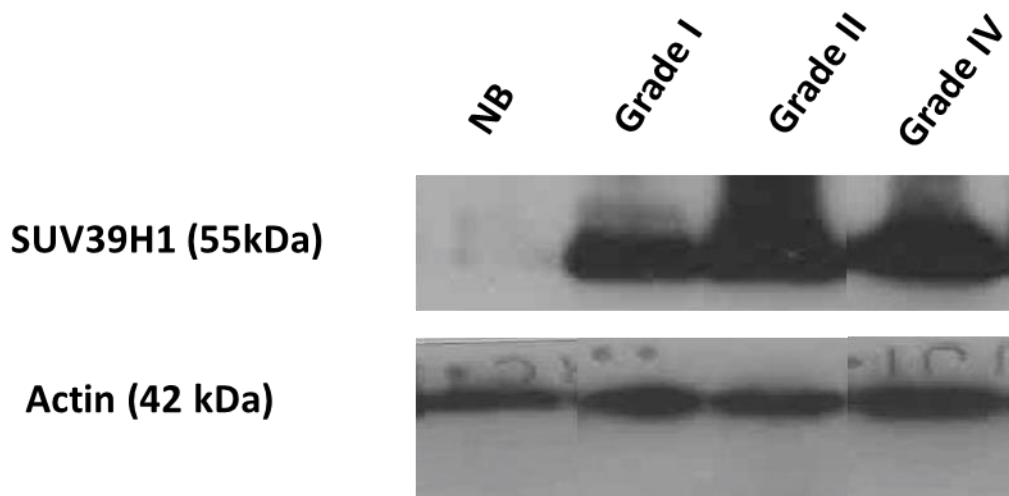


Εικόνα 5.3.3.: Θετικά για την έκφραση ενζύμου SUV39H1 γλοιακά κύτταρα σε αντιπροσωπευτικό ιστό αστροκυτώματος Grade III.



Εικόνα 5.3.4.: Θετικά για την έκφραση ενζύμου SUV39H1 γλοιακά κύτταρα σε αντιπροσωπευτικό ιστό γλοιοβλαστώματος Grade IV.

5.3.2. Επιβεβαίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της SUV39H1 με Western Blotting

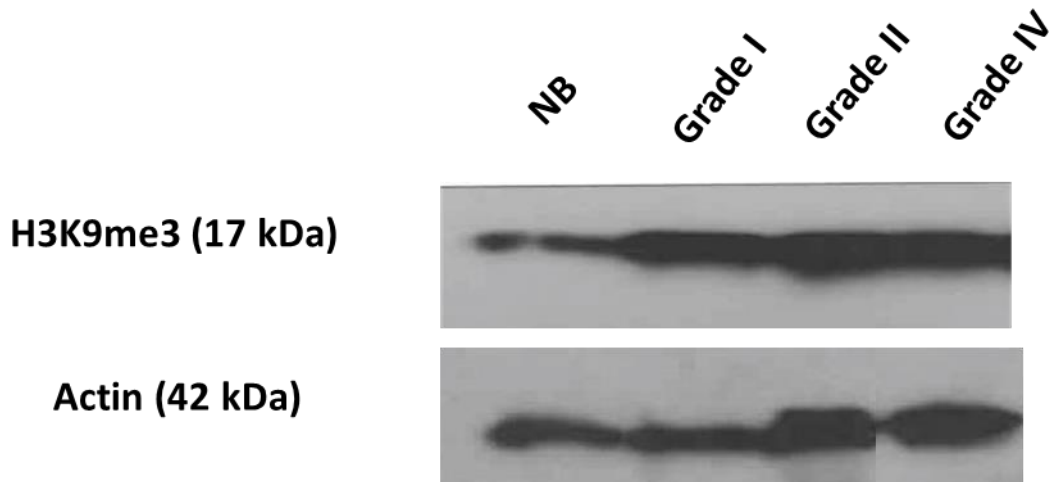


Εικόνα 5.3.5.: Επίπεδα έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών SUV39H1. Το πρώτο δείγμα πρόκειται για δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου, ενώ τα υπόλοιπα προέρχονται από εγκεφαλικό ιστό 3 ασθενών με αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I, II και IV αντίστοιχα.

Στο φιλμ εμφανίζεται ευκρινής 'μπάντα' μεγέθους 55 περίπου kDa, που αντιστοιχεί στη ζητούμενη πρωτεΐνη.

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης SUV39H1 παρουσιάστηκαν αυξημένα σε δείγματα ασθενών με αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας I, II και IV σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο, η έκφραση του οποίου είναι σχεδόν μηδενική.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της τροποποίησης H3K9me3 που επιτελείται από τη μεθυλοτρανσφεράση SUV39H1.



Εικόνα 5.3.6.: Επίπεδα έκφρασης της τροποποίησης H3K9me3 σε ανθρώπινου φυσιολογικού ιστού εγκεφάλου και σε ιστούς γλοιωμάτων Grade I, Grade II και Grade IV.

Σε όλα τα δείγματα πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζεται η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3, που επιτελείται κατά κύριο λόγο από την μεθυλοτρανφεράση των ιστονών SUV39H1. Η τροποποίηση αυτή εκφράζεται τόσο στο δείγμα φυσιολογικού εγκεφάλου όσο και στα υπόλοιπα δείγματα που αντιστοιχούν σε αστροκυττώματα Grade I, Grade II και Grade IV, με την έκφραση της συγκεκριμένης τροποποίησης ωστόσο να σημειώνεται πιο χαμηλή στο δείγμα που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό εγκέφαλο.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γλοιώματα είναι οι συχνότεροι συμπαγείς όγκοι της παιδικής ηλικίας και προσβάλλουν παιδιά από την βρεφική ηλικία μέχρι την εφηβεία, σε ποσοστό που ξεπερνά το 20% (Baldwina et al, 2004).

