

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ
ΣΚΟΥΤΕΡΗΣ – ΔΟΣΧΟΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΆΝΘΡΩΠΟ: ΈΡΕΥΝΑ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»**

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή (σ. 5)
 - i. Ιστολογία του πνεύμονα (σ. 6)
 - ii. Παθολογοανατομία των όγκων του πνεύμονα (σ. 9)
 - a. Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (σ. 9)
 - b. Πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα (σ. 12)
 - c. Καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων (σ. 14)
 - d. Άλλοι τύποι NSCLC (σ. 14)
 - e. Νευροενδροκρινείς όγκοι (σ. 15)
 - f. Τυπικό καρκινοειδές (σ. 16)
 - g. Άτυπο καρκινοειδές (σ.17)
 - h. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα (σ. 17)
 - i. Νευροενδοκρινές καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (σ. 17)
 - j. Άλλα είδη όγκων του πνεύμονα (σ. 19)
 - iii. Σταδιοποίηση των όγκων του πνεύμονα (σ. 19)
 - iv. Επιγενετική στον καρκίνο (σ. 21)
 - a. Επιγενετική στον καρκίνο του πνεύμονα (σ. 23)
 - b. Επιγενετική της ογκογένεσης στο NSCLC (σ. 24)
 - c. Επιγενετική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του NSCLC και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (σ. 25)
 - d. Επιγενετική της ογκογένεσης του SCLC (σ. 26)
 - v. Απορρύθμιση των μηχανισμών σχετικών με το μικροπεριβάλλον του όγκου (σ. 27)
 - vi. Απορρύθμιση των μοριακών μηχανισμών (σ. 32)
 - vii. Απορρύθμιση των σημάτων του μικροπεριβάλλοντος κατά την επιδιόρθωση του πνευμονικού ιστού (σ. 33)
 - viii. Απορρύθμιση των αντλιών ιόντων κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης (σ. 35)

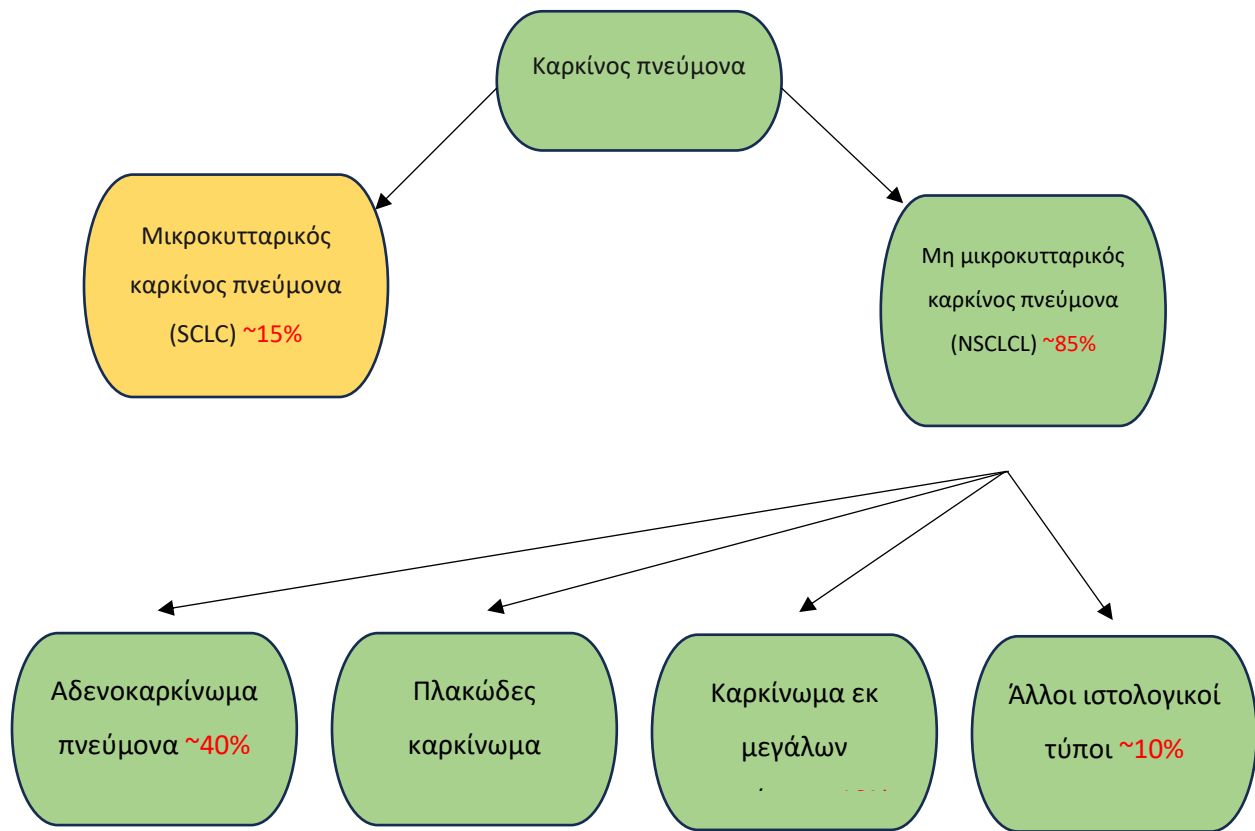
- ix. Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός κατά τη διάρκεια της μεσεγγυματογενούς μετατροπής (σ. 36)
 - x. Γονιδιακές μετατροπές ανάλογα τον υπότυπο (σ. 37)
2. Μηχανισμοί απορρύθμισης της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα (σ. 39)
- i. Απορρύθμιση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα (σ. 39)
 - ii. Απορρύθμιση των DNMTs (σ. 42)
 - iii. Απορρύθμιση των TETs (σ. 44)
 - iv. Υπομεθυλίωση (σ.45)
 - v. Υπερμεθυλίωση (σ.46)
 - vi. Τα γονίδια *CDKN2A*, *RASSF1A*, *PTEN*, *TERT* και *SNCG* (σ. 48)
 - a. Το γονίδιο *CDKN2A* (σ. 48)
 - b. Το γονίδιο *RASSF1A* (σ. 50)
 - c. Το γονίδιο *PTEN* (σ.51)
 - d. Το γονίδιο *TERT* (σ.53)
 - e. Το γονίδιο *SNCG* (σ. 56)
3. Μεθυλίωση του DNA στους διάφορους ιστολογικούς υπότυπους του καρκίνου του πνεύμονα (σ.58)
- i. Μεθυλίωση του DNA στο μη μικροκυτταρικό και μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (σ.58)
 - ii. Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (σ.60)
4. Εφαρμογές στην κλινική πράξη (σ.63)
- i. Η μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο του πνεύμονα (σ.63)
 - ii. Η μεθυλίωση στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (σ.63)
 - iii. Η μεθυλίωση στην πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (σ.65)
 - iv. Μεθυλίωση του DNA στο αίμα για πρώιμη διάγνωση (σ.66)

- v. Αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA στο αίμα για την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (σ.69)
 - vi. Κάπνισμα και μεθυλίωση του DNA (σ.71)
 - vii. Συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και του καρκίνου του πνεύμονα (σ.73)
 - viii. Μοριακές μεταλλάξεις και μεθυλίωση (σ.73)
5. Συμπεράσματα (σ.76)
6. Βιβλιογραφικές αναφορές (σ.79)

1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η δεύτερη πιο συχνή κακοήθεια παγκοσμίως και η πρώτη αιτία θανάτου σχετιζόμενου με τον καρκίνο, με 2,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 1,9 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως [1]. Η διάκριση βάσει της ιστολογικής ταξινόμησης γίνεται σε δύο ομάδες: σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non small-cell Lung cancer – NSCLC), που αποτελεί περίπου το 85% των περιστατικών, και μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (small-cell Lung cancer – SCLC), που αποτελεί περίπου το 15% των περιστατικών (σχήμα 1). Ο NSCLC διακρίνεται περαιτέρω σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (40%), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (25%) και καρκίνο πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα με ή χωρίς νευροενδοκρινή χαρακτήρα (~10%) [2]. Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις στην πρώιμη διάγνωση και τη θεραπεία, οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο με σημαντικά χειρότερη πρόγνωση, με την 5ετή επιβίωση να είναι πτωχή (22% για όλα τα στάδια συνδυαστικά) [3,4]. Συνεπώς, η ανάγκη για εύρεση νέων μεθόδων για την πιο έγκαιρη διάγνωση, την παρακολούθηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων, την αναγνώριση των ασθενών που θα ανταποκριθούν ή όχι στη θεραπεία καθώς και σε ποιο είδος θεραπείας είναι εμφανής

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς για την καρκινογένεση είναι η μεθυλίωση των υποκινητών του DNA. Η μεθυλίωση, είτε πρόκειται για υπερμεθυλίωση είτε για υπομεθυλίωση, πρόκειται για ένα επιγενετικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και των παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει διαταραχές στη μεθυλίωση πολλών γονιδίων στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης του πνεύμονα, από το κάπνισμα και τις προκαρκινικές αλλοιώσεις έως τις πιθανότητες μετάστασης και της πρόγνωσης του νοσήματος, ανεξαρτήτως του ιστολογικού υπότυπου. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να ανιχνευθούν στα πτύελα, σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ενώ οι πιο πρόσφατες μελέτες τις ανιχνεύουν και στο αίμα. Σκοπός αυτής της διπλωματικής είναι η ανάλυση της διαδικασίας της μεθυλίωσης, η σημασία που έχει στην καρκινογένεση και η εφαρμογή της στην κλινική πράξη, προκειμένου να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα.



Σχήμα 1: Διάγραμμα με τις κυριότερους ιστολογικούς τύπους του καρκίνου του πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε μικροκυτταρικό καρκίνο (SCLC) και μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC), ο οποίος μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα, καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων και άλλους ιστολογικούς τύπους. Με κόκκινα γράμματα η συχνότητα εμφάνισης κάθε υπότυπου.

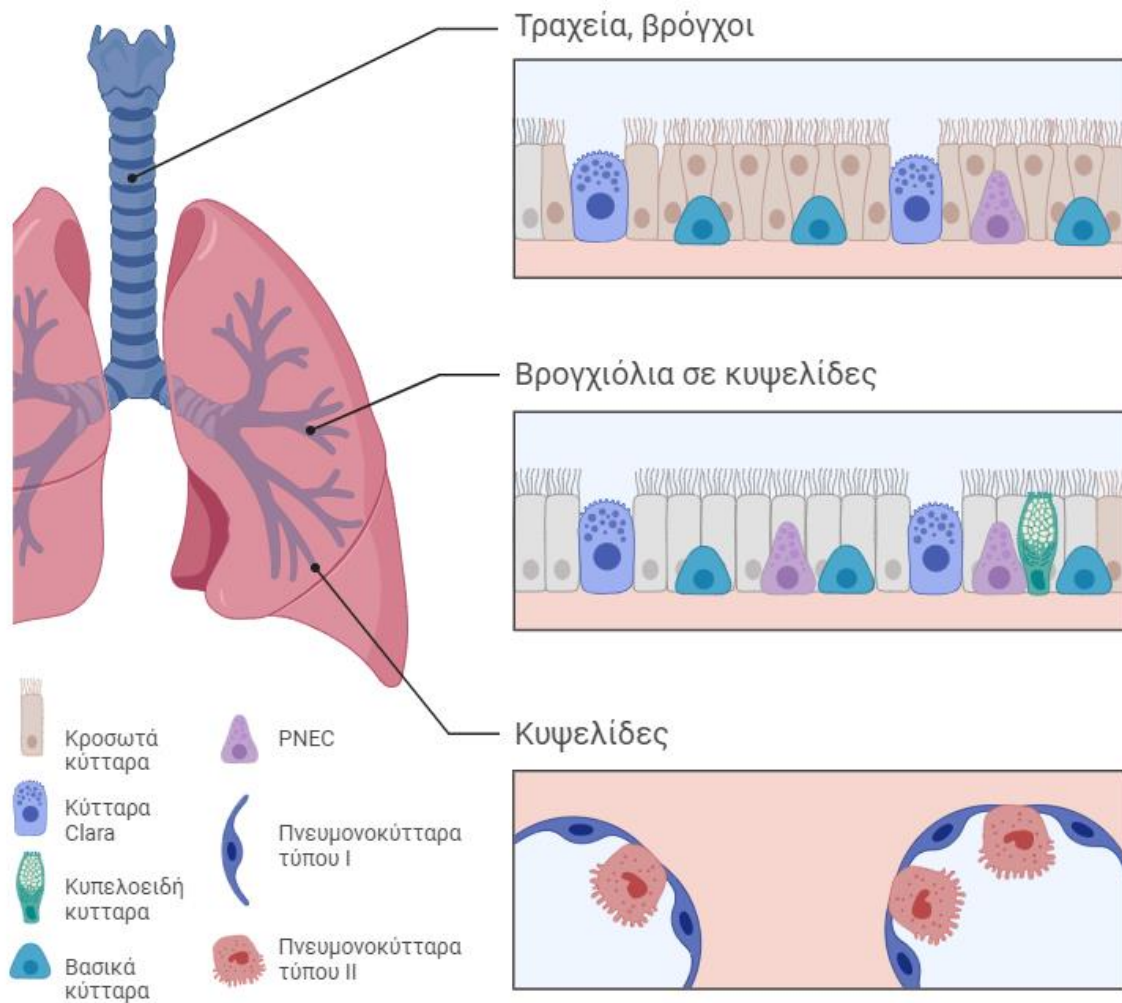
1.ι. Ιστολογία του πνεύμονα

Ο πνευμονικός ιστός αποτελείται φυσιολογικά από αναπνευστικό επιθήλιο το οποίο καλύπτει την τραχεία, τους βρόγχους, τα βρογχιόλια και τις κυψελίδες προκειμένου να πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων. Τα κύρια επιθηλιακά κύτταρα, όπως τα κυπελλοειδή, τα κροσωτά, τα βασικά, τα ενδογενή πνευμονικά νευροενδοκρινή κύτταρα (Pulmonary Neuroendocrine cells – PNECs) βρίσκονται στο ψευδοπολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο, ενώ τα κύτταρα Clara βρίσκονται κυρίως στα βρογχιόλια. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν σαν κύριο ρόλο την προστασία του πνεύμονα από τραυματισμούς και λοιμώξεις, τη διατήρηση της ομοιόστασης και τη διακοπή της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα κύτταρα Clara έχουν σαν κύριο ρόλο την παραγωγή βλέννας και λιπιδίων για τη διατήρηση της υγρασίας των αεραγωγών. Τα πνευμονοκύτταρα καλύπτουν το κυψελιδικό επιθήλιο και διακρίνονται σε τύπου I και II. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου I καλύπτουν το 95% της επιφάνειας των κυψελίδων. Είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό της δομής των κυψελίδων και την ανταλλαγή των αερίων. Σε περίπτωση βλάβης, καθώς δεν φέρουν πυρήνα, δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Τα

πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι περισσότερα σε αριθμό από τα τύπου I, όμως καλύπτουν μικρότερη επιφάνεια λόγω του μεγέθους τους. Η βασική τους λειτουργία είναι η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της δομής της κυψελίδας, η παραγωγή βλέννας για την παγίδευση ρύπων και μικροοργανισμών, και η διαφοροποίησή τους σε πνευμονοκύτταρα τύπου I σε περίπτωση βλάβης τους [5].

Όταν ένα κύτταρο του πνεύμονα υφίσταται βλάβη πολλά από τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως τα βασικά, τα Clara και τα πνευμονοκύτταρα τύπου II δρουν ως αρχέγονα κύτταρα προκειμένου να αντικατασταθεί αυτό που καταστράφηκε. Σε περίπτωση βλάβης από ναφθαλίνη τα PNECs μπορεί να αντικαταστήσουν τα κυλινδρικά και τα κύτταρα Clara. Η δραστηριότητα αυτών των κυττάρων περιορίζεται στο σημείο στο οποίο βρίσκονται. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι πέρα από αυτά τα κύτταρα εμπλέκονται και άλλοι τύποι στη θεραπεία μακρινών θέσεων, όπως το LNEP (lineage-negative epithelial progenitor), ένας πρόγονος των βασικών κυττάρων που λέγεται BESC (bronchial epithelial stem cell) και μια υποκατηγορία των πνευμονοκυττάρων τύπου II που λέγονται AEP (alveolar epithelial progenitor) [5]. Τα κύτταρα αυτά μαζί με τα γνωστά προγονικά κύτταρα εμπλέκονται στην εμφάνιση των καρκινικών προγονικών κυττάρων (cancer stem cells – CSCs), καθώς πληρούν κάποιες βασικές προϋποθέσεις: παρουσιάζουν μακρά επιβίωση, εμφανίζονται μετά από βλάβη στο DNA και φλεγμονή, μπορεί να επιβιώσουν μέτρια ή σοβαρή βλάβη και να διαφοροποιηθούν για να επιφέρουν την ομοιόσταση.

Η συνεχής βλάβη στο πνευμονικό επιθήλιο διαταράσσει τη φυσιολογία των πνευμόνων, προκαλώντας διαταραχή στη δομή, τη λειτουργικότητα και χρόνια φλεγμονή, οδηγώντας σε βλάβη στο DNA και στις πρωτεΐνες. Η διαταραχή της δομής και της λειτουργικότητας περιλαμβάνει αλλοίωση σε λειτουργίες επιβίωσης του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων μεταβολών στη χρωματίνη, βιοηλεκτρικά συμβάντα, μηχανικό στρες, και χημικές διαβαθμίσεις. Το μικροπεριβάλλον που παρουσιάζει χρόνια φλεγμονή μπορεί τελικά να οδηγήσει σε βλάβες που δεν επιδιορθώνονται ορθώς, το οποίο βοηθάει στην εμφάνιση CSCs και την καρκινογένεση. Ενδοκυττάρια βλάβη στο DNA μπορεί να προκληθεί από τοξικούς παράγοντες ή από αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species – ROS) που παράγονται επίσης από χρόνια φλεγμονή. Η παρατεταμένη βλάβη του DNA μπορεί να προκαλέσει τα προγονικά κύτταρα να συσσωρεύσουν γονιδιακές βλάβες, που σε συνδυασμό με επιγενετικούς παράγοντες, οδηγεί στη δημιουργία του όγκου [5].



Εικόνα 1: Βασικά κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου του πνεύμονα και των κύριων βρόγχων. Τα κροσωτά, τα κυπελοειδή, τα βασικά και τα PNEC κύτταρα βρίσκονται κυρίως στο επιθήλιο και είναι υπεύθυνα για την προστασία του πνεύμονα. Τα κύτταρα Clara έχουν σαν κύριο ρόλο την παραγωγή βλέννας και λιπιδίων για τη διατήρηση της υγρασίας των αεραγωγών. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου I είναι υπεύθυνα για τη δομή των κυψελίδων και την ανταλλαγή των αερίων. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι υπεύθυνα για την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και την επιδιόρθωση των βλαβών. PNEC: pulmonary neuroendocrine cell.

1.ii. Παθολογοανατομία των όγκων του πνεύμονα

Οι πρωτοπαθείς κακοήθεις όγκοι του πνεύμονα διακρίνονται σε δύο κύριες υποκατηγορίες: το μη μικροκυτταρικό (NSCLC), που αποτελεί την πλειοψηφία των περιστατικών, και το μικροκυτταρικό (SCLC), που αποτελεί περίπου το 15% των περιστατικών. Το NSCLC διακρίνεται περαιτέρω σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα, και καρκίνο πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα.

1.ii.a Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα

Τα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα είναι ο συχνότερος ιστολογικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα. Αποτελούν περίπου το 40% του συνόλου των διαγνώσεων, με την επίπτωση τους να αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Συνήθως εμφανίζεται με μια περιφερική βλάβη με κεντρική ίνωση και πιθανή έλξη του υπεζωκότα. Άλλοι πιθανοί τρόποι εμφάνισης περιλαμβάνουν κεντρική βλάβη, διάχυτη κατανομή σε ολόκληρο τον πνευμονικό λοβό, αμφοτερόπλευρη μικροζώδη κατανομή και πάχυνση του υπεζωκότα. Παρουσιάζει συνήθως αδενική διαφοροποίηση ή παραγωγή βλέννης. Συνήθως στην ανοσοϊστοχημεία εκφράζουν πνευμονοκυτταρικούς δείκτες, με το TTF-1 και τη NapsinA να εκφράζονται σε περισσότερο από το 85% των αδενοκαρκινωμάτων, βοηθώντας στη διαφορική διάγνωση των χαμηλής διαφοροποίησης όγκων. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή διάγνωση έχει αναγνωρίσει πολλούς στόχους που μπορούν επίσης να βοηθήσουν στη διαφοροποίησή τους σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς υπότυπους, όπως είναι τα EGFR, ALK, BRAF, RET, MET και KRAS [6]. Τα αδενοκαρκινώματα παρουσιάζουν περαιτέρω διάκριση ανάλογα τα χαρακτηριστικά τους και το μέγεθος του όγκου.

Το αδενοκαρκίνωμα *in situ* (AIS) παρουσιάζεται συνήθως ως σχετικά μικρού μεγέθους όγκοι (<3cm) με νεοπλασματικά κύτταρα να αναπτύσσονται πάνω σε προϋπάρχουσες κυψελιδικές δομές (λεπιδικό πρότυπο ανάπτυξης) χωρίς σημεία διήθησης του στρώματος, των αγγείων ή του υπεζωκότα. Ως λεπιδικού χαρακτηρίζονται τα καρκινικά κύτταρα που αναπτύσσονται πάνω στην επιφάνεια φυσιολογικών κυψελίδων και απεικονιστικά χαρακτηρίζεται από θαμβή ύαλο. Τα περισσότερα AIS είναι μη βλεννοπαραγωγά, με μικρή έως μέτρια πλειομορφική κυβοειδή προς κυλινδρική διάταξη των κυττάρων του όγκου στο τοίχωμα της κυψελίδας. Δεν υπάρχει δεύτερο θηλώδες ή μικροθηλώδες πρότυπο ανάπτυξης. Ένα μικρό ποσοστό αυτών των όγκων παρουσιάζουν παραγωγή βλέννης ή είναι μεικτού τύπου. Αν ο όγκος περιλαμβάνει μικρό στοιχείο διήθησης (<5mm) χαρακτηρίζεται ως μικροδιηθητικό αδενοκαρκίνωμα (Microinvasive adenocarcinoma - MIA). Η διήθηση συνήθως προκαλεί σχηματισμό δεσμοπλαστικού στρώματος και μπορεί να εμφανιστεί ως μη λεπιδικό πρότυπο ανάπτυξης, όπως ακινιώδες, θηλώδες, μικροθηλώδες ή συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης. Το MIA δεν

χαρακτηρίζεται μόνο από το περιορισμένο βαθμό διήθησης αλλά και από έλλειψη προχωρημένων μοτίβων διήθησης, όπως η νέκρωση του όγκου, η διήθηση λεμφικών αγγείων και του υπεζωκότα. Και οι δύο τύποι είναι χαμηλού βαθμού και έχουν επιβίωση στα 5 έτη σχεδόν 100% [6].

Τα διηθητικά αδενοκαρκινώματα είναι ένα συνονθύλευμα μορφολογικών υπότυπων και η κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση τον προεξέχοντα υπότυπο. Οι υπότυποι περιλαμβάνουν το λεπιδικό, τον ακινοειδή, το θηλώδη, το μικροθηλώδη και τα συμπαγή μοτίβα. Σε περίπτωση ύπαρξης σε μικρότερο ποσοστό κάποιου δεύτερου υπότυπου καταγράφεται ποσοστιαία σε πολλαπλάσια του 5%. Αυτή η κατηγοριοποίηση έχει προγνωστική σημασία, με την καλύτερη πρόγνωση να την παρουσιάζει το λιπιδικό τύπου, μέτρια πρόγνωση για τα ακινοειδή και τα θηλώδη αδενοκαρκινώματα και πτωχή πρόγνωση για τα συμπαγή και μικροθηλώδη αδενοκαρκινώματα [6].

Η λεπιδική ανάπτυξη είναι συχνό φαινόμενο στα αδενοκαρκινώματα. Το λεπιδικό πρότυπο ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από εξάπλωση των κυττάρων του όγκου κατά μήκος των υπαρχόντων κυψελιδικών δομών, αν και μπορεί να συνυπάρχει και σκληρυντική πάχυνση των διαφραγμάτων της κυψελίδας. Εκτός από την προϋπόθεση να είναι το κυρίαρχο πρότυπο ανάπτυξης πρέπει να συνυπάρχουν και μία ή περισσότερες προϋποθέσεις για να χαρακτηριστεί ένα αδενοκαρκίνωμα ως λεπιδικού τύπου. Αυτές είναι: πάνω από 5mm διήθησης (παρουσία δεσμοπλαστικού ή μυοϊνοβλαστικού στρώματος), διασπορά μέσω των κενών αέρος, διήθηση αγγείων, διήθηση του υπεζωκότα, νέκρωση του όγκου [6].

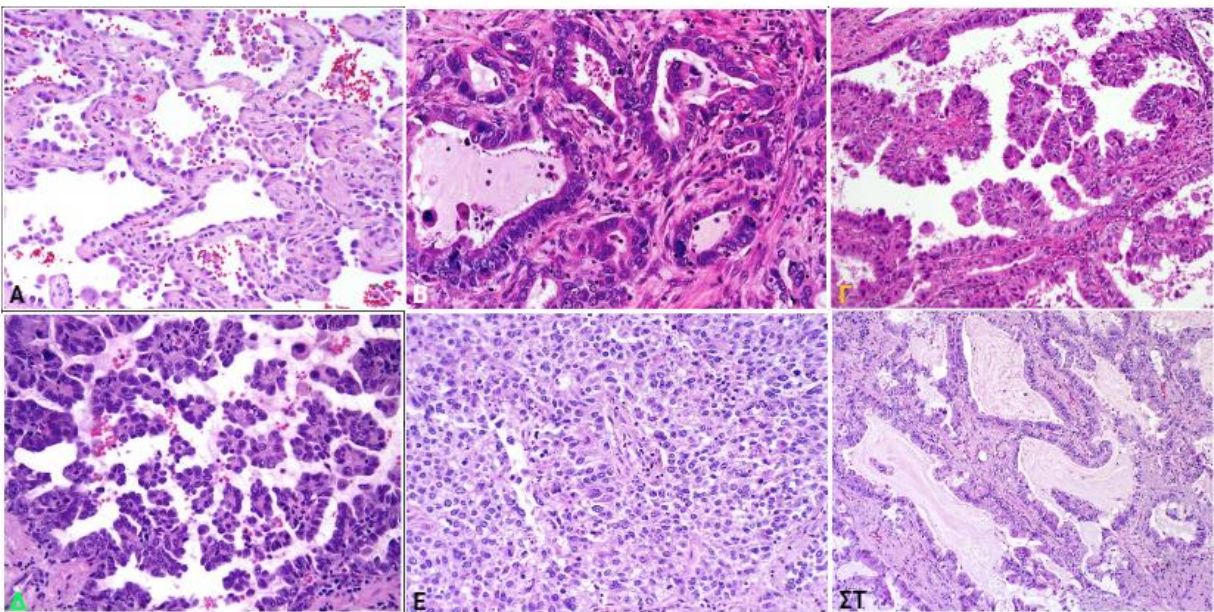
Το ακινοειδές αδενοκαρκίνωμα είναι ένας κοινός τύπος αδενοκαρκινώματος με τα κύτταρα του όγκου να διατάσσονται σε κλασική μορφή τύπου αδένου σε ινοελαστικό στρώμα. Δεν πρέπει να υπάρχει σύγχυση του δεσμοπλαστικού στρώματος αυτού του είδους αδενοκαρκινώματος με προϋπάρχουσες κυψελιδικές δομές με πάχυνση των τοιχωμάτων της κυψελίδας που μπορεί να εμφανίζονται σε λεπιδικό τύπου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα κύτταρα του όγκου που παρουσιάζουν πιο περίπλοκους σχηματισμούς, όπως είναι αυτός που μοιάζει με φωλιά, υποδηλώνουν πιο επιθετική συμπεριφορά [6].

Στο θηλώδες αδενοκαρκίνωμα τα κύτταρα του όγκου σχηματίζουν θηλώδη αρχιτεκτονική καθώς επενδύουν την επιφάνεια των διακλαδούμενων ινοαγγειακών πυρήνων. Η παρουσία των ινοαδενικών πυρήνων διαχωρίζει αυτόν τον υπότυπο από το μικροθηλώδη.

Στο μικροθηλώδες πρότυπο τα κύτταρα του όγκου σχηματίζουν ανεξάρτητες δέσμες χωρίς ινοαγγειακό πυρήνα και εμφανίζονται ως απομονωμένες, μικρές και συμπαγείς ομάδες κυττάρων. Μπορεί να υπάρχουν και ψαμμώδη σωμάτια.

Τα συμπαγή αδενοκαρκινώματα περιλαμβάνουν τους όγκους των οποίων τα κύτταρα σχηματίζουν ομάδες χωρίς μοτίβα, συμπεριλαμβανομένων και των χαμηλά διαφοροποιημένων και αδιαφοροποίητων όγκων που εκφράζουν ανοσοϊστοχημικούς δείκτες συμβατούς με αδενοκαρκίνωμα (όπως TTF-1 και NapsinA). Πρέπει να τονιστεί ότι συγκεκριμένοι δείκτες που σχετίζονται με έκφραση στα πλακώδη καρκινώματα, όπως το p63 και το p40 μπορεί να παρουσιάζουν εστιακή έκφραση στα συμπαγή αδενοκαρκινώματα [6].

Σπάνιες παραλλαγές των διηθητικών αδενοκαρκινωμάτων περιλαμβάνουν το διηθητικό βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα, το κολλοειδές, το εμβρυϊκό και το εντερικό αδενοκαρκίνωμα. Το διηθητικό βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα είναι συνήθως πολυεστιακό και τα κύτταρα του όγκου δεν έχουν έκφραση του TTF-1, όπως συμβαίνει συχνά στο κλασικό αδενοκαρκίνωμα. Τα εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα πρέπει να διακρίνονται από τα μεταστατικά καρκινώματα του παχέος εντέρου [6].



Εικόνα 2 : Αδενοκαρκινώματα πνεύμονα. Α) Λεπιδικό αδενοκαρκίνωμα. Β) Ακτινοειδές αδενοκαρκίνωμα. Γ) Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα. Δ) Μικροθηλώδες αδενοκαρκίνωμα. Ε) Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα. ΣΤ) Βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα.

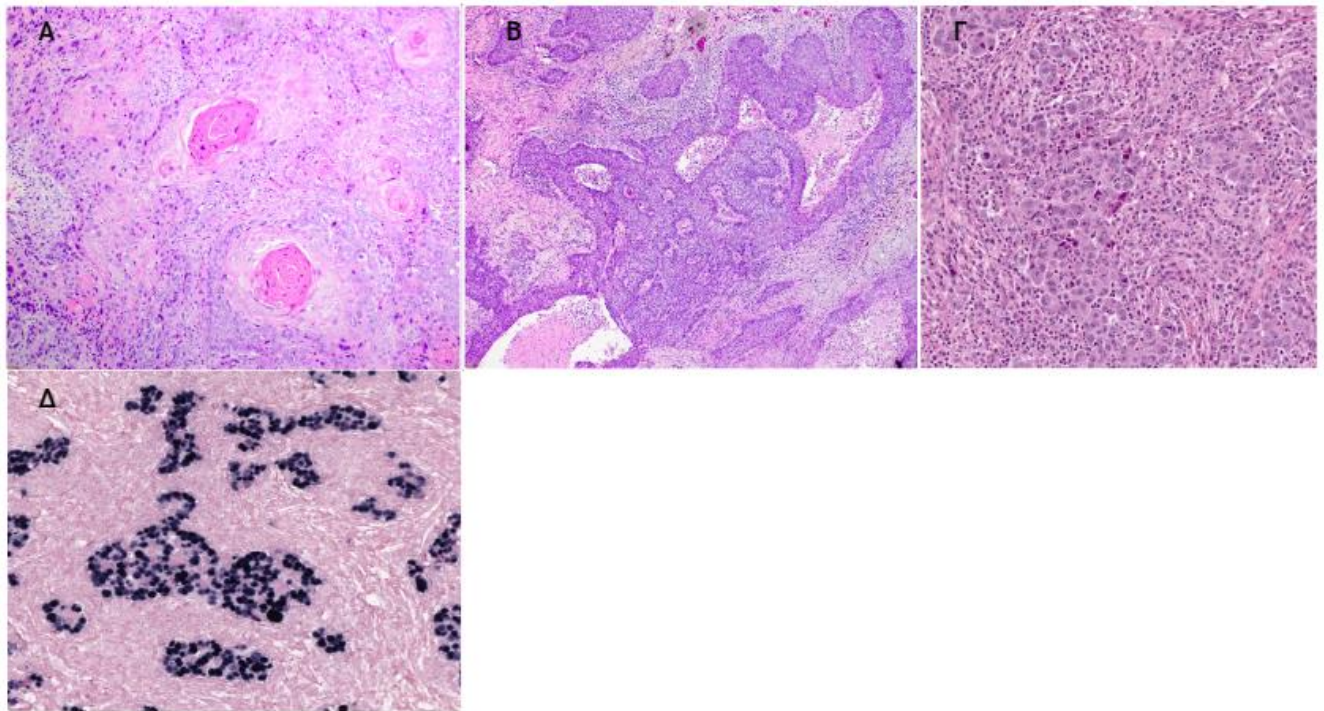
Grade	Διαφοροποίηση	Μοτίβα
1	Καλά διαφοροποιημένο	Λεπιδικό προεξέχων με καθόλου ή <20% υψηλού grade μοτίβα
2	Μέτρια διαφοροποιημένο	Ακινειδές ή θηλώδες προεξέχων με καθόλου <20% υψηλού grade μοτίβα
3	Χαμηλά διαφοροποιημένο	Οποιοσδήποτε όγκος με >20% υψηλού grade μοτίβα

Πίνακας 1: Βαθμός διαφοροποίησης αδενοκαρκινωμάτων πνεύμονα. Ο βαθμός διαφοροποίησης των αδενοκαρκινωμάτων πνεύμονα εξαρτάται από τον προεξέχοντα ιστολογικό τύπο και το βαθμό συνύπαρξης άλλων μοτίβων. Ο λεπιδικός τύπος έχει την καλύτερη διαφοροποίηση, ο ακινειδές και ο θηλώδης έχουν μέτρια διαφοροποίηση και ο μικροθηλώδης και ο συμπαγής τη χαμηλότερη.

1.ii.b Πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα

Τα πλακώδη καρκινώματα αποτελούν περίπου το 25% των καρκίνων του πνεύμονα. Η επίπτωσή τους έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια πιθανώς λόγω των αλλαγών στις συνήθειες του καπνίσματος. Συνήθως εμφανίζεται σε κεντρικό σημείο του πνεύμονα κοντά στους κύριους βρόγχους και μπορεί να σχηματίσει κοιλότητες όταν φτάσει σε μεγάλο μέγεθος. Στην εξέταση με το μικροσκόπιο το πλακώδες καρκίνωμα παρουσιάζει χαρακτηριστικά κερατινοποίηση και διακυτταρικές γέφυρες και έχει συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης. Τα κύτταρα του όγκου παρουσιάζουν συνήθως υπερχρωματικούς πυρήνες και μέτριο προς μεγάλο κυτταρόπλασμα. Μπορεί να υπάρχει ξεχωριστή κερατινοποίηση των κυττάρων ή ομάδες κυττάρων που σχηματίζουν φωλιές κερατίνης έκκεντρα. Τα κύτταρα του όγκου δεν παρουσιάζουν σχηματισμό σαν αδένια ή παραγωγή βλέννης. Τα πλακώδη καρκινώματα διακρίνονται περαιτέρω σε κερατινοποιημένα, μη κερατινοποιημένα, βασαλοειδή και λεμφοεπιθηλιακά. Ο βασαλοειδής υπότυπος παρουσιάζει διαφορετικό μοριακό προφίλ σε σχέση με τους άλλους δύο τύπους και χαρακτηρίζεται από αντοχή στην κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Η αναγνώριση των βασικών χαρακτηριστικών, όπως η κερατινοποίηση, ο σχηματισμός των φωλεών κερατίνης και οι διακυτταρικές γέφυρες, είναι που θέτει τη διάγνωση του πλακώδους καρκινώματος. Σε περίπτωση χαμηλής διαφοροποίησης, συγκεκριμένοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες όπως το p40, CK5/6, CK5, και p63, ενώ στην περίπτωση του λεμφοεπιθηλιακού υπότυπου και η παρουσία του EBV, χρησιμοποιούνται για

τη διαφορική διάγνωση. Το TTF-1 είναι συνήθως αρνητικό, αν και εστιακές ασθενώς θετικές χρώσεις έχουν αναφερθεί. Αν και οι όγκοι σε αυτή την κατηγορία συνήθως δεν υποβάλλονται σε μοριακό έλεγχο, η ανάδειξη μεταλλάξεων σε οδηγά γονίδια όπως το DDR2, το PIK3CA, το FGFR1 και το AKT1 μπορεί να βοηθήσουν στη μελλοντική εμφάνιση προσωποποιημένης θεραπείας [6]. Επίσης, ένα μικρό ποσοστό ασθενών με πλακώδη καρκινώματα, νεαρούς σε ηλικία και μη καπνιστές, μπορεί να εμφανίσουν μεταλλάξεις σε EGFR και MET ή αναδιατάξεις σε ALK και ROS1, οπότε είναι σκόπιμος ο έλεγχος και σε αυτή την υποομάδα. Η επιβίωση των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα είναι κατά κύριο λόγο καλύτερη σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα.



Εικόνα 3 : Πλακώδες καρκίνωμα. Α) Πλακώδες καρκίνωμα με νησίδες κερατίνης. Β) Βασαλοειδές πλακώδες καρκίνωμα. Γ) Λεμφοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Δ) Χρώση EBEB σε λεμφοεπιθηλιακό καρκίνωμα.

Μορφολογικά χαρακτηριστικά	Βαθμολογία	Επεξήγηση
Εκβλαστήσεις όγκου	1	Καθόλου εκβλαστήσεις
	2	<15 εκβλαστήσεις /10 οπτικά πεδία
	3	>15 εκβλαστήσεις/10 οπτικά πεδία
Μέγεθος φωλιάς όγκου	1	>15 κύτταρα (μεγάλη φωλιά)
	2	5-15 κύτταρα (μέτρια φωλιά)
	3	<5 (2-4 κύτταρα) (μικρή φωλιά)
	4	Διήθηση από μονήρες κύτταρο
Συνδυαστική βαθμολογία	2-3	Grade 1 (καλά διαφοροποιημένο)
	4-6	Grade 2 (μέτρια διαφοροποιημένο)
	7	Grade 3 (χαμηλά διαφοροποιημένο)

Πίνακας 2: Πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα. Ο Weichert και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα βαθμονομημένο σύστημα για τη διαφοροποίηση των πλακωδών καρκινωμάτων του πνεύμονα. Το σύστημα στηρίζεται στο άθροισμα δύο βαθμολογιών, των εκβλαστήσεων του όγκου και του μεγέθους της φωλιάς του όγκου.

1.ii.c Καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων

Το καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων (Large cell carcinoma – LCC) αποτελεί μια μειονότητα των NSCLC τα οποία δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση που να είναι ενδεικτική προέλευσης και δεν έχουν ειδικούς μορφολογικούς και ανοσοϊστοχημικούς χαρακτήρες που να ταιριάζουν με αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα ή νευροενδοκρινές. Συνήθως εμφανίζονται περιφερικά, με ογκώδη φαινότυπο και νεκρώσεις. Τα κύτταρα είναι συνήθως μεγάλα και πολυγωνικά σε σχήμα, με πλειόμορφο και κυστικό πυρήνα και σχηματίζουν φωλιές χωρίς συγκεκριμένο πρότυπο. Το καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων με νευροενδοκρινή χαρακτηριστικά (Large cell neuroendocrine carcinoma – LCNEC) κατατάσσεται στους νευροενδοκρινείς όγκους του πνεύμονα. Τα LCC αποτελούν λιγότερο από το 3% των όγκων του πνεύμονα. Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος πρέπει να είναι εκτενής, ώστε να μπορεί να γίνει διάκριση από τα χαμηλής διαφοροποίησης αδenoκαρκινώματα ή πλακώδη καρκινώματα. Η διάγνωση μπορεί να τεθεί μόνο σε περίπτωση εξαίρεσης του συνόλου του όγκου. Σε περιπτώσεις βιοψίας, η διάγνωση ορίζεται ως NSCLC μη προσδιορισμένο (NOS), καθώς δεν έχει γίνει πλήρης ανάλυση του συνόλου του όγκου και της προέλευσης των κυττάρων [6]. Η πρόγνωση του είναι δυσμενής, ειδικά για αυτά που δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένο υπότυπο.

1.ii.d Άλλοι τύποι NSCLC

Το αδenoπλακώδες καρκίνωμα είναι ένας σπάνιος υπότυπος του NSCLC που αποτελεί λιγότερο από 5% όλων των καρκίνων πνεύμονα. Πρόκειται για ένα υβριδικό καρκίνωμα που περιέχει στοιχεία και από τους δύο τύπος σε ποσοστό τουλάχιστον 10% το καθένα. Από κλινικής απόψεως, το αδenoπλακώδες

καρκίνωμα έχει παρόμοιες θεραπευτικές επιλογές με το αδenoκαρκίνωμα, έχοντας ωστόσο χειρότερη πρόγνωση [6].

Το πλειόμορφο, το ατρακτοκυτταρικό και το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα είναι σπάνιοι υπότυποι του NSCLC, αποτελώντας λιγότερο από το 3% των περιπτώσεων. Αυτοί οι όγκοι παρουσιάζουν ατρακτόμορφη ή γιγαντοκυτταρική κυτταρική διαφοροποίηση, που ομοιάζει με σάρκωμα. Η έκφραση της κυτοκερατίνης είναι σημαντική στη διαφορική διάγνωση από πρωτοπαθές σάρκωμα του πνεύμονα. Καθώς μερικοί όγκοι μπορεί να παρουσιάσουν ασθενή ή απουσία έκφρασης κοινών επιθηλιακών δεικτών, πολλαπλά αντισώματα έναντι των κερατίνων μπορεί να είναι απαραίτητα. Επιθηλιακοί δείκτες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η πανκυτοκερατίνη, η κυτοκερατίνη AE1/AE3, το CK7 και το EMA. Η πρόγνωσή τους είναι δυσμενής [6].

Το καρκινοσάρκωμα αποτελείται από NSCLC και σαρκωματοειδή στοιχεία, όπως ραβδομυοσάρκωμα, χονδροσάρκωμα και οστεοσάρκωμα. Τα καρκινώματα μπορεί σπανίως να εμφανιστούν από τα αδένια των βρόγχων, ανάλογα με τους ιστούς των σιελογόνων αδένων. Κύριοι ιστολογικοί τύποι περιλαμβάνουν το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα, το αδenoειδές κυστικό καρκίνωμα και το επιθηλιακό – μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα [6].

1.ii.e Νευροενδοκρινείς όγκοι

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι (Neuroendocrine tumors – NETs) σαν σύνολο αποτελούν το 20% περίπου των όγκων του πνεύμονα [6]. Τα κοινά τους χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν οργανοειδές πρότυπο ανάπτυξης, κοκκίωδες – τύπου αλατοπίπερου – μοτίβο χρωματίνης και την έκφραση πολλαπλών νευροενδοκρινών δεικτών, όπως η χρωμογρανίνη Α, η συναπτοφυσίνη και το CD56. Σε αυτή την ομάδα όγκων υπάρχει ετερογενής βαθμός διαφοροποίησης, με τους καλά διαφοροποιημένους όγκους να εμφανίζουν τα περισσότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά και τους χαμηλά διαφοροποιημένους όγκους να χάνουν μερικά ή τα περισσότερα από τα διακριτά νευροενδοκρινή διαφοροδιαγνωστικά κριτήρια. Αυτή η ιστολογική διαφοροποίηση χαρακτηρίζεται από το ρυθμό πολλαπλασιασμού του όγκου, το οποίο με τη σειρά του σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου και την πρόγνωση. Η κατηγοριοποίηση του 2021 του WHO διακρίνει αυτή την ομάδα σε 4 κύριες κατηγορίες: το τυπικό καρκινοειδές (typical carcinoid – TC), το άτυπο καρκινοειδές (atypical carcinoid – AC), το SCLC και το LCNEC [6, 7]. Καθώς ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να παρέχει ακριβείς πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση, χρησιμοποιείται μαζί με την παρουσία ή απουσία νέκρωσης για χωρίσει τα NET σε τρεις βαθμούς προγνωστικής σημασίας. Τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας NET αντιστοιχούν στο TC, τα μετρίου βαθμού στο AC, και τα υψηλού βαθμού στα SCLC και

LCNEC. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφράζεται ως ο αριθμός των μιτώσεων στις περιοχές μεγαλύτερης δραστηριότητας και να μετράται ως ο αριθμός των μιτώσεων σε 2mm². Ο δείκτης Ki-67 είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για την αξιολόγηση μικρών δειγμάτων από βιοψίες και για τη διάκριση των καρκινοειδών από τα SCLC και LCNEC. Συνήθως τα TC έχουν Ki-67 λιγότερο από 5%, τα AC 9 με 18% και τα SCLC και LCNEC να ξεπερνούν το 30%. Ωστόσο, το Ki-67 δεν είναι αποδεκτό κριτήριο για την κατηγοριοποίηση των νευροενδοκρινών νεοπλασμάτων, λόγω της απουσίας συγκεκριμένων κανόνων για τη μέτρησή του σε αυτούς τους όγκους του πνεύμονα, τα αντικρουόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα για την προγνωστική του σημασία και την απουσία σαφών διαφορών μεταξύ των διαφόρων υποτύπων [6].

1.ii.f Τυπικό καρκινοειδές

Τα τυπικά καρκινοειδή αποτελούν το 1% με 2% όλων των όγκων του πνεύμονα. Στον παιδιατρικό πληθυσμό ωστόσο, τα καρκινοειδή αποτελούν ένα συχνό τύπο όγκου. Τα τυπικά καρκινοειδή έχουν σχετικά μικρό μέσο όρο εμφάνισης (45-55 έτη) και συχνότερη διάγνωση σε πρώιμα στάδια (πάνω από 70% των περιστατικών εμφανίζονται σε στάδιο I), καθώς και καλύτερη πρόγνωση (πάνω από 90% 5ετή επιβίωση). Δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση με το κάπνισμα γιατί η επίπτωση του καπνίσματος στους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με TC είναι παρόμοια με το γενικό πληθυσμό. Το καρκινοειδές σύνδρομο εμφανίζεται σπάνια, εκτός αν υπάρχουν ηπατικές μεταστάσεις. Οι καρκινοειδείς όγκοι εμφανίζονται περίπου στο 5% των ασθενών με MEN 1, αν και οι περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζονται ως σποραδικά περιστατικά [6].

Τα TCs εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Τα κύτταρα του όγκου είναι κατά κύριο λόγο μικρά σε μέγεθος και ίδια σε σχήμα. Η διάταξη της χρωματίνης είναι κανονική ή ήπια κοκκιώδης χωρίς εμφανή πυρήνα. Υπάρχει μέτρια ποσότητα ηωσινόφιλου κυτταροπλάσματος, το οποίο κρατάει τα κύτταρα σε συγκεκριμένη απόσταση το ένα από το άλλο. Τα κύτταρα του όγκου είναι τυπικά οργανωμένα σε φωλιές, με δοκιδώδη, ταινιοειδή ή διάταξη σε ροζέτες. Κάποια TCs έχουν χαρακτηριστικά ατρακτοειδών κυττάρων οργανωμένα σε παράλληλη διάταξη. Παρουσιάζουν κατά κανόνα χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, με 1 μίτωση/mm², χωρίς νέκρωση. Συνήθως εκφράζουν τους κοινούς νευροενδοκρινείς δείκτες, όπως συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη και CD56.

1.ii.g Άτυπο καρκινοειδές

Όπως και τα TCs, τα AC είναι συχνότερα στις νεαρότερες ηλικίες και εμφανίζονται σε πρώιμα στάδια. Η συχνότητα εμφάνισης στους καπνιστές είναι διπλάσια σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η πρόγνωση είναι αρκετά μικρότερη από το TC, με την 5ετή επιβίωση να είναι λιγότερο από 80%.

Τα ACs έχουν μορφολογικούς χαρακτήρες παρόμοιους με τα TCs, αν και τα καρκινικά κύτταρα στα AC τείνουν να παρουσιάζουν μεγαλύτερη κυτταρολογική ατυπία. Τα βασικά χαρακτηριστικά των ACs είναι ο μέτριος ρυθμός πολλαπλασιασμού και η παρουσία νέκρωσης του όγκου. Τα ACs έχουν ένα μέτριο ρυθμό μίτωσης, μεταξύ 2 και 10/mm². Η νέκρωση του όγκου είναι εστιακά εμφανής και λιγότερο από 10% του όγκου [6].

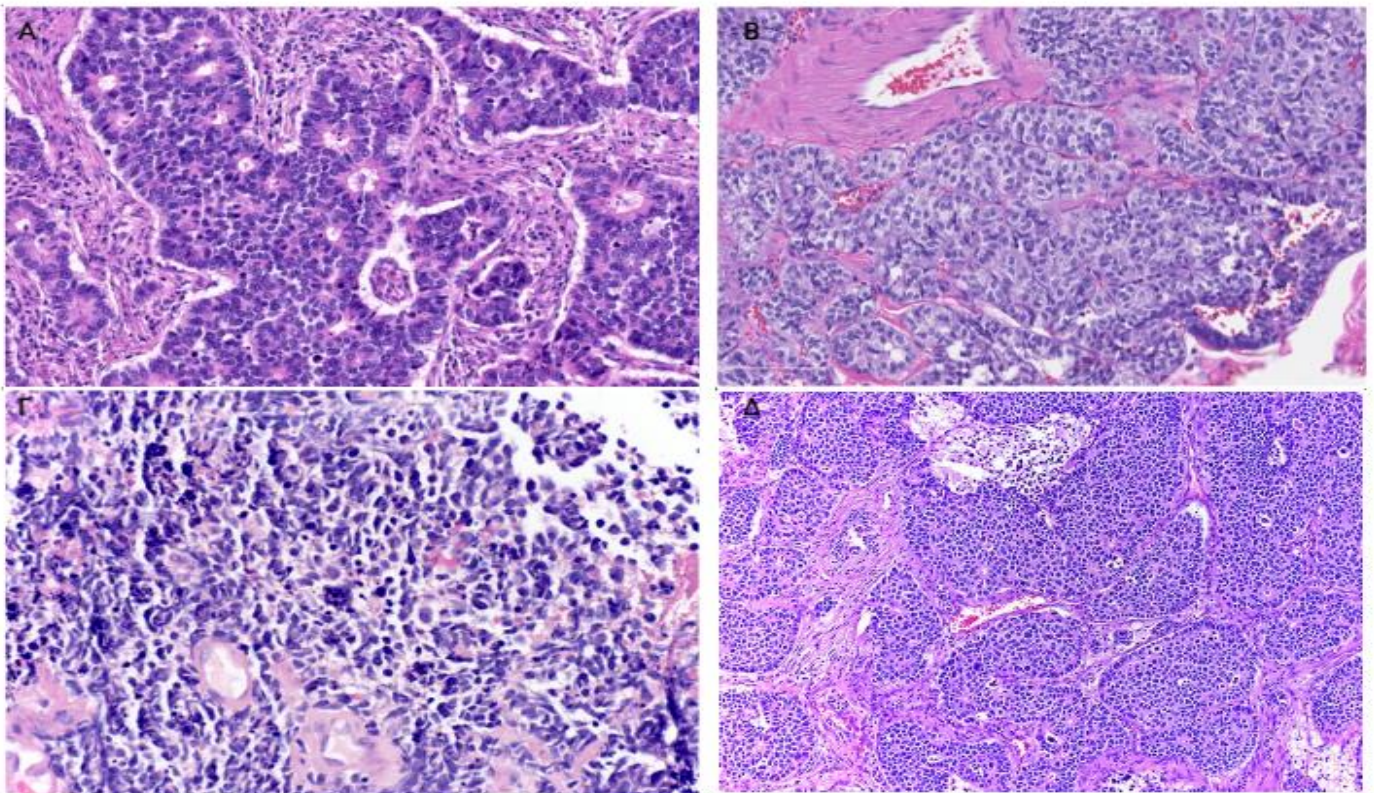
1.ii.h. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Το SCLC αποτελεί το 15% περίπου των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα []. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς έχουν ιστορικό καπνίσματος [4, 7]. Είναι ιδιαίτερα επιθετικός τύπου καρκίνου. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζονται με προχωρημένη νόσο κατά τη διάγνωση. Η επιβίωση στη 2ετία είναι λιγότερη από 10% [4]. Συνήθως εντοπίζεται κεντρικά σε μείζον αεραγωγό. Έχει διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά και προσεκτική αξιολόγηση της απλής χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης προσφέρει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια. Τα κύτταρα του όγκου είναι μικρά σε μέγεθος συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, συνήθως λιγότερο από τη διάμετρο τριών ώριμων λεμφοκυττάρων. Η χρωματίνη είναι κοκκώδης χωρίς εμφανή πυρήνα. Το κυτταρόπλασμα είναι μικρό και τα κυτταρικά όρια δυσδιάκριτα. Υπάρχει υψηλός αριθμός μιτώσεων, συνήθως μεγαλύτερος από 10 μιτώσεις/mm². Υπάρχει επίσης υψηλός ρυθμός απόπτωσης και συχνή παρουσία εκτεταμένης νέκρωσης του όγκου. Τα κύτταρα του όγκου σχηματίζουν οργανικές φωλιές ή διάχυτες στρώσεις. Σε περιπτώσεις μικρής βιοψίας με σημαντική καταστροφή κυττάρων, η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να βοηθήσει για να τεθεί η διάγνωση. Συχνές χρώσεις που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την πανκερατίνη και νευροενδοκρινείς δείκτες (CD56, χρωμογραφίνη, συναπτοφυσίνη) αν και η έκφρασή του είναι μικρότερη από τα καρκινοειδή. Εξαίρεση αποτελεί το TTF-1, που εκφράζεται περίπου στο 90% των SCLC. Υψηλό Ki-67 (>50%, συνήθως 70-100%) είναι χαρακτηριστικό του SCLC [6, 7].

1.ii.i. Νευροενδοκρινές καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα

Το LCNEC, όπως το SCLC, σχετίζεται με βαρύ ιστορικό καπνίσματος. Εντοπίζεται συνήθως περιφερικά στον πνεύμονα. Πρόκειται για ιδιαίτερα επιθετικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα. Όπως υποδηλώνει και το όνομα, τα κύτταρα του όγκου είναι μεγαλύτερα από το SCLC και έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα.

Άλλα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν το πολυγωνικό σχήμα, τη συχνή παρουσία πυρήνα και το χαμηλό λόγο πυρήνα-κυτταροπλάσματος. Υπάρχει μια διακριτή νευροενδοκρινής αρχιτεκτονική, με δοκιδώδη ανάπτυξη και σχηματισμό ροζετών, ενώ εμφανής είναι η απουσία χαρακτηριστικών σχετιζόμενων με αδενική διαφοροποίηση. Όπως και το SCLC, αυτοί οι όγκοι παρουσιάζουν υψηλό αριθμό μιτώσεων ($>10/\text{mm}^2$) και νέκρωση του όγκου. Για τη διάγνωση πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον ένας ανοσοϊστοχημικός δείκτης. Ο λόγος είναι ότι για να τεθεί η διάγνωση πρέπει να υπάρχει συνδυασμός των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών, καθώς το 20% των NSCLC παρουσιάζουν θετική απάντηση σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Αυτοί οι όγκοι χαρακτηρίζονται ως NSCLC με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Η 5ετής επιβίωση είναι χειρότερη από τους άλλους τύπους NSCLC και δεν ξεπερνά το 30% [4, 6].



Εικόνα 4 : Νευροενδοκρινείς όγκοι του πνεύμονα: Α) Τυπικό καρκινοειδές. Β) Άτυπο Καρκινοειδές. Γ) Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα. Δ) Νευροενδοκρινές καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα.

Είδος όγκου	Ιστολογικά ευρήματα	Ανοσοϊστοχημεία	Grade
TC	Καρκινοειδής αρχιτεκτονική, 1 μίτωση/mm ²	CgA, συναπτοφυσίνη, CD56	1 – χαμηλός βαθμός κακοήθειας
AC	Καρκινοειδής αρχιτεκτονική, 2-10 μιτώσεις/mm ² , εστιακές νεκρώσεις	CgA, συναπτοφυσίνη, CD56	2 – μέτριος βαθμός κακοήθειας
SCLC	Κύτταρα μικρού μεγέθους, ελάχιστο κυτταρόπλασμα, >60 μιτώσεις/mm ² , εκτεταμένες νεκρώσεις	Πανκερατίνη, μικρότερη έκφραση CgA, συναπτοφυσίνη, CD56	3 – υψηλός βαθμός κακοήθειας
LCNEC	Κύτταρα μεγάλου μεγέθους, συχνή απουσία πυρήνιου, άφθονο κυτταρόπλασμα, >30 μιτώσεις/mm ² , εκτεταμένες νεκρώσεις	CgA, συναπτοφυσίνη, CD56	3 – υψηλός βαθμός κακοήθειας

Πίνακας 3: Βαθμός κακοήθειας νευροενδοκρινών όγκων πνεύμονα. Τα τυπικά καρκινοειδή του πνεύμονα παρουσιάζουν το χαμηλότερο βαθμό κακοήθειας, με σαφή αρχιτεκτονική και ελάχιστες μιτώσεις. Τα άτυπα καρκινοειδή παρουσιάζουν μέτριο βαθμό κακοήθειας με εστιακές νεκρώσεις και μικρό αριθμό μιτώσεων. Τα μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα και τα νευροενδοκρινή καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό κακοήθειας, με αυξημένο αριθμό μιτώσεων και εκτεταμένες νεκρώσεις. TC: typical carcinoid, AC: atypical carcinoid, SCLC: small cell lung cancer, LCNEC: Large-cell neuroendocrine cancer.

1.ii.j. Άλλα είδη όγκων του πνεύμονα

Εκτός από τα καρκινώματα που αναφέρθηκαν νωρίτερα, άλλα είδη όγκων μπορούν να εμφανιστούν από τον πνεύμονα, όπως μεσεγχυματογενείς όγκοι, μελάνωμα, όγκοι από γεννητικά κύτταρα και άλλοι [6].

1.iii. Σταδιοποίηση των όγκων του πνεύμονα

Η σταδιοποίηση των όγκων του πνεύμονα γίνεται βάσει των κριτηρίων του AJCC (American Joint Committee on Cancer) χρησιμοποιώντας τρεις παραμέτρους: το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T), την επέκταση σε λεμφαδένες (N) και τις μεταστάσεις (M) [8]. Το στάδιο κατά T χαρακτηρίζεται από το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου καθώς και σημεία άμεσης διήθησης γειτονικών ιστών. Το στάδιο κατά N αναφέρεται στους συγκεκριμένους τοπικούς λεμφικούς σταθμούς που βρίσκονται σε σχέσεις κοντινές με τον αρχικό όγκο (ομόπλευρα ή ετερόπλευρα). Το στάδιο κατά M αναφέρεται στην παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων και διαφοροποιείται ανάλογα το βαθμό και τη θέση εντόπισης. Ο συνδυασμός των τριών αυτών παραμέτρων δίνει ένα λατινικό αριθμό από το I έως το IV. Υψηλότερο στάδιο σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και καθορίζει και τη θεραπευτική τακτική.

Η σταδιοποίηση για το SCLC χρησιμοποιεί το ίδιο σύστημα TNM όπως και στο NSCLC και έχει προγνωστικό χαρακτήρα [7, 8]. Ωστόσο, λόγω της επιθετικότητας της νόσου και του περιορισμένου ρόλου του χειρουργείου, χρησιμοποιείται και ένα δεύτερο σύστημα σταδιοποίησης στην κλινική πρακτική. Σε αυτό το σύστημα οι ασθενείς κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, βάσει της δυνατότητας να λάβουν ακτινοθεραπεία σε ένα μόνο πεδίο: οι ασθενείς με περιορισμένη νόσο στο ένα ημιθώρακιο (συμπεριλαμβανομένων και των λεμφαδένων) και οι ασθενείς με εκτεταμένη νόσο, που είναι αυτοί που δεν πληρούν τα κριτήρια για να μπουν στην πρώτη κατηγορία. Η 5ετής επιβίωση για τους ασθενείς περιορισμένης νόσου είναι λιγότερο από 25% ενώ για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο η επιβίωση στα 2 έτη είναι λιγότερο από 5%.

TNM 8 ^η έκδοση – Χαρακτηριστικά του κύριου όγκου	
T _x	Κύτταρα σε πτύελα ή βρογχικές εκπλύσεις αλλά όχι σε απεικόνιση ή βρογχοσκόπηση
T ₀	Καμία ένδειξη όγκου
T _{is}	Καρκίνωμα in situ
T ₁	≤3cm περιβαλλόμενος από πνεύμονα/σπλαγγχνικό υπεζωκότα, χωρίς συμμετοχή κύριου βρόγχου
T _{1a(mi)}	Ελάχιστα διηθητικό καρκίνωμα
T _{1a}	≤1cm
T _{1b}	>1 έως ≤2cm
T _{1c}	>2 έως ≤3cm
T ₂	>3 έως ≤5cm ή συμμετοχή του κυρίου βρόγχου χωρίς διήθηση της τραχείας ανεξάρτητα από την απόσταση από αυτή ή διήθηση του σπλαγγχνικού πέταλου του υπεζωκότα ή ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα που εκτείνεται ως την πύλη του πνεύμονα
T _{2a}	>3 έως ≤4cm
T _{2b}	>4 έως ≤5cm
T ₃	>5 έως ≤7cm στη μεγαλύτερη διάσταση ή όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί το θωρακικό τοίχωμα, το περικάρδιο, το φρενικό νεύρο ή δορυφόρα οζίδια στον ίδιο λοβό.
T ₄	>7cm στη μεγαλύτερη διάμετρο ή οποιοσδήποτε όγκος με διήθηση του μεσοθωρακίου, του διαφράγματος, της καρδιάς, των μεγάλων αγγείων, του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου, της τραχείας, του οισοφάγου, της σπονδυλικής στήλης ή δεύτερος όγκος σε διαφορετικό λοβό του ίδιου πνεύμονα.
N ₁	Ομόπλευροι περιβρογχικοί ή/και πυλαίοι και ενδοπνευμονικοί λεμφαδένες
N ₂	Ομόπλευροι μεσοθωρακικοί ή/και υποτραχειακοί λεμφαδένες
N ₃	Ετερόπλευροι μεσοθωρακικοί ή πυλαίοι λεμφαδένες, ομόπλευροι/ετερόπλευροι τραχηλικοί/υπερκλειδίοι λεμφαδένες
M ₁	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
M _{1a}	Μετάσταση στον ετερόπλευρο πνεύμονα ή υπεζωκοτικό/περικαρδιακό οζίδιο/κακοήθης συλλογή

M _{1b}	Μονήρης εξωθωρακική μετάσταση, συμπεριλαμβανομένου μονήρους μη τοπικού λεμφαδένα
M _{1c}	Πολλαπλές εξωθωρακικές μεταστάσεις σε ένα ή περισσότερα όργανα

Πίνακας 4: Το σύστημα TNM για τον καρκίνο του πνεύμονα (8^η έκδοση). Οι τρεις παράμετροι του συστήματος, μέγεθος όγκου, λεμφαδενική επέκταση, μεταστατικές εστίες, έχει προγνωστικό χαρακτήρα για τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. T: tumor, N: node, M: metastasis.

Στάδιο	T	N	M	Κλινική 5-ετής επιβίωση	Παθολογοανατομική 5-ετής επιβίωση
IA1	T _{1mi} , T _{1a}	N ₀	M ₀	92	90
IA2	T _{1b}	N ₀	M ₀	83	85
IA3	T _{1c}	N ₀	M ₀	77	80
IB	T _{2a}	N ₀	M ₀	68	73
IIA	T _{2b}	N ₀	M ₀	60	65
IIB	T ₁ , T ₂ / T ₃	N ₁ / N ₀	M ₀	53	56
IIIA	T ₁ , T ₂ / T ₄	N ₂ / N ₀ , N ₁	M ₀	36	41
IIIB	T ₁ , T ₂ / T ₃ , T ₄	N ₂ / N ₃	M ₀	26	24
IIIC	T ₃ , T ₄	N ₃	M ₀	13	12
IVA	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M _{1a} / M _{1b}	10	
IVB	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M _{1c}	0	

Πίνακας 5: Σταδιοποίηση κατά TNM και 5ετής επιβίωση. Η 5ετής επιβίωση των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα μειώνεται όσο μεγαλύτερο το στάδιο κατά την αρχική διάγνωση. T: tumor, N: node, M: metastasis.

1.iv. Επιγενετική στον καρκίνο.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης τροφοδοτείται από τη συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών που έχουν ως αποτέλεσμα στην απορρύθμιση ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA. Ο καρκίνος του πνεύμονα, αν και επηρεάζεται σε ένα ποσοστό από τις γονιδιακές μεταλλάξεις, φαίνεται να παρουσιάζει συχνότερα επιγενετικές μεταβολές [9].

Οι επιγενετικές μεταβολές συμβαίνουν χωρίς να προκληθεί αλλοίωση στην αλληλουχία του DNA. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν μεθυλίωση νουκλεϊκών οξέων, τροποποίηση ιστονών, αναδιάταξη χρωματίνης και μεταβολές στην έκφραση μη κωδικοποιητικών RNA, κάθε ένα από τα οποία μπορεί να

δράσει σε συνεργασία με άλλες μοριακές διαδικασίες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται σε ένα αυστηρά ρυθμισμένο πρότυπο. Λαμβάνει χώρα στις κυτοσίνες, κατά κύριο λόγο στα CpG νουκλεοτίδια, συνήθως σε ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων μέσω της δράσης των μεθυλτρανσφερασών του DNA (DNA methyltransferases – DNMTs) και των απομεθυλασών [10]. Στον ιστό του όγκου ωστόσο η ομοιόσταση της μεθυλίωσης μπορεί να διαταραχθεί, οδηγώντας σε επιγενετικές μεταβολές βασικών ρυθμιστικών περιοχών που σχετίζονται με ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, μέσω υπομεθυλίωσης ή υπερμεθυλίωσης.

Η υπομεθυλίωση σχετίζεται με γονιδιωματική αστάθεια και ανευπλοειδία, απώλεια της γονιδιακής εντύπωσης, επανενεργοποίηση των μεταθέσιμων στοιχείων και κυρίως ενεργοποίηση των ογκογονιδίων [11]. Το αντίθετο γεγονός, η υπερμεθυλίωση του DNA, μπορεί να έχει διπλό ρόλο ανάλογα με το που συμβαίνει στο γονιδίωμα. Η υπερμεθυλίωση φάνηκε να έχει διπλό ρόλο ανάλογα τη θέση που εμφανίζεται στο γονιδίωμα. Η μία λειτουργία περιλαμβάνει τη σίγαση για ένα μεγάλο αριθμό ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε μια πληθώρα όγκων όταν συμβαίνει σε περιοχές πλούσιες σε CpG μέσα σε υποκινητές γονιδίων [11]. Η δεύτερη λειτουργία μπορεί να εμποδίσει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων άμεσα ή έμμεσα μέσω χρήσης σύμπλοκων πρωτεϊνών με μια μεγάλη συγγένεια για το μεθυλιωμένο DNA. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει στη συγκέντρωση αναδιαμορφωτών χρωματίνης, αποακετυλασών και μεθυλασών ιστονών, οδηγώντας τελικά στη σίγαση των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή μη κωδικοποιητικών RNA, κάποια από τα οποία μπορεί να παίζουν ρόλο στην κακοήθη μεταλλαγή [12]. Δίπλα στους υποκινητές των γονιδίων, τα τμήματα των γονιδίων μπορεί να παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης σχετιζόμενα με υψηλότερη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου [13]. Αυτό υποδηλώνει ότι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου μπορεί να λειτουργήσει ως ενεργοποιητής της μεταγραφής ογκογονιδίων [11].

Η κατάσταση της χρωματίνης μπορεί να μεταβληθεί δυναμικά από ένα συντονισμένο δίκτυο πρωτεϊνών που δείχνουν διαφορετικούς τρόπους δράσης. Το καλύτερα μελετημένο σύμπλεγμα είναι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν, ρυθμίζουν ή αφαιρούν τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις βασικών ιστονών πρωτεΐνης, γνωστές ως σήματα ιστόνης [13]. Οι δεσμευτικές πρωτεΐνες των ιστονών αλληλοεπιδρούν με τα νουκλεοσώματα, τα θεμελιώδη υλικά της χρωματίνης των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα σήματα ιστόνης προκαλούν ομοιοπολική μετατροπή των ιστονών, μεταβάλουν τη σύνδεση με το DNA και με αυτό τον τρόπο μπορούν να προσελκύσουν μετατροπείς των ιστονών, οδηγώντας τελικά σε μετατροπή της δομής της χρωματίνης, σίγαση γονιδίων ή ενεργοποίηση. Αυτές οι μεταβολές μπορεί να είναι

ποικίλες σε φύση, συμπεριλαμβανομένων πολλών παραλλαγών μεθυλίωσης ιστονών ή ακετυλίωσης λυσίνης, όπως και φωσφορυλίωσης, γλυκοσυλίωσης ή ουβικουιτινοποίησης των βάσεων αργινίνης, σερίνης και θρεονίνης [1]. Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες και μοριακά σύμπλοκα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, όπως τα HDACs (histone deacetylases) και τα PRC (polycomb repressive complexes), που μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων μέσω τροποποίησης των ιστονών ή μέσω μετατροπής της χρωματίνης με διαφορετικό τρόπο από την ενζυμική της λειτουργία [11]. Εκτός της μετατροπής των ιστονών, άλλα μοτίβα αναδιάταξης της χρωματίνης στον καρκίνο περιλαμβάνουν το σύμπλοκο SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), το οποίο μπορεί να μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων χρησιμοποιώντας ATP για να αναδιατάξει τα νουκλεοσώματα και να αναπροσαρμόσει τη χρωματίνη ή παραλλαγές ιστονών, που μπορούν να ανταλλάξουν βασικές φυσιολογικές ιστόνες στα νουκλεοσώματα, προκαλώντας διαφορετικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες που μπορεί να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης [14].