Τις τελευταίες δεκαετίες η πλειονότητα των μελετών είναι στραμμένες στο γενετικό υπόβαθρο των ασθενειών, γεγονός που οδήγησε στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δημιουργία καρκίνου. Μελέτες του μοριακού προφίλ του γενετικού γονιδιώματος αποκάλυψαν χαρακτηριστικές γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους γλοιωμάτων, γεγονός που οδήγησε το 2016, στην αναθεώρηση της ταξινόμησης των όγκων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) (Louis et al, 2016). Αυτά τα μοριακά χαρακτηριστικά μπορούν σήμερα να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την ταξινόμηση των γλοιωμάτων, να οδηγήσουν σε εξατομικευμένη θεραπεία και να βελτιώσουν την πρόγνωση του ασθενούς.

Μολονότι πλέον είναι ευρέως αποδεκτό πως εκτός από τη γενετική, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση διαδραματίζει και η επιγενετική (Ellis et al, 2009), μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισαν οι επιγενετικοί μηχανισμοί να μελετώνται διεξοδικά. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, σε αντίθεση με τις γενετικές, δεν κληρονομούνται και είναι αναστρέψιμες, γεγονός πολλά υποσχόμενο καθώς η κατανόηση αυτών, αλλά και των ενζύμων που συμμετέχουν στις επιγενετικές τροποποιήσεις είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών (Nagarajan et al, 2009).

Η μεθυλίωση ιστονών είναι μια δυναμική διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών, που προσθέτουν μεθυλομάδες στα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης και οι απομεθυλάσες των ιστονών που διενεργούν ακριβώς την αντίστροφη διαδικασία. Ο επιγενετικός αυτός μηχανισμός μπορεί να οδηγήσει τόσο σε μεταγραφική ενεργοποίηση όσο και σε μεταγραφική καταστολή γονιδίων ανάλογα με το κατάλοιπο λυσίνης το οποίο δέχεται την τροποποίηση, και παίζει σημαντικό ρόλο στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό (Spygroulou et al, 2013).

Η μεθυλίωση των αμινοξέων λυσίνης των ιστονών καταλύεται από μεθυλοτρανσφεράσες που φέρουν στο μόριό τους μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή 130 αμινοξέων, την περιοχή SET. Περισσότερες από 200 πρωτεΐνες, που επιτελούν ποικίλες λειτουργίες και που συναντώνται σε ευρύ φάσμα οργανισμών, βρέθηκε πως περιέχουν την περιοχή SET και έχει προταθεί ότι ο κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών **SETD2**, **MLL2** και **SUV39H1**, οι οποίες μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσινών της ιστόνης H3 που βρίσκονται στις θέσεις 36 (H3K36), 4 (H3K4) και 9 (H3K9) αντίστοιχα.

Η **SETD2** είναι μια μεθυλοτρανσφεράση ιστονών που διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, όπως η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων, η επιμήκυνση, ο ομόλογος ανασυνδιασμός και η απόπτωση, καθώς αλληλεπιδρά με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, ρυθμίζοντας επιλεκτικά τη μεταγραφική δραστηριότητα των αποπτωτικών γονιδίων puma, noxa, και p53AIP1 (Sarakbi et al, 2009).

Ο Park και οι συνεργάτες του ανέφεραν την άμεση σύνδεση μεταξύ της SETD2 και της μίτωσης, κατά την οποία η κυτταροπλασματική μεθυλίωση της τουμπουλίνης πραγματοποιείται από την SETD2 προωθώντας τον κατάλληλο διαχωρισμού χρωμοσωμάτων και τελικά τη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας (Park et al, 2016). Ένα χρόνο μετά, μελέτη έδειξε πως τα επίπεδα SETD2 είναι τα υψηλότερα κατά τη διάρκεια της μίτωσης και μειώνονται όταν το κύτταρο εισέλθει στην G1 (Raghuvar et al, 2017).

Ακόμη η μεθυλοτρανσφεράση αυτή αποτελεί τη μοναδική γνωστή μεθυλοτρανσφεράση που πραγματοποιεί την τριμεθυλίωση της λυσίνης 36 της ιστόνης 3 *in vivo*, μία ιδιαίτερα σημαντική τροποποίηση που εμπλέκεται στην επιμήκυνση και την επιδιόρθωση λαθών και σηματοδοτεί τις μεταγραμμένες περιοχές γονιδίων (Wozniak and Strahl, 2014). Η H3K36 μεθυλιώνεται συν-μεταγραφικά με Set2 και λειτουργεί, εν μέρει, για να διατηρήσει τη δομή της χρωματίνης και να αποτρέψει ακατάλληλη μεταγραφή από κρυπτικούς υποκινητές κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης (Keogh et al, 2005). Αυτή η λειτουργία του H3K36me εξαρτάται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου Rpd3S

αποακετυλάσης ιστονών και την αναστολή της ανταλλαγής ιστονών (Venkatesh et al, 2012). Η έκφραση του ενζύμου αυτού σε συνδυασμό με την τροποποίηση που επιτελεί, φαίνεται πως διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γήρανσης, πιθανότατα μέσω της διατήρησης μεταγραφικής πιστότητας στο γονιδίωμα, αλλά και στο μάτισμα του RNA, καθώς διαφοροποιήσεις στην έκφραση της SETD2 και της τριμεθυλίωσης της H3K36 έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία εναλλακτικών εξονίων κατά τη διαδικασία του ματίσματος (Luco et al, 2010). Επιπρόσθετα η τροποποίηση H3K36 επηρεάζει και άλλους επιγενετικούς μηχανισμούς, καθώς είναι απαραίτητη για την καθιέρωση της μεθυλίωσης του DNA σε γονιδιακά σώματα, βασικό ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης.