Άλλα στοιχεία που εμφανίζονται πολύ συχνά στην καρκινογένεση είναι τα μη κωδικοποιητικά RNA. Αυτά τα RNA λειτουργούν από μόνα τους και δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Τα μη κωδικοποιητικά RNA έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στο μεταγραφικό και στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και φέρεται να είναι κύριοι ρυθμιστές παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, όπου ένας αριθμός μη κωδικοποιητικών RNA έχει καταγραφεί ως ογκογόνα ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Συγκεκριμένοι υπότυποι μη κωδικοποιητικών RNA περιλαμβάνουν τα microRNAs (miRNAs), που πρόκειται για μικρά RNA που μειώνουν τη δράση των mRNA, εμποδίζοντας την έκφραση γονιδίων, και τα long non-coding RNAs (lncRNAs), τα οποία αλληλοεπιδρούν με ένζυμα και παράγοντες που τροποποιούν τη χρωματίνη και επηρεάζουν τη λειτουργία τους [11].

1.iv.a Επιγενετική στον καρκίνο του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει μεγάλη συχνότητα επιγενετικών αλλοιώσεων κυρίως στα σύμπλοκα των HDAC και SWI/SNF, με συχνότητα μεταλλάξεων περίπου 20% σε κάθε περίπτωση. Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να σχετίζονται με τον κύριο παράγοντα κινδύνου, το κάπνισμα. Επιπλέον, φαίνεται το κάπνισμα να έχει μια ευρεία επίπτωση στη μεθυλίωση του DNA, ακόμα και χρόνια μετά τη διακοπή του [15]. Σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα έχουν παρατηρηθεί αλλαγές της μεθυλίωσης σε γονίδια σχετιζόμενα με τη νόσο και σε δείγματα DNA περιφερικού αίματος. Συγκεκριμένα, υπομεθυλίωση γονιδίων σε δείγματα αίματος, όπως τα AHRR και F2RL3 έχει συσχετιστεί με το κάπνισμα και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα [16]. Άλλες μελέτες έχουν αναδείξει υπερμεθυλίωση του υποκινητή του p16 και σε μικρότερη έκταση της κινάσης DAP σε

βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με καρκίνο πνεύμονα, εύρημα που διαπιστώθηκε και σε πρώην ή νυν καπνιστές χωρίς καρκίνο πνεύμονα, υποδηλώνοντας τη συσχέτισή του με το κάπνισμα [11]. Επίσης μοτίβα έκφρασης των miRNA σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να σχετίζονται επίσης με το κάπνισμα, πιθανώς λόγω των τοξινών που περιέχονται στα τσιγάρα [17]. Αυτά τα αποτελέσματα ωστόσο πρέπει να εξετάζονται με προσοχή, καθώς έχει φανεί ότι μεθυλίωση του DNA συγκεκριμένων θέσεων CpG μπορεί να σχετίζονται με την ποσότητα του καπνίσματος και το είδος του κυττάρου.

1.ii. b Επιγενετική της ογκογένεσης στο NSCLC

Τα αποτελέσματα πολλών μελετών έδειξαν ότι μείωση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων ως πιθανό αίτιο της ογκογένεσης, με την υπερμεθυλίωση να είναι το βασικό αίτιο της μειωμένης έκφρασης. Μεταξύ των πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που αναγνωρίστηκαν στο πλακώδες καρκίνωμα, πολλά μέλη της οικογένειας homeobox φαίνεται να εμπλέκονται, όπως τα HOXA2, HOXA4 και NKX2-1, όπως και άλλα γονίδια μεταγραφικών παραγόντων, όπως τα ZNF132 και το GATA2. Στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα, γονίδια όπως τα KCNIP4, ZEB2 και FOXF1 φάνηκε να είναι υπερμεθυλωμένα. Επιπλέον, υπερμεθυλίωση μεταγραφικών γονιδίων όπως τα FOXA2, FOXJ1, HOXA5, TAL1 και HLF υπάρχει και στους δύο υπότυπους, όπως και σε ασθενείς με ΧΑΠ, που είναι προδιαθεσικός παράγοντας για τον καρκίνο του πνεύμονα [18].

Εκτός από την υπερμεθυλίωση, πολλοί άλλοι επιγενετικοί μηχανισμοί έχει φανεί να συμμετέχουν στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Για παράδειγμα, ανώμαλη έκφραση συγκεκριμένων DNMTs, όπως η DNMT1, DNMT3A και DNMT3B φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Αυτά τα ένζυμα φαίνεται να προκαλούν διαταραχές της μεθυλίωσης και αναπροσαρμογή της χρωματίνης σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης του NSCLC και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα [19]. Στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα το DNMT1 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση κατά την εμφάνιση του καρκίνου, οδηγώντας σε υπερμεθυλίωση και σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το RASSF1A, το οποίο εμπλέκεται στη σηματοδότηση του RAS και το CDKN2A, ένας αναστολέας κυκλικής κίνησης στη φάση G1/S [11]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι διαταραχές στη μεθυλίωση των υποκινητών επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων σε προνεοπλασματικές βλάβες πλακώδους ιστολογίας, όπως το γονίδιο FHIT, που η μείωση της έκφρασής του σχετίζεται με πολλαπλασιασμό και διήθηση, ή του ογκοκατασταλτικού miR-47b, που η μείωση της έκφρασής του σχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου μέσω του μονοπατιού Wnt [20]. Συμπλέγματα αναδιάταξης της χρωματίνης έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα. Αυτό διαπιστώθηκε από μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα όπου

παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα H4K20me₃ λόγω διαταραχής της δραστηριότητας των αναδιαμορφωτών χρωματίνης και της αύξησης της έκφρασης του EZH2, που εμπλέκεται στην ενίσχυση του H3K27me₃ και τη σίγαση ογκοκατασταλτικών miRNA (π.χ. miR-196b, miR-200b, miR-200c, miR-205) [11].

Όσον αφορά το αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, υπερμεθυλίωση υποκινητών και επακόλουθη μείωση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, όπως το MGMT, το RARβ, το DAPK, το hTERT, το PTPRN2, όπως και τα CDKN2A και RASSF1A και πολλοί ανταγωνιστές του μονοπατιού Wnt, έχουν διαπιστωθεί σε προκαρκινικές αλλοιώσεις σχετικές με αυτό τον υπότυπο [21].

1.ii. c. Επιγενετική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του NSCLC και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Καθώς και περισσότερες μελέτες στοχεύουν το μικροπεριβάλλον του όγκου και την αλληλεπίδρασή του με τα καρκινικά κύτταρα, νέα δεδομένα έχουν προκύψει προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς αυτούς. Για παράδειγμα, τα miR-221 και miR-222, που υπερεκφράζονται στο NSCLC, στοχεύουν το TIMP3, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον έλεγχο της ομοιόστασης των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών και που η μείωση της έκφρασής τους προάγει την ανάπτυξη του όγκου [11]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η παρουσία προσταγλανδινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Οι προσταγλανδίνες προκαλεί την υπερέκφραση του c-Myc στα στρωματικά κύτταρα, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του miR17-92 που στοχεύει το ογκοκατασταλτικό PTEN, εμποδίζοντας την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του NSCLC [22]. Άλλες αλληλεπιδράσεις του όγκου με το μικροπεριβάλλον του φάνηκε να προωθούν την αγγειογένεση, συμπεριλαμβάνοντας την αύξηση της έκφρασης των let-7b και miR-126 από τα καρκινικά κύτταρα και αυτά που τα περιβάλλουν, οδηγώντας σε αυξημένη πυκνότητα των μικρών αγγείων [23]. Οι όγκοι επίσης μπορεί να αναπτύξουν μηχανισμούς για να επηρεάσουν το μικροπεριβάλλον ώστε να δημιουργήσουν ένα προμεταστατικό περιβάλλον. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του NSCLC μπορεί να προκαλέσουν την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6 και ο TNF-α μέσω παρουσίασης των miR-21 και miR-29a σε TAMs (tumor associated macrophages), οδηγώντας τελικά σε αύξηση του μεταστατικού δυναμικού [24].

Επιπλέον, υπάρχουν πολλά παραδείγματα που να παρουσιάζουν το ρόλο της επιγενετικής στη ρύθμιση της αντικαρκινικής δράσης του ανοσοποιητικού στον καρκίνο του πνεύμονα. Ο TGFβ για παράδειγμα φαίνεται να προκαλεί έκκριση του miR-183 από καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, το οποίο με τη σειρά του καταστέλλει την έκφραση του DAP12, ένα βασικό υποδοχέα σήματος στα NK κύτταρα, καταστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την αντικαρκινική κυτταροτοξική τους δράση [25]. Το miR-9, που

φάνηκε να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του πνεύμονα, μειώνει την έκφραση του γονιδίου του MHC1, εμποδίζοντας την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από αυτά του ανοσοποιητικού [26].

1.ii.d Επιγενετική της ογκογένεσης του SCLC

Επιγενετικές αλλαγές συμβαίνουν και στο SCLC. Πρόσφατες αναλύσεις έδειξαν διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης στο SCLC συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, με το 75% των περιπτώσεων να παρουσιάζει μεθυλίωση σε νευροενδοκρινικούς παράγοντες όπως το NEUROD1 [27]. Επιπλέον, διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης και έκφρασης γονιδίων έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των δειγμάτων SCLC, το οποίο οδηγεί στην αναγνώριση υπότυπων του SCLC, γεγονός που δεν θα μπορούσε να γίνει βασιζόμενοι μόνο σε ιστολογικά ή γενετικά κριτήρια [28]. Μεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι συχνό φαινόμενο στο SCLC. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή και η μείωση της έκφρασης του RASSF1A έχει βρεθεί σχεδόν σε όλους τους όγκους, υποδηλώνοντας συσχέτιση του γεγονότος αυτού με την εμφάνιση του καρκίνου. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο DAPK, το οποίο είναι μεθυλιωμένο στο ένα τρίτο των περιπτώσεων με SCLC, καθώς και γονίδια που βρίσκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης [29].

Εκτός από διαταραχές στα επίπεδα της μεθυλίωσης, μεταβολές στα ένζυμα και τους παράγοντες αναδιάταξης της χρωματίνης έχουν επίσης αναγνωρισθεί στο SCLC. Απώλεια της μεθυλίωσης της ιστόνης H4 έχει αναφερθεί σε νευροενδοκρινείς όγκους του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένου του SCLC, και σχετίζεται με αύξηση του πολλαπλασιασμού [30]. Επιπλέον, πολλαπλές μεταλλάξεις έχουν αναγνωρισθεί σε γονίδια που κωδικοποιούν αναδιαμορφωτικά ένζυμα. Η συχνότερη είναι αυτή που συμβαίνει στο γονίδιο MLL2, που κωδικοποιεί τη μεθυλτρανσφεράση της ιστόνης H3K4, που απαντάται στο 8% των SCLC, οδηγώντας τελικά σε απενεργοποίησή του [31]. Σε μικρότερη συχνότητα έχουν παρατηρηθεί απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια των ακετυλτρανσφερασών των ιστονών CREBBP, EP300 και KAT6B, στο γονίδιο απομεθυλίωσης της ιστόνης UTX, και στα γονίδια υπεύθυνα για τους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBRM1, ARID1A και ARID1B [31, 32]. Εκτός από αυτές τις μεταλλάξεις, έχει παρατηρηθεί και μεταβολή στην έκφραση των αναδιαμορφωτών χρωματίνης σε αυτούς του όγκους. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ASXL3, που έχει ανιχνευτεί σε SCLC και σχετίζεται με αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και αύξηση της έκφρασης της μεθυλτρανσφεράσης της ιστόνης EZH2, που ενεργοποιεί την ογκογένεση μέσω του E2F [28].

Οι επιγενετικές μεταβολές μπορεί να έχουν ρόλο και στα προχωρημένα στάδια ανάπτυξης του SCLC. Μια πρόσφατη μελέτη έχει αναγνωρίσει ένα μεταγραφικό παράγοντα, τον Nfib, που εμπλέκεται στην

αύξηση της διαθεσιμότητας της χρωματίνης σε πολλαπλές θέσεις του γονιδιώματος και στην επαγωγή προγραμμάτων έκφρασης των νευρικών γονιδίων που επηρεάζουν την ικανότητα για μετάσταση των κυττάρων του SCLC [33]. Επιπλέον, το MYCL που παρουσιάζει συχνά αυξημένη έκφραση στο SCLC, φαίνεται να υπόκειται σε έλεγχο από σούπερ ενισχυτές και να βασίζεται σε ακετυλίωση των ιστονών για την υπερέκφρασή του [34].

1.iii. Απορρύθμιση των μηχανισμών σχετικών με το μικροπεριβάλλον του όγκου

Οι βλάβες στα χρωμοσώματα, οι γενετικές μεταλλάξεις και οι αλλοιώσεις στο μικροπεριβάλλον έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προγονικές αλλοιώσεις στις κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα [35]. Αυτοί οι ενδογενείς και εξωγενείς ρυθμιστικοί παράγοντες με κοινό παρονομαστή τη χρόνια φλεγμονή εμπλέκονται στους μηχανισμούς που σχετίζονται με την καρκινογένεση στον πνεύμονα και την εμφάνιση των CSCs.

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από CAF (cancer-associated fibroblasts), ECM (extracellular matrix) και διηθητικά κύτταρα του ανοσοποιητικού. Στον καρκίνο του πνεύμονα, τα κακοήθη κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τα στρωματικά διηθητικά κύτταρα που με τη σειρά τους συμβάλλουν στην καρκινογένεση [35].

Τα CAFs είναι υπεύθυνα για τη δεσμοπλασία που εμφανίζουν οι NSCLC. Είναι υπεύθυνα για τον αυξημένο πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διήθηση, τη μετάσταση και την αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή. Τα CAFs που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινους όγκους εκκρίνουν IL6, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη μεταγωγή του σήματος μέσω της JAK2 και ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω του STAT3 προκειμένου να αυξήσουν το μεταστατικό δυναμικό. Τα CAFs επίσης εκφράζουν IGF2, ο οποίος μέσω πρόσδεσης στον IGF1 υποδοχέα (IGF1 receptor- IGF1R) στα CSCs ενεργοποιεί το NANOG, οδηγώντας στην αύξηση των CSCs. Τα CAFs επίσης ρυθμίζουν τις μοριακές απαντήσεις στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για παράδειγμα, CAFs που απομονώθηκαν από καλλιέργειες ανθρώπινων NSCLC φάνηκε ότι εξέφραζαν τους συνδέτες PDL1 και PDL2 (programmed cell death protein 1/2 ligand) φάνηκε να καταστέλλουν τη λειτουργία των T κυττάρων. Παρόμοια, σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια, τα CAFs φάνηκε να παρουσιάζουν αντιγόνα συνδυαστικά με το MHC I σε αντιγονοπαρουσιαστικά CD8⁺ T κύτταρα, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αυξημένη έκφραση του PDL2 και του FASL (FAS ligand) σε αυτά τα T κύτταρα με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή τους [35].

Τα CAFs μπορούν να επηρεάσουν και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Σε πειράματα φάνηκε ότι κύτταρα ύστερα από θεραπεία με πλατίνα που παρουσίαζαν έκφραση του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης AXL και του συνδέτη GAS6 από τα CAFs είχαν μεγαλύτερο μεταστατικό δυναμικό [35]. Τα δεδομένα αυτά εξηγούν το μειωμένο προσδόκιμο των ασθενών που εκφράζουν AXL και GAS6.

Το ECM, που αποτελείται από κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και γλυκοσαμινογλυκάνες, είναι ένα από τα βασικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών των στρωματικών κυττάρων για να οδηγήσει στην καρκινογένεση . Σε ποντίκια με μεταλλαγμένους KRAS NSCLC, η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP14 που εκφραζόταν στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων προκαλούσε την προτεολυτική επεξεργασία του HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), οδηγώντας στην ενεργοποίηση του EGFR και την ανάπτυξη του όγκου . Σε μια άλλη μελέτη, ο υποδοχέας για την γλυκοσαμινογλυκάνη υαλουρονάση HMMR, αύξησε τη σηματοδότηση μέσω του ECM και ενίσχυσε την ανάπτυξη του όγκου εκτός του πνεύμονα . Σε ποντίκια, ανεπάρκεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου LKB1 αύξησε την έκφραση της πρωτεΐνης του ECM λυσική οξειδάσης μέσω του HIF1α μονοπατιού, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τη β1 ιντεγκρίνη . Η πυκνότητα του ECM φαίνεται επίσης να λειτουργεί ως φραγμός για τη διήθηση των T κυττάρων στα κύτταρα του όγκου στο NSCLC [35].

Η αγγειογένεση αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου [36]. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες του όγκου συνεισφέρουν στην μετάσταση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας στη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων που υποστηρίζουν την εξέλιξη του όγκου. Σε μοντέλα ποντικών με NSCLC KRAS μεταλλαγμένους όγκους, η ενδοθηλιακή έκφραση των miRNAs miR-143 και miR-145 βοήθησε την ανάπτυξη του όγκου μέσω της αγγειογένεσης, υποδεικνύοντας έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο [37]. Η NAD εξαρτώμενη πρωτεΐνη αποακετυλάση σιρτουΐνη 1, βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης, φάνηκε να αυξάνει την πυκνότητα των αγγείων και να ενισχύει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων Lewis του πνεύμονα μέσω μείωσης της έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού DLL4-Notch και αποακετυλίωσης του NOTCH1 ενδοκυττάρου χώρου σε ενδοθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα [38]. Ωστόσο η αντίληψη ότι η ανάπτυξη του όγκου στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στη νέο-αγγειογένεση αμφισβητείται, καθώς ένα μέρος ασθενών με NSCLC εμφανίζουν πρότυπα ανάπτυξης ανεξαρτήτως. Αυτοί οι όγκοι φαίνεται να χρησιμοποιούν προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία παρά να δημιουργούν νέα και έχουν και περισσότερο επιθετική συμπεριφορά. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι θεραπείες με αντιαγγειογένεση, όπως είναι το bevacizumab, έχουν μέτρια κλινικά αποτελέσματα στους ασθενείς με NSCLC [35]. Λόγω της

πολυπλοκότητας πίσω από το μηχανισμό αυτό, είναι απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για να αποσαφηνιστούν οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη διαδικασία αυτή.

Τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος που εμπλέκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου εμφανίζουν μηχανισμούς που βοηθούν ή εμποδίζουν την ανάπτυξη ενός όγκου. Τα μυελοειδή κύτταρα κοκκιωματώδους και μονοκυτταρικής προέλευσης είναι συστατικά της ενδογενούς ανοσολογικής απάντησης και συνεισφέρουν στην καρκινογένεση με πολλούς μηχανισμούς. Έχουν σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της επίκτητης ανοσίας μέσω ελέγχου της σύνθεσης των TILs (tumor infiltrating lymphocytes), την ενεργοποίησή τους και την αντικαρκινική τους δράση [35].

Τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells – DCs) προέρχονται από τα μυελοειδή και αναγνωρίζονται ως κύριοι ενορχηστρωτές της αντιογκογόνου ανοσίας μέσω του μηχανισμού δράσης τους, παρουσιάζοντας αντιγόνα του όγκου σε ώριμα T λεμφοκύτταρα στους λεμφαδένες [39]. Ωστόσο οι όγκοι μπορούν να καταστείλουν τη λειτουργία των DCs ή να μεταβάλλουν το μικροπεριβάλλον για να χρησιμοποιήσουν ανοσοκατασταλτικά DCs. Σε ασθενείς με NSCLC, τα DCs αυξάνουν την έκφραση του κατασταλτικού μορίου B7-H3 (γνωστό και ως CD276), με αποτέλεσμα να μην διεγείρουν τα T κύτταρα [40]. Επίσης τα DCs παράγουν TGFβ, που ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T κυττάρων σε FOXP3⁺ ρυθμιστικά T (T_{regs}) κύτταρα που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Μια προκλινική μελέτη έδειξε ότι χορήγηση DCs που είχαν εκτεθεί στη χημειοκίνη CCL21 οδήγησε σε αυξημένη διήθηση DCs, CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του πνεύμονα, οδηγώντας σε μειωμένο φορτίο μεταλλάξεων του όγκου [35].

Τα MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός που μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών [39]. Τα MDSCs διακρίνονται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: πολυμορφοπυρηνικά MDSCs (PMN-MDSCs) και μονοκυτταρικά MDSCs (M-MDSCs). Τα PMN-MDSCs φέρουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα ουδετερόφιλα, ενώ τα M-MDSCs μοιάζουν περισσότερο στα άωρα μονοκύτταρα.

Τα TAMs (Tumor-associated macrophages) υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό στο μικροπεριβάλλον του NSCLC, εμφανίζουν μεγάλη πλαστικότητα και έχουν ποικιλία φαινότυπων, συμπεριλαμβανομένων των M1 (ενεργοποιούνται μέσω της κλασικής οδού, με αντι-ογκογόνο δράση) και των M2 (ενεργοποιούνται μέσω διαφορετικών οδών, με ανοσοκατασταλτική δράση), τα οποία επηρεάζονται από τη φύση του τοπικού μικροπεριβάλλοντος. Σε μοντέλα ποντικών με KRAS μεταλλάξεις, τα TAM που εκφράζουν IL6 αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω του STAT3 [35].

Τα ουδετερόφιλα που διεισδύουν σε όγκους NSCLC κυριαρχούν στο ανοσολογικό τοπίο [41]. Μια πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε ένα μοναδικό υπότυπο ουδετερόφιλων που εκφράζουν δείκτες τόσο από ουδετερόφιλα όσο και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen presenting cells – APCs), διευκολύνοντας την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων και ενισχύοντας την αντικαρκινική δράση των Τ κυττάρων [42]. Τα ουδετερόφιλα επίσης εκφράζουν IL-1β, η οποία ρυθμίζει την αντίσταση στον αναστολέα NF-κΒ [43]. Επίσης η εξάντληση των ουδετερόφιλων φαίνεται να βοηθάει στη μείωση της καρκινογένεσης σε μοντέλα ποντικών [44].

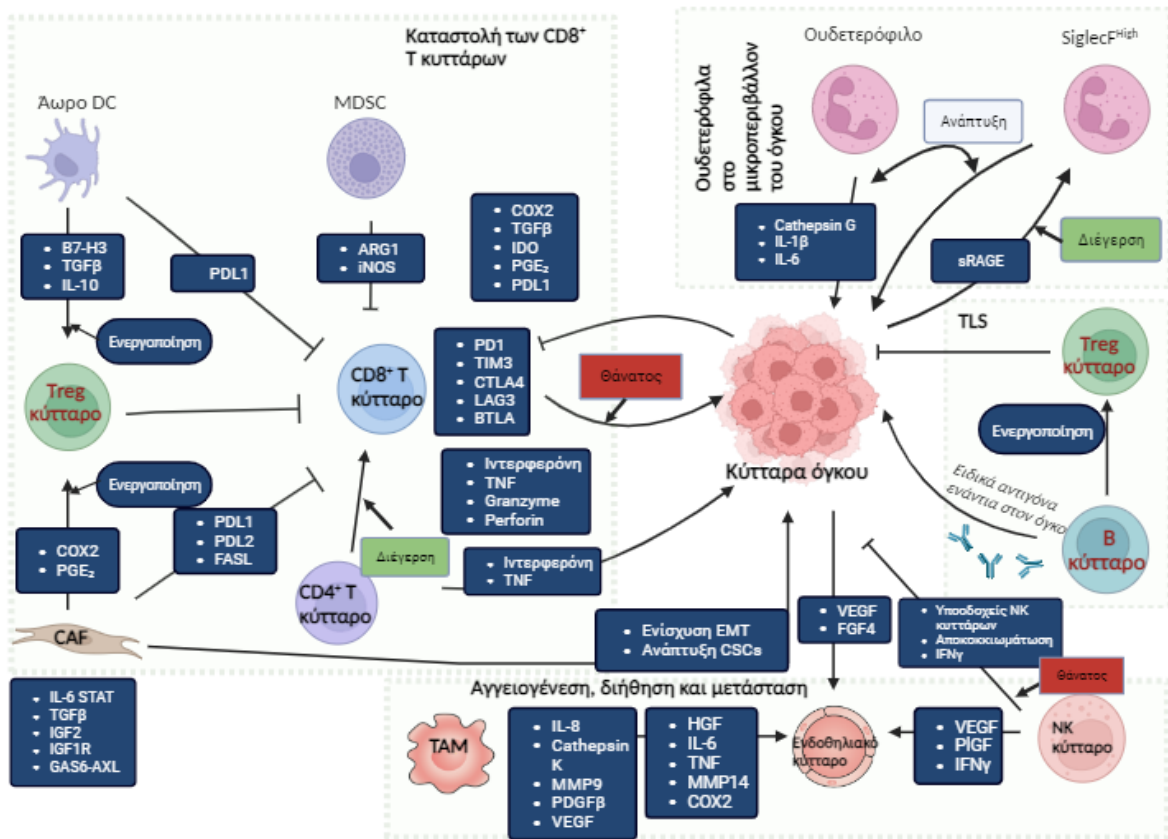
Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer- NK) είναι λεμφοκύτταρα του ενδογενούς ανοσολογικού συστήματος που έχουν βασικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση μέσω αναγνώρισης των κυττάρων του όγκου σαν ξένα κύτταρα, προκαλώντας άμεση καταστροφή τους [45]. Πολλές μελέτες εξετάζουν τη συχνότητα, την τοποθεσία, το φαινότυπο και τη λειτουργική κατάσταση των NK κυττάρων που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον όγκων του πνεύμονα σε ποντίκια και ανθρώπους . Παράγοντες που ρυθμίζουν την ανταπόκριση των NK κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του πνεύμονα περιλαμβάνουν το TFGβ, ο PIGF (placental growth factor) και η ιντερφερόνη-γ (IFNγ) . Δυσλειτουργική μορφή των NK κυττάρων σχετίζεται με μείωση της έκφρασης των NK υποδοχέων στα κύτταρα, μείωση της κοκκίωσης και απώλεια έκφρασης της IFNγ σε ανθρώπινους όγκους NSCLC [35].

Τα Τ λεμφοκύτταρα που διεισδύουν σε όγκους, ειδικότερα τα CD4⁺ και CD8⁺, και οι ανοσορρυθμιστικές τους κυτταροκίνες αντιπροσωπεύουν την επίκτητη ανοσία, εκτελούν κύριες κυτταροτοξικές λειτουργίες στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ρυθμίζουν την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία [46]. Τα ανοσοκατασταλτικά FOXP3⁺ T_{reg} κύτταρα ενεργοποιούνται από την αυξημένη έκφραση της PGE₂ μέσω της COX2 στα καρκινικά κύτταρα. Εξάντληση των T_{reg} είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του φορτίου μεταλλάξεων του όγκου σε ποντίκια και σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης granzyme A, granzyme B, περφορίνης και IFNγ στα CD8⁺ TILs . Σε KRAS μοντέλα όγκων σε ποντίκια, αναστολή του PD1 είχε συσχέτιση με αύξηση της έκφρασης του PD1 και της IFNγ σε ένα μέρος των T_{reg}, υποδηλώνοντας απώλεια της ανοσοκατασταλτικής δράσης [35].

Τα CD8⁺ κυτταροτοξικά κύτταρα προκαλούν την καταστροφή των κυττάρων του όγκου μέσω παραγωγής IFNγ, TNF και granzyme B ύστερα από την πρόσδεση των υποδοχέων τους [47]. Ωστόσο οι όγκοι έχουν διάφορους τρόπους για την καταστολή των CD8⁺ Τ κυττάρων. Για παράδειγμα, τα T_{reg} μπορούν να καταστείλουν απευθείας τη δράση των CD8⁺ . Επιπλέον, η συνεχής έκθεση των Τ κυττάρων σε αντιγόνα μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία ή εξάντλησή τους . Σε ασθενείς με NSCLC, η πρόοδος της νόσου συνδέεται με αύξηση της έκφρασης της εξάντλησης των Τ κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων

των PD1, TIM3, CTLA4, LAG3 και BTLA στα CD8⁺ TILs . Παρά τον κεντρικό ρόλο που έχουν τα CD8⁺ κύτταρα στη αντιμετώπιση του όγκου, η επιτυχημένη ανοσολογική απόκριση χρήζει της συνεργασίας των CD8⁺ και των CD4⁺ T κυττάρων [35].

Τα διηθητικά B κύτταρα έχουν αναδειχθεί ως βασικοί ρυθμιστές του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Σε ασθενείς με NSCLC, τα διηθητικά B κύτταρα και τα CD4⁺ T κύτταρα βρίσκονται μέσα στα TLS (Tertiary Lymphoid Structures) και αυτές οι δομές σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση [48]. Φάνηκε ότι τα B κύτταρα που συλλέχθηκαν από ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν αντιγόνα στα CD4⁺ TILs και να μεταβάλουν το φαινότυπό τους in vitro . Επίσης, ενεργοποιημένα B διηθητικά λεμφοκύτταρα συνδέονται με ενεργοποιημένα CD4⁺ T κύτταρα, ενώ τα εξαντλημένα B κύτταρα συνδέονται με ανοσοκατασταλικά T_{reg} [35].



Εικόνα 5: Το ετερογενές μικροπεριβάλλον του όγκου. Το μικροπεριβάλλον του όγκου περιλαμβάνει μια ποικιλία στρωματικών κυττάρων προγραμματισμένα από αυτόν. Ένα μείζον συμβάν της ανοσοκαταστολής στο μικροπεριβάλλον είναι η απενεργοποίηση των κυτταροτοξικών CD8⁺ T κυττάρων μέσω διάφορων μηχανισμών. Τα άωρα δενδριτικά κύτταρα (DCs) παράγουν TGFβ, το οποίο αυξάνει τον πληθυσμό των ανοσοκατασταλτικών FOXP3⁺ T_{reg} κυττάρων, τα οποία με τη σειρά

τους αναστέλλουν τα CD8⁺ T κύτταρα. Τα DCs εκφράζουν επίσης PDL1 για άμεση καταστολή των CD8⁺ T κυττάρων. Τα MDSCs εκφράζουν ARG1 και iNOS, τα οποία συνεισφέρουν στην καταστολή των T κυττάρων. Τα CAFs μπορούν επίσης να καταστέλλουν τη δραστηριότητα των CD8⁺ T κυττάρων ενεργοποιώντας T_{regs} ή εκφράζοντας PDL1, PDL2 και FASL. Επιπλέον, τα κύτταρα του όγκου μπορούν να παράγουν απευθείας κατασταλτικά μόρια συμπεριλαμβανομένων των COX2, PGE₂, PDL1 και IDO, το οποίο μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα των CD8⁺ TILs. Τα ουδετερόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου του πνεύμονα, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω έκκρισης κυτταροκινών IL-6 και IL-8. Οι όγκοι εκκρίνουν sRAGE, το οποίο ενεργοποιεί συστηματικά τους οστεοβλάστες στο μυελό των οστών προκειμένου να παράγουν SiglecF ουδετερόφιλα, το οποίο προωθεί την ανάπτυξη του όγκου μέσω αύξησης της αγγειογένεσης, τη διαφοροποίηση των μυελοειδών κυττάρων, την καταστολή των T κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται στον VEGF από πολλαπλές πηγές συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του όγκου, των NK κυττάρων και των TAMs για να προάγουν την αγγειογένεση. Εκτός από την αγγειογένεση, τα TAMs ενεργοποιούν και άλλα μονοπάτια για να ενισχύσουν τη διήθηση και τη μετάσταση μέσω της έκκρισης διάφορων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των IL-6, COX2, MMP9 και MMP14. Εκτός από την πρόκληση της αγγειογένεσης, τα NK κύτταρα ρυθμίζουν την ανοσοκαταστολή μέσω μείωσης της έκφρασης των υποδοχέων τους, την απώλεια του αποκοκκιωματούδους δυναμικού και τη μειωμένη έκφραση της IFN γ . Τα B κύτταρα στα TLS μπορούν είτε να παράγουν αντιγόνα έναντι του όγκου ή να περάσουν από μια δυσλειτουργική κατάσταση που παράγει τα T_{regs}. BTLA: B and T lymphocyte attenuator, CSCs: Cancer stem cells, CTLA4: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, EMT: epithelial-to-mesenchymal transition, FGF4: fibroblast growth factor 4, GAS6: growth arrest-specific protein 6, HGF: hepatocyte growth factor, IGF1R: insulin-like growth factor 1 receptor, IGF2: insulin-like growth factor 2, LAG3: lymphocyte activation gene 3, PDGF β : platelet-derived growth factor- β , PlGF: placental growth factor, STAT: signal transducer and activator of transcription, TIM3: T cell membrane protein 3, TNF: tumour necrosis factor

1.iv. Απορρύθμιση των μοριακών μηχανισμών

Η εξέλιξη της έρευνας και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στη μετατροπή του υγιή πνευμονικού ιστού στο αντίστοιχο καρκίνωμα, ανεξάρτητα από το κύτταρο που προέρχεται, έχει βοηθήσει στην αναγνώριση των μεταλλάξεων που προκαλούν τα καρκινώματα του πνεύμονα.

Πειράματα σε ποντίκια με βλάβες στα γονίδια PTEN και CDKN2A και υπερέκφραση του SHOX2 στα τραχειοβρογχικά βασικά κύτταρα, κύτταρα Clara και πνευμονοκύτταρα τύπου II φαίνεται να οδηγούν στην εμφάνιση πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα [49]. Από την άλλη πλευρά, μια ομάδα ογκογονιδίων αποτελούμενων από τα TP53, myrAKT1, RB1, MYC, BCL2 φάνηκε να οδηγούν στη μετατροπή των φυσιολογικών βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων σε νευροενδοκρινή μικρού μεγέθους κύτταρα, με μεταγραφικό και γονιδιωματικό προφίλ παρόμοιο με το SCLC [50]. Ενεργοποίηση της σηματοδότησης Notch, κυρίως του NOTCH2, μπλοκάροντας τη δράση του SHOX2 προκαλεί τη μετατροπή των κυττάρων Clara σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα [51]. Συνήθως αυτές οι μοριακές διαταραχές έχουν την ικανότητα να βοηθούν στην επιβίωση, τη διακοπή της διαφοροποίησης και την

παρεμπόδιση της φυσιολογικής λειτουργίας των CSCs. Ένα άλλο παράδειγμα απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι μέσω του μονοπατιού του KEAP1/NRF2. Μεταλλάξεις στο KEAP1 έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του μονοπατιού, το οποίο έχει επίσης προστατευτικό ρόλο απέναντι στο οξειδωτικό στρες του κυττάρου [52].