Μεταλλάξεις του γονιδίου, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SETD2 και έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του ενζύμου, έχουν συσχετιστεί με καρκίνο των νεφρών (clear cell renal cell carcinoma /CCRCC) (Liu et al, 2004), αλλά και νεοπλασμάτα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Brennan et al, 2013). Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως πιθανό αποτέλεσμα τη μείωση της H3K36me3. Οι μειώσεις στην H3K36me3 οδηγούν σε αλλοιώσεις στη γονιδιακή ρύθμιση, αυξημένη συχνότητα αυθόρμητων μεταλλάξεων και χρωμοσωμική αστάθεια (Li et al, 2016).

Στην παρούσα εργασία η έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης **SETD2** εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένη στα δείγματα παιδιατρικών εγκεφαλικών όγκων που μελετήθηκαν, συγκριτικά με ιστό φυσιολογικού εγκεφάλου, τόσο μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όσο και ανοσοϊστοχημικά. Σύμφωνα με άλλες έρευνες η έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών λυσίνης της οικογένειας SET έχει βρεθεί αυξημένη σε αθανατοποιημένα βρογχοεπιθηλιακά κύτταρα (Scott et al, 2004).

Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί πως η πυρηνική έκφραση του ενζύμου είναι υψηλότερη σε πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα σε σχέση με αστροκυττώματα μεγαλύτερου βαθμού κακοήθειας. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξαν και ο Sarakbi με τους συνεργάτες του το 2009, οπότε διαπίστωσαν πως τα επίπεδα της έκφρασης της SETD2 σε δείγματα από ασθενείς με πιο επιθετικούς όγκους που εμφάνισαν μετάσταση, τοπική υποτροπή ή απεβίωσαν από καρκίνο του μαστού ήταν πολύ

χαμηλότερα σε σύγκριση με εκείνους που ήταν ελεύθεροι από ασθένεια για περισσότερο από 10 χρόνια (Sarakbi et al, 2009).

Μία υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει την χαμηλότερη έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης σε υψηλού βαθμού κακοήθειας αστροκυττώματα είναι πως το γονίδιο *setd2* σε αυτά τα γλοιώματα έχει υποστεί μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα τη σίγηση του ή τη δημιουργία μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Σύμφωνα με μελέτη του Fontebasso στο 15% των παιδιατρικών γλοιωμάτων έχουν εντοπιστεί ανάλογες μεταλλάξεις στο γονίδιο (Fontebasso et al, 2013). Σε υψηλού βαθμού γλοιώματα οι μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως στην 5' περιοχή της SET υπομονάδας και είναι κυρίως μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης, οι οποίες έχουν επίδραση και στην έκφραση της τριμεθυλίωσης της H3K36, μειώνοντας τα ποσοστά της (Viaene et al, 2018). Μια άλλη θεωρία διατυπώθηκε το 2012 από τον Gerlinger και τους συνεργάτες του, οι οποίοι πραγματοποιώντας διερεύνηση της ετερογένειας εντός όγκου έδειξαν πως η αδρανοποίηση του SETD2 μπορεί να είναι ένα καθυστερημένο γεγονός στην ανάπτυξη του καρκίνου που παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα νεφρών (Gerlinger et al, 2012).

Όσον αφορά στην έκφραση της τριμεθυλίωσης **H3K36**, που επιτελεί αποκλειστικά η μεθυλοτρανφεράση SETD2, είναι πάρα πολύ υψηλή στο σύνολο των δειγμάτων των αστροκυττωμάτων, με υψηλότερη έκφραση να σημειώνεται στα αναπλαστικά αστροκυττώματα βαθμού κακοήθειας III, αποτέλεσμα αναμενόμενο, καθώς η έκφραση της συγκεκριμένης τροποποίησης είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια.

Η διαφορετική αυτή έκφραση της SETD2 τόσο μεταξύ φυσιολογικού και νεοπλασματικού παιδιατρικού ιστού όσο και μεταξύ των διαφορετικών βαθμών κακοήθειας, αν και χρειάζεται επιβεβαίωση σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ιστών, υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη μεθυλοτρανσφεράση εμπλέκεται στον παθολογικό μηχανισμό και μπορεί να αποτελέσει δυνητικό βιοδείκτη στην παθολογοανατομική εξέταση των παιδιατρικών γλοιωμάτων.

Η επόμενη μεθυλοτρανφεράση που ασχοληθήκαμε ήταν η **MLL2**. Η μεθυλοτρανσφεράση ιστονών **MLL2** είναι ένα ένζυμο που παίζει σημαντικό ρόλο στη

ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων. Δρα ως συνενεργοποιητής του p53 και είναι μία από τις κυριότερες μεθυλοτρανσφεράσες που πραγματοποιούν τη μεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3, τροποποίηση η οποία αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης γονιδίων. Η MLL2 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του επιπέδου της μονομεθυλίωσης της H3K4 στα κύτταρα, ενώ έχει βρεθεί πως η ενζυματική περιοχή SET είναι άμεσα υπεύθυνη για αυτή τη λειτουργία *in vivo* (Changcun et al, 2013). Η τριμεθυλιωμένη H3K4 (H3K4me3) είναι ένα επιγενετικό σημάδι που σχετίζεται με τους προαγωγούς των ενεργά μεταγραφέντων γονιδίων. Με τον καθορισμό αυτής της τροποποίησης, η MLL2 είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας γονιδίων *Hox*, που ελέγχουν συλλογικά την τύχη των κυττάρων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (Milne et al, 2002).

Πρόσφατα, η MLL2 έχει αναδειχθεί ως ένα από τα πλέον συχνά μεταλλαγμένα γονίδια σε μια ποικιλία καρκίνων και σε άλλες ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος non-Hodgkin (Morin et al, 2011), του μυελοβλαστώματος, του γαστρικού καρκίνου και του συνδρόμου Kabuki. Μεταλλάξεις στο KMT2D που έχουν προσδιοριστεί έως τώρα, δείχνουν πως η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου, γιαυτό αλλώστε και θεωρείται πως έχει ρόλο καταστολέα όγκων σε διάφορους ιστούς (Guo et al, 2013). Διαφοροποιήσεις στα πρότυπα έκφρασης του ενζύμου επηρεάζουν τόσο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, όσο και την ικανότητα αυτών να μεταναστεύουν (Changcun et al, 2013).

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας τα αποτελέσματα αναφορικά με την **MLL2** μεθυλοτρανσφεράση λυσίνης ιστονών έδειξαν χαμηλή προς μέτρια έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης σε παιδιατρικά δείγματα ιστών εγκεφαλικών όγκων, ελαφρώς πιο υψηλή σε σχέση με ιστούς φυσιολογικού εγκεφάλου. Ο Huntsman και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η MLL2 ενισχύεται σε μερικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστωμάτων και καρκίνου του παγκρέατος (Huntsman et al, 1999). Ωστόσο, σε άλλους συμπαγείς όγκους, όπως ο καρκίνος του μαστού, η έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης εμφανίζεται ελαττωμένη σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς (Rabello et al, 2013). Σε καρκινικές

σειρές μυελοβλαστώματος μια ανεπάρκεια της πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα τον εξασθενημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ελαττωματική μετανάστευση των κυττάρων αυτών.

Η έκφραση της MLL2 σε δείγματα υψηλότερων βαθμών κακοήθειας εμφανίζεται αυξημένη, σε σύγκριση με τα δείγματα πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων, βαθμού κακοήθειας I. Υψηλότερη έκφραση της MLL2 φαίνεται πως προάγει την εξέλιξη του όγκου και έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο στον οισοφάγο (Abudureheman et al, 2018), ενώ μείωση της έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης της ιστόνης MLL2 συσχετίζεται με βελτιωμένο αποτέλεσμα στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Dawkins et al, 2017).

Όσον αφορά στην τροποποίηση H3K4me3, παρατηρήθηκε πως σε ορισμένα δείγματα πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων η έκφραση της τριμεθυλίωσης ήταν σαφώς αυξημένη σε σχέση με το φυσιολογικό εγκέφαλο.

Η τελευταία μεθυλοτρανσφεράση που ασχοληθήκαμε στην παρούσα εργασία ήταν η **SUV39H1**. Η SUV39H1, αποτελεί την πρώτη μεθυλοτρανσφεράση ιστονών που περιγράφηκε το 2000. Συμμετέχει στο σχηματισμό και τη διατήρηση της ετεροχρωματίνης, καθώς δεσμεύεται με την HP1, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο, το οποίο δρα σε περιοχές ετεροχρωματίνης σε περικεντρικές περιοχές (Lachner et al, 2001), αλλά και στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων (Rea et al, 2000). Κατά τη διάρκεια της μίτωσης των κυττάρων στους ανθρώπους, το γονίδιο *Suv39h1* παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για τον σωστό διαχωρισμό χρωμοσωμάτων (Chu et al, 2012). Η μεθυλοτρανσφεράση αυτή αποτελεί μαζί με την SETDB1, τα δυο ένζυμα που πραγματοποιούν την τριμεθυλίωση της H3K9, ένα σημάδι γονιδιακής αποσιώπησης. Η απορρύθμιση της έκφρασης της SUV39H1 και της τροποποίησης που επιτελεί έχει συσχετιστεί με ογκογόνο φαινότυπο σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες.

Έχει διαπιστωθεί πως σε ιστούς γλοιωμάτων ενηλίκων η έκφρασή της μεθυλοτρανσφεράσης είναι αυξημένη σε σχέση με τους φυσιολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς, ενώ τα επίπεδα της έκφρασης συσχετίστηκαν θετικά με την κατηγορία και ιστολογική κακοήθεια των γλοιωμάτων (Spygorouliou et al, 2014).

Όμως, στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα της έκφρασης της N-μεθυλοτρανσφεράσης **SUV39H1** παρουσίαζαν απόκλιση και συγκεκριμένα η έκφραση αυτής δεν εμφάνιζε ιδιαίτερα μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιστών γλοιωμάτων και του φυσιολογικού ιστού, ενώ υψηλότερη ήταν η έκφραση σε χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας γλοιώματα, γεγονός που υποδεικνύει τη μικρή εμπλοκή της στη γλοιωματογενεση.

Αναφορικά με την τροποποίηση H3K9me3 τα αποτελέσματα δείχνουν υψηλή έκφραση της σε σχέση με τον ιστό φυσιολογικού εγκεφάλου σε όλα τα δείγματα πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων που μελετήθηκαν. Η έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης SUV39H1 στα ίδια δείγματα πιλοκυτταρικών αστροκυττωμάτων ήταν επίσης υψηλή.