Η πρωτεΐνη NF-κΒ παρουσιάζει επίσης υπερέκφραση στο NSCLC. Σε μια μελέτη που αφορούσε CSC από NSCLC ανθεκτικό στην αγωγή με πλατίνα, η έκφραση του NF-κΒ μπορούσε να μειωθεί χρησιμοποιώντας ένα μικρομοριακό αναστολέα δεϋδρομεθυλεποξικινομικίνης (DHMEQ) για να αποκατασταθεί η ευαισθησία προς την πλατίνα, υποδεικνύοντας ότι το NF-κΒ μπορεί να σχετίζεται με την επιβίωση των κυττάρων στον καρκίνο του πνεύμονα [49].

Το YAP το οποίο συνεχώς αναστέλλεται από το μονοπάτι Hippo στα προγονικά κύτταρα του πνεύμονα φαίνεται να υπερεκφράζεται στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα [53]. Η υπερέκφραση του YAP φαίνεται να συσχετίζεται με παρατεταμένη επιβίωση και αυτοφαγία στις κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος πνεύμονα A549 και H1299 και οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του mTOR μέσω καταστολής του PTEN. Επομένως, τα CSCs μπορεί να οδηγήσουν στην αναστολή της λειτουργία του μονοπατιού Hippo μέσω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης YAP.

Το γονίδιο STK11 είναι επίσης ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα, και συνήθως εμφανίζεται μαζί με μεταλλάξεις στο KRAS. Ανεξάρτητα με το αν εμφανίζεται μαζί ή ξεχωριστά από το KRAS, σχετίζεται με χειρότερη συνολική επιβίωση στο μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα. Σε μια μελέτη φάνηκε ότι το STK11 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο μέσω του μονοπατιού STK11/MARK3/ERK1/2, εξηγώντας πως η απώλειά του οδηγεί στην αναστολή της διαφοροποίησης των CSCs [49].

1.v. Απορρύθμιση των σημάτων του μικροπεριβάλλοντος κατά την επιδιόρθωση του πνευμονικού ιστού

Η συνεχής φλεγμονή των αεραγωγών που παρατηρείται στους χρόνιους καπνιστές με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και καρκίνο του πνεύμονα σχετίζεται με τη συνεχόμενη επιδιόρθωση του ιστού και πιθανώς συνδυάζεται με την αδιάκοπη βλάβη που προκαλείται, είτε από το αρχικό καρκινογόνο (π.χ. κάπνισμα) είτε από τη χρόνια φλεγμονή [54]. Η χρόνια φλεγμονή είναι ένα επιβλαβές γεγονός, καθώς μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη στους ιστούς και να εμποδίσει την επιδιόρθωσή τους. Για παράδειγμα, οι ROS από τον καπνό του τσιγάρου μπορεί να λειτουργήσουν ως δεύτερος αγγελιοφόρος για ενδοκυττάρια ενεργοποίηση μονοπατιών όπως το NF-κΒ που προκαλεί φλεγμονή ή εμμέσως προκαλώντας βλάβη στον ιστό, που με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή ως μηχανισμός επιδιόρθωσης [49]. Ο καπνός του τσιγάρου εξασφαλίζει την επανειλημμένη

έκθεση του πνεύμονα σε τοξικά σωματίδια και ROS, οδηγώντας σε παρατεταμένη φλεγμονή. Αυτό φάνηκε και σε μία μελέτη όπου βρέθηκε ότι ο καπνός δρα μέσω καθυστέρησης του θανάτου των ουδετερόφιλων, το οποίο με τη σειρά του παρατείνει την καταστροφή του ιστού και τη διάρκεια καταστροφής των τοξικών ουσιών μέσω της δράσης ενζύμων και των ROS [55]. Από την άλλη, ο καπνός του τσιγάρου εμφανίζει και ανοσοκατασταλτική δράση στα φλεγμονώδη κύτταρα που εμφανίζονται ως απάντηση στη βλάβη των ιστών [49]. Παρόλο που παρουσιάζουν αύξηση στον αριθμό τους, τα μακροφάγα των κυψελίδων φαίνεται να έχουν μειωμένη δραστικότητα στην επιδιόρθωση των ιστών μετά την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, παρατείνοντας περαιτέρω τη φλεγμονή. Επιπλέον, το κάπνισμα εμποδίζει την επιδιόρθωση των ιστών μέσω παράτασης της επιβίωσης των ινοβλαστών, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον υποστηρικτικό τους ρόλο στην αναγέννηση των ιστών [56]. Ανεξάρτητα όμως από την επίδραση του καπνού, τα προγονικά κύτταρα πρέπει να επικοινωνήσουν με τα φλεγμονώδη κύτταρα ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν, αλλιώς δεν γίνεται να διακοπεί η φλεγμονώδης αντίδραση. Αυτό είναι εμφανές σε πειράματα με ποντίκια τα οποία δεν έχουν το *Yap/tafazzin* (Taz) στο μονοπάτι Hippo. Τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν καθυστέρηση στον πολλαπλασιασμό των πνευμονοκυττάρων II και αδυναμία στην αναστολή της φλεγμονής που προκαλεί το NF-κB, οδηγώντας σε παρατεταμένη φλεγμονή [57].

Τα χημικά σήματα που προέρχονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον μπορεί επίσης να επηρεάζονται αρνητικά από τη χρόνια φλεγμονή. Ύστερα από επαναλαμβανόμενους κύκλους οξείας φλεγμονής, τα προγονικά κύτταρα του πνεύμονα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού μπορεί να μην ανταποκρίνονται σε εξωγενή σήματα καταστολής ή διαφοροποίησης όπως οι συνδέτες BMP, Notch και IL6 εξαιτίας της απευαισθητοποίησης των υποδοχέων που μεταφέρουν το σήμα [58]. Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να ευθύνεται για τη βλάβη στο σήμα είναι η βλάβη των πηγών που δημιουργούν το σήμα, όπως τα στρωματικά κύτταρα, με τρόπο παρόμοιο με τα παρεγχυματικά κύτταρα από τους παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα ή από τη χρόνια φλεγμονή, οδηγώντας τελικά σε δυσλειτουργικούς συνδέτες που δεν είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν τη διαφοροποίηση ή να καταστείλουν τα CSCs. Το μονοπάτι BMP που είναι υπεύθυνο για την καταστολή είναι επηρεασμένο με αυτό το μηχανισμό. Αυτό διαπιστώθηκε όταν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες των συνδετών BMP6 και BMP7 διορθώθηκαν σε κυτταρικές σειρές NSCLC και SCLC αντίστοιχα, σταμάτησε ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων. Ακόμα, επαναλαμβανόμενη ή συνεχής έκκριση χημειοκινών και κυτταροκινών στο σημείο της φλεγμονής μπορεί να αλλοιώνει άλλα σήματα που προέρχονται από το μικροπεριβάλλον. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί επίσης, μέσω οξείας έκκρισης κυτταροκινών όπως η IL1B, να διατηρεί τον πολυδύναμο χαρακτήρα του κυττάρου προκαλώντας μεταβολή στη χρωματίνη

στο CDH1 και ακολούθως επαναπρογραμματισμό της επιθηλιακής σε μεσεγχυματογενή μετατροπή (Epithelial to mesenchymal transition – EMT) [49].

1.vi. Απορρύθμιση των αντλιών ιόντων κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης

Εκτός από την επικοινωνία μέσω συνδετών, όπως για παράδειγμα το WNT7B και το FGF10, τα κύτταρα μπορούν να επικοινωνήσουν μέσω διαύλων εισροής και εκροής ιόντων H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- μέσω των αντίστοιχων αντλιών, προκαλώντας μεταβολές στην κυτταρική μεμβράνη [59]. Κύτταρα σε μια συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να παρουσιάσουν μια χωροχρονική διανομή των δυναμικών τους ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκονται. Τα βιοηλεκτρικά γεγονότα που προκαλούν αλλαγές στα ιόντα, το pH, τη δυναμική της μεμβράνης και τα ηλεκτρικά πεδία στον εξωκυττάριο χώρο επηρεάζουν τους μορφολογικούς και λειτουργικούς χαρακτήρες των ιστών και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τη λειτουργία. Γενικότερα, απορρύθμιση του δυναμικού των κυττάρων από την αρχική κατάσταση ηρεμίας τους προκαλεί ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που μπορούν να ρυθμίσουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Βιοηλεκτρικά σήματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μέσω των χασμάτων ανιόντων και να παρέχουν πληροφορίες για τη θέση και την ταυτότητα κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης των ιστών [60].

Ο μηχανισμός με τον οποίο η χρόνια φλεγμονή μπορεί να επηρεάσει αυτό το μονοπάτι δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, διαφορές στα δυναμικά που ρυθμίζουν την οργάνωση των ιστών μπορεί να μεταβληθούν κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής και να οδηγήσουν σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας στην εμφάνιση του όγκου. Για παράδειγμα, ROS από φλεγμονώδη κύτταρα όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) επηρεάζουν το διεπιθηλιακό δυναμικό και τα ηλεκτρικά πεδία για να διεγείρουν την αναγέννηση. Σε συνθήκες μη ύπαρξης ROS λόγω αναστολής της παραγωγής μέσω του NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), η αναγέννηση ήταν μειωμένη σε γυρίνο *Xenopus laevis* που είχε αφαιρεθεί η ουρά του, ωστόσο μπορούσε να σωθεί μέσω εξωγενούς προσθήκης H_2O_2 , το οποίο φαίνεται να αυξάνει τη λειτουργία των διαύλων Na^+ για να επάγει την αναγέννηση. Το πείραμα αυτό αποδεικνύει ότι η χρόνια φλεγμονή μπορεί να αυξήσει την αναγεννητική ικανότητα των προγονικών κυττάρων λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS. Η επαγόμενη αναγέννηση μέσω του ROS μπορεί να σχετίζεται με ένα εξελικτικό φαινόμενο που ονομάζεται πολλαπλασιασμός επαγόμενος από την απόπτωση (Apoptosis induced proliferation -AiP). Πρόκειται για ένα συμπληρωματικό μηχανισμό των ετοιμοθάνατων κυττάρων για να προκαλέσουν τον

πολλαπλασιασμό είτε μέσω του μονοπατιού ROS/TNF/JNK είτε μέσω έκκρισης μιτογόνων σημάτων όπως το WNT και το SHH [49].

Ένας άλλος τρόπος δράσης συμβαίνει όταν τα αποπτωτικά ουδετερόφιλα δεν απομακρύνονται κατά τη χρόνια φλεγμονή, με αποτέλεσμα τα κυτταρικά τους περιεχόμενα συμπεριλαμβανομένων κυτταροτοξικών πρωτεασών, κασπασών και ROS να ελευθερώνονται στο σημείο της φλεγμονής [61]. Τα ROS μπορεί να λειτουργήσουν ως ενεργοποιημένα ιόντα, όπως το O_2^- , προκαλώντας αλλαγές στο επιθηλιακό διαμεμβρανικό ή διεπιθηλιακό δυναμικό. Μεταβολές στο διαμεμβρανικό δυναμικό στο κυτταρικό επίπεδο μπορεί να ενισχύσει την καρκινογένεση, όπως φαίνεται και από τις μεταβολές στα εμβρυϊκά stem cell του *Xenopus laevis*, που μπορούν να διεγείρουν μελανοκύτταρα για να αποκτήσουν ένα διηθητικό υπερπολλαπλασιαστικό φαινότυπο, υποδηλώνοντας πιθανή νεοπλασματική μετατροπή []. Αντιθέτως, υπερπόλωση καταστεί τα κύτταρα ανθεκτικά σε κακοήγη μετατροπή ακόμα και όταν υπάρχει έκφραση ογκογονιδίων [49].

Επιπροσθέτως, λόγω της επιβλαβής φύσης της χρόνιας φλεγμονής, οι γειτονικοί υποστηρικτικοί ιστοί όπως τα νεύρα, τα οποία χρησιμεύουν για την επικοινωνία σε μεγάλες αποστάσεις, μπορεί να καταστραφούν, οδηγώντας σε αυξημένη επίπτωση της ανάπτυξης του όγκου [49]. Στον πνεύμονα, αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα PNEC και την ανάπτυξη του SCLC.

1.v. Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός κατά τη διάρκεια της μεσεγχυματογενούς μετατροπής

Η EMT είναι μια φυσιολογική κυτταρική οδός επαναπρογραμματισμού που επίσης εμφανίζεται κατά την επιδιόρθωση των ιστών, ειδικά κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού προκειμένου να βοηθήσει στην αναγέννηση [62]. Η EMT ενεργοποιεί το μεσεγχυματογενή φαινότυπο με την έκφραση της CDH2/N-cadherin και απενεργοποιεί τον επιθηλιακό φαινότυπο με τη μείωση της έκφρασης του CDH1. Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια φαίνεται να ενεργοποιούν την EMT ενεργοποιώντας έναν από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες (SNAIL, TWIST, ZEB). Ωστόσο, μόνο η ενεργοποίηση του TGFβ1 μέσω του μονοπατιού του TGFβ έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιήσει και τους τρεις παράγοντες ταυτόχρονα. Λόγω αυτής της δραστηριότητας, ο TGFβ1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα CSCs για την κατάχρηση της EMT, καθώς είναι μία από τις κυτταροκίνες που είναι ελεύθερα διαθέσιμες κατά την αναγεννητική φάση [63]. Παρόλο που η EMT είναι συνήθως παροδικά ενεργοποιημένη κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης των ιστών από τον επαναπρογραμματισμό της χρωματίνης που προκαλεί σίγαση στο CDH1, μερική ενεργοποίηση της EMT είναι κοινό εύρημα σε πολλούς όγκους. Επιπλέον, «αναμνηστική» EMT μπορεί να δημιουργηθεί μέσω οξείας έκθεσης στην IL1β για να προκαλέσει παρατεταμένη δράση της EMT και διατήρηση του πολυδύναμου δυναμικού, υποστηρίζοντας τη δράση

των CSCs στην εξέλιξη του όγκου, οδηγώντας σε κλινικά αποτελέσματα όπως είναι η αντίσταση στη θεραπεία, η μετάσταση και η δυνατότητα του καρκινικού κυττάρου να ξεφεύγει από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού [64].

1.vi. Γονιδιακές μετατροπές ανάλογα τον υπότυπο

Πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές μεταβολές φαίνεται να ευθύνονται για την εμφάνιση και την ανάπτυξη των διάφορων ιστολογικών υπότυπων. Ο SCLC συχνά εμφανίζεται με την ταυτόχρονη απενεργοποίηση των δύο ογκοκατασταλτικών γονιδίων TP53 και R8 [65]. Τα γονίδια TP53 και CDKN2A είναι συχνά μεταλλαγμένα στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα, ενώ στο αδenoκαρκίνωμα είναι τα γονίδια KRAS, EGFR, TP53, KEAP1, STK11 και NF1 [66]. Επιγενετικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων μεθυλίωση του DNA, μετασχηματισμό ιστονών και έκφραση μη κωδικοποιητικού RNA έχουν επίσης αναφερθεί στον καρκίνο του πνεύμονα. Παραδείγματος χάρη, σε σύγκριση με το φυσιολογικό πνεύμονα, τα κύτταρα του όγκου εμφανίζουν υπερακετυλίωση H4K5/H4K8, υποακετυλίωση H4K12/H4K16 και απώλεια του H4K20me3 [67]. Τα microRNA miR-196a και miR-200b, μαζί με τα μη κωδικοποιητικά RNA MALAT1 και HOTAIR φαίνεται να παρουσιάζουν υπερέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα [68]. Από τους επιγενετικούς παράγοντες, η μεθυλίωση του DNA είναι ο πιο καλά μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός που μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων μέσω τροποποίησης της δομής της χρωματίνης και την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα (Transcription Factor-TF). Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες μεθόδους και λαμβάνοντας υπόψιν διάφορους παράγοντες πρέπει να επιλεγθεί η κατάλληλη. (π.χ. το στόχο της μελέτης, την ποιότητα και την ποσότητα του διαθέσιμου DNA, την απαιτούμενη ευαισθησία και ειδικότητα και το κόστος) [69]. Διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA διαφόρων γονιδίων έχουν παρατηρηθεί στους διάφορους ιστολογικούς υπότυπους καρκίνου του πνεύμονα [70-73], στην κατάσταση των μεταλλάξεων κοινών ογκογονιδίων [74], στο ιστορικό καπνίσματος [72-75], το φύλο [76], και τη φυλή [77,78]. Επιπλέον φαίνεται ότι μεθυλίωση του DNA μεμονωμένων γονιδίων ή ομάδων γονιδίων, καθώς και επιγενετικοί υπότυποι σχετίζονται με την πρόγνωση [79-81]. Επομένως, η κατάσταση στη μεθυλίωση του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος και ικανός βιοδείκτης για την πρώιμη διάγνωση, την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα [82]. Για παράδειγμα, η ταυτόχρονη μεθυλίωση των γονιδίων SHOX2 και RASSF1A έχει πολύ μεγαλύτερη ειδικότητα (>90%) και ευαισθησία (>70%) για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε σχέση με την κλασική κυτταρολογική μέθοδο [83,84]. Άλλες μελέτες φαίνεται να αναγνωρίζουν άλλα ζεύγη γονιδίων ως πιθανούς βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωση (RASSF1A και RARβ2, SHOX2 και PTGER4, p16 και RARβ2) [85-88]. Συγκεκριμένοι δείκτες μεθυλίωσης

σχετίζονται με επιθετική συμπεριφορά του καρκίνου του πνεύμονα και μεταστατικό δυναμικό, όπως αυξημένη μεθυλίωση των DAL-1, EPHB6, HS3ST2, TMEM88 και MGMT και μειωμένη μεθυλίωση του ELMO3 [29-94].

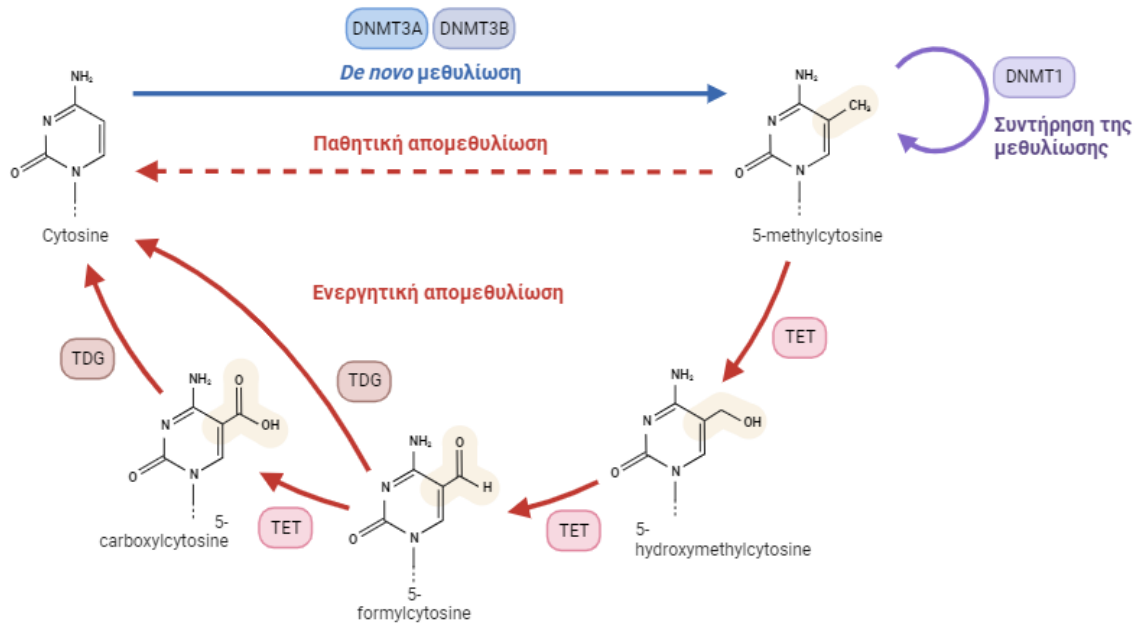
Οι θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (χειρουργείο, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, στοχεύουσα θεραπεία) καθορίζονται από διάφορους παράγοντες όπως η ιστολογική ταυτοποίηση του όγκου, το στάδιο και οι μοριακές αλλοιώσεις [95]. Παρόλο που το χειρουργείο είναι η κύρια θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με πρώιμο καρκίνο πνεύμονα, οι περισσότεροι διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο, καθιστώντας αδύνατη αυτή την επιλογή. Η πρώτη επιλογή θεραπείας για αυτούς τους ασθενείς είναι η χημειοθεραπεία, με ή χωρίς ακτινοθεραπεία αναλόγως του σταδίου. Τα τελευταία χρόνια προστέθηκε και η ανοσοθεραπεία στο θεραπευτικό αλγόριθμο, από την οποία όμως όφελος φαίνεται να έχει περιορισμένος αριθμός ασθενών (περίπου 20-25% των ασθενών), χωρίς να έχουμε αναγνωρίσει κάποιο βιοδείκτη που να μπορεί να μας προσδιορίσει με ακρίβεια ποιοι είναι αυτοί οι ασθενείς [96]. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιοι δείκτες μεθυλίωσης του DNA μπορεί να προσφέρουν καθοδήγηση για την επιλογή επιπλέον θεραπευτικών επιλογών. Για παράδειγμα, τα επίπεδα μεθυλίωσης των APC, HOXA9, RARβ2 και RASSF1A μπορεί να βοηθήσουν στην καλύτερη διάκριση των υπότυπων του καρκίνου του πνεύμονα και να καθορίσουμε το θεραπευτικό πλάνο [97]. Επίσης η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να έχει στενή συσχέτιση με το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (Tumor mutational burden – TMB) στον καρκίνο του πνεύμονα, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός ή συμπληρωματικός βιοδείκτης για την ανοσοθεραπεία. Υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του IGFBP-3 υποδηλώνουν κύτταρα ανθεκτικά στην πλατίνα [98], ενώ υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του RASSF1A μπορεί να υποδηλώνουν μια καλύτερη ανταπόκριση στη γεμισταβίνη στο NSCLC [99]. Επιπροσθέτως, ο αλκυλιούν παράγοντας τεμοζολαμίδη μπορεί να είναι περισσότερο δραστήσιος σε SCLC με μεθυλίωση του MGMT [100].

2. Μηχανισμοί απορρύθμισης της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα

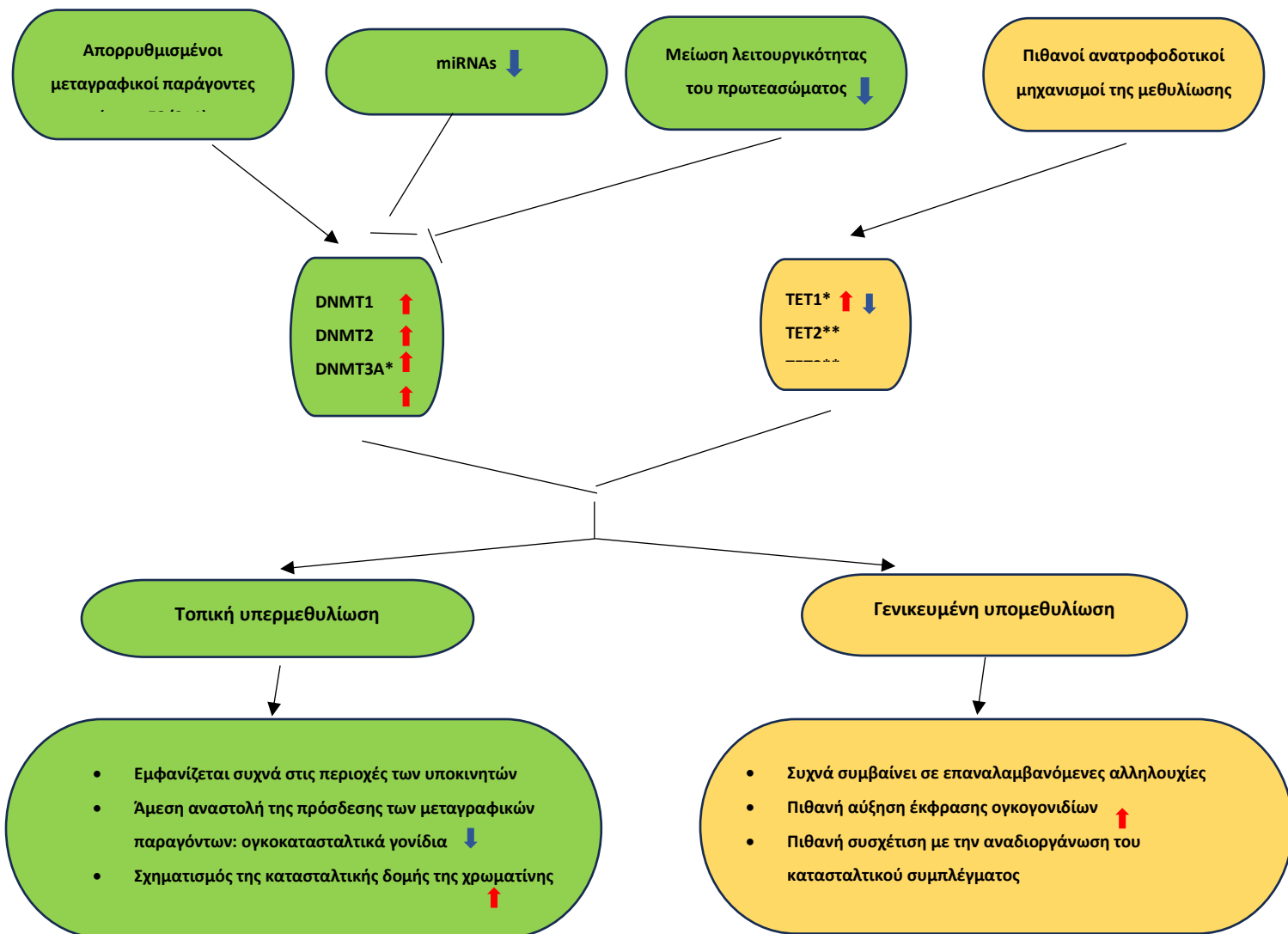
2.i. Απορρύθμιση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα.

Η μεθυλίωση του DNA είναι η βιολογική διαδικασία αποτρέπει τους ανασυνδυασμούς μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, οδηγώντας σε καταστολή της δραστηριότητας των γονιδίων και σε σταθεροποίηση του γονιδιώματος [101]. Η διαδικασία της μεθυλίωσης είναι επηρεασμένη στα καρκινικά κύτταρα, δημιουργώντας είτε ολική υπομεθυλίωση είτε μεμονωμένα υπερμεθυλίωση των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [101-103]. Αρκετές από τις διαδικασίες της διαταραγμένης μεθυλίωσης έχουν αναγνωριστεί και στον καρκίνο του πνεύμονα, ειδικά όσον αφορά τη μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων υποκινητών του DNA [104]. Η μεθυλίωση του DNA γίνεται με την ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 5 του άνθρακα μιας βάσης κυτοσίνης (5mC), που γίνεται από ένζυμα μεθυλτρανσφεράσης του DNA (DNA methyltransferase enzymes – DNMTs). Στα θηλαστικά, οι μεταβολές συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του γονιδιώματος πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CpG, που ονομάζονται νησίδια CpG (CpG islands – CGIs), και βρίσκονται κοντά ή μέσα σε περιοχές των υποκινητών. Διαταραγμένη υπομεθυλίωση του DNA σε όλη την έκταση του γονιδιώματος και τοπική υπερμεθυλίωση των υποκινητών έχουν παρατηρηθεί στους περισσότερους όγκους, ακόμα και στα αρχικά στάδια μιας κακοήθειας [105]. Παρόλο που γενικότερη μείωση στη μεθυλίωση των CpG θεωρείται ότι ενεργοποιεί ογκογονίδια και ρετροτρανσποσόνια και αυξάνει τη γονιδιωματική αστάθεια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συνήθως αδρανοποιούνται από την υπερμεθυλίωση του DNA. Ένα πρόσφατο στοχαστικό μοντέλο υποθέτει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε κάθε θέση CpG ρυθμίζονται δυναμικά από την τοπική δραστηριότητα των DNMTs και των απομεθυλασών του DNA (π.χ. ένζυμα TET) όπως και το ρυθμό αντιγραφής του DNA [106] (σχήμα 2). Απορρύθμιση των DNMTs και των TETs έχουν συνδεθεί με μεταλλάξεις του όγκου στον καρκίνο του πνεύμονα (σχήμα 3).

Μεθυλίωση του DNA



Εικόνα 6: Η δυναμική της μεθυλίωσης από τα DNMTs και τα TETs. Τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA αποτελούνται από μεθυλωμένα και απομεθυλωμένα CpGs μπορεί να δημιουργηθούν εξ αρχής από τα DNMTs, τυπικά τα DNMT3A και DNMT3B. Το μοτίβο της μεθυλίωσης διατηρείται κατά την αντιγραφή του DNA από το DNMT1, αλλά μπορεί να χαθεί μέσω παθητικής ή ενεργητικής μεθυλίωσης, το οποίο καταλύεται από τα ένζυμα TETs και TDG. TETs: ten-eleven translocation enzymes, DNMT: DNA methyltransferase, TDG: Thymine-DNA glycosylase.



Σχήμα 2: Πιθανοί μηχανισμοί και συνέπειες των μεταβολών της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα. Πολλαπλοί μηχανισμοί οφείλονται στη διαφορετική έκφραση των DNMTs στον καρκίνο του πνεύμονα, αλλά λιγότερα είναι γνωστά για τα TETs, με ένα μοντέλο να προτείνει ότι το TET1 μπορεί να ρυθμίζεται μέσω ανατροφοδοτικού μηχανισμού από μεθυλίωση του υποκινητή. Τα αποτελέσματα είναι συχνή τοπική υπερμεθυλίωση στις περιοχές των υποκινητών και γενικευμένη υπομεθυλίωση, κυρίως στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Αυτά τα βήματα μπορεί να οδηγήσουν σε πολλαπλές πιθανές γονιδιωματικές συνέπειες, συμπεριλαμβανομένων της μειωμένης έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την ενεργοποίηση αλλαγών μεγάλων συμπλεγμάτων χρωματίνης και αυξημένη γονιδιωματική αστάθεια.
 *αντικρουόμενες αναφορές για την έκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα στη βιβλιογραφία. **τα επίπεδα έκφρασης των TET2 και TET3 στον καρκίνο του πνεύμονα δεν έχουν περιγραφεί καλά στη βιβλιογραφία. DNMT: DNA methyltransferase, TET: Ten-eleven translocation enzyme, τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν αυξημένη έκφραση, τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τη μειωμένη έκφραση.

2.ii. Απορρύθμιση των DNMTs

Υπάρχουν πέντε γνωστά DNMTs στους ανθρώπους, το καθένα εμφανίζει διαφορετική ειδικότητα απέναντι στο μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο DNA: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Το DNMT1 λειτουργεί στις ημιμεθυλιωμένες θέσεις των CpG και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της μεθυλίωσης στις θυγατρικές αλυσίδες του DNA μετά την αντιγραφή [107]. Αντιθέτως, τα DNMT3A και DNMT3B εμπλέκονται στη de novo μεθυλίωση του DNA κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Το DNMT2 (ή TRDMT1) δεν μεθυλιώνει DNA αλλά πολλαπλά tRNA [108]. Το DNMT3L αλληλεπιδρά με τα DNMT3A και DNMT3B για να ενισχύσει τη δραστηριότητά τους [19].

Υπερέκφραση των DNMTs έχει συχνά παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα με υπερέκφραση του DNMT1 και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση [109-111]. Η ερευνητική ομάδα του Belinsky απέδειξε ότι μείωση στο DNMT1 μειώνει την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα που οφείλεται στο κάπνισμα σε μοντέλα ποντικών [112]. Η καταστολή των DNMT1 και DNMT3B είχε ως αποτέλεσμα στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου, την απόπτωση και την επανενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε κυτταρικές σειρές με καρκίνο πνεύμονα [113]. Παρόλο που τα DNMTs δεν εμφανίζουν συχνά σωματικές μεταλλάξεις στον καρκίνο του πνεύμονα, πολλοί είναι οι μηχανισμοί που αποδίδονται στην υπερέκφραση των DNMTs, συμπεριλαμβανομένων της απορρύθμισης των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. p53/Sr1), της μείωσης της έκφρασης των miRNA (π.χ. miR-101) που ρυθμίζουν αρνητικά τα DNMTs, και μείωση της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος των DNMTs [111,113,114] (σχήμα 3). Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι αν και φαίνεται το DNMT3A να υπερεκφράζεται στον καρκίνο πνεύμονα, υπάρχουν δεδομένα ότι μπορεί να λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο [110]. Ο Husni και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι έλλειψη του DNMT3A ευνοεί την εξέλιξη του όγκου μέσω της απομεθυλίωσης των ογκογονιδίων, ενώ υψηλότερη έκφραση συνοδεύεται από καλύτερη πρόγνωση στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα [115]. Τα ίδια ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε πειράματα με ποντίκια, όπου η αφαίρεση του DNMT3A συνοδευόταν από ανάπτυξη του όγκου [116]. Δεν είναι ακόμα σίγουρο αν ο ειδικός ρόλος και τα επίπεδα έκφρασης του DNMT3A σχετίζονται με τους διάφορους ιστολογικούς τύπους του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς μια μελέτη διαπίστωσε αυξημένα επίπεδα στο SCLC αλλά όχι στο NSCLC [117]. Οι λειτουργίες των DNMT2 και DNMT3L στον καρκίνο του πνεύμονα είναι λιγότερο γνωστές, αλλά το DNMT2 φαίνεται να έχει αυξημένη δραστηριότητα στο SCLC σε σύγκριση με πολλούς άλλους ιστολογικούς υπότυπους [118].

Ο μηχανισμός δράσης έχει πολλούς διαφορετικούς τρόπους μέσω των οποίων η διαταραγμένη δραστηριότητα των DNMTs μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η υψηλή έκφραση των DNMTs

σχετίζεται με την παράταση της επιβίωσης του κυττάρου, με συνέπεια η απορρύθμισή τους να απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Μια μελέτη από την ομάδα του Sato δείχνει ότι υπερέκφραση των DNMTs σχετίζεται με παράταση της επιβίωσης κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα σε ανθρώπους [117]. Τα DNMTs φαίνεται να είναι σημαντικά για τη σύνθεση των ριβοσωμάτων, που με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κυττάρου μέσω της ρύθμισης της ωρίμανσης του rRNA και της διατήρησης της λειτουργίας του πυρηνίσκου ως θέσης δημιουργίας των ριβοσωμάτων [119,120]. Ο Wu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι στους EGFR μεταλλαγμένους NSCLC το DNMT1 βοηθάει την παράταση επιβίωσης του κυττάρου μέσω μεθυλίωσης των υποκινητών και μείωσης της έκφρασης των hMLH1 και hMSH2, τα οποία καταστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο [121].