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής υποδεικνύουν ότι πιθανόν η συγκεκριμένη μεθυλοτρανσφεράση δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των παιδιατρικών όγκων σε αντίθεση με τους ενήλικες, ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Η έκφραση αυτών των μεθυλοτρανσφερασών και των αντίστοιχων τροποποιήσεων που επιτελούν μεταξύ φυσιολογικού εγκεφάλου και παθολογικού ιστού διαφόρων βαθμών κακοήθειας πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω προκειμένου να διαλευκανθεί πλήρως η συμβολή τους στην δημιουργία παιδιατρικών όγκων εγκεφάλου.

Συμπερασματικά, η μεθυλοτρανσφεράση SETD2 και η αντίστοιχη τροποποίηση της τριμεθυλίωσης H3K36, που αυτή επιτελεί, διαδραματίζουν πιθανά σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των γλοιωμάτων. Η αλληλεπίδραση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, όπως η μεθυλίωση ιστονών και η μεθυλίωση στο DNA, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για μελλοντική έρευνα. Επιπροσθέτως, η αναγνώριση των γονιδίων που επηρεάζονται, είτε άμεσα είτε έμμεσα από την αναστολή των μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών είναι πρωταρχικής σημασίας για την κατανόηση της διαδικασίας σχηματισμού και ανάπτυξης των γλοιωμάτων. Τέλος, η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται ή ενεργοποιούνται από τις επιγενετικές αλλαγές κατά την ανάπτυξη των γλοιωμάτων, θα μπορούσε να οδηγήσει σε

ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων και ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aagaard L, Schmid, Warburton, Jenuwein. «Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres.» 2000.
- Alagoz M, Katsuki Y , Ogiwara H, Ogi T, Shibata A, Kakarougkas A, JeggoP. «SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53bp1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells.» 2015.
- Ali ZS, Lang SS, Sutton LN. «Conservative Management of Presumed Low-Grade Gliomas in the Asymptomatic Pediatric Population. .» 2014.
- Amigorena, RS Allan E Zueva F Cammas HA Schreiber V Masson GT Belz D Roche C Maison JP Quivy G Almouzni S. «An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment.» 2012.
- Ang SY, Uebersohn A, Spencer CI, Huang Y, Lee JE, Ge K, Bruneau BG. «KMT2D regulates specific programs in heart development via histone H3 lysine 4 dimethylation.» 2016.
- Ausio. «Histone variants the structure behind the function. Brief Funct Genomic Proteomic.» 2006.
- Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. «Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes.» 2005.
- Bártová Eva, Jana Krejčí, Andrea Harničarová, Gabriela Galiová, and Stanislav Kozubek. «Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review.» 2008.
- Baumann Nicole, Pham-Dinh Danielle. «Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System".» 2001.

- Bavle A, Jones J, Lin FY, et al « Dramatic clinical and radiographic response to BRAF inhibition in a patient with progressive disseminated optic pathway glioma refractory to MEK inhibition.» *Pediatr Hematol Oncol* , 2017.
- Belmonte, W Zhang J Li K Suzuki J Qu P Wang J Zhou X Liu R Ren X Xu A Ocampo T Yuan J Yang Y Li L Shi D Guan H Pan S Duan Z Ding M Li F Yi R Bai Y Wang C Chen F Yang X Li Z Wang E Aizawa A Goebel RD Soligalla P Reddy CR Esteban F Tang GH Liu JC. «Aging stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging.» 2015.
- Berger. «An embarrassment of niches: the many covalent modification sof histones in transcriptional regulation.» 2003.
- Blionas Alexandros, Dimitrios Giakoumettis, Alexia Klonou, Eleftherios Neromyliotis, Ploutarchos Karydakis, Marios S. Themistocleous. «Paediatric gliomas: diagnosis, molecular biology and management.» 2018.
- Bögershausen N, Wollnik B. «"Unmasking Kabuki syndrome".» 2013.
- Carvalho Alves-Silva J, do Amaral Rabello D, Oliveira Bravo M, Lucena-Araujo A, Madureira de Oliveira D, Morato de Oliveira F, Magalhaes Rego E, Pittella-Silva F, Saldanha-Araujo F. «Aberrant levels of SUV39H1 and SUV39H2 methyltransferase are associated with genomic instability in chronic lymphocytic leukemia.» 2018.
- Chang, Min. «Regulation of lifespan by histone deacetylase.» 2002.
- Changcun Guo, Lee H. Chen, Yafen Huang, Chun-Chi Chang, Ping Wang et al «KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone.» 2013.
- Chen B, Wang J, Wang J, Wang H, Gu X, Tang L, Feng X. «A regulatory circuitry comprising TP53, miR-29 family, and SETDB1 in non-small cell lung cancer.» 2018.
- Coleman, Terence Z.Wong and R. Edward. «PET Imaging in Brain Tumors.» χ.χ.

- Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, et.al. «Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes.» 2010.
- Dasgupta T, Haas-Kogan DA. « The Combination of Novel Targeted Molecular Agents and Radiation in the Treatment of Pediatric Gliomas. .» *Front Oncol* , 2013.
- Diwanji TP, Engelman A, Snider JW, et al «Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults.» *Adolesc Health Med Ther* , 2017.
- Durando X, Lemaire JJ, Tortochaux J, et al «High-dose BCNU followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in supratentorial high-grade malignant gliomas: a retrospective analysis of 114 patients.» *Bone Marrow Transplant*, 2003.
- Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL. «Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation.» 2008.
- El-Ayadi M, Ansari M, Sturm D, et al «High-grade glioma in very young children: a rare and particular patient population.» *Oncotarget*, 2018.
- Elizabeth Ward, Carol DeSantis,Anthony Robbins ,Betsy Kohler,Ahmedin Jemal. «Childhood and adolescent cancer statistics.» *CA: a cancer journal for clinicians*, 2014.
- Ellis L., Atadja P.W., Johnstone R. W. *Mol Cancer Ther.* «Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications .» 2009.
- Engel JD, von Hippel PH. «Effects of methylation on the stability of nucleic acid conformations. Studies at the polymer level. .» 1978.
- Esteller, M. «"Epigenetics Provides a New Generation of Oncogenes and Tumour-suppressor Genes" .» 2006.