Επιπλέον, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να απενεργοποιηθούν μέσω της μεθυλίωσης του DNA λόγω της δραστηριότητας των DNMTs, είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο. Άμεση καταστολή γίνεται μέσω απευθείας απενεργοποίησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ του μεθυλιωμένου DNA και των μεταγραφικών παραγόντων που είναι ευαίσθητη στη μεθυλίωση. Εναλλακτικά, το μεθυλιωμένο DNA χρησιμοποιεί τη θέση πρόσδεσης m5CpG (m5CpG-binding domain -MBD), το οποίο περιέχει πρωτεΐνες που δημιουργούν σύμπλοκο εμποδίζοντας την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA [122]. Έμμεση καταστολή γίνεται μέσω της πρόσδεσης του HDAC στο MBD-CpG σύμπλοκο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κατασταλτικών δομών χρωματίνης στα γειτονικά γονίδια ή ακόμα και σε ολόκληρο τμήμα χρωμοσώματος [123,124].

Δεδομένης της δράσης των DNMTs στην ογκογένεση του πνεύμονα, πολλοί αναστολείς των DNMTs (DNMTis) έχουν δημιουργηθεί κι έχουν δοκιμαστεί στον καρκίνο του πνεύμονα και σε άλλα νεοπλάσματα. Συχνά χρησιμοποιούμενοι DNMTis, όπως η 5-Αζακυτιδίνη και το παράγωγό της 5-Αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (decitabine) είναι ανάλογα νουκλεοσιδίων και λειτουργούν μέσω σύνδεσης με ομοιοπολικούς δεσμούς με τα DNMTs, απενεργοποιώντας αυτά τα ένζυμα, με αποτέλεσμα η μεθυλίωση του υποκινητή να μην διατηρείται μετά από κάθε κύκλο κυτταρικού πολλαπλασιασμού [119]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα γονίδια που είχαν απενεργοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκατασταλτικών, να εκφράζονται. Όταν χορηγούνται υψηλές δόσεις των DNMTis τα νουκλεοσιδικά ανάλογα ενσωματώνονται στο DNA και σχηματίζουν σύμπλοκα που εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο [125]. Μια μελέτη φάσης I που εξέταζε το συνδυασμό decitabine με βαλπροϊκό οξύ (αναστολέας HDAC) έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, ωστόσο είχε μεγάλη τοξικότητα [126]. Επιπλέον, το decitabine φάνηκε να αναστρέφει την αντοχή στο Gefitinib μέσω απομεθυλίωσης των υποκινητών

RASSF1A και GADD45β σε σειρές με NSCLC [127]. Υβριδισμός των ολιγονουκλεοτιδίων στις 3-μη μεταφρασμένες περιοχές και η πρόκληση αποδόμησης των mRNA των DNMTs επίσης δοκιμάστηκαν. Το MG98 μείωσε την έκφραση των DNMTs και οδήγησε στην αναστολή της ανάπτυξης και την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα [113]. Η έκφραση των MiR-29s σχετίστηκε με μειωμένη έκφραση των DNMT3A και DNMT3B και αυξημένη έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων FHIT και WWOX, οδηγώντας στην αναστολή της ογκογένεσης τόσο in vivo όσο και in vitro [128]. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι μείωση της έκφρασης των DNMTs μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιωματική αποσταθεροποίηση μέσω της χρωμοσωμικής αντιμετάθεσης [129]. Επομένως, είναι σημαντικό να ληφθούν και οι δύο πτυχές υπόψιν όταν στοχεύουμε τα DNMTs.

2.iii. Απορρύθμιση των TETs

Τα ένζυμα TET (Ten-Eleven Translocation) καταλύουν την οξειδωση του 5mC, οδηγώντας στην αναστροφή της μεθυλίωσης του DNA, η οποία αρχικά θεωρούταν ένα μη αναστρέψιμο επιγενετικό γεγονός. Η οικογένεια των πρωτεϊνών TET αποτελείται από τα TET1, TET2 και TET3, τα οποία έχουν την ίδια καταλυτική λειτουργία αλλά διαφέρουν στη δομή τους [130]. Παρόλο που οι μεταλλάξεις των TET δεν είναι συχνές στον καρκίνο του πνεύμονα, με το TET2 να έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τις άλλες δύο υποομάδες, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην έκφραση [130,131]. Ωστόσο, οι διαφορές έκφρασης των TETs, ειδικότερα των TET2 και TET3, στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένουν ασαφείς, ενώ αντικρουόμενες παρατηρήσεις σε κυτταρικές σειρές και σε μοντέλα όγκων να έχουν παρατηρηθεί για το TET1. Πρόσφατες μελέτες που βασίζονται κυρίως σε κυτταρικές σειρές προτείνουν ένα πιθανό μηχανισμό ανατροφοδότησης όπου η έκφραση του TET1 μειώνεται απευθείας από ένα μηχανισμό μεθυλίωσης των υποκινητών του DNA όταν τα φυσιολογικά κύτταρα εκτίθενται σε καρκινογόνα, αλλάζοντας περαιτέρω την ισορροπία προς τη μεθυλίωση των CpGs στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. ABE1, HOXA9, HOXA7, OGG1, TIMP και XRCC1) και τελικά την απενεργοποίησή τους [132,133]. Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι το TET1 συχνά υπερεκφράζεται (2 με 90 φορές περισσότερο στο 40-70% των όγκων) και λειτουργεί ως ογκογονίδιο στα αδενοκαρκινώματα και στα πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα που έχουν βλάβη στο p53 [134]. Επιπροσθέτως ανακάλυψαν ότι το TP53 με μεταλλάξεις μεταστροφής δεν μπορούσε να προσδεθεί στον υποκινητή και να καταστέλλει το TET1. Επομένως, ο ακριβής μηχανισμός της δραστηριότητας των TETs στον καρκίνο του πνεύμονα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ωστόσο αρκετοί παράγοντες, όπως η κατάσταση των μεταλλάξεων και τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται (κυτταρικές σειρές ενάντια πρωτοπαθείς όγκους), πρέπει να ληφθούν υπόψιν σε μελλοντικές μελέτες.

2.iv. Υπομεθυλίωση

Όπως και σε αρκετούς όγκους, εκτεταμένη υπομεθυλίωση σε όγκους του πνεύμονα απαντάται σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, συμπεριλαμβανομένων των SINEs, LINEs, τις επαναλήψεις υποτελομερών, και τις τμηματικές επαναλήψεις [69,135]. Υπομεθυλίωση στο LINE-1 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και συχνότερη διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο, ανεξαρτήτως οδηγών μεταλλάξεων σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα [136,137]. Παρά το γεγονός ότι η υπομεθυλίωση σε ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής δεν συναντάται τόσο συχνά όσο η υπερμεθυλίωση, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Απομεθυλίωση των CpGs μέσα στα CGIs του γονιδίου SNCG με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε πολλούς συμπαγείς όγκους, ανάμεσά τους και στον καρκίνο του πνεύμονα [138]. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι το SNCG να σχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό των όγκων [139]. Μια πρώιμη μελέτη έδειξε ότι τα γονίδια MAGE εμφανίζουν αυξημένη έκφραση στο 70-85% των NSCLC και στο πνευμονικό επιθήλιο που φέρει βλάβες από καρκινογόνες ουσίες, σχετιζόμενα με απώλεια της μεθυλίωσης [140]. Η υπερέκφραση των MAGE σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση στον καρκίνο του πνεύμονα [83]. Εκτός της δράσης τους ως ογκογονίδια, τα MAGE μπορεί να συνεισφέρουν στη λειτουργία των καρκινικών stem cells [141].

Εναλλακτικά, η υπομεθυλίωση στους όγκους μπορεί να προκαλεί τη γονιδιωματική αστάθεια μέσω της επανενεργοποίησης των ρετροτρανσποσόνιων και της αναδιάταξης των χρωμοσωμάτων. Μια μελέτη σε ασθενείς με NSCLC έδειξε ότι υπομεθυλίωση στο 3' άκρο της περιοχής του HRAS μπορεί να σχετίζεται με γονιδιακή απώλεια [142]. Ο Δάσκαλος και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι αυξημένη υπομεθυλίωση των ρετρομεταφερόμενων στοιχείων (LINE-1 και Alu) οδηγεί στην ενισχυμένη μεταγραφή τους και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη γονιδιωματική αστάθεια στο NSCLC [143]. Επιπλέον, αυξημένη υπομεθυλίωση σχετίζεται με περισσότερες μεταλλάξεις, αριθμό διαφορετικών παραλλαγών, και το φορτίο ανισορροπίας των αλληλίων, καθώς και το λόγο Treg/CD8 κατά την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα [144]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τον πιθανό ρόλο της υπομεθυλίωσης του DNA στην αυξημένη χρωμοσωμική αστάθεια, την εμφάνιση μεταλλάξεων, και το τροποποιημένο μικροπεριβάλλον. Αντιθέτως, ο Johnstone και οι συνεργάτες του υπέθεσαν ότι η γενικευμένη υπομεθυλίωση συνδέεται στενά με συμπαγή και σχετικά σιωπηλά τμήματα γονιδίων [145]. Η αναδιοργάνωση των τμημάτων είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ανοσογονικότητας ενάντια στον όγκο και την απενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάστασης ανάμεσα σε πολλούς συμπαγείς όγκους. Ως εκ τούτου, πρότειναν ότι η γενικευμένη υπομεθυλίωση που

παρατηρείται στους όγκους μπορεί να μην είναι επακόλουθο της κακοήθειας, αλλά της συσσώρευσης κυτταρικών τμημάτων, τα οποία έχουν περισσότερο ογκοκατασταλτικό παρά ογκογόνο ρόλο.

2.v. Υπερμεθυλίωση

Παρόλο που οι μηχανισμοί πίσω από την υπομεθυλίωση είναι περιορισμένοι, υπάρχει πληθώρα μελετών για τους στόχους και το ρόλο της υπερμεθυλίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι διαφορές στα αποτελέσματα ανάμεσα στις μελέτες οφείλονται στο διαφορετικό τους σχεδιασμό, τα υλικά (π.χ. πρωτοπαθής όγκος ενάντια σε κυτταρικές σειρές), ετερογένεια (διάφοροι ιστολογικοί υπότυποι) και τεχνικές (π.χ. ποσοτική ή ποιοτική προσέγγιση, διαφορετικός αριθμός CpGs, διαφορετικές πλατφόρμες καταγραφής, διαφορετικές στατιστικές μέθοδοι) [146]. Ανεξάρτητα από αυτά τα δεδομένα, πολλαπλά CGIs πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν βρεθεί υπερμεθυλωμένα στον καρκίνο του πνεύμονα [27, 135,-147-148]. Αυτά τα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες που συνήθως απορρυθμίζονται στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης (CASP8, DAPK, TNFRSF6, DR4, DR5), τον κυτταρικό κύκλο (CDKN2A/p16, PTEN, RASSF1A), την επιδιόρθωση του DNA (MGMT, MLH1, MSH2), τη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών (APC, RARβ-2, RUNX3, SHOX2) και την προσκόλληση και εισβολή των κυττάρων (CDH1, CDH13, TSLC1) [149-153] (πίνακας 1). Πολλά από αυτά τα γονίδια ενεργοποιούνται ξανά μετά από θεραπεία με αναστολείς της μεθυλίωσης (π.χ. 5'-aza-2' deoxycytidine) σε κυτταρικές σειρές με καρκίνο πνεύμονα, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τη σίγαση τους από τη μεθυλίωση του DNA [154]. Παρόλο που η μεθυλίωση μπορεί να μην οδηγεί απαραίτητα σε απενεργοποίηση γονιδίων, πολύ μεθυλωμένοι στόχοι έχουν φανεί χρήσιμοι ως επιγενετικοί δείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα [81].

Υπάρχουν αναφορές σε όγκους τόσο υπερμεθυλίωσης όσο και υπομεθυλίωσης στα ίδια γονίδια. Για παράδειγμα, ο υποκινητής του πιθανού ογκοκατασταλτικού γονιδίου UNC5D παρουσιάζει υπερμεθυλίωση, ενώ τα ιντρόνια στο μονοπάτι εμφάνιζαν υπομεθυλίωση στον καρκίνο του πνεύμονα, υποδηλώνοντας μια πιθανή περίπλοκη αλληλεπίδραση των δύο αντίθετων μηχανισμών προκειμένου να ρυθμιστεί η γονιδιακή έκφραση [135]. Επιπλέον, η υπερμεθυλίωση του DNA δεν έχει πάντα ως αποτέλεσμα στην απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αλλά αντιθέτως στην ενεργοποίηση ογκογόνων γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του TERT φάνηκε ότι οδηγεί στην υπερέκφραση των TERT στο 82% των όγκων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του πνεύμονα [155]. Αν και η διάσπαση του μονωτή μέσω της υπερμεθυλίωσης οδηγώντας στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων έχει παρατηρηθεί σε γλοιώματα και όγκους του γαστρεντερικού, η σημασία ενός τέτοιου μηχανισμού πρέπει να διερευνηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα [156,157].

Παρόλο που πολλά από τα προαναφερθέντα γονίδια υπόκεινται σε μεταβολές στη μεθυλίωση στον καρκίνο του πνεύμονα γενικότερα, μερικά από αυτά σχετίζονται περισσότερο με διαφορετικούς ιστολογικούς υπότυπους, το κάπνισμα και τις μοριακές μεταβολές. Κατανοώντας τη συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA σε ξεχωριστούς υπότυπους του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών, την ανακάλυψη χρήσιμων βιοδεικτών για τη διάγνωση και την πρόγνωση και στην εφαρμογή εξατομικευμένης αγωγής.

Αλλαγές μεθυλίωσης στους όγκους	Γονίδια	Μονοπάτια	Ιστολογικός τύπος	Αναφορά
Υπερμεθυλίωση	APC	Κυτταρική επιβίωση, μετάσταση	NSCLC, SCLC	[187, 188]
	CASP8	Απόπτωση	SCLC	[153]
	CDH1	Κυτταρική προσκόλληση	NSCLC, SCLC	[189,190]
	CDH13	Κυτταρική προσκόλληση	NSCLC, SCLC	[187]
	CDKN2A/p16	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	NSCLC, SCLC	[118, 173]
	DAPK	Απόπτωση	NSCLC	[152]
	FHIT	Κυτταρική επιβίωση και απόπτωση	NSCLC, SCLC	[192,193]
	GSTP1	Αποτοξίνωση	NSCLC, SCLC	[194,195]
	MGMT	Επιδιόρθωση DNA	NSCLC, SCLC	[194,196]
	MLH1	Επιδιόρθωση DNA	NSCLC	[176]
	MSH2	Επιδιόρθωση DNA	NSCLC	[176]
	PTEN	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	NSCLC	[197]
	RARβ	Κυτταρική διαφοροποίηση, επιβίωση	NSCLC, SCLC	[177]
	RASSF1A	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου, διατήρηση γονδιωματικής σταθερότητας, απόπτωση, μετάσταση	NSCLC, SCLC	[198,199]
	RUNX3	TGF-β/Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι	NSCLC, SCLC	[178]
	SEMA3B	Κυτταρική προσκόλληση	NSCLC, SCLC	[28, 200]
	SHOX2	Κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση	NSCLC, SCLC	[180]
	TERT	Επιβίωση καρκινικών κυττάρων	NSCLC, SCLC	[184]
	TGFBR2	Σηματοδότηση	NSCLC	[202]
	TNFRSF6/Fas	Απόπτωση	SCLC	[153]
TRAIL-R1/DR4	Απόπτωση	SCLC	[153]	
TSLC1	Κυτταρική προσκόλληση	NSCLC, SCLC	[203]	
Υπομεθυλίωση	MAGE	Ρύθμιση μεταγραφής, καρκινογένεση	NSCLC	[141]
	SNCG	Μετάσταση	NSCLC, SCLC	[139]

Πίνακας 6: Επιλεγμένα γονίδια με τις συχνότερες μεταβολές στη μεθυλίωση στον καρκίνο του πνεύμονα και οι βιολογικές τους λειτουργίες. NSCLC: Non-small Cell lung cancer, SCLC: small cell lung cancer.

2. vi. Τα γονίδια *CDKN2A*, *RASSF1A*, *PTEN*, *TERT* και *SNCG*

Τα γονίδια *CDKN2A*, *RASSF1A*, *PTEN*, *SHOX2* και *MAGE* είναι από τα συχνότερα γονίδια που υφίστανται αλλαγές στη μεθυλίωσή τους στον καρκίνο του πνεύμονα. Κάθε ένα από αυτά τα γονίδια συμμετέχει σε διαφορετικό σημείο της καρκινογένεσης, ενώ μπορεί να απαντηθούν και στους δύο υπότυπους καρκίνου του πνεύμονα.

2.vi. α. Το γονίδιο *CDKN2A*

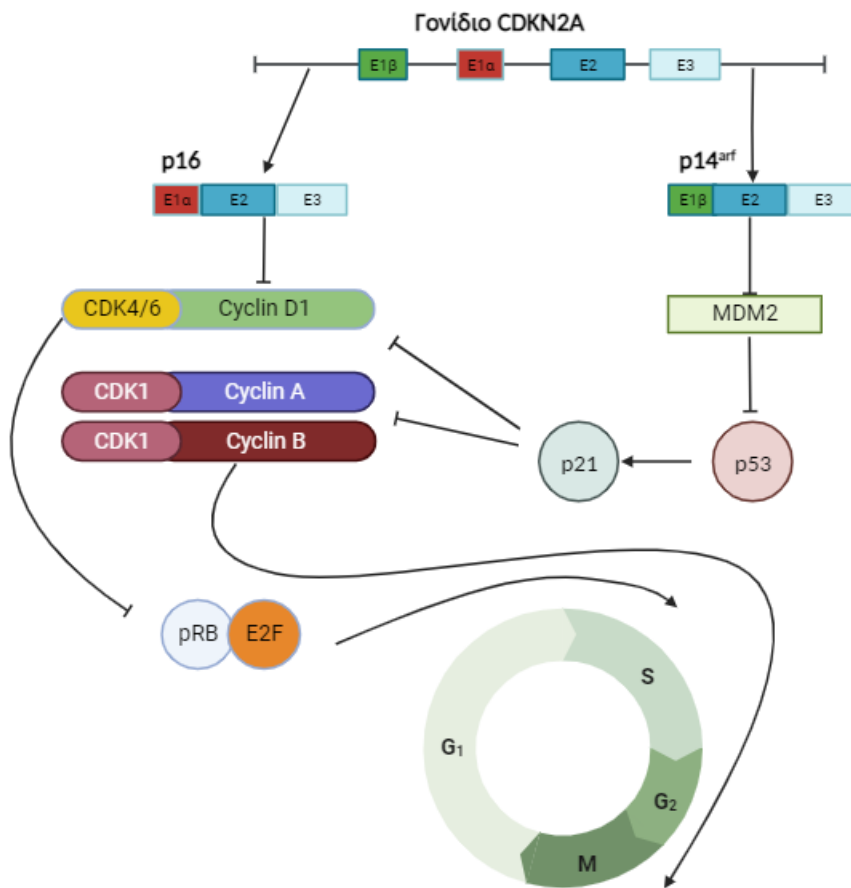
Το *CDKN2A* πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 9p21. Είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση των πρωτεϊνών p14^{arf} και p16, που έχουν ογκοκατασταλτική δράση.. Η αλληλουχία του γονιδίου επηρεάζεται και από ένα επιπλέον εξώνιο 1β, το οποίο μεταγράφεται από τον ίδιο τον υποκινητή του. Το τελικό RNA περιλαμβάνει τα εξώνια 2 και 3 αλλά το τελικό αποτέλεσμα είναι μια διαφορετική πρωτεΐνη γιατί μεταφράζονται με διαφορετικό τρόπο. Επομένως, ενώ τα εξώνια 2 και 3 μοιράζονται από τα δύο mRNA, κωδικοποιούν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, τις p16 και p14^{arf}. Η πλειονότητα των ανθρώπινων όγκων παρουσιάζει μεταλλάξεις στο *CDKN2A* κατατάσσοντάς ως δεύτερο μεταξύ των συχνότερα απενεργοποιημένων γονιδίων στον καρκίνο της3. Η συχνότητα εμφάνισης των διαταραχών της λειτουργίας του στον καρκίνο του πνεύμονα είναι >70%, είτε μέσω ομόζυγης διαγραφής είτε μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου [158].

Η p16 αναστέλλει τις κινάσες CDK4 και CDK6 και ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος, εμποδίζοντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Τρεις μηχανισμοί ευθύνονται για την απενεργοποίηση του: ομόζυγη διαγραφή, υπερμεθυλίωση του υποκινητή και σημειακή μετάλλαξη, ενώ συχνότεροι είναι οι δύο πρώτοι μηχανισμοί. Μελέτες έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο p16 είναι υψηλότερη στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με μεταλλάξεις στο *KRAS*, ενώ φαίνεται να υπάρχει αυξημένο ποσοστό και στους καπνιστές [159]. Επιπλέον, φαίνεται ότι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p16 και τον EGFR είναι αμοιβαία αποκλειόμενες [160].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία που έχει η πρωτεΐνη p14^{arf} στην καρκινογένεση και τις πολλές λειτουργίες της. Η βασικότερη είναι η ενεργοποίηση p14^{arf} ενεργοποιεί του p53 μέσω δέσμευσης του Mdm2. Επίσης αναστέλλει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης BP1/Mule μέσω της λιγκάσης της

ουμπικουϊτίνης, σταθεροποιώντας το p53 . Επιπλέον, φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη του κυττάρου ανεξάρτητα από την παρουσία του p53, ενώ ρυθμίζει και λειτουργίες του κυττάρου όπως η αυτοφαγία, η λειτουργία των μιτοχονδρίων, η μεταγραφή και δημιουργία ριβοσωμάτων. Σε κυτταρικές σειρές με έλλειψη του p53, η υπερέκφραση της p14^{arf} οδηγούσε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 [161].

Οι βλάβες του γονιδίου αυτού μπορεί να ανιχνευθεί στα κύτταρα ασθενών με καρκίνο και προκαρκινικές αλλοιώσεις, υποδηλώνοντας τη χρήση του ως βιοδείκτη για την ανεύρεση σε πρώιμα στάδια [162]. Ήδη αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τον πιθανό αυτό ρόλο, ανιχνεύοντας τον τόσο στα πτύελα όσο και στο αίμα, τονίζοντας όμως την ανάγκη για χρήση και επιπλέον δεικτών για τη σωστή διάγνωση. Επιπλέον έχει φανεί ότι υπερμεθυλίωση του γονιδίου σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς κάτω των 60 ετών με NSCLC [163]. Απουσία έκφρασης του p14^{arf} έχει συσχετιστεί με νόσο προχωρημένου σταδίου, πιο επιθετική συμπεριφορά και μεταστατικό δυναμικό [161].



Εικόνα 7 : Το γονίδιο CDKN2A και η επιρροή στον κυτταρικό κύκλο. Το γονίδιο CDKN2A, μέσω τροποποιημένου ματίσματος κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p16 και p14^{INK4} οι οποίες παρουσιάζουν διαφορά στο πρώτο εξώνιό τους. Η πρωτεΐνη p16 αναστέλλει το σύμπλεγμα CDK4/6 και κυκλίνης D1 μέσω διατήρησης των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος σε φωσφοττησκατάσταση, απενεργοποιώντας τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες. Ελεύθεροι E2F έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή πολλαπλών πρωτεϊνών, οι περισσότερες από τις οποίες είναι απαραίτητες για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S. Αντιθέτως, το p14^{INK4} σταθεροποιεί και ενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 μέσω αναστολής του MDM2, το οποίο αναστέλλει το p53. Το ενεργοποιημένο p53 προωθεί την έκφραση του p21, έναν αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, το οποίο είναι αναστολέας του συμπλέγματος CDK1- κυκλίνης A/B, εμποδίζοντας τη μετάβαση από τη φάση G2 στη μετάφαση.

2.vi. β. Το γονίδιο RASSF1

Το γονίδιο RASSF1 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο στη θέση 3p21.3, με 8 διαφορετικές ισομορφές. Από τις 8, οι RASSF1A και RASSF1C είναι αυτές που απαντώνται συχνότερα στα φυσιολογικά κύτταρα. Η βασική λειτουργία της ισομορφής RASSF1A είναι να καταστέλλει τις κυκλίνες A2 και D1, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η πρώτη λειτουργία που αναγνωρίστηκε ήταν η δέσμευση του RAS στη GTP μορφή της προκειμένου να επάγει την απόπτωση [164]. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων αναστέλλοντας την HDAC6, οδηγώντας σε αύξηση των ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων, που είναι πιο σταθεροί δομικά, ενώ συνδέεται και με τις MAPs (microtubule-associated proteins) που ρυθμίζουν τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Οι περισσότερες λειτουργίες του πραγματοποιούνται μέσω των μονοπατιών Hippo και Wnt και το ρυθμιστή της απόπτωσης 1 (Modulator of apoptosis 1 – MOAP1). Μια άλλη λειτουργία είναι και η ρύθμιση της απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασης με το KRAS και ενεργοποίησης του μονοπατιού MST2-LATS1 [165].

Ο βιολογικός ρόλος του RASSF1C δεν είναι τόσο σαφής όσο του RASSF1A. Η θέση του φαίνεται να είναι στον πυρήνα ή γύρω από αυτόν, ενώ σε περίπτωση βλάβης του DNA μεταβαίνει στο κυτταρόσολιο. Η φυσιολογική του λειτουργία φαίνεται να είναι η επιβίωση του κυττάρου και ο πολλαπλασιασμός του, αντίθετη με αυτή του RASSF1A. Κάποιες μελέτες φαίνεται να δείχνουν τη λειτουργία του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων. Άλλες μελέτες το χαρακτηρίζουν ως ογκογονίδιο, ενισχύοντας τη συσσώρευση β-κατενίνης σε κύτταρα HeLa και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων [166].

Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου φαίνεται να είναι από τα βασικά γεγονότα κατά τα αρχικά στάδια εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα, και στους δύο υπότυπους. Μεθυλίωση του

ίδιου του γονιδίου καθώς και ενός άλλου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του HIC1, οδηγεί στη μετατροπή των μεσεγχοματικών αρχέγονων κυττάρων σε καρκινικά. Η μετατροπή αυτή γίνεται και λόγω συσσώρευσης της πρωτεΐνης YAP1 στον πυρήνα και την έκφραση της P4HA2 (prolyl 4-hydroxylase alpha-2), με επακόλουθο τη συσσώρευση κολλαγόνου και τροποποίηση του ECM, εμφανίζοντας μεγαλύτερη δυσκαμψία. Στο NSCLC φαίνεται να ανιχνεύεται σε πρώιμο στάδιο, ενώ η εμφάνισή του σχετίζεται με μεγαλύτερες πιθανότητες υποτροπής στα στάδια I και II. Αδρανοποίηση του γονιδίου έχει επίσης συσχετιστεί με αντίσταση στη γεμισταβίνη και καλύτερη ανταπόκριση στην πακλιταξέλη. Στο SCLC η απώλεια της ετεροζυγωτίας του γονιδίου φαίνεται να πλησιάζει το 90%, αναδεικνύοντας τη σημαντική λειτουργία που έχει σε αυτό το είδος καρκίνου [166, 167].

2. vii. Το γονίδιο PTEN

Η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN είναι συχνό φαινόμενο σε πολλά είδη καρκίνων. Τοποθετείται στη χρωμοσωμική θέση 10q23 και αποτελείται από 9 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 403 αμινοξέα με διπλή λιπιδική και πρωτεϊνική λειτουργία φωσφατάσης. Σε αντίθεση με άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια που ακολουθούν το μοντέλο της απενεργοποίησης των αλλήλων, το PTEN φαίνεται να μην ακολουθεί αυτό το μοτίβο, καθώς όπως έχει φανεί και σε μελέτες in vivo, ακόμα και μικρή μείωση των επιπέδων του μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα για εμφάνιση καρκίνου. Η φυσιολογική του λειτουργία είναι ο έλεγχος της εύρυθμης λειτουργίας του μονοπατιού PI3K/mTOR/Akt, αφαιρώντας μια φωσφορική ομάδα από το PIP3 και μετατρέποντας το σε PIP2, διακόπτοντας τη λειτουργία του μονοπατιού. Άλλες λειτουργίες περιλαμβάνουν τη διατήρηση της χρωμοσωμικής σταθερότητας και της επιδιόρθωσης του DNA μέσω της πρωτεΐνης RAD51, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της επιδιόρθωσης του DNA, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω δέσμησης στην ιστόνη H1 και την απενεργοποίηση ογκοπρωτεϊνών, όπως οι PLK και AURK. Απουσία του PTEN συνδέεται επίσης με αυξημένη διήθηση ουδετερόφιλων και επιθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας σε αύξηση της φλεγμονής και της αγγείωσης, μετατρέποντας το μικροπεριβάλλον του όγκου και αυξάνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [168].

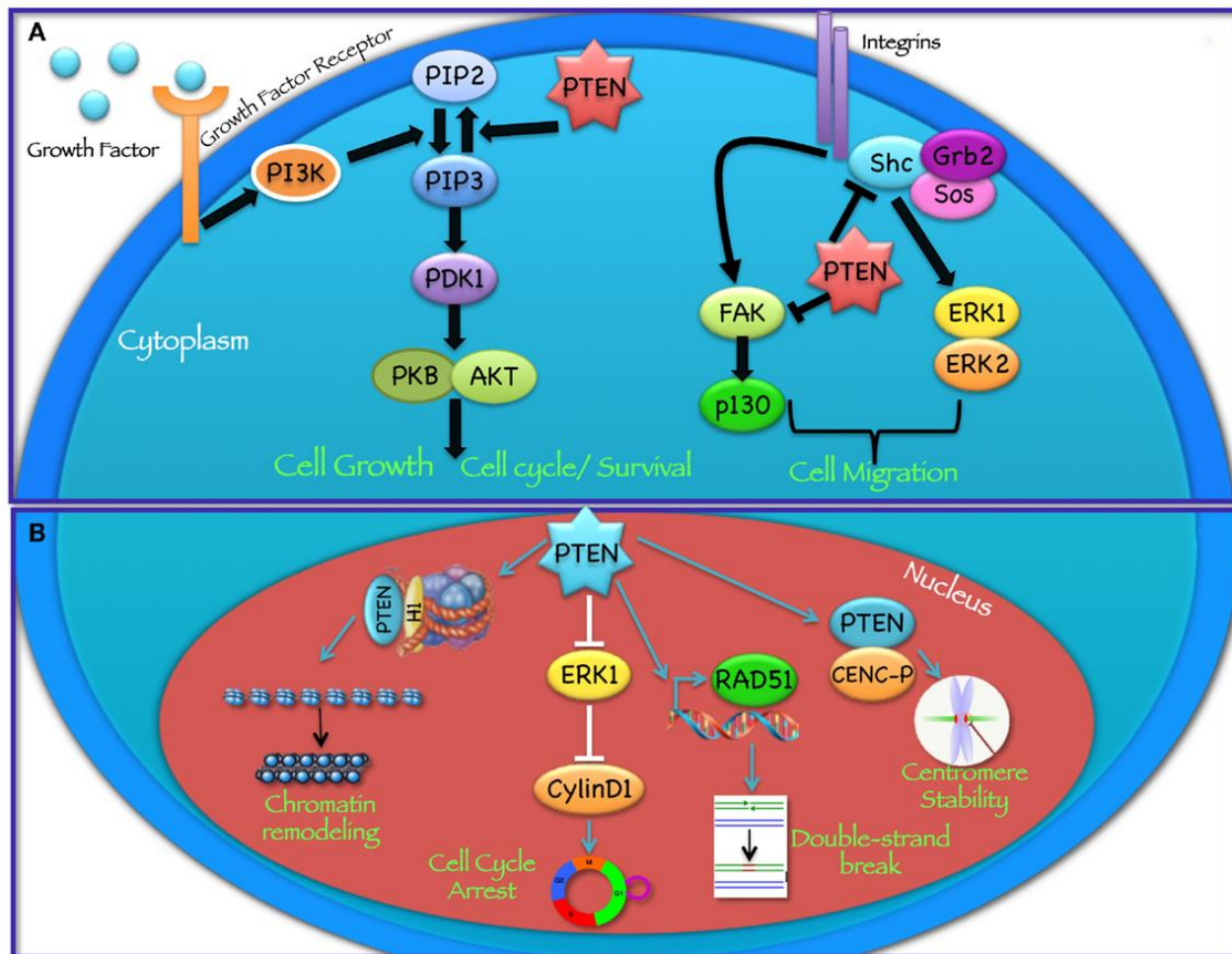
Ένας άλλος ρόλος του PTEN είναι η ρύθμιση του μεταστατικού δυναμικού του κυττάρου. Απουσία του PTEN φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των δεικτών του EMT N-cadherin, της βιμεντίνης, ενώ προκαλεί και τροποποίηση της δομής των κυττάρων. Αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης έχει διαπιστωθεί αποκλειστικά στον πυρήνα κυττάρων με απουσία του PTEN. Η υποξία είναι μια κατάσταση που μπορεί να προκαλέσει το EMT. Σε Κύτταρα NSCLC που βρίσκονταν σε συνθήκες υποξίας, τα επίπεδα του PTEN

φάντης είναι μειωμένα, οι δείκτες του EMT αυξημένοι και η β-κατενίνη βρισκόταν στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, προωθώντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [168].

Σε επιγενετικό επίπεδο, ένας από τους μηχανισμούς σίγασης του PTEN είναι η διαταραχή της μεθυλίωσης του υποκινητή του. Σε κυτταρικές σειρές με πρώιμο καρκίνο πνεύμονα στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του γονιδίου, το 35% παρουσίαζε μεθυλίωση του υποκινητή [168].

Η απώλεια ή η μειωμένη δραστηριότητα του PTEN στον καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζεται σε σχετικά μεγάλο ποσοστό ασθενών, σε αντίθεση με τους υγιείς ασθενείς που μπορεί να έχουν μικρή ή και καθόλου μείωση της έκφρασης, ενώ φαίνεται να υπάρχει υπεροχή και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα έναντι εκείνων με αδενοκαρκίνωμα. Η διαταραχή της λειτουργίας του σχετίζεται με επιθετικότητα της νόσου και μειωμένο προσδόκιμο των ασθενών. Απώλεια της δράσης του PTEN σε ασθενείς που παίρνουν αναστολείς του EGFR (π.χ. gefitinib, afatinib, Osimertinib) φαίνεται να προκαλεί αντίσταση σε αυτούς μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/mTOR, ενώ έχει συσχετιστεί επίσης με χειρότερη πρόγνωση [168, 169].

Το PTEN φαίνεται να επηρεάζει και την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Τα T_{regs} έχουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης, ειδικά μέσω του μονοπατιού PI3K/mTOR. Η έκφραση του PTEN είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα των T_{regs} , καταστέλλει γεγονότα όπως η μεταγραφή και ο μεταβολισμός των κυττάρων μέσω του άξονα mTORC2 (mTOR complex 2). Αναστολή του PTEN in vivo είχε ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ανοσοεπιτήρησης από τα T_{regs} και την εμφάνιση φλεγμονής. Επαναφορά της δράσης του PTEN έχει δείξει αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές κυττάρων Lewis από πνεύμονα, καθώς η συγχορήγηση του μορίου με χημειοθεραπεία είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι όγκοι που δεν εκφράζουν PTEN φαίνεται να έχουν αύξηση στη συγκέντρωση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, όπως το VEGF. Κλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τα θετικά αυτά αποτελέσματα στον καρκίνο του πνεύμονα [169]. Όλα αυτά τα ευρήματα τονίζουν κρίσιμο ρόλο που έχει η μεθυλίωση του PTEN στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα.



Εικόνα 8 : Κυτταροπλασματικές και πυρηνικές λειτουργίες του PTEN. Το PTEN έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών. Στο κυτταρόπλασμα το PTEN αποφωσφορυλιώνει το PIP3 σε PIP2, αναστέλλοντας τη λειτουργία του PI3K και παρεμποδίζοντας όλες τις λειτουργίες του μονοπατιού AKT/mTOR, όπως η συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, η έναρξη του κυτταρικού θανάτου, η μεταγραφή, η μετάφραση, η διέγερση της αγγειογένεσης και η ανανέωση των stem-cell. Επιπλέον, μέσω της δράσης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης έναντι του FAK και του SHC, το PTEN ρυθμίζει μονοπάτια που επηρεάζουν τη μετανάστευση των κυττάρων. Στον πυρήνα, το PTEN συμμετέχει στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας, την επιδιόρθωση των βλαβών της διπλής έλικας του DNA, τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού και την προώθηση την εξαρτημένη από την ουμπικουϊτίνη απενεργοποίηση των ογκοπρωτεϊνών, όπως οι PLK1 και AURK. Ακόμα, το PTEN ελέγχει την πορεία του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζοντας την φωσφορυλίωση του ERK και τα επίπεδα της κυκλίνης D1 και ρυθμίζει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω δέσμευσης της ιστόνης H1.

2. viii. Το γονίδιο TERT

Το TERT γονίδιο (Telomerase Reverse transcriptase) βρίσκεται στη θέση 5p15.33 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη hTERT (humanTERT), η οποία μαζί με ένα σύμπλεγμα RNA που ονομάζεται hTERC (human telomerase RNA), σχηματίζουν τον πυρήνα του ενζύμου τελομεράση. Η τελομεράση είναι υπεύθυνη για

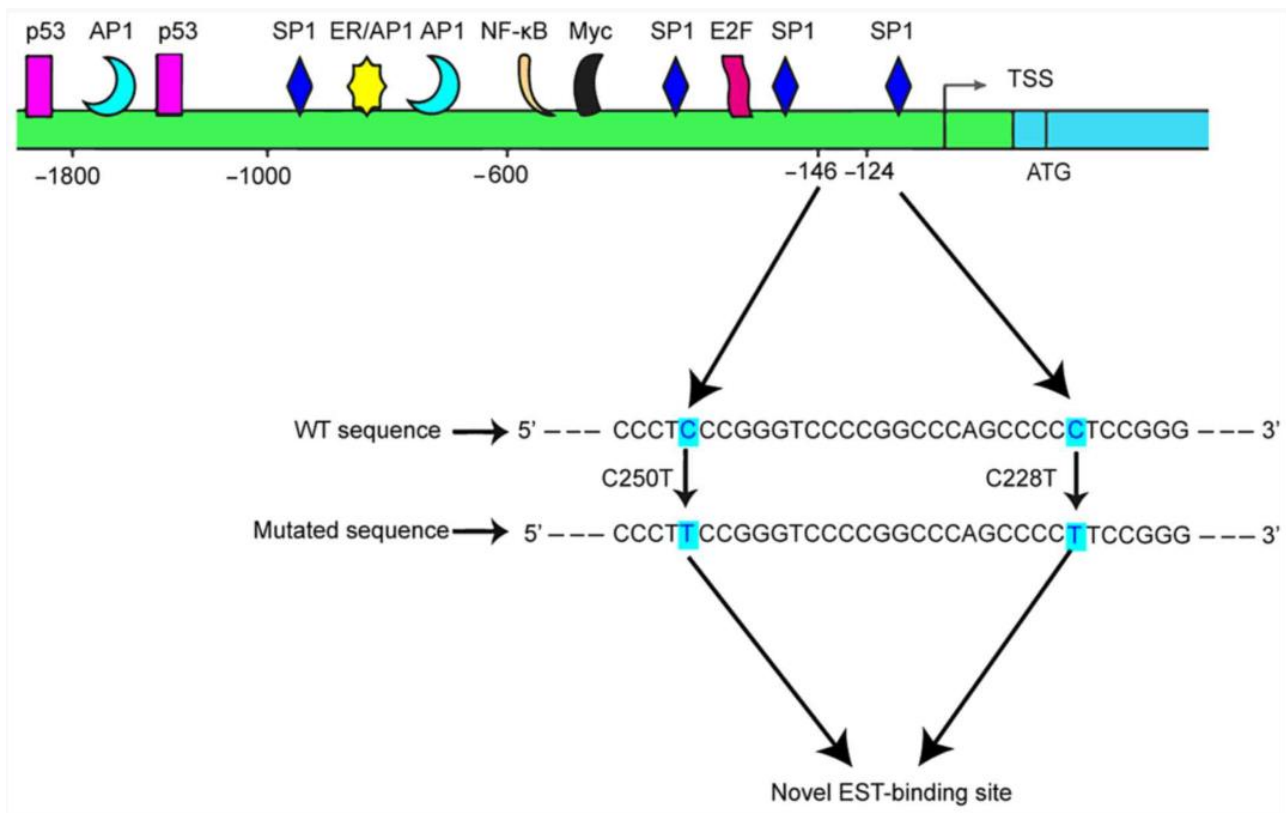
τη διατήρηση και την αύξηση των τελομερών, αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων TTAGGG στο τέλος των χρωμοσωμάτων μαζί με ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών γνωστών ως Shelterin. Η φυσιολογική λειτουργία των τελομερών είναι η προστασία των άκρων των χρωμοσωμάτων από σύντηξη και καταστροφή, διατηρώντας τη γενωμική σταθερότητα και ακεραιότητα. Το μήκος και η σταθερότητα των τελομερών μπορεί να καθορίσει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων και σχετίζονται με τη γήρανσή της και τον πολλαπλασιασμό. Κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το μήκος των τελομερών μειώνεται σε κάθε κύκλο στάδιο της, και όταν φτάσει σε ένα συγκεκριμένο μήκος, τα κύτταρα προχωρούν σε κυτταρικό θάνατο [170].

Στους φυσιολογικούς ιστούς, η τελομεράση είναι ανενεργή, με εξαίρεση τα κύτταρα της σπονδυλικής στήλης, το περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών. Αντιθέτως, το 90% περίπου των όγκων παρουσιάζουν μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου TERT, προκαλώντας διατήρηση στο μήκος των τελομερών τους, οδηγώντας τελικά σε κύτταρα με συνεχή ανάπτυξη και παρατεταμένη επιβίωση. Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι το 88,9% των μεταβολών στη δράση της τελομεράσης οφείλεται κυρίως στη δράση της hTERT, τονίζοντας περαιτέρω τη σημασία της φυσιολογικής λειτουργίας του γονιδίου [170].

Ο υποκινητής του γονιδίου έχει μεγάλο αριθμό βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης, ενώ δεν φαίνεται να έχει κουτιά TATA και CAAT. Ωστόσο, έχει αρκετές θέσεις για μεταγραφικούς παράγοντες (όπως τα ογκογονίδια c-Myc, Sp1, HIF-1, AP2), τα οποία ρυθμίζουν τη δράση του. Αντίθετα, ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα p53, WT1 και Menin αναστέλλουν τη δράση της πρωτεΐνης hTERT [171]. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι οι επιγενετικές μεταβολές του υποκινητή του γονιδίου είναι από τις πιο συχνές αιτίες για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου TERT. Μελέτες έχουν δείξει άμεση συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή με την έκφραση του mRNA της hTERT και τη δραστηριότητα της τελομεράσης [170, 171].

Η έκφραση του γονιδίου TERT στον καρκίνο του πνεύμονα έχει μελετηθεί εκτενώς. Το ποσοστό εμφάνισης μεταβολών στο γονίδιο TERT σε NSCLC κυμαίνεται μεταξύ 50% και 90% και η εμφάνισή τους σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο, και το μεταστατικό δυναμικό του όγκου [171]. Οι συχνότερες μεταβολές, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, είναι αυτές που αφορούν τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου, καθώς είναι αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση mRNA και παθολογικής πρωτεΐνης. Βάσει αυτών των ευρημάτων, έχει μελετηθεί και η έκφρασή του ως βιοδείκτης, με θετικά αποτελέσματα για την έγκαιρη διάγνωση των κακοηθειών του πνεύμονα και την αναγνώριση των όγκων με επιθετική συμπεριφορά και χειρότερη πρόγνωση.

Ένα άλλο πεδίο έρευνας σχετικό με το γονίδιο TERT είναι η χρήση του ως θεραπευτικού στόχου. Δύο από αυτές τις επιλογές είναι οι αναστολείς του HDAC, chidamide και vorinostat, τα οποία αναστέλλουν τη δραστηριότητα της τελομεράσης μέσω μεταβολών στη μεθυλίωση του υποκινητή [171]. Περαιτέρω έρευνα πάνω σε αυτό το πεδίο είναι απαραίτητη για την ανεύρεση νέων θεραπευτικών επιλογών.



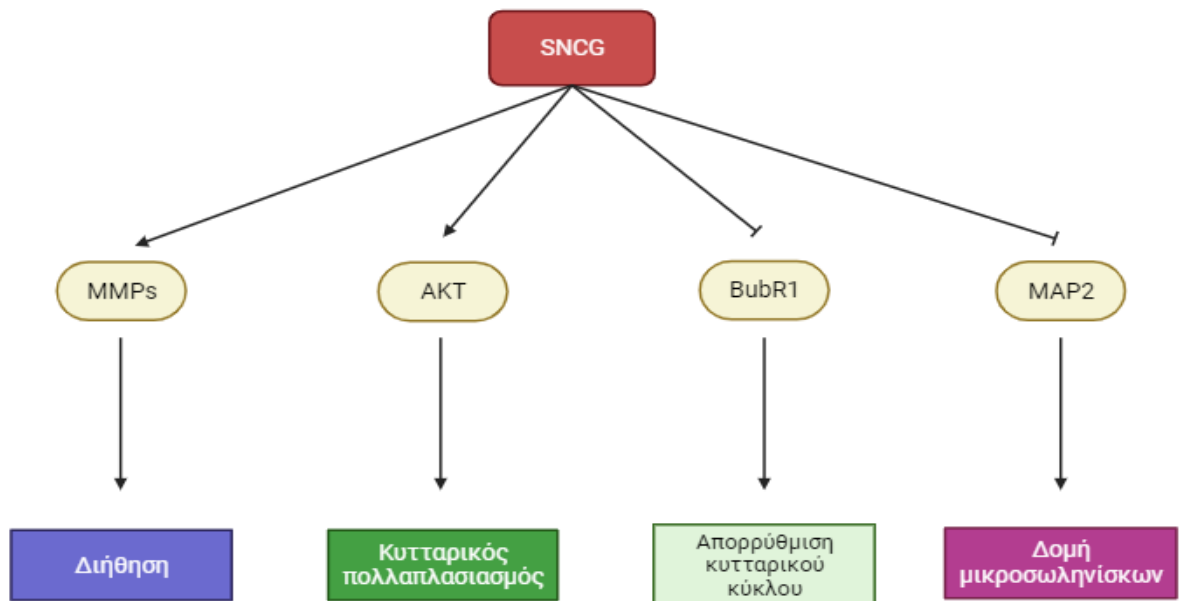
Εικόνα 9 : Ο υποκινητής του TERT και συνήθεις θέσεις πρόσδεσης και μεταλλάξεων. Τα Myc, ER, SP1, NF-κβ, p53, AP1 και E2F ρυθμίζουν την έκφραση του TERT μέσω πρόσδεσης στις διάφορες θέσεις τους. Το ATG είναι το πρώτο κωδικόνιο και η μπλε περιοχή είναι η του κωδικοποιούμενου γονιδίου. Η πράσινη περιοχή είναι η περιοχή του υποκινητή. Τα C250T και C228T είναι μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT που εμφανίζονται κυρίως σε δύο σημεία και δημιουργούν νέους EST (E-twenty-six) μεταγραφικούς παράγοντες. TSS: transcription starter site, ER: estrogen receptor, SP1: specificity protein 1, AP1: transcription factor activator protein 1, EST: E-twenty six binding site, TERT: telomerase reverse transcriptase.

2. Το γονίδιο SNCG

Η οικογένεια των γονιδίων της συνουκλεΐνης περιλαμβάνει τρία μέλη: την α-συνουκλεΐνη (SNCA), τη β-συνουκλεΐνη (SNCB) και τη γ-συνουκλεΐνη (SNCG). Εκφράζονται φυσιολογικά στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και το καθένα επιτελεί διαφορετικό ρόλο στη νευρική σύναψη. Το ογκογονίδιο SNCG, που βρίσκεται στη θέση 10q23.2, εκφράζεται στους περιφερικούς νευρώνες, τον οφθαλμικό ιστό και τα αδιποκύτταρα και η φυσιολογική του λειτουργία φαίνεται να είναι η διατήρηση της δομής των νευρώνων, στη δομή της κερατίνης του δέρματος, ενώ φαίνεται να ενεργοποιεί και τα μονοπάτια MAPK και Elk-1 [139].

Αυξημένη έκφραση του SNCG έχει παρατηρηθεί σε αρκετά είδη καρκίνου, όπως είναι του πνεύμονα, του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας και του ήπατος. Το εξώνιο 1 του γονιδίου περιέχει μια περιοχή CGI που είναι μεθυλιωμένη στους ιστούς που δεν εκφράζεται φυσιολογικά. Στα καρκινικά κύτταρα ωστόσο, η περιοχή αυτή είναι υπομεθυλιωμένη, οδηγώντας σε έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου. Έκφραση της πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με επιθετική συμπεριφορά και μεταστατικό δυναμικό. Μέσω αύξησης της δραστηριότητας των MMPs (matrix metalloproteases) οδηγεί σε αποδόμηση του εξωκυττάρου περιβάλλοντος του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διήθηση από καρκινικά κύτταρα [172]. Αλληλεπίδραση με την κινάση BubR1 οδηγεί σε μείωση της δράσης της και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά από βλάβη στα κύτταρα, ενώ φαίνεται να επιδρά και στο μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR μέσω ενεργοποίησης του AKT με αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη του SNCG αλληλοεπιδρά με τα κέντρα ελέγχου της μιτωτικής δραστηριότητας και της δομής των μικροσωληνίσκων, οδηγώντας σε αντοχή στα φάρμακα που στοχεύουν σε αυτή.

Βλάβες στη μεθυλίωση του SNCG φαίνεται να έχουν άμεση συσχέτιση με το κάπνισμα. Η έκθεση στον καπνό προκαλεί μειωμένη έκφραση του DNMT3B, οδηγώντας στην υπομεθυλίωση της [172]. Η αναγνώριση των μεταβολών στη μεθυλίωση σε καπνιστές μπορεί να οδηγήσει στην πρώιμη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα, ενώ αναστολείς του μονοπατιού AXL φαίνεται να αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου SNCG και να σταματούν την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών *in vitro* [139, 172].



Εικόνα 10 : Το ογκογονίδιο SNCG και η επίδρασή του στην καρκινογένεση. Το γονίδιο SNCG δεν εκφράζεται φυσιολογικά στον πνευμονικό ιστό. Η υπομεθυλίωσή του έχει ως αποτέλεσμα πολλά γεγονότα που συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Η αύξηση της λειτουργίας των MMPs έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος και τη διήθησή του από καρκινικά κύτταρα. Η μείωση της έκφρασης της κινάσης BubR1 οδηγεί στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, που σε συνδυασμό με την αύξηση της έκφρασης του AKT, οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης MAP2 οδηγεί στην τροποποίηση της δομής των μικροσωληνίσκων, προσδίδοντας αντοχή σε φάρμακα που στοχεύουν σε αυτούς. SNCG: Gamma-synuclein, AKT: Protein kinase B, BubR1: Budding uninhibited by benzimidazole-related 1) κινάση, MAP2: microtubule associated protein 2.

3. Μεθυλίωση του DNA στους διάφορους ιστολογικούς υπότυπους του καρκίνου του πνεύμονα

3.i. Μεθυλίωση του DNA στο μη μικροκυτταρικό και μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Καθώς η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ανήκουν παρουσιάζουν μη μικροκυτταρικό ιστολογικό τύπο, πολλά μοτίβα μεθυλίωσης του DNA που περιγράφονται στον καρκίνο του πνεύμονα αφορούν αυτή την υποομάδα. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν συστηματικές μελέτες που να συγκρίνουν γονιδιωματική μεθυλίωση του DNA μεταξύ NSCLC και SCLC. Πρώιμες μελέτες που εξετάζουν συγκεκριμένα γονίδια δείχνουν ότι οι υποκινητές πολλαπλών γονιδίων εμφανίζουν υπερμεθυλίωση και στους δύο ιστολογικούς τύπους, με διαφορετικές συχνότητες μεθυλίωσης (πίνακας 1). Για παράδειγμα, τα γονίδια APC, CDH13 και CDKN2A/p16 ήταν πιο συχνά υπερμεθυλιωμένα στον NSCLC παρά στο SCLC [118, 188, 191]. Αντιθέτως, επιλεγμένα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια της απόπτωσης (CASP8, TNFRSF6/Fas, TRAIL-R1/DR4) βρέθηκε ότι είναι μεθυλιωμένα σε κυτταρικές σειρές από SCLC αλλά όχι σε NSCLC [153].

Μια διεθνής μελέτη ασθενών με SCLC αναγνώρισε 73 γονίδια στόχους με αυξημένη έκφραση σε συγκεκριμένες μεταγραφικές θέσεις πρόσδεσης σχετικές με τη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων NEUROD1, HAND1, ZNF423, REST και homeobox [148]. Ως εκ τούτου οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να προκαλέσει σφάλμα στη διαφοροποίηση των νευροενδοκρινών κυττάρων με αποτέλεσμα τη μετάβαση των πρόδρομων καρκινικών κυττάρων προς το μικροκυτταρικό υπότυπο. Μια επακόλουθη μελέτη έδειξε ότι η ομάδα πρωτεϊνών Polycomb EZH2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο πρωτοπαθές SCLC σε σύγκριση με άλλους ιστολογικούς υπότυπους και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη συνολική μεθυλίωση του υποκινητή [204]. Η EZH2 συσσωρεύει DNMTs, γεγονός που αποδεικνύει τη σύνδεση της EZH2 και της διαταραγμένης μεθυλίωσης στο SCLC [205]. Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα του Sun μελέτησε τη μεθυλίωση του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα σε 18 ζεύγη όγκων/φυσιολογικών ιστών ασθενών με NSCLC και παρατήρησε ότι το 46,1% των υπερμεθυλιωμένων περιοχών με διαφορές στη μεθυλίωση (differentially methylated regions – DMR) υπερκαλύπτουν τους υποκινητές στα εμβρυονικά stem cells (ESCs), συμπεριλαμβανομένων πολλών γονιδίων homeobox και σχετιζόμενων με την ανάπτυξη, όπως φάνηκε προηγουμένως και σε μια άλλη κοόρτη [74, 206]. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν εκτενή μεθυλίωση στα γονίδια homeobox και σχετιζόμενα με την ανάπτυξη, που είναι ένας κοινός μηχανισμός σίγασης γονιδίων μέσω μεθυλίωσης που γίνεται μέσω του συμπλόκου Polycomb μεταξύ των διάφορων

υπότυπων του καρκίνου του πνεύμονα [149]. Αν και η απορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων σχετικών με τη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση μέσω μεθυλίωσης συνεισφέρει στην καρκινογένεση του SCLC, δεν είναι σαφές πως και πότε η διαταραγμένη μεθυλίωση επηρεάζει ακριβώς τη διαφοροποίηση.

Μια συσχέτιση ανάμεσα στη μεθυλίωση και την έκφραση των γονιδίων μπορεί να βοηθήσει ώστε να ξεχωρίσουμε τα οδηγά γεγονότα για κάθε υπότυπο. Η μεθυλίωση του DNA φάνηκε να είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς υπεύθυνους για την αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου BCL2 και μείωση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων RB1 και TCF21 στο SCLC [148, 204]. Παρόλο που δεν έχει φανεί να υπάρχει απορρύθμιση μέσω της μεθυλίωσης των γονιδίων BCL2 και RB1 στο NSCLC, το γονίδιο TCF21 φαίνεται να μην εκφράζεται μέσω υπερμεθυλίωσης [206,207]. Πρώιμες μελέτες στο NSCLC αναφέρουν μονήρη γονίδια ή επιλεγμένα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την υπερμεθυλίωση των υποκινητών τους (π.χ. CDKN2A, FHIT, DAPK, RASFF1A). Μια πρόσφατη μελέτη σε ολόκληρο το γονιδίωμα αναγνώρισε 20 πιθανά υπερμεθυλιωμένα οδηγά γονίδια (π.χ. SLIT2, CDO1, TCF21, PCHD17, IRX1, HSPB6, TBX5) και 13 μη κωδικοποιητικά RNA λόγω των οδηγών τους σε NSCLC [132]. Περαιτέρω μελέτες που να συγκρίνουν τη μεθυλίωση του DNA σε SCLC και NSCLC είναι απαραίτητες και θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε τύπο.

Η χρήση δεικτών μεθυλίωσης του DNA για τη διαφορική διάγνωση αποτελεί επίσης ένα πεδίο έρευνας. Ο Walter και οι συνεργάτες του παρατήρησαν πολύ υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του RASSF1A στο SCLC και τα νευροενδοκρινή καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα σε σχέση με το NSCLC, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό βιοδείκτη για τη διαφορική διάγνωση [208]. Σε μια πρόσφατη μελέτη της Nunes και των συνεργατών της εξέτασαν τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών τεσσάρων γονιδίων (APC, HOXA9, RARβ2, RASSF1A) μεταξύ διάφορων ιστολογικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα σε κυκλοφορούν DNA (circulating cell-free DNA-cfDNA) [96]. Βρήκαν ότι τα γονίδια HOXA9 και RASSF1A είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στο SCLC σε σχέση με το NSCLC από δείγματα 129 ασθενών, επιδεικνύοντας σχετικά υψηλή ειδικότητα και ακρίβεια (>79%) αλλά μέτρια ευαισθησία (63,9% και 52% αντίστοιχα). Μελέτες σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών είναι απαραίτητες για τη χρήση του cfDNA στην κλινική πράξη.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι τα μοτίβα μεθυλίωσης παρουσιάζουν διαφορές στην πρόγνωση και την ανταπόκριση ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο. Για παράδειγμα, υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT υποδεικνύει ότι οι ασθενείς με SCLC θα έχουν όφελος από την αγωγή με τεμοζολαμίδη, ενώ οι ασθενείς με NSCLC δεν θα έχουν [99]. Η κλινική χρησιμότητα της μεθυλίωσης του

RASSF1A έχει φανεί στο NSCLC αλλά όχι στο SCLC. Οι ασθενείς με NSCLC και μεθυλιωμένο το RASSF1A ανταποκρίνονται καλύτερα στη γεμισιταβίνη σε αντίθεση με ασθενείς που δεν εμφανίζουν μεθυλίωση [98]. Επίσης αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν καλύτερη επιβίωση όταν λάβουν αγωγή με πακλιταξέλη σε σχέση με τη γεμισιταβίνη [209].

3.ii. Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα

Το αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και το πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα είναι οι δύο ιστολογικοί υπότυποι που αποτελούν την πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα. Θεωρείται ότι έχουν διαφορετική κυτταρική προέλευση με διακριτά μοριακά χαρακτηριστικά, έκφραση γονιδίων και θεραπευτικές επιλογές [210,211]. Επομένως, διαφορές στα μοτίβα μεθυλίωσης είναι αναμενόμενες και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για καλύτερη διάγνωση και προσωποποιημένη θεραπεία. Παλαιότερες μελέτες με αντικείμενο συγκεκριμένα γονίδια αναγνώρισαν ότι η συχνότητα μεθυλίωσης των γονιδίων ANK1, APC, CCND2, CDH13, GATA3, KCNH5, LINE-1, RARβ, RASSF1A και RUNX3 είναι αρκετά μεγαλύτερη στο πλακώδες καρκίνωμα σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα [72,76,172,176,212-218]. Μια παλαιότερη μελέτη χρησιμοποιώντας το HumanMethylation27 BeadChips για να εξετάσει 48 όγκους NSCLC σταδίου I αναγνώρισε 263 υπερμεθυλιωμένα σημεία CpG και 513 υπομεθυλιωμένα σημεία CpG στο πλακώδες καρκίνωμα σε σύγκριση με το αδενοκαρκίνωμα [71]. Χρησιμοποιώντας δεδομένα από το TCGA (The Cancer Genome Atlas) ο Yang και οι συνεργάτες του βρήκαν 391 γονίδια με αντίθετα μοτίβα μεθυλίωσης στα αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη καρκινώματα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, με τα CTSE και SLC5A7 να εμφανίζουν επίσης αντίθετα μοτίβα έκφρασης [219]. Αυτά τα γονίδια γενικά απαντώνται σε μεταβολικά μονοπάτια, οδηγώντας στο πιθανό συμπέρασμα ότι οι διαφορές μεθυλίωσης του DNA πιθανώς να οφείλονται στις διαφορές στα μικροπεριβάλλοντα ανάμεσα σε αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα. Αντιθέτως, μια πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε μια μέθοδο αποσυνέλιξης των κυττάρων για να αναγνωρίσει διαφορετικά μεθυλιωμένα είδη κυττάρων (differentially methylated cell types – DMCTs) παρατήρησε ότι οι περισσότερες αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA των κυττάρων είναι ανεξάρτητη από τον ιστολογικό υπότυπο [220]. Επομένως, περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να διευκρινιστεί αν υπάρχει σημαντικού βαθμού διαφορά στη μεθυλίωση του DNA στο σύνολο του γονιδιώματος και για να διαλευκανθεί πως μπορεί να συνεισφέρει στα διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο.

Η ανοσοϊστοχημεία είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ αδενοκαρκινώματος και πλακώδους καρκινώματος, αλλά η ευαισθησία ακόμα και του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου δείκτη, του TTF-1, είναι μόνο 62% [221]. Σε μια προσπάθεια να αναγνωρίσει

χρήσιμους δείκτες μεθυλίωσης του DNA προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη διαφορική διάγνωση, η ερευνητική ομάδα του Carvalho βρήκε τρία DMRs με σημαντική διαφορά ανάμεσα σε 20 αδενοκαρκινώματα και 27 πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα (GAS1, FAM78B, DOTL1) [222]. Ωστόσο, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μελέτη περισσότερων DMR σε μεγαλύτερη κλίμακα είναι απαραίτητη για να φτιαχτεί ένα πιο ακριβές και διακριτό πάνελ γονιδίων. Μια μετανάλυση που χρησιμοποίησε τη συχνότητα μεθυλίωσης από 151 μελέτες για 108 γονίδια υποδεικνύει ότι δύο υπομεθυλιωμένα γονίδια (CDKN2A και MGMT) και τρία υπερμεθυλιωμένα γονίδια (CDH13, RUNX3, APC) μπορεί να βοηθήσουν στη διάκριση των δύο υπότυπων [223]. Κανένα όμως από αυτά δεν έχει επιβεβαιωθεί ξεχωριστά ως βιοδείκτης για διαφορική διάγνωση σε μεγάλες βάσεις δεδομένων. Ο Shi και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν έξι γονίδια (CLDN1, TP63, TPX5, TCF21, ADHFE1, HNF1B) ως πιθανούς δείκτες μεθυλίωσης του DNA για τη διάγνωση του πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα σε σύγκριση με τον υγιή ιστό, χωρίς ωστόσο να εξετάζουν αν μπορεί να διακρίνει μεταξύ των δύο υπότυπων [224]. Χρησιμοποιώντας κυκλοφορούν cfDNA, ο Nunes και η ομάδα του παρατήρησαν ότι ο υποκινητής του HOXA9 είχε υψηλότερη μεθυλίωση στο πλακώδες καρκίνωμα σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα, όμως με ευαισθησία και ειδικότητα που ανέρχονταν μόλις σε 55,2% και 74,3% αντίστοιχα [96]. Ένας συνδυασμός έκφρασης και μεθυλίωσης μπορεί να φανούν χρήσιμα για τη βελτίωση της κατηγοριοποίησης, προκειμένου να βρεθούν οι καλύτεροι δείκτες για τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ αδενοκαρκινώματος και πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα [225].

Επιπλέον με την κλασική ιστολογική ταυτοποίηση, η γονιδιακή έκφραση διαχωρίζει το NSCLC σε επιθηλιακό και μεσεγχυματογενή φαινότυπο με διαφορετικές ανταποκρίσεις στους EGFR αναστολείς (π.χ. erlotinib) [226]. Ο Walter και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω διάκριση μεταξύ της έκφρασης σε αυτούς τους φαινότυπους στο NSCLC σε κυτταρικές σειρές και όγκους, με τη μεθυλίωση του ERBB2 και του ZEB2 να έχουν ιδιαίτερη προγνωστική σημασία [227].

Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σε συγκεκριμένες συσχετίσεις προγνωστικών δεικτών του DNA στους δύο υπότυπους. Σε μια ανάλυση, η Heller και οι συνεργάτες της παρατήρησαν ότι ασθενείς με πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα που παρουσίαζαν μεθυλίωση των γονιδίων HOXA2 και HOXA10 είχαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με αυτούς που οι όγκοι τους δεν παρουσίαζαν μεθυλίωση [72]. Στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα υπερέκφραση του γονιδίου FAM83A που σχετίζεται με μειωμένη μεθυλίωσή του φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, ενώ υπερμεθυλίωση του GRK6 μπορεί

να αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό [228,229]. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν οι ίδιες αλλαγές υπάρχουν και στα πλακώδη καρκινώματα.

4. Εφαρμογές στην κλινική πράξη

4.i. Η μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο του πνεύμονα

Όλα τα νεοπλάσματα παρουσιάζουν επιγενετικές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές σε συνδυασμό με γενετικές αλλαγές και περιβαλλοντικούς παράγοντες αποτελούν σημαντικές συνιστώσες για τη δημιουργία και την πρόοδο των κακοηθειών [230].

Η απενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, φάνηκε ότι είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς στην καρκινογένεση [231-233]. Παρόλο που έχει διαπιστωθεί ότι οι σωματικές μεταλλάξεις, η μείωση των επαναλήψεων των βάσεων του DNA, και η υπερμεθυλίωση των υποκινητών συσχετίζονται με την απενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα, οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες για τον κύριο μηχανισμό δράσης. Σε μια πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η υπερμεθυλίωση των διδύναμων ή PRC2 (polycomb repressive complex 2) υποκινητών, οι οποίοι σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων, έχει μείζονα ρόλο στην καρκινογένεση [234]. Αν και πολλαπλές μεταλλάξεις ή μεταβολή στον αριθμό των αντιγράφων των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων επηρεάζουν τη λειτουργικότητά τους, είναι δύσκολο να βρεθούν κατάλληλοι βιοδείκτες για την αναγνώριση της κακοήθειας σε πρώιμο στάδιο λόγω της μεγάλης ετερογένειας που παρουσιάζουν και την δυσκολία εύρεσης της μετάλλαξης που οφείλεται για το συμβάν [235]. Αντιθέτως, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών στα ογκοκατασταλτικά γονίδια συναντάται συχνότερα και μπορεί να σχετίζεται περισσότερο με την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου ή την πρόγνωση [236], δίνοντας τους ένα σαφές πλεονέκτημα για χρήση ως βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα.

4.ii. Η μεθυλίωση στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Η πρώτη ένδειξη ότι οι διαταραχές της μεθυλίωσης των υποκινητών του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης προήλθε από τα ευρήματα μίας μελέτης της ερευνητικής ομάδας του Belinsky[173]. Εκεί βρέθηκε ότι η υπερμεθυλιωμένη περιοχή του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDKN2A (γνωστό και ως p16INK4a) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την αναγνώριση προκαρκινικών αλλοιώσεων, καθώς 3 από τους 7 ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο πνεύμονα και 5 στους 26 ασθενείς υψηλού κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα παρουσίαζαν αυτή την αλλοίωση σε δείγματα πτυέλων. Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισής της αυξανόταν όσο υπήρχε πρόοδος της νόσου από βασικοκυτταρική υπερπλασία (17%), σε πλακώδη μεταπλασία (24%) σε in situ καρκίνωμα (50%). Παρόμοια αποτελέσματα για τη μεθυλίωση του υποκινητή του CDKN2A

αναδείχθηκαν και σε μια άλλη μελέτη, όπου το 24% των ασθενών με διαγνωσμένο NSCLC παρουσίαζαν διαταραχές στη μεθυλίωση σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage – BAL) [237]. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν και τρεις επιπλέον βιοδείκτες: μεταλλάξεις του p53, μεταλλάξεις στο K-RAS και μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability – MSI). Το συνολικό ποσοστό και των τεσσάρων βιοδεικτών που ανευρίσκονταν τόσο στον όγκο όσο και στο BAL ανερχόταν σε 53% των ασθενών, αναδεικνύοντας μια αρκετά υποσχόμενη διαγνωστική μέθοδο. Αρκετές μελέτες έχουν ως αντικείμενό τους τη διαταραγμένη μεθυλίωση πολλών γονιδίων σε τμήματα όγκου, BAL, πλευριτικό υγρό και αίμα, ενώ οι περισσότερες από αυτές είναι προγνωστικές. Τα αποτελέσματα από μία μελέτη που είχε σαν κύριο στόχο την αναγνώριση διαφορών στη μεθυλίωση γονιδίων μεταξύ φυσιολογικού ιστού και αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, ανέδειξε τέσσερα γονίδια (CDKN2A EX2, CDX2, HOXA1, OPCML) με ευαισθησία 67-86% και ειδικότητα 74-82%[238]. Παρόμοια αποτελέσματα όσων αφορά τη σχέση του γονιδίου CDKN2A σε δείγματα όγκου και πτυέλων παρατηρήθηκαν σε τρεις επιπλέον μελέτες [239-241]. Ο συνδυασμός των γονιδίων (NEUROG2, NID2, RASSF1A, APC και HOXC9) σε ιστούς με NSCLC παρείχε μια σημαντική διαγνωστική ικανότητα, με 91.26% ευαισθησία και ειδικότητα 84.62% σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς [242]. Σε 31 ασθενείς με NSCLC το 80% έφερε βλάβες στη μεθυλίωση τριών γονιδίων (CDH1, APC, RASSF1A), ενώ το 68% αυτών των ασθενών παρουσίαζε τις ίδιες βλάβες και στο BAL [243]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις μελέτες που αναφέρθηκαν οι βλάβες στη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων εμφανίζονταν μόνο στις περιπτώσεις που αυτές υπήρχαν και στον πρωτοπαθή όγκο.