- Fangusaro. «Pediatric high grade glioma: a review and update on tumor clinical characteristics and biology.» *Front Oncol*, 2012.
- Faria CMC, Rutka JT, Smith C, Kongkham P. «Epigenetic mechanisms regulating neural development and pediatric brain tumor formation.» 2011.
- Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. «Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail.» 2005.
- Fontanilla, Hiral P., Pinnix, Chelsea C., Ketonen, Leena M., Woo, Shiao Y., Vats, Tribhawan S., Rytting, Michael E., Wolff. «Palliative reirradiation for progressive diffuse intrinsic pontine glioma.» 2012.
- Fritschi, Susan Peters Deborah C. Glass Alison Reid Nicholas de Klerk Bruce K. Armstrong Stewart Kellie Lesley J. Ashton Elizabeth Milne Lin. «Parental occupational exposure to engine exhausts and childhood brain tumors.» 2013.
- Gajjar A, Bowers DC, Karajannis MA, et al « Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming the Diagnostic and Clinical Landscape.» *Clin Oncol* , 2015.
- Garcia MA, Solomon DA, Haas-Kogan DA. «Exploiting molecular biology for diagnosis and targeted management of pediatric low-grade gliomas.» *Future Oncol* , 2016.
- Goel, Ayush, και Frank. Gaillard. «"Ependymoma".» 2014.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. «Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms.» *Science*, 1985.
- Götz, M. & Huttner, W.B. «The cell biology of neurogenesis.» 2005.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, et al « "Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP".» 2010.
- Greenop, Kathryn, Susan Peters, Lin Fritschi, Deborah Glass, και Lesley Ashton. «Exposure to household painting and floor treatments, and parental occupational

- paint exposure and risk of childhood brain tumors: results from an Australian case-control study.» *Cancer Causes Control*, 2013.
- Greer, Eric L., και Yang Shi. «"Histone Methylation: A Dynamic Mark in Health, Disease and Inheritance".» 2012.
- Grossniklaus U, Paro R. «Transcriptional silencing by Polycomb group proteins.» 2014.
- Gurney JG, Kadan-Lottick N. «Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology.» 2001.
- HaoZeng, WeiXu. «Enzymatic Assays of Histone Methyltransferase Enzymes.» 2015.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000167548;r=12:49018975-49059774;t=ENST00000301067.
- <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>
- <https://www.uniprot.org/uniprot/O43463#function>
- Hu M, Sun XJ, Zhang YL, Kuang Y, Hu CQ, Wu WL, Shen SH, Du TT, Li H, He F, Xiao HS, Wang ZG, Liu TX, Lu H, Huang QH, Chen SJ, Chen Z. «Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling.» 2010.
- Jaenisch, R. and Bird, A. «Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* » 2003.
- Jasencakova Z, Soppe WJ, Meister A, Gernand D, Turner BM, Schubert I. «Histone modifications in Arabidopsis- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin.» 2003.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV et al « A t(1; 19)(q10; oligodendroglioma., p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with Cancer Res.» 2006.
- Jeremy Schwartzentruber, Andrey Korshunov, Xiao-Yang Liu, David T. W. Jones, Elke Pfaff, Karine Jacob, Dominik Sturm, Adam M. Fontebasso, Dong-Anh Khuong

- Quang, et al «Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma.» *Nature*, 2012.
- Jessen KR, Mirsky R. «"Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein".» *Nature*, 1980.
- Jinghui Zhang, Li Ding, Linda Holmfeldt, Gang Wu,¹ Sue L. Heatley, Debbie Payne-Turner, John Easton, Xiang Chen, Jianmin Wang, Michael Rusch, Charles Lu, Shann-Ching Chen, Lei Wei, J. Racquel Collins-Underwood, Jing Ma, et al «The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.» *nature*, 2012.
- Joel C. Eissenberg, and Ali Shilatifard. «Histone H3 Lysine 4 (H3K4) Methylation in Development and Differentiation.» 2010.
- Johnson WL¹, Yewdell WT¹, Bell JC¹, McNulty SM², Duda Z^{3,4}, O'Neill RJ^{3,4}, Sullivan BA², Straight AF¹. «RNA-dependent stabilization of SUV39H1 at constitutive heterochromatin.» 2017.
- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. «Epigenetic modifications as therapeutic targets.» 2010.
- Keogh, M.C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., et al «Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex.» 2005.
- Kim DH, Rhee JC, Yeo S, Shen R, Lee SK, Lee JW, Lee S . « "Crucial roles of mixed-lineage leukemia 3 and 4 as epigenetic switches of the hepatic circadian clock controlling bile acid homeostasis in mice". *Hepatology*.» 2015.
- Kline C, Felton E, Allen IE, et al «Survival outcomes in pediatric recurrent high-grade glioma: results of a 20year systematic review and meta-analysis.» *J Neurooncol* , 2018.
- Klonou Alexia, Danai Spiliotakopoulou, Marios S. Themistocleous, Christina Piperi, Athanasios G. Papavassiliou. «Chromatin remodeling defects in pediatric brain tumors.» 2018.