Σε άλλη μελέτη με BAL από 89 ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα (SCLC και NSCLC) αναδείχθηκαν βλάβες στη μεθυλίωση των υποκινητών APC, p16 και RASSF1A σε ποσοστό 63% για όγκους που βρίσκονταν σε κεντρικούς βρόγχους και 44% για όγκους σε περιφερικούς βρόγχους[244]. Υπερμεθυλίωση του RASSF1A αναδείχθηκε σε 88% ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και 24% βρογχικών εκπλυμάτων από περιφερικούς όγκους [245,246]. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του SHOX2 στο πλάσμα μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση των κακοήθων νεοπλασμάτων, με ευαισθησία 60% και ειδικότητα 90%, με το ποσοστό να είναι διαφορετικό ανάλογα του ιστολογικού τύπου και του σταδίου της νόσου κατά τη διάγνωση[180].

Σε δείγματα πτυέλων, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών RASSF1A και 3OST2 διαχώρισαν τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα από τους υγιείς με ευαισθησία 85% και ειδικότητα 74%. Στην ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκε και τεστ αναπνοής που περιλάμβανε μεγαλύτερο αριθμό υποκινητών (RASSF1A, cytoglobin, APC, FAM19A4, PHACTR3, 3OST2, PRDM14) με ευαισθησία 80% και ειδικότητα

48%[247]. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση των υποκινητών 7 γονιδίων σε 2 διαφορετικούς ανεξάρτητους πληθυσμούς [(MGMT, DAPK, PAX5β, Dal-1, PCDH20, Jph3, Kif1a), (DAPK, PAX5β, PAX5a, Dal-1, GATA 5, SULF2, CXCL14) σε δείγματα πτυέλων προέβλεψε το 71-77% των βλαβών σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σταδίου 1 [248]. Το γονίδιο MLH1 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, η οποία όταν συνδυάζεται με το ετεροδιμερές της PMS2 σχηματίζουν το Mutl alpha, ένα τμήμα του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA. Βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης σχετίζονται με πολλαπλές κληρονομούμενες κακοήθειες, όπως είναι το σύνδρομο κληρονομικού μη πολυποδιακούς καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC – σύνδρομο Lynch). Έχει βρεθεί ότι υπερμεθυλίωση του υποκινητή του MLH1 συναντάται σε ποσοστό 38% των πτυέλων ασθενών με NSCLC αρχικού σταδίου, σε σχέση με 55% από δείγματα του όγκου [249]. Στην ίδια μελέτη, ένα συνολικό ποσοστό 72% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε εξαίρεση του κύριου όγκου παρουσίαζαν τις ίδιες βλάβες στη μεθυλίωση του υποκινητή στα πτύελα και στον κύριο όγκο. Οι διαφορές στη μεθυλίωση τριών γονιδίων (RASSF1A, p16INK4a, RARb) σε δείγμα πλευριτικής συλλογής μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ καρκίνου πνεύμονα και κακοήθους μεσοθηλιώματος. Οι ασθενείς στη μελέτη που παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση σε ένα από τα γονίδια είχαν 3,5 φορές περισσότερες πιθανότητες να πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα, δείχνοντας μια επιπλέον επιλογή για ευκολότερη διάγνωση [250].

4.iii. Η μεθυλίωση στην πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Η πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι σημαντική για τη χορήγηση της κατάλληλης αγωγής και τη συχνότητα της παρακολούθησης. Στο ήδη υπάρχον σύστημα σταδιοποίησης TNM, το οποίο χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης, έχουν πρόσφατα προστεθεί και μοριακοί βιοδείκτες όπως το EGFR, ALK και PD-L1 [251,252]. Ωστόσο, περίπου 1 στους 3 ασθενείς με νόσο σταδίου I θα υποτροπιάσει, λόγω μικρομεταστατικής νόσου η οποία ανευρίσκεται συνήθως σε λεμφαδενικές θέσεις. Αυτό δημιουργεί την ανάγκη για ανεύρεση νέου προγνωστικού βιοδείκτη.

Η διαταραχή της μεθυλίωσης του DNA έχει μελετηθεί και αυτή ως πιθανός βιοδείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί αφορούν ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα αρχικού σταδίου, οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε εξαίρεση του όγκου τους και έχει γίνει PCR ανάλυση των υποκινητών γονιδίων που οφείλονται για καρκινογένεση. Σε αναδρομική μελέτη που διεξήχθη σε 51 ασθενείς με σταδίου I NSCLC και υποτροπίασαν 40 μήνες μετά το χειρουργείο αναγνωρίστηκαν 4 γονίδια (APC, RASFF1A, p16, CDH13) τα οποία σχετίζονταν με πρώιμη υποτροπή. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη η οποία παρείχε στοιχεία ότι η πρόγνωση του καρκίνου του

πνεύμονα μπορεί να συσχετίζεται με τη μεθυλίωση των υποκινητών του DNA, ανεξαρτήτως από άλλους παράγοντες (TNM, ηλικία, ιστορικό καπνίσματος, ιστολογικός τύπος)[78]. Επιπλέον, υπάρχουν περαιτέρω δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν την προγνωστική χρήση της μεθυλίωσης των γονιδίων p16 και CDH13 στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα που φέρουν μετάλλαξη EGFR, τα οποία υποστηρίζουν την προηγούμενη μελέτη [253].

Υπερμεθυλίωση των υποκινητών ογκοκατασταλτικών συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Μεθυλίωση περισσότερων από τεσσάρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε δείγματα του όγκου και των γειτονικών υγιών ιστών είχε ως αποτέλεσμα χειρότερη 2ετή πρόγνωση ελεύθερης νόσου σε μελέτη με 78 ασθενείς, υποδεικνύοντας εννέα γονίδια που ευθύνονται (APC, CDH13, KLK10, DLEC1, RASSF1A, EFEMP1, SFRP1, RARβ, p16INK4A) [254]. Το BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) είναι ένα γονίδιο που έχει συσχετιστεί με τον έλεγχο των μεταστατικών εστιών σε πολλά είδη καρκίνου, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του πνεύμονα. Σε μελέτη με 352 ασθενείς με NSCLC, μεθυλίωση του υποκινητή του BRMS1 και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA του BRMS1 συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση στους ασθενείς αυτούς [255]. Αντιθέτως, η υπερμεθυλίωση των SHOX2 και PITX2 σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση [256]. Επιπλέον, ο έλεγχος σε 27578 CpGs, ανέδειξε 10 ομάδες σε 10 γονίδια που συσχετίστηκαν με καλύτερη πρόγνωση σε 48 ασθενείς με NSCLC σταδίου I [71].

4.iv. Μεθυλίωση του DNA στο αίμα για πρόωμη διάγνωση

Τα δείγματα αίματος είναι μια εύκολα προσβάσιμη πηγή για την ανεύρεση βιοδεικτών. Βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι DNA από καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση μπορεί να ανιχνευθούν στον ορό και το πλάσμα, μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA σε πολλά γονίδια έχουν μελετηθεί σε δείγματα αίματος πολλών ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιες μεταβολές συγκεκριμένες μεταβολές στη μεθυλίωση που ανευρίσκονται σε δείγματα αίματος μπορεί να σχετίζονται με αλλαγές σε συγκεκριμένους ιστούς, οι οποίες δεν θα μπορούσαν να αναγνωριστούν εύκολα με άλλο τρόπο [162]. Σε μία παλαιότερη μελέτη, η μεθυλίωση έξι γονιδίων (RASSF1A, CDKN2A, RARβ, CDH13, FHIT, BLU) έδειξε παρόμοια επίπεδα μεταξύ πλάσματος και ασθενών με καρκίνο σε ποσοστό περίπου 75%, ενώ σε περίπτωση ανεύρεσης δύο ή περισσότερων μεταβολών στη μεθυλίωση υπήρχε αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου με ευαισθησία 73% και ειδικότητα 82% [257, 258]. Σε μια άλλη μελέτη τεσσάρων γονιδίων (DAPK, ECAD, p16, MGMT), σε δείγματα από βρογχικό επιθήλιο, αίμα και τμήματα όγκου από καρκίνο πνεύμονα τόσο σε καπνιστές όσο και μη καπνιστές, παρουσιάστηκαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα παρουσίαζαν

μεγαλύτερα ποσοστά βλαβών στη μεθυλίωση του MGMT και του p16 στα δείγματα του όγκου σε σχέση με τα άλλα δείγματα (55% και 44% έναντι 11% και 5% σε τμήματα βρογχικού επιθηλίου έναντι 17% και 5% στο αίμα αντίστοιχα). Αντιθέτως, οι βλάβες στη μεθυλίωση και των γονιδίων ECAD και DAPK ήταν παρόμοιες σε όλα τα δείγματα μεταξύ καπνιστών και ασθενών με καρκίνο, ενώ ταυτόχρονα δεν υπήρχαν μεταβολές στους μη καπνιστές, υποδεικνύοντας ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωση της νόσου. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι βλάβες στους υποκινητές των ECAD και DAPK συμβαίνουν πρώιμα στην καρκινογένεση, ενώ βλάβες στους υποκινητές των p16 και MGMT, σε συνδυασμό και με άλλων γονιδίων, είναι αυτές που ωθούν τις προκαρκινοματώδεις καταστάσεις σε συμπαγή όγκο [259]. Το γονίδιο SHOX2 έχει επίσης σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των ασθενών με καρκίνο. Σε δείγμα 343 ασθενών που συγκρίθηκαν τα επίπεδα της μεθυλίωσης του SHOX2 σε τμήματα του όγκου με τα επίπεδά του στο πλάσμα, τα αποτελέσματα ανέδειξαν ευαισθησία 60% και ειδικότητα 90% για την αναγνώριση των ασθενών που έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα σε σχέση με εκείνους που δεν παρουσίαζαν νόσο. Το ποσοστό της ευαισθησίας ήταν υψηλότερο για ασθενείς υψηλού σταδίου, καθώς συσχετίζεται με υψηλότερο φορτίο νόσου. Επιπλέον τα πλακώδη καρκινώματα και τα μικροκυτταρικά καρκινώματα παρουσίαζαν υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα σε ποσοστό 63% και 80% αντίστοιχα [260]. Σε μία μετα-ανάλυση που περιλάμβανε είκοσι έξι δημοσιεύσεις με 1768 ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα και 1323 μάρτυρες, διερευνήθηκε η διαγνωστική αξία που έχουν οι βλάβες στη μεθυλίωση του γονιδίου p16INK4A σε δείγματα ορού ή βρογχικών εκκρίσεων. Με την ευαισθησία να ανέρχεται στο 37% και την ειδικότητα στο 95% στα δείγματα από ορό, η χρήση του ως βιοδείκτη για διάγνωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα παραμένει περιορισμένη [261]. Ωστόσο, άλλες μελέτες ανέδειξαν ότι η χρήση των βιοδεικτών στον ορό ήταν κατώτερη διαγνωστικά σε σχέση με αυτή στα πτύελα για τα γονίδια CDKN2A, DAPK, PAX5b και GATA5 [180]. Το ποσοστό της μεθυλίωσης του ίδιου γονιδίου σε δύο άλλες μελέτες ήταν 72% και 26%, με την ανάλυση στην πρώτη μελέτη να δείχνει ότι το ποσοστό της συνδυαστικής διάγνωσης μέσω κυτταρολογικής ανάλυσης πτυέλων και του p16INK4A να ανέρχεται σε 92%, βοηθώντας στην πρώιμη αναγνώριση των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα [262-264]. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεθυλίωση των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων στο αίμα δεν σχετίζεται με το στάδιο της νόσου [103].

Τα καρκινικά κύτταρα μέσω της απόπτωσης και της νέκρωσης απελευθερώνουν νουκλεϊκά οξέα στο αίμα. Αυτά στη συνέχεια υπόκεινται σε φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα ή άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία εκκρίνουν το DNA σε άλλους ιστούς. Το cfDNA φέρει αλλαγές στη μεθυλίωση παρόμοιες με αυτές στον ιστό του όγκου, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί

για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα [265-267]. Σε μελέτη με 96 γονίδια όπου αναλύθηκαν οι αλλαγές στο cfDNA στον ορό 204 ασθενών υπήρχε διαφοροποίηση των ασθενών που είχαν καρκίνο πνεύμονα από εκείνους με καλοήθεις αλλοιώσεις (πνευμονική ίνωση, ΧΑΠ). Σε πάνελ με τέσσερις βιοδείκτες (HOXD10, PAX9, PTPRN2, STAG3) η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι 87,8% και 90,2% αντίστοιχα [36]. Σε μια ανάλυση των υποκινητών 6 γονιδίων (CDO1, HOXA9, AJAP1, PTGDR, UNCX, MARCH11) σε 43 ασθενείς με στάδιο IA μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα σε σχέση με 42 ασθενείς χωρίς νόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα ανήλθαν σε 72.1% και 71.4% αντίστοιχα, οδηγώντας στην ευκολότερη διάγνωση αυτών των ασθενών [268,269]. Άλλη έρευνα με 150 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα σταδίου έως IIA ανέδειξε 5 γονίδια (SOX17, TAC1, HOXA7, CDO1, ZFP42) που εντοπίζονταν στο πλάσμα με ευαισθησία και ειδικότητα που κυμαίνονταν μεταξύ 65-76% και 74-84% αντίστοιχα, σε σχέση με τους υγιείς ασθενείς [270]. Ειδικότερα, ο συνδυασμός των γονιδίων SOX17, TAC1 και HOXA7 στο πλάσμα παρείχε ευαισθησία 93% και ειδικότητα 62%. Επιπλέον, μία μελέτη εξέτασε μια πιο οικονομική μέθοδο εφαρμογής της μεθυλίωσης του DNA, καθώς μεθυλιωμένο DNA αναλύθηκε εκτενώς προκειμένου να αναγνωρισθεί το μοτίβο του cfDNA στον καρκίνο του πνεύμονα [271]. Η ανάλυση ανέδειξε μια ομάδα δέκα διαφορετικών μεθυλιωμένων γονιδίων στον καρκίνο του πνεύμονα (B3GAT2, BCAR1, HLF, HOPX, HOXD11, MIR1203, MYL9, SLC9A3R2, SYT5, VTRNA 1-3) ανάμεσα σε 330 διαφορετικές μεθυλιωμένες περιοχές στους υποκινητές των γονιδίων ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Από αυτές αναγνωρίστηκαν 33 υπερμεθυλιωμένες και 297 υπομεθυλιωμένες περιοχές. Η πρόσφατη μελέτη THUNDER εξέτασε δύο διαφορετικές μεθόδους διάγνωσης μέσω cfDNA, τις MCDBT-1 και MCDBT-2, για έξι διαφορετικούς τύπους καρκίνου (πνεύμονα, παχέος εντέρου, οισοφάγου, ήπατος, παγκρέατος και ωοθηκών) σε 1693 συμμετέχοντες. Από τα δεδομένα στον πραγματικό πληθυσμό, το MCDBT-1 είχε ευαισθησία 70,6% και ειδικότητα 98,9%, ενώ το MCDBT-2 75,1% και 95,1% αντίστοιχα, ανάμεσα στους 6 αυτούς τύπους καρκίνου, αναδεικνύοντας μια ακριβή μέθοδο αναγνώρισης των όγκων αυτών [272]. Όλες αυτές οι μελέτες μπορούν να μας βοηθήσουν να αναγνωρίσουμε νέους βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα μέσω του αίματος. Ωστόσο, υπάρχουν ανησυχίες ότι οι διαφορές στη μεθυλίωση που αναγνωρίζονται στον ορό, πιθανώς από αποπτωτικό DNA, είναι ενδεικτικά νόσου προχωρημένου σταδίου [273].

Παράλληλα, έρευνα για αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε κύτταρα παρωτίδας μπορεί να παρέχει καλύτερη κατανόηση για την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα, λόγω του ότι τα κύτταρα αυτά είναι άμεσα εκτεθειμένα στα περισσότερα καρκινογόνα, όπως το κάπνισμα. Μια μελέτη EWAS (epigenome-wide association studies) σε κύτταρα από παρωτίδα και του αίματος έδειξε ότι τα διαφορετικά μεθυλιωμένα CpGs στα κύτταρα της παρωτίδας ήταν πολύ αυξημένα συγκριτικά με τα

δείγματα του αίματος [274]. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι πολύ ενδιαφέροντα, καθώς οι αλλοιώσεις στη μεθυλίωση του DNA στον ιστό της παρωτίδας μπορεί να είναι πολύ σημαντικά για την καρκινογένεση στον πνεύμονα ή τη μετατροπή προκαρκινικών αλλοιώσεων, υποδηλώνοντας την περαιτέρω διερεύνηση βιοδεικτών για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη με 1097 ασθενείς στην Κίνα με πνευμονικά οζίδια 5-30 χιλιοστά συνδυάστηκαν τρεις διαφορετικές διαγνωστικές μέθοδοι, η κλινική, η απεικονιστική και δείκτες μεθυλίωσης του cfDNA, προκειμένου να γίνει η σωστή αναγνώριση των κακοηθειών. Με το συνδυασμό των μεθόδων η ευαισθησία για τον αποκλεισμό της κακοήθειας φτάνει το 98%, με την πιθανότητα σωστής διάγνωσης ασθενών με καρκίνο να φτάνει το 83%, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα αχρείαστα χειρουργεία κατά 89% και την καθυστέρηση των θεραπειών κατά 73% [275]. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των ασθενών υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.

4.v. Αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA στο αίμα για την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα

Μια πρόωμη μελέτη διαπίστωσε ότι διαταραχή της μεθυλίωσης του p16 μπορεί να ανιχνευτεί στα πτύελα των καπνιστών με καρκίνο του πνεύμονα 3 χρόνια πριν γίνει κλινική διάγνωση [78, 276]. Μέχρι σήμερα τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν εφαρμοστεί κλινικά, κυρίως γιατί η μέθοδος αυτή δεν αφορούσε προσβάσιμα δείγματα, όπως είναι από το αίμα. Ταυτόχρονα, υπάρχουν πολλά στοιχεία από πρόσφατες μελέτες EWAS που επιβεβαιώνουν ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA στο αίμα σχετίζονται με το κάπνισμα [278-280]. Επιπλέον, φαίνεται ότι ενώ οι περισσότερες αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA αναστρέφονται στους μη καπνιστές, οι αλλαγές αυτές επιμένουν ακόμα και μετά τη διακοπή του καπνίσματος σε καπνιστές [281]. Βασισμένοι σε αυτά τα ευρήματα από τις μελέτες EWAS, σημαντικές κλινικές εφαρμογές αναφέρθηκαν σε πολλαπλές μελέτες [282-286]. Συγκεκριμένα, αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε δείγματα αίματος από ασθενείς με καρκίνο συσχετίστηκαν με την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου ή τη θνητότητα. Αυτά τα αποτελέσματα έχουν κλινική εφαρμογή, καθώς έγιναν στο πλαίσιο προοπτικών μελετών.

Χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη μελέτη ESTHER εξετάστηκε το F2RL3, που απαντάται σε καπνιστές, και η συσχέτισή του με τον καρκίνο του πνεύμονα [287]. Υπομεθυλίωση του F2RL3 είχε ισχυρή συσχέτιση τόσο με την εμφάνιση όσο και με τη θνητότητα του καρκίνου του πνεύμονα, η οποία επέμενε ακόμα και μετά την αφαίρεση άλλων εξωγενών παραγόντων. Αυτή η μελέτη είχε σημαντικά αποτελέσματα λόγω του προοπτικού της χαρακτήρα, καθώς βασιζόταν σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν χρόνια πριν τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Περαιτέρω έρευνα από την ίδια

ομάδα χρησιμοποιώντας δεδομένα από την κοόρτη ESTHER, εξέτασαν ταυτόχρονα ξεχωριστά και συνδυαστικά τις πιθανότητες θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα και τη συσχέτιση με τη μεθυλίωση διάφορων δεικτών, με μέση παρακολούθηση τα 13,8 χρόνια [288]. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ότι υπομεθυλίωση σε 77 CpGs σχετίζεται με το κάπνισμα και υπομεθυλίωση σε 121 CpGs σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα CpGs είναι πολλά υποσχόμενοι στόχοι για την ανάδειξη ασθενών με πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Μια άλλη πρόσφατη EWAS ανέδειξε τη σημασία των αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA στο περιφερικό αίμα στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Το Cg05575921 στο AHRR (aryl hydrocarbon receptor repressor), το AHRR και το cg03636183 στο F2RL3 αναγνωρίστηκαν ως οι πιο σημαντικές συσχετίσεις με την πιθανότητα εμφάνισης του καρκίνου πνεύμονα στην κοόρτη NOWAC (Norwegian Women and Cancer Study) και επιβεβαιώθηκαν σε επιπλέον ζεύγη από τις κοόρτες MCCS (Melbourne Collaborative Cohort Study), NSHDS (Northern Sweden Health and Disease Study) και EPIC (European Prospective Investigation into Cancer) [283]. Η μελέτη έδειξε ότι αλλαγές στη μεθυλίωση στα γονίδια AHRR και F2RL3 ήταν σημαντικές ακόμα και μετά την προσαρμογή για το κάπνισμα, αν και είχε φανεί νωρίτερα ότι αλλαγές στα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA των γονιδίων AHRR και F2RL3 εμφανίστηκαν λόγω καπνίσματος [16]. Επομένως, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA των γονιδίων AHRR και F2RL3 μπορεί να επηρεάζουν το ρόλο που έχει το κάπνισμα στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι προαναφερθείσες μελέτες βασίζονται κυρίως σε δείγματα αίματος ασθενών με NSCLC και λίγες έχουν γίνει που να αφορούν ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Τα εννέα πιστοποιημένα CpG σημεία διέκριναν τους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα από αυτούς που δεν είχαν σε ποσοστό 85,8% σε δείγματα περιφερικού αίματος. Ειδικότερα, τα γονίδια CSF3R και ERCC1 συνδυαστικά ανέδειξαν το υψηλότερο ποσοστό αναγνώρισης [290].

Ωστόσο, υπάρχουν κάποια δεδομένα από μία μελέτη που αναφέρουν ότι τα ανωτέρω δεδομένα σχετικά με τη μεθυλίωση του DNA στο αίμα και την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να είναι λανθασμένα [291]. Προκειμένου να αναγνωριστούν τα πιθανά για αυτές τις αλλαγές στη μεθυλίωση διενεργήθηκε μια μελέτη χρησιμοποιώντας μια μετα-ανάλυση τεσσάρων EWAS μελετών και μια τυχαιοποιημένη Μεντελιανή ανάλυση δύο δειγμάτων [292]. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπήρχαν λίγα δεδομένα όσον αφορά για τη συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA σε διάφορα σημεία, ανάμεσά τους και το AHRR, και της εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να αναγνωριστεί ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στο αίμα.

4.vi. Κάπνισμα και μεθυλίωση του DNA

Είναι ευρέως γνωστό ότι το κάπνισμα σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (μεταξύ 15 με 25 φορές περισσότερο σε σχέση με τους μη καπνιστές). Παλαιότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι το κάπνισμα σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με εμφάνιση SCLC, με το 2,5% μόνο των περιστατικών με SCLC να αφορά μη καπνιστές, σε αντίθεση με το 15-25% με NSCLC [293,294]. Υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και καρκινογένεσης στον πνεύμονα μέσω μεθυλίωσης του DNA. Ο Gao και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το κάπνισμα σχετίζεται με υπομεθυλίωση (KLF6, TERT, MSH5, ACTA2, GATA3, VTI1A) και υπερμεθυλίωση (STK3A, CHRNA5) γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να σχετίζονται με μεθυλίωση του DNA [295]. Ο Zhang και η ομάδα του παρατήρησαν ότι υπομεθυλίωση των AHRR (cg05575921), 6p21.33 (cg06126421) και F2RL3 (cg03636183) σχετίζεται με το κάπνισμα και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου [296]. Η ερευνητική ομάδα του Baglietto αναγνώρισαν τρεις επιπλέον υπομεθυλιωμένες CpGs ενδεικτικές του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (cg21566642 και cg05951221 στο 2q37.1 και cg23387569 στο 12q41.1) [297]. Το πιο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι η υπομεθυλίωση των περισσότερων από αυτών των CpGs ήταν χαμηλότερη για τους ενεργούς καπνιστές, και αυξανόταν με το πέρασμα του χρόνου μετά τη διακοπή του καπνίσματος για τους πρώην καπνιστές [297].

Το κάπνισμα φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη μεθυλίωση του DNA συγκεκριμένων γονιδίων σε ανάλυση όγκων του πνεύμονα (π.χ. p16, APC, MGMT, ANK1, MTHFR) [76,172,212,298,299]. Αντιθέτως, οι Pulling και Wu έδειξαν ότι μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT είναι πιο συχνή στους μη καπνιστές παρά στους καπνιστές [300,301]. Παρόλο που οι λόγοι για την απόκλιση αυτή είναι δεν είναι εμφανείς, ο Liu και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση δειγμάτων σε παραφίνη και όχι φρέσκων δειγμάτων όγκων ευθύνεται μάλλον για αυτές τις διαφορές [298]. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του MGMT μπορεί να είναι συχνότερο σε όγκους με μεταλλαγμένο TP53 και όχι με όλους τους όγκους του πνεύμονα [301]. Επιπλέον, το RUNX3 ήταν πιο συχνά μεθυλιωμένο στους μη καπνιστές [178]. Τα καρκινογόνα του τσιγάρου είναι πιθανό να αυξήσουν την έκφραση του DNMT1 μέσω της διακοπής του μονοπατιού που εμπλέκεται στην ομπουκουοντίωση του DNMT1, οδηγώντας στην υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και τελικά στην καρκινογένεση του πνεύμονα [302,303]. Επιπλέον, το κάπνισμα μπορεί να προκαλεί χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση και οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε διαταραγμένη μεθυλίωση ακολουθούμενη από ενεργοποίηση του συμπλέγματος σίγασης (DNMT1, DNMT3B, μέλη του κατασταλτικού Polycomb συμπλέγματος 4) [304].

Ακόμα, ο Vaz και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι χρόνια έκθεση στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί διαταραχές στη μεθυλίωση στα γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και τη μορφοποίηση των κυττάρων του επιθηλίου των βρόγχων [305]. Υπέθεσαν ότι αυτή η έκθεση μετατρέπει τα κύτταρα σε μια πολυδύναμη κατάσταση μέσω επιγενετικών αλλαγών, ενεργοποιώντας σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια και ευαισθητοποιώντας τα κύτταρα στη μεταμόρφωση από ένα ογκογόνο γεγονός (π.χ. μεταλλάξεις KRAS)

Υπάρχουν περιορισμένες μελέτες που να συγκρίνουν συστηματικά τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα ανάμεσα στους καπνιστές και τους μη καπνιστές και οι περισσότερες διαφορές ήταν μικρές σε αριθμό. Χρησιμοποιώντας ένα πάνελ 30 γονιδίων, ο Pesek και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι το CDH13 είναι συχνότερα μεθυλιωμένο στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές στον προχωρημένο NSCLC [306]. Μια πρώιμη ανάλυση όλου του γονιδιώματος χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Illumina Infinium HumanMethylation27 αναγνώρισε πέντε γονίδια ως υπερμεθυλιωμένα (IRF8, IHH, LGALS4, IL18BP, VTN), αλλά μόνο το LGALS4 είχε μικρότερη έκφραση στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές που εμφάνισαν αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα [74]. Παρόμοια, η ερευνητική ομάδα του Bjaanaes χρησιμοποίησε την πλατφόρμα Illumina 450K και αναγνώρισε 225 CpGs από 147 ξεχωριστά γονίδια ως υπερμεθυλιωμένα σε καπνιστές με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σε μια ανεξάρτητη κοόρτη, αλλά κανένα από αυτά δεν έδειξε σημαντικά διαφορετική μεθυλίωση στην κοόρτη TCGA [73]. Ωστόσο, το LGALS4 επιβεβαιώθηκε ως υπερμεθυλιωμένο και με μειωμένη έκφραση, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα [74]. Αν και το LGALS4 ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και υπάρχει υπόθεση ότι λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η λειτουργία του στον καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι σαφής [307]. Χρησιμοποιώντας δεδομένα από το TCGA, η ερευνητική ομάδα του Bakulski σύγκριναν την κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA στους μη καπνιστές, τους πρώην και τους νυν καπνιστές με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. Για τους ενεργούς καπνιστές, κατέγραψαν πολλαπλά διαφορετικά μεθυλιωμένα CpGs σε μικρά πυρηνικά RNA γονίδια, γονίδια ριβοσωμικών υπομονάδων, MYO1G και ZFP28 [308]. Αυτά τα CpGs καταγράφηκαν στο MYO1G και τα οικογενή γονίδια του κυτοχρώματος p450 (CYP1A1, CYP1B1) στους πρώην καπνιστές. Ωστόσο, οι ερευνητές τονίζουν ότι τα δεδομένα αυτά πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, λόγω του μεγέθους του δείγματος, την ετερογένεια των κυττάρων καθώς και επιγενετικών αλλαγών λόγω της προόδου του καρκίνου και όχι της έκθεσης στο κάπνισμα.

4.vii. Συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και του καρκίνου του πνεύμονα

Παρόλο που αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε καπνιστές στα CpGs, συμπεριλαμβανομένων των σημείων AHRR και F2RL3, επιβεβαιώθηκε ότι σχετίζονται με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα [284, 289], ο βιολογικός τους ρόλος δεν έχει ακόμα κατανοηθεί. Μια επιγενεομική ανάλυση εξέτασε το μηχανισμό δράσης των μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη δημιουργία του καρκίνου του πνεύμονα [309]. Η μελέτη ανέδειξε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας AHR και ο καταστολέας του AHRR, εμπλέκονται με την καρκινογένεση του πνεύμονα. Το AHRR δεν είχε υπερέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα και το AHR εμφάνιζε σταδιακή απενεργοποίηση κατά τη μετάβαση από δυσπλασία σε καρκίνωμα, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση του AHRR ως απάντηση στο κάπνισμα και η αδρανοποίηση του AHR ήταν γεγονότα που σχετίζονταν με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι το μονοπάτι του AHR σχετίζεται με τη ρύθμιση της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης και η σταδιακή απενεργοποίησή του μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές που οδηγούν στην καρκινογένεση [310,311]. Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας του FOXJ1 που ευθύνεται για τα κύτταρα στους αεραγωγούς και την απομάκρυνση των εισπνεόμενων παθογόνων και το FOXA2, που έχουν ρόλους στη μορφοποίηση του καρκίνου φάνηκε ότι είναι απενεργοποιημένα στον καρκίνο του πνεύμονα και στα in situ καρκινώματα, υποδηλώνοντας ότι απενεργοποίησή τους συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου. Εκτός από τα μονοπάτια του AHR και FOXJ1, το μονοπάτι του HIF3A, που εμπλέκεται στην υποξία, παρουσιάζει σταδιακή απενεργοποίηση μεταξύ δυσπλασίας, καρκινώματος in situ και καρκίνου του πνεύμονα, υποδεικνύοντας πιθανό μονοπάτι σχετιζόμενο με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα.

Η ηλικία, ένας επίσης σημαντικός παράγοντας κινδύνου όπως και το κάπνισμα, μπορεί να θεωρηθεί ως αιτιολογικός παράγοντας μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και του καρκίνου του πνεύμονα. Ένας βιοδείκτης ηλικίας αναπτύχθηκε μετρώντας τα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA σε ανθρώπινους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του αίματος [312]. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σε 2029 γυναίκες, η μελέτη έδειξε ότι η γήρανση είχε άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, υποδηλώνοντας έναν πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη.

4.viii. Μοριακές μεταλλάξεις και μεθυλίωση

Οι μεταλλάξεις του KRAS εμφανίζονται στο 20-40% των NSCLC, με μεγαλύτερη συχνότητα στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σε σχέση με το πλακώδες (32% έναντι 4%), τους καπνιστές έναντι τους μη καπνιστές (30% έναντι 10%) και σχεδόν ποτέ στο SCLC [313,314]. Μια παλαιότερη μελέτη έδειξε συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων KRAS και το μεθυλιωμένο p16, καθώς και υψηλότερο δείκτη

μεθυλίωσης στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα [315]. Η Selamat και οι συνεργάτες της διαπίστωσαν ότι οι μεταλλάξεις του KRAS σχετίζονται με μια υποομάδα στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με υψηλότερη μεθυλίωση, παρόμοια με ευρήματα που βρέθηκαν και στον καρκίνο παχέος εντέρου [74,316]. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις του KRAS δεν φαίνονταν να είναι οι οδηγές μεταλλάξεις αυτής της υποομάδας, υπονοώντας ότι πιο περίπλοκοι μηχανισμοί μπορεί να είναι υπεύθυνοι. Αντιθέτως, μία μελέτη στο σύνολο του γονιδιώματος που συνέκρινε όγκους με μεταλλαγμένο και φυσιολογικό KRAS διαπίστωσε μόνο δύο υπομεθυλιωμένα CpGs που αντιστοιχούσαν στα γονίδια PFDN1 και MAEA [73]. Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα μιας μελέτης είναι ότι τα περισσότερα αδενοκαρκινώματα και καρκινώματα εκ μεγάλων κυττάρων με μεταλλάξεις KRAS δεν φέρουν μεθυλίωση του υποκινητή του RASSF1A [317], το οποίο όμως δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες μελέτες [199,318]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, εμφάνιση KRAS μεταλλάξεων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα είχαν ως αποτέλεσμα σε αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε γονίδια υπεύθυνα για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση [319].