- Kolb EA, Gorlick R, Houghton PJ, et al «Initial testing (stage 1) of AZD6244 (ARRY-142886) by the Pediatric Preclinical Testing Program.» *Pediatr Blood Cancer* , 2010.
- Kowalski A, Palyga J. « Linker histone subtypes and their allelic variants. .» *Cell Biol*, 2013.
- Krueger DA, Care MM, Agricola K, et al «Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma.» 2013.
- Krueger DA, Care MM, Agricola K, et al giant cell astrocytoma. «Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal .» . *Neurology* , 2013.
- Lagst G, Becker PB. «Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?» 2004.
- Lai, X., Deng, Z., Guo, H., Zhu, X., & Tu, W. «HP1 α is highly expressed in glioma cells and facilitates cell proliferation and survival.» 2017.
- Lee JE, Wang C, Xu S, Cho YW, Wang L, Feng X, et al "*H3K4 mono- and dimethyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation.*, 2013.
- Lee JS, Smith E, Shilatifard A. « "The language of histone crosstalk".» *Cell*, 2010.
- Lehnertz B1, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. «Lehnertz B1, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH.» 2003.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. «Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF.» 2006.
- Li Jun, Duns Gerben, Westers Helga, Sijmons Rolf, Anke van den Berg, and Klaas Kok. «SETD2: an epigenetic modifier with tumor suppressor functionality.» 2016.

- Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, Weisenberger DJ, Egger G, Takai D, Gonzales FA, Jones PA. «Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome.» 2004.
- Liu BL, Cheng JX, Zhang X et al «Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients.» 2010.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee W, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. «The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.» 2016.
- 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, Ohgaki H, P. «International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading.» 2014.
- Lu, Chao, και συν. «"IDH Mutation Impairs Histone Demethylation and Results in a Block to Cell Differentiation".» 2012.
- Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. «Regulation of alternative splicing by histone modifications.» *Science.*, 2010.
- Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, Neuberger DS, Sinha AU, Sallan SE, Silverman LB, Kung AL, Lo Nigro L, Ebert BL, Armstrong SA Nat Commun. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in pae. « Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in pae.» χ.χ.
- Mar BG, Chu SH, Kahn JD, Krivtsov AV, Koche R, Castellano CA, Kotliar JL, Zon RL, McConkey ME, Chabon J, Chappell R, Grauman PV, Hsieh JJ, Armstrong SA, Ebert BL Blood. «SETD2 alterations impair DNA damage recognition and lead to resistance to chemotherapy.»

Masui K., Cloughesy T.F., Mischel P.S. « Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies.» 2014.

Matsuura, Yuhki Yokoyama Miki Hieda Yu Nishioka Ayaka Matsumoto Satomi Higashi Hiroshi Kimura Hirofumi Yamamoto Masaki Mori Shuji Matsuura Nariaki. «Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo.» 2013.

mediadrumworld.com. *EYE OF SCIENCE*

Meel MH, Schaper SA, Kaspers GJ, et al « Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric highgrade glioma. .» *Cell Mol Life Sci* , 2018.

Melanie Braig, Soyoung Lee, Christoph Loddenkemper, Cornelia Rudolph, Antoine H.F.M. Peters, Brigitte Schlegelberger, Harald Stein, Bernd Dörken, Thomas Jenuwein & Clemens A. Schmitt. «Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development.» *nature*, 2005.

Milne, T. et al « MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. .» 2002.

Mitchell, Henikoff Steven and Smith. «Histone Variants and Epigenetics.» 2014.

Mo W, Liu Q, Lin CC, Dai H, Peng Y, Liang Y, Peng G, Meric-Bernstam F, Mills GB, Li K, Lin SY. «mTOR Inhibitors Suppress Homologous Recombination Repair and Synergize with PARP Inhibitors via Regulating SUV39H1 in BRCA-Proficient Triple-Negative Breast Cancer.» 2016.

Morin Ryan D., Maria Mendez-Lago,Marco A. Marra et al «Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma.» *Nature*, 2011.

Nagarajan RP1, Costello JF. « Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme.» 2009.

Nathan J. Robison, Mark W. Kieran. «Diffuse intrinsic pontine glioma: A reassessment. J. Neurooncol.» 2014.

- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. «Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation.» 2002.
- Okano M1, Bell DW, Haber DA, Li E. «DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. .» 1999.
- Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C, et al «"The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development".» 2015.
- Prasad R, Zhadanov AB, Sedkov Y, Bullrich F, Druck T, Rallapalli R,. "*Structure and expression pattern of human ALR, a novel gene with strong homology to ALL-1 involved in acute leukemia and to Drosophila trithorax*". 1997.
- Pruss Dmitry, Hayes Jeffrey , Wolffe Alan P. «Nucleosomal anatomy- where are the histones?» 1995.
- Rachel Tobias Baldwin, Susan Preston-Martin. «Epidemiology of brain tumors in childhood—a review.» 2004.
- Ramsahoye BH1, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. «Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a.» 2009.
- Rao RC, Dou Y. «Rao RC "Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases". Nature Reviews.» 2015.
- 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.» 2000.
- Rudà R, Bello L, Duffau H, et al «Seizures in low-grade gliomas: natural history, pathogenesis, and outcome after treatments.» . *Neuro Oncol*, 2012.

- Sarakbi W Al, W Sasi, WG Jiang, T Roberts, RF Newbold, K Mokbel. «The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinicopathological parameters.» 2009.
- Schuettengruber B, Martinez AM, Iovino N, et al «Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. .» *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010.
- Seligson DB, Horvath S, McBrien MA et al « Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers.» 2009.
- SepSA, G. Levidou, A. Gargalionis, C. Adamopoulos, A. Spyropoulou, G. Dalagiorgou, I. Thymara, E. Boviatsis, M.S. Themistocleous, K. Petraki, G. Vrettakos, V. Samaras, A. Zisakis, E. Patsouris, C. Piperi, and P. Korkolopoulou,. «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.» 2015.
- Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, et al « Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells.» 2014.
- Sidler C, Woycicki R, Li D, Wang B, Kovalchuk I, Kovalchuk O. «A role for SUV39H1-mediated H3K9 trimethylation in the control of genome stability and senescence in WI38 human diploid lung fibroblasts.» 2014.
- Sievert AJ, Fisher MJ. «Pediatric low-grade gliomas. .» 2009.
- Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, et al « Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas.» . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2013.
- Skucha Anna, Ebner Jessica , and Grebien Florian. «Roles of SETD2 in Leukemia—Transcription, DNA-Damage, and Beyond.» 2019.
- Spencer VA, Davie JR. « Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression.» 1999.

- Spyropoulou A., Piperi Ch., Adamopoulos Ch., Paravassiliou A.G. «Deregulated Chromatin Remodeling in the Pathobiology of Brain Tumors.» 2013.
- Stupp R., Brada M., van den Bent M. J., Tonn J.-C., Pentheroudakis G. «clinical practice guidelines High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Onco.*» 2014.
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V et al « Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. .» *Cancer Cell* , 2012.
- Sumana Chakravarty, Arvind Kumar. «Histone lysine methyltransferases and demethylases.» Στο *International Review of Neurobiology*,. 2014.
- Susanne Kleff, Erik D. Andrulis, Carl W. Anderson and Rolf Sternglanz. «Identification of a Gene Encoding a Yeast Histone H4 Acetyltransferase.» 1995.
- Tachibana, Yoichi Shinkai and Makoto. «H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP.» 2011.
- Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK. «Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance.» *Curr Cancer Drug Targets*, 2012.
- Theodoros Kantidakis, Marco Saponaro, Richard Mitter, Stuart Horswell, Andrea Kranz, Stefan Boeing, Ozan Aygün, Gain P. Kelly, Nik Matthews, Aengus Stewart, A. Francis Stewart and Jesper Q. Svejstrup 1 Mutation of cancer driver MLL2 results in tr. «Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability.» 2016.
- Toska E, Osmanbeyoglu HU, Castel P, Chan C, Hendrickson RC, Elkabets M, Dickler MN, Scaltriti M, Leslie CS, Armstrong SA, Baselga J (March 2017). "PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D". «Toska E.» 2017.
- Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M.M., Saint, M., Kumar, S., et al «Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes.» *Nature*, 2012.

- Wagner EJ, Carpenter PB. « Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol .» Cell Biol*, 2012.
- Warren Fiskus, Yongchao Wang, Arun Sreekumar, Kathleen M. Buckley, Huidong Shi, Anand Jillella, Celalettin Ustun, Rekha Rao, Pravina Fernandez, Jianguang Chen, Ramesh Balusu, Sanjay Koul, Peter Atadja, Victor E. Marquez, Kapil N. Bhalla, «Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells» 2009
- Warren. «Pediatric high-grade gliomas: survival at what cost?» 2012.
- Wells EM, Packer RJ. «Pediatric brain tumors. *Continuum (Minneapolis)* .» 2015.
- Whitney L Johnson, William T Yewdell, Jason C Bell, Shannon M McNulty, Zachary Duda, Rachel J O'Neill, Beth A Sullivan, Aaron F Straight. «RNA-dependent stabilization of SUV39H1 at constitutive heterochromatin.» 2017.
- Wolffe AP, Guschin D. «Chromatin structural features and targets that regulate transcription.» 2000.
- Wolffe AP, Hayes JJ. «Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.*» 1999.
- Wozniak G.G. and Strahl, B.D. « Hitting the 'mark': interpreting lysine methylation in the context of active transcription.» 2014.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Beckfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M. et al « Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas.» 2012.
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. «A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling.» 2006.
- Yokoyama Y1, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, Yamamoto H, Mori M, Matsuura S, Matsuura N. «Cancer-associated upregulation of histone H3

- lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo.» 2013.
- Yuan H, Li N, Fu D, Ren J, Hui J, Peng J, Liu Y, Qiu T, Jiang M, Pan Q, Han Y, Wang X, Li Q, Qin JJ Clin Fontebasso AM, Liu XY, Sturm D, Jab. « Invest Chromatin remodeling defects in pediatric and young adult glioblastoma: a tale of a variant histone 3 tail.»
- Yuhki Yokoyama, Miki Hieda, Yu Nishioka, Ayaka Matsumoto, Satomi Higashi, Hiroshi Kimura, Hirofumi Yamamoto, Masaki Mori, Shuji Matsuura, Nariaki Matsuura. «Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo.» 2013.
- Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al (June 2013). "De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease" (PDF). Nature.,. «Zaidi S.» 2013.
- Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, et al «"Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis".» 2015.
- Zhang J, Wu G, Miller CP, et al «Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric lowgrade gliomas.» 2013.
- Zhao T, Ma XD, Huang YQ. «Experimental study of SUV39H1 gene specific siRNA in human leukemia cell line.» 2013.
- Zhu, Pao, Huynh, Suh ,Tonnu, Nederlof, Gage, Verma. «BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing.» 2011.
- Zhuo, Jiayi WangWenzhe YanXiaofei PengYafeng JiangLiyu HeYouming PengEmail authorXian ChenMuyao YeHui. «Functional Role of SUV39H1 in Human Renal Tubular Epithelial Cells Under High-glucose Ambiance.» 2018.