Η συχνότητα των μεταλλάξεων EGFR είναι πολύ συχνότερα στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές με NSCLC (49,3% έναντι 21,5%), γυναίκες σε σχέση με άντρες (43,7% έναντι 24%) αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με πλακώδες καρκίνωμα (38% έναντι 11,7%) και Ασιατικής καταγωγής σε σχέση με τους υπόλοιπους (38,4% έναντι 15-20%) [320]. Με την ολοένα και αυξανόμενη χρήση των EGFR αναστολέων, μια καλύτερη κατανόηση των γενετικών και επιγενετικών προφίλ είναι απαραίτητη για τη σωστή χρήση της θεραπευτικής στρατηγικής. Μια παλαιότερη μελέτη έδειξε ότι οι EGFR μεταλλαγμένοι όγκοι έχουν μικρότερο δείκτη μεθυλίωσης και ήταν συχνότερα σχετιζόμενοι με μη μεθυλιωμένα p16 και CDH13 [315]. Η ερευνητική ομάδα του Pesek διαπίστωσε ένα μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης των APC, CDKN2B, ESR1 και VHL σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR [306]. Μια μελέτη από τον Bjaanaes και τους συνεργάτες του αναγνώρισε 454 διαφορετικά μεθυλιωμένα (κυρίως υπερμεθυλιωμένα) CpGs μέσα σε 275 ξεχωριστά γονίδια στους EGFR μεταλλαγμένους όγκους σε σχέση με τους μη μεταλλαγμένους όγκους. Αυτά τα γονίδια είναι εμπλουτισμένα στα σηματοδοτικά μονοπάτια του mTOR και του EIF2, τα οποία οι συγγραφείς υποδεικνύουν ότι μπορεί να εξηγήσουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού του mTOR και των EGFR TKIs στους καρκίνους πνεύμονα με μεταλλάξεις στο EGFR. Χρησιμοποιώντας δεδομένα από τον TCGA, ο Xu και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι το EGFR είναι σημαντικά υπομεθυλιωμένο στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με μεταλλάξεις του EGFR σε σύγκριση με τα φυσιολογικά [321]. Επιπλέον, δεκαεννέα υπομεθυλιωμένα CpGs και επτά υπερμεθυλιωμένα CpGs σε EGFR μεταλλαγμένους όγκους, σε σχέση με τους φυσιολογικούς, επίσης παρατηρήθηκαν, χωρίς όμως να έχει συζητηθεί ο βιολογικός τους ρόλος. Αναγνώρισαν συσχετίσεις μεταξύ της μεθυλίωσης του EGFR και της γονιδιακής έκφρασης και στους μεταλλαγμένους και στους

φυσιολογικούς όγκους, υπονοώντας ότι το EGFR μπορεί να ρυθμίζεται επιγενετικά. Γεγονός αποτελεί ότι μεθυλίωση στον υποκινητή του EGFR φαίνεται να συνεισφέρει σε αντίσταση στους TKIs του EGFR [322].

Η ειδική συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του TP53 και της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι τόσο γνωστή. Η ερευνητική ομάδα του Bjaanaes αναγνώρισε 2026 υπομεθυλιωμένα και 349 υπερμεθυλιωμένα CpGs που αντιστοιχούν σε 834 ξεχωριστά γονίδια στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με μεταλλάξεις του TP53 σε σχέση με τους φυσιολογικούς όγκους [73]. Παρόλο που οι υποκείμενες βιολογικές λειτουργίες αυτών των γονιδίων δεν συζητήθηκαν εκτενώς, ένας αριθμός από αυτά τα γονίδια αναγνωρίστηκε ως υπομεθυλιωμένος σε καρκινώματα του μαστού με μεταλλάξεις του TP53, όπως το γονίδιο AFF3 [323]. Οι μεταλλάξεις του TP53 φαίνεται να επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA μέσω της υπερέκφρασης του DNMT1 στον καρκίνο του πνεύμονα και να αυξάνουν τη γονιδιωματική αστάθεια, χωρίς ωστόσο να είναι σαφές πως επηρεάζουν τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν, και ιδίως την υπομεθυλίωση. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι μεταλλάξεις του TP53 σχετίζονται επίσης με υπομεθυλίωση στο βασικοκυτταρικό καρκίνο μαστού και σε καρκινώματα του παχέος εντέρου [324].

5. Συμπεράσματα

Η μεθυλίωση του DNA και η απορρύθμισή της παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα. Οι μηχανισμοί που οφείλονται για τις διαταραχές της μεθυλίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα είναι πολλοί και χρήζουν περαιτέρω έρευνας για την αναγνώριση του τρόπου λειτουργίας τους. Η απορρύθμιση των διαφόρων παραγόντων που σχετίζονται με τη διαδικασία αυτή (DNMTs, TETs, Polycomb πρωτεΐνες) παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του πνεύμονα, ανοίγοντας τις δυνατότητες για δημιουργία στοχευμένων θεραπειών. Ωστόσο, προκειμένου να γίνει αυτό, πρέπει πρώτα να αποσαφηνιστεί ακριβώς ο ρόλος τους, καθώς διάφορες μελέτες έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα για κάποιες υποκατηγορίες τους (π.χ. DNMT3A), που πιθανώς να οφείλονται σε παράγοντες όπως οι οδηγές μεταλλάξεις και οι ιστολογικοί υπότυποι.

Η καρκινογένεση είναι ένα γεγονός που οφείλεται στη συσσώρευση βλαβών και μεταλλάξεων σε περισσότερους από ένα ρυθμιστικούς μηχανισμούς, μοριακά μονοπάτια ή τη δράση του ανοσοποιητικού. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι. Για παράδειγμα, το DNMTB έχει περισσότερες από 30 ισομορφές, με τη ΔDNMT3B4-del να είναι η πιο συχνή στα NSCLC [315]. Σε αυτή τη μελέτη η υπερέκφραση της ΔDNMT3B4-del οδήγησε σε αύξηση της γενικότερης υπομεθυλίωσης, της τοπικής υπερμεθυλίωσης του γονιδίου καθώς και επιθηλιακή δυσπλασία. Ωστόσο η έκφραση και μόνο της ΔDNMT3B4-del δεν ήταν επαρκής για τη μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα σε καρκινικά κύτταρα σε μοντέλα ζώων, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία για την εμφάνιση του καρκίνου.

Η δυναμική αναδιαμόρφωση της μεθυλίωσης του DNA είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα και τον προγραμματισμό της λειτουργίας των κυττάρων καθώς αυτά εξέρχονται από την πολυδύναμη κατάσταση [316]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπερμεθυλίωση του DNA σε σημαντικά για την ανάπτυξη γονίδια όπου επιδρά το σύμπλοκο Polycomb στα εμβρυϊκά πολυδύναμα κύτταρα είναι ένα κοινό σημείο της καρκινογένεσης σε πολλά είδη όγκων, συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα [206,305,317]. Το υπάρχον μοντέλο υποδεικνύει ότι η υπερμεθυλίωση του DNA μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της ισορροπίας προς τη σίγαση αυτών των γονιδίων υπεύθυνων για την ανάπτυξη. Τα γονίδια αυτά παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα εμβρυϊκά και ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα, με αποτέλεσμα η σίγασή τους να ενεργοποιεί μια πολυδύναμη κατάσταση με αυξημένη έκφραση ογκογόνων μονοπατιών (π.χ. KRAS/MAPK) και την ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε κακοήγη μετατροπή. Η απορρύθμιση των διάφορων μεταγραφικών παραγόντων, είτε μέσω μεθυλίωσης του DNA ή σωματικών μεταλλάξεων, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις σε οδηγά γονίδια μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση στους διάφορους υπότυπους [317].

Συνήθως οι περισσότερες μελέτες συγκεντρώνονται σε υπερμεθυλιωμένους υποκινητές και γονίδια με μειωμένη έκφραση. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου TERT μέσω υπερμεθυλίωσης του DNA δείχνει ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα παρόμοιων φαινομένων [184]. Αν και ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός πίσω από αυτό δεν είναι γνωστός, η υπερμεθυλίωση μπορεί να ρυθμίζει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων ευαίσθητων στη μεθυλίωση ή και την έκφραση γειτονικών γονιδίων που τελικά επηρεάζουν την έκφραση. Εναλλακτικά, η μεθυλίωση του DNA μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές της γονιδιωματικής τοπολογίας, προκαλώντας διαταραχές στην έκφραση και την αλληλεπίδραση ογκογονιδίων στον καρκίνο [185,186]. Συνεπώς περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της γενικευμένης μεθυλίωσης στο γονιδίωμα, καθώς και πως η ταυτόχρονη υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση σε σημεία CpG στο ίδιο γονίδιο επηρεάζει την έκφρασή του.

Ένα ακόμα σημαντικό ερώτημα είναι οι διαφορές στη μεθυλίωση μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων στον καρκίνο του πνεύμονα. Προκειμένου να αναλυθούν εκτενώς, είναι απαραίτητες μεγαλύτερες μελέτες, ώστε να βρεθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί ογκογένεσης κάθε υπότυπου, την αναγνώριση βιοδεικτών για τη διαφορική διάγνωση και την ανάπτυξη προσωποποιημένης θεραπευτικής αγωγής.

Το κάπνισμα παραμένει ο σημαντικότερος αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης καρκίνου στους καπνιστές [305,317]. Ωστόσο, έχει μεγάλη σημασία η αναγνώριση των επιπλέον αιτιών (π.χ. μόλυνση περιβάλλοντος, χρόνια φλεγμονή, ηλικία, οξειδωτικό στρες) που επηρεάζουν την επιγενετική μετατροπή των υγιών κυττάρων σε καρκινικά στους μη καπνιστές. Χρησιμοποιώντας μεγάλες βάσεις δεδομένων με στοιχεία αυτών των πληθυσμών, αρκετά από αυτά τα ερωτήματα μπορούν να απαντηθούν [318].

Παρόλο που ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, δεν υπάρχουν βιοδείκτες για την πρόληψη και την πρόγνωση του νοσήματος. Καθώς έχουν αναγνωριστεί άναρχα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA, η έρευνα έχει στραφεί στην ανακάλυψη βιοδεικτών για τη χρήση τους στην αναγνώριση του πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα. Πρώιμες μελέτες έχουν αναγνωρίσει αρκετούς βιοδείκτες υποψήφιους για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα εξετάζοντας δείγματα από αρκετούς ασθενείς. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, κανένας βιοδείκτης μεθυλίωσης του DNA δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν δείγματα αίματος, που είναι εύκολα προσβάσιμα και ειδικά σε προοπτικές μελέτες, δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς που εμφάνισαν καρκίνο πνεύμονα και νέες μέθοδοι έρευνας, όπως το EWAS, αναμένεται να

παρέχουν χρήσιμα δεδομένα για την πρόγνωση και την πρόβλεψη. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την κατάλληλη εκμετάλλευσή τους στην καθημερινή κλινική πράξη.

Ένα ακόμα σημαντικό αντικείμενο έρευνας πάνω στον τομέα της μεθυλίωσης είναι οι θεραπευτικές επιλογές που μπορούν να προκύψουν. Μεθυλίωση σε συγκεκριμένα γονίδια μπορεί να υποδεικνύει αντίσταση ή ευαισθησία σε αντινεοπλασματικούς παράγοντες (π.χ. μεθυλίωση MGMT σχετίζεται με ευαισθησία στην τεμοζολαμίδη, ενώ μεθυλίωση του RASSF1A σχετίζεται με αντοχή στη γεμισταβίνη). Αρκετά ενδιαφέρουσα είναι η χρήση παραγόντων που άρουν τη μεθυλίωση, όπως είναι η 5-aza-2'-deoxycytidine και οι παράγοντες που στοχεύουν τη μεθυλίωση των ιστονών, όπως το EZH2. Περαιτέρω έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη και αναμένονται αρκετά θετικά αποτελέσματα.

Όλα αυτά αποτελούν αντικείμενο μελέτης και έρευνας και δείχνουν τη σπουδαιότητα που έχει η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα, προκειμένου να επικεντρωθεί ένα σημαντικό μέρος της επιστημονικής κοινότητας στην εξερεύνηση αυτής της πολύ σημαντικής βιολογικής διαδικασίας.

6. Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71(3), 209–249 (2021).
2. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 5(3), 288–300 (2016).
3. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* 7(9), 170070 (2017).
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 72(1), 7–33 (2022).
5. Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med.* 20(8), 822–832 (2014).
6. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 25(3), 447–468 (2016).
7. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 7(1), 1–20 (2021).
8. Weerakkody Y, Worsley C, Bell D, *et al.* Lung cancer (staging - IASLC 8th edition). Reference article, Radiopaedia.org
9. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.* 150(1), 12–27 (2012).
10. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 21(2), 163–167 (1999).
11. Quintanal-Villalonga Á, Molina-Pinelo S. Epigenetics of lung cancer: a translational perspective. *Cell Oncol (Dordr).* 42(6), 739–756 (2019).
12. Zug—agoit— J, Molina-Pinelo S, Lopez-Rios F, Paz-Ares L. Biological therapies in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J.* 49(3), 1601520 (2017).
13. Tarakhovsky A. Tools and landscapes of epigenetics. *Nat Immunol.* 11(7), 565–568 (2010).
14. Francis NJ, Saurin AJ, Shao Z, Kingston RE. Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell.* 8(3), 545–556 (2001).
15. Joehanes R, Just AC, Marioni RE, *et al.* Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet.* 9(5), 436–447 (2016).
16. Gao X, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H. Tobacco smoking and methylation of genes related to lung cancer development. *Oncotarget.* 7(37), 59017–59028 (2016).
17. Schembri F, Sridhar S, Perdomo C, *et al.* MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(7), 2319–2324 (2009).
18. Teixeira VH, Pipinikas CP, Pennycuik A, *et al.* Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nat Med.* 25(3), 517–525 (2019).
19. Kim H, Kwon YM, Kim JS, *et al.* Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 107(5), 1042–1049 (2006).
20. Mascaux C, Martin B, Verdebout JM, Meert AP, Ninane V, Sculier JP. Fragile histidine triad protein expression in nonsmall cell lung cancer and correlation with Ki-67 and with p53. *Eur Respir J.* 21(5), 753–758 (2003).
21. Licchesi JDF, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis.* 29(5), 895–904 (2008).
22. Krysan K, Kusko R, Grogan T, *et al.* PGE2-driven expression of c-Myc and oncomiR-17-92 contributes to apoptosis resistance in NSCLC. *Mol Cancer Res.* 12(5), 765–774 (2014).

23. Jusufović E, Rijavec M, Keser D, *et al.* let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non-small-cell lung cancer. *PLoS One.* 7(9), e45577 (2012).
24. Fabbri M, Paone A, Calore F, *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(31), E2110-2116 (2012).
25. Xu T, Liu X, Han L, Shen H, Liu L, Shu Y. Up-regulation of miR-9 expression as a poor prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol.* 16(5), 469–475 (2014).
26. Gao F, Zhao Z-L, Zhao W-T, *et al.* miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(3), 610–616 (2013).
27. Kalari S, Jung M, Kernstine KH, Takahashi T, Pfeifer GP. The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene.* 32(30), 3559–3568 (2013).
28. Poirier JT, Gardner EE, Connis N, *et al.* DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. *Oncogene.* 34(48), 5869–5878 (2015).
29. Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K, *et al.* Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res.* 9(8), 3034–3041 (2003).
30. Li F, Ye B, Hong L, Xu H, Fishbein MC. Epigenetic modifications of histone h4 in lung neuroendocrine tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 19(5), 389–394 (2011).
31. Augert A, Zhang Q, Bates B, *et al.* Small Cell Lung Cancer Exhibits Frequent Inactivating Mutations in the Histone Methyltransferase KMT2D/MLL2: CALGB 151111 (Alliance). *J Thorac Oncol.* 12(4), 704–713 (2017).
32. Hu J, Wang Y, Zhang Y, *et al.* Comprehensive genomic profiling of small cell lung cancer in Chinese patients and the implications for therapeutic potential. *Cancer Med.* 8(9), 4338–4347 (2019).
33. Denny SK, Yang D, Chuang C-H, *et al.* Nfib Promotes Metastasis through a Widespread Increase in Chromatin Accessibility. *Cell.* 166(2), 328–342 (2016).
34. Kato F, Fiorentino FP, Alibés A, *et al.* MYCL is a target of a BET bromodomain inhibitor, JQ1, on growth suppression efficacy in small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 7(47), 77378–77388 (2016).
35. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 19(1), 9–31 (2019).
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144(5), 646–674 (2011).
37. Dimitrova N, Gocheva V, Bhutkar A, *et al.* Stromal expression of miR-143/145 promotes neoangiogenesis in lung cancer development. *Cancer Discov.* 6(2), 188–201 (2016).
38. Xie M, Liu M, He C-S. SIRT1 regulates endothelial Notch signaling in lung cancer. *PLoS One.* 7(9), e45331 (2012).
39. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* 19(2), 108–119 (2018).
40. Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, *et al.* Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating B7-H3. *J Thorac Oncol.* 6(7), 1162–1168 (2011).
41. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 8(3), 125–158 (2014).
42. Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, *et al.* Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell.* 30(1), 120–135 (2016).
43. McLoed AG, Sherrill TP, Cheng D-S, *et al.* Neutrophil-Derived IL-1 β Impairs the Efficacy of NF- κ B Inhibitors against Lung Cancer. *Cell Rep.* 16(1), 120–132 (2016).

44. Vikis HG, Gelman AE, Franklin A, *et al.* Neutrophils are required for 3-methylcholanthrene-initiated, butylated hydroxytoluene-promoted lung carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 51(12), 993–1002 (2012).
45. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol.* 30, 647–675 (2012).
46. Markowitz GJ, Havel LS, Crowley MJ, *et al.* Immune reprogramming via PD-1 inhibition enhances early-stage lung cancer survival. *JCI Insight.* 3(13), e96836, 96836 (2018).
47. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22, 329–360 (2004).
48. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, *et al.* Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 189(7), 832–844 (2014).
49. Heng WS, Kruyt FAE, Cheah S-C. Understanding Lung Carcinogenesis from a Morphostatic Perspective: Prevention and Therapeutic Potential of Phytochemicals for Targeting Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 22(11), 5697 (2021).
50. Park JW, Lee JK, Sheu KM, *et al.* Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. *Science.* 362(6410), 91–95 (2018).
51. Xu X, Huang L, Futtner C, *et al.* The cell of origin and subtype of K-Ras-induced lung tumors are modified by Notch and Sox2. *Genes Dev.* 28(17), 1929–1939 (2014).
52. Kashima J, Kitadai R, Okuma Y. Molecular and Morphological Profiling of Lung Cancer: A Foundation for “Next-Generation” Pathologists and Oncologists. *Cancers (Basel).* 11(5), 599 (2019).
53. Xu W, Zhang M, Li Y, *et al.* YAP manipulates proliferation via PTEN/AKT/mTOR-mediated autophagy in lung adenocarcinomas. *Cancer Cell Int.* 21, 30 (2021).
54. Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med.* 15(4), 303–307 (2009).
55. Xu Y, Li H, Bajrami B, *et al.* Cigarette smoke (CS) and nicotine delay neutrophil spontaneous death via suppressing production of diphosphoinositol pentakisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(19), 7726–7731 (2013).
56. Miglino N, Roth M, Lardinois D, Sadowski C, Tamm M, Borger P. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation by translational mechanisms. *Eur Respir J.* 39(3), 705–711 (2012).
57. LaCanna R, Liccardo D, Zhang P, *et al.* Yap/Taz regulate alveolar regeneration and resolution of lung inflammation. *J Clin Invest.* 129(5), 2107–2122 (2019).
58. Ouadah Y, Rojas ER, Riordan DP, Capostagno S, Kuo CS, Krasnow MA. Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. *Cell.* 179(2), 403–416.e23 (2019).
59. Adams DS, Levin M. Endogenous voltage gradients as mediators of cell-cell communication: strategies for investigating bioelectrical signals during pattern formation. *Cell Tissue Res.* 352(1), 95–122 (2013).
60. McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form. *Dev Biol.* 433(2), 177–189 (2018).
61. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 15(5), 1033 (2018).
62. Heng WS, Gosens R, Kruyt FAE. Lung cancer stem cells: origin, features, maintenance mechanisms and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol.* 160, 121–133 (2019).
63. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DMW. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol.* 61, 3–11 (2017).
64. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 216(5), 1016–1026 (2019).

65. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 553(7689), 446–454 (2018).
66. Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, *et al.* Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 14(22), 7237–7245 (2008).
67. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of Lung Cancer. *Transl Res*. 165(1), 74–90 (2015).
68. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)*. 5(1), 3 (2016).
69. Pfeifer GP, Rauch TA. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Semin Cancer Biol*. 19(3), 181–187 (2009).
70. Morán A, Fernández-Marcelo T, Carro J, *et al.* Methylation profiling in non-small cell lung cancer: clinical implications. *Int J Oncol*. 40(3), 739–746 (2012).
71. Lokk K, Vooder T, Kolde R, *et al.* Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 7(6), e39813 (2012).
72. Heller G, Babinsky VN, Ziegler B, *et al.* Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis*. 34(3), 513–521 (2013).
73. Bjaanæs MM, Fleischer T, Halvorsen AR, *et al.* Genome-wide DNA methylation analyses in lung adenocarcinomas: Association with EGFR, KRAS and TP53 mutation status, gene expression and prognosis. *Mol Oncol*. 10(2), 330–343 (2016).
74. Selamat SA, Chung BS, Girard L, *et al.* Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome Res*. 22(7), 1197–1211 (2012).
75. Yuan Y, Liu L, Chen H, *et al.* Comprehensive Characterization of Molecular Differences in Cancer between Male and Female Patients. *Cancer Cell*. 29(5), 711–722 (2016).
76. Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, *et al.* Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 103(2), 153–160 (2003).
77. Park SL, Patel YM, Loo LWM, *et al.* Association of internal smoking dose with blood DNA methylation in three racial/ethnic populations. *Clin Epigenetics*. 10(1), 110 (2018).
78. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 358(11), 1118–1128 (2008).
79. Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, *et al.* A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 31(32), 4140–4147 (2013).
80. Karlsson A, Jönsson M, Lauss M, *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis of lung carcinoma reveals one neuroendocrine and four adenocarcinoma epitypes associated with patient outcome. *Clin Cancer Res*. 20(23), 6127–6140 (2014).
81. Liang R, Li X, Li W, Zhu X, Li C. DNA methylation in lung cancer patients: Opening a “window of life” under precision medicine. *Biomed Pharmacother*. 144, 112202 (2021).
82. Ren M, Wang C, Sheng D, Shi Y, Jin M, Xu S. Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis. *Ann Diagn Pathol*. 27, 57–61 (2017).
83. Zhang C, Yu W, Wang L, *et al.* DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer Diagnosis. *J Cancer*. 8(17), 3585–3591 (2017).
84. Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdyntseva NV, *et al.* Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*. 81(3), 397–403 (2013).
85. Xu Z, Wang Y, Wang L, *et al.* The performance of the SHOX2/PTGER4 methylation assay is influenced by cancer stage, age, type and differentiation. *Biomark Med*. 14(5), 341–351 (2020).

86. Weiss G, Schlegel A, Kottwitz D, König T, Tetzner R. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Plasma-Based Discrimination between Patients with Malignant and Nonmalignant Lung Disease. *J Thorac Oncol.* 12(1), 77–84 (2017).
87. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, *et al.* Aberrant promoter methylation of p16(INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer.* 116(5), 720–725 (2005).
88. Yu J, Bulk E, Ji P, *et al.* The EPHB6 receptor tyrosine kinase is a metastasis suppressor that is frequently silenced by promoter DNA hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 16(8), 2275–2283 (2010).
89. Hwang J-A, Kim Y, Hong S-H, *et al.* Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLoS One.* 8(11), e79634 (2013).
90. Ma R, Feng N, Yu X, *et al.* Promoter methylation of Wnt/ β -Catenin signal inhibitor TMEM88 is associated with unfavorable prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Med.* 14(4), 377–386 (2017).
91. Zhang Y, Xu R, Li G, Xie X, Long J, Wang H. Loss of expression of the differentially expressed in adenocarcinoma of the lung (DAL-1) protein is associated with metastasis of non-small cell lung carcinoma cells. *Tumour Biol.* 33(6), 1915–1925 (2012).
92. Søres S, Daugaard IL, Sørensen BS, *et al.* Hypomethylation and increased expression of the putative oncogene ELMO3 are associated with lung cancer development and metastases formation. *Oncoscience.* 1(5), 367–374 (2014).
93. Hashimoto K, Narita Y, Matsushita Y, *et al.* Methylation status of O6-methylguanine-DNA-methyl transferase promoter region in non-small-cell lung cancer patients with brain metastasis. *Clin Transl Oncol.* 14(1), 31–35 (2012).
94. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan O, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 1856(2), 189–210 (2015).
95. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother.* 124, 109821 (2020).
96. Nunes SP, Diniz F, Moreira-Barbosa C, *et al.* Subtyping Lung Cancer Using DNA Methylation in Liquid Biopsies. *J Clin Med.* 8(9), 1500 (2019).
97. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, *et al.* IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 29(11), 1681–1690 (2010).
98. Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, *et al.* Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation on survival of non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine. *Lung Cancer.* 56(1), 115–123 (2007).
99. Hiddinga BI, Pauwels P, Janssens A, Meerbeek JP van. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): A drugable target in lung cancer? *Lung Cancer.* 107, 91–99 (2017).
100. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 6(8), 597–610 (2005).
101. The history of cancer epigenetics | Nature Reviews Cancer
102. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 92(7), 564–569 (2000).
103. Ansari J, Shackelford RE, El-Osta H. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. *Transl Lung Cancer Res.* 5(2), 155–171 (2016).
104. The fundamental role of epigenetic events in cancer | Nature Reviews Genetics
105. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci.* 39(7), 310–318 (2014).
106. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 301, 179–201 (2006).

107. Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, *et al.* The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J.* 34(18), 2350–2362 (2015).
108. Jurkowska RZ, Anspach N, Urbanke C, *et al.* Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res.* 36(21), 6656–6663 (2008).
109. Lin R-K, Hsu H-S, Chang J-W, Chen C-Y, Chen J-T, Wang Y-C. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5' CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer.* 55(2), 205–213 (2007).
110. Lin R-K, Wu C-Y, Chang J-W, *et al.* Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res.* 70(14), 5807–5817 (2010).
111. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, *et al.* Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res.* 63(21), 7089–7093 (2003).
112. Kassis ES, Zhao M, Hong JA, Chen GA, Nguyen DM, Schrupp DS. Depletion of DNA methyltransferase 1 and/or DNA methyltransferase 3b mediates growth arrest and apoptosis in lung and esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 131(2), 298–306 (2006).
113. Yan F, Shen N, Pang J, *et al.* Restoration of miR-101 suppresses lung tumorigenesis through inhibition of DNMT3a-dependent DNA methylation. *Cell Death Dis.* 5(9), e1413 (2014).
114. Lin R-K, Wang Y-C. Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci.* 4, 46 (2014).
115. Husni RE, Shiba-Ishii A, Iiyama S, *et al.* DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 97, 59–65 (2016).
116. Gao Q, Steine EJ, Barrasa MI, *et al.* Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(44), 18061–18066 (2011).
117. Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y. The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene.* 21(31), 4822–4829 (2002).
118. Cohen AL, Piccolo SR, Cheng L, *et al.* Genomic pathway analysis reveals that EZH2 and HDAC4 represent mutually exclusive epigenetic pathways across human cancers. *BMC Med Genomics.* 6, 35 (2013).
119. Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R. Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. *Curr Genomics.* 10(5), 336–352 (2009).
120. Espada J, Ballestar E, Santoro R, *et al.* Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 35(7), 2191–2198 (2007).

121. Wu X-Y, Chen H-C, Li W-W, Yan J-D, Lv R-Y. DNMT1 promotes cell proliferation via methylating hMLH1 and hMSH2 promoters in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *The Journal of Biochemistry*. 168(2), 151–157 (2020).
122. Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res*. 66(17), 8342–8346 (2006).
123. Mutskov VJ, Farrell CM, Wade PA, Wolffe AP, Felsenfeld G. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev*. 16(12), 1540–1554 (2002).
124. Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*. 38(5), 540–549 (2006).
125. Qin T, Youssef EM, Jelinek J, *et al*. Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines. *Clin Cancer Res*. 13(14), 4225–4232 (2007).
126. Chu BF, Karpenko MJ, Liu Z, *et al*. Phase I study of 5-aza-2'-deoxycytidine in combination with valproic acid in non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 71(1), 115–121 (2013).
127. Hou T, Ma J, Hu C, *et al*. Decitabine reverses gefitinib resistance in PC9 lung adenocarcinoma cells by demethylation of RASSF1A and GADD45 β promoter. *Int J Clin Exp Pathol*. 12(11), 4002–4010 (2019).
128. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, *et al*. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(40), 15805–15810 (2007).
129. Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res*. 65(19), 8635–8639 (2005).
130. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 30(7), 733–750 (2016).
131. Yang H, Liu Y, Bai F, *et al*. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*. 32(5), 663–669 (2013).
132. Chen H-Q, Chen D-J, Li Y, *et al*. Epigenetic silencing of TET1 mediated hydroxymethylation of base excision repair pathway during lung carcinogenesis. *Environ Pollut*. 268(Pt B), 115860 (2021).
133. Li L, Li C, Mao H, *et al*. Corrigendum: Epigenetic inactivation of the CpG demethylase TET1 as a DNA methylation feedback loop in human cancers. *Sci Rep*. 6, 34435 (2016).
134. Filipczak PT, Leng S, Tellez CS, *et al*. p53-Suppressed Oncogene TET1 Prevents Cellular Aging in Lung Cancer. *Cancer Res*. 79(8), 1758–1768 (2019).
135. Rauch TA, Zhong X, Wu X, *et al*. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(1), 252–257 (2008).

136. Kitahara H, Okamoto T, Shimamatsu S, *et al.* LINE-1 Hypomethylation Is Associated With Malignant Traits and Cell Proliferation in Lung Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 40(10), 5659–5666 (2020).
137. Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, *et al.* Long interspersed nucleotide element 1 hypomethylation is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg.* 96(5), 1790–1794 (2013).
138. Liu H, Liu W, Wu Y, *et al.* Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer Res.* 65(17), 7635–7643 (2005).
139. Shao T, Song P, Hua H, *et al.* Gamma synuclein is a novel Twist1 target that promotes TGF- β -induced cancer cell migration and invasion. *Cell Death Dis.* 9(6), 625 (2018).
140. Jang SJ, Soria JC, Wang L, *et al.* Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 61(21), 7959–7963 (2001).
141. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 37, 1–8 (2015).
142. Vachtenheim J, Horáková I, Novotná H. Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 54(5), 1145–1148 (1994).
143. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, *et al.* Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 124(1), 81–87 (2009).
144. Hu X, Estecio MR, Chen R, *et al.* Evolution of DNA methylome from precancerous lesions to invasive lung adenocarcinomas. *Nat Commun.* 12(1), 687 (2021).
145. Johnstone SE, Reyes A, Qi Y, *et al.* Large-Scale Topological Changes Restrain Malignant Progression in Colorectal Cancer. *Cell.* 182(6), 1474-1489.e23 (2020).
146. Siegmund KD, Laird PW. Analysis of complex methylation data. *Methods.* 27(2), 170–178 (2002).
147. Rauch T, Wang Z, Zhang X, *et al.* Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(13), 5527–5532 (2007).
148. Rauch TA, Wang Z, Wu X, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol.* 33(2), 287–296 (2012).
149. Tang X, Khuri FR, Lee JJ, *et al.* Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92(18), 1511–1516 (2000).
150. Kim, DH., Nelson, H., Wiencke, J. *et al.* Promoter methylation of DAP-kinase: association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 20, 1765–1770 (2001).
151. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, *et al.* Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* 10(3), 356–364 (2003).
152. Shivapurkar N, Toyooka S, Eby MT, *et al.* Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther.* 1(1), 65–69 (2002).

153. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 61(1), 249–255 (2001).
154. Merlo A, Herman JG, Mao L, *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1(7), 686–692 (1995).
155. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, *et al.* p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 61(8), 3419–3424 (2001).
156. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, *et al.* Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(20), 11891–11896 (1998).
157. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, *et al.* Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 58(1), 131–138 (2007).
158. Zhao R, Choi BY, Lee M-H, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. *EBioMedicine.* 8, 30–39 (2016).
159. Gutiontov SI, Turchan WT, Spurr LF, *et al.* CDKN2A loss-of-function predicts immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 11(1), 20059 (2021).
160. Tam KW, Zhang W, Soh J, *et al.* CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 8(11), 1378–1388 (2013).
161. Cilluffo D, Barra V, Di Leonardo A. P14ARF: The Absence that Makes the Difference. *Genes (Basel).* 11(7), 824 (2020).
162. Tuo L, Sha S, Huayu Z, Du K. P16INK4a gene promoter methylation as a biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer: An updated meta-analysis. *Thorac Cancer.* 9(8), 1032–1040 (2018).
163. Bradley DP, Gattuso P, Pool M, *et al.* CDKN2A (p16) promoter hypermethylation influences the outcome in young lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol.* 21(4), 207–213 (2012).
164. García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. RASSF1A Tumour Suppressor: Target the Network for Effective Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 12(1), 229 (2020).
165. Dubois F, Bergot E, Zalcmán G, Levallet G. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis-an updated review. *Cell Death Dis.* 10(12), 928 (2019).
166. Estrabaud E, Lassot I, Blot G, *et al.* RASSF1C, an isoform of the tumor suppressor RASSF1A, promotes the accumulation of beta-catenin by interacting with betaTrCP. *Cancer Res.* 67(3), 1054–1061 (2007).
167. Malpeli G, Innamorati G, Decimo I, *et al.* Methylation Dynamics of RASSF1A and Its Impact on Cancer. *Cancers (Basel).* 11(7), 959 (2019).
168. Gkoutakos A, Sartori G, Falcone I, *et al.* PTEN in Lung Cancer: Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around. *Cancers (Basel).* 11(8), 1141 (2019).

169. Parikh AR, Ali SM, Schrock AB, *et al.* Response to rapamycin analogs but not PD-1 inhibitors in PTEN-mutated metastatic non-small-cell lung cancer with high tumor mutational burden. *Lung Cancer (Auckl)*. 9, 45–47 (2018).
170. Lee DD, Leão R, Komosa M, *et al.* DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. *J Clin Invest*. 129(1), 223–229 (2019).
171. Yang L, Li N, Wang M, *et al.* Tumorigenic effect of TERT and its potential therapeutic target in NSCLC (Review). *Oncol Rep*. 46(2), 182 (2021).
172. Hsu C-C, Su Y-F, Tsai K-Y, *et al.* Gamma synuclein is a novel nicotine responsive protein in oral cancer malignancy. *Cancer Cell International*. 20(1), 300 (2020).
173. Brabender J, Usadel H, Metzger R, *et al.* Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 9(1), 223–227 (2003).
174. Gomes A, Reis-Silva M, Alarcão A, Couceiro P, Sousa V, Carvalho L. Promoter hypermethylation of DNA repair genes MLH1 and MSH2 in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung. *Rev Port Pneumol*. 20(1), 20–30 (2014).
175. Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, *et al.* Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 92(16), 1303–1307 (2000).
176. Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, *et al.* Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer. *Oncol Rep*. 15(1), 129–135 (2006).
177. Grote HJ, Schmiemann V, Kiel S, *et al.* Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer*. 110(5), 751–755 (2004).
178. Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, *et al.* SHOX2 DNA Methylation is a Biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 10(1), 600 (2010).
179. Kim DS, Kim MJ, Lee JY, Kim YZ, Kim EJ, Park JY. Aberrant methylation of E-cadherin and H-cadherin genes in nonsmall cell lung cancer and its relation to clinicopathologic features. *Cancer*. 110(12), 2785–2792 (2007).
180. Heller G, Fong KM, Girard L, *et al.* Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene*. 25(6), 959–968 (2006).
181. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene*. 21(35), 5450–5461 (2002).
182. Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, *et al.* Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature*. 529(7584), 110–114 (2016).
183. Flavahan WA, Drier Y, Johnstone SE, *et al.* Altered chromosomal topology drives oncogenic programs in SDH-deficient GISTs. *Nature*. 575(7781), 229–233 (2019).

184. Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, *et al.* Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene*. 20(27), 3528–3532 (2001).
185. Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, *et al.* Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res*. 7(7), 1998–2004 (2001).
186. Yu Q, Guo Q, Chen L, Liu S. Clinicopathological significance and potential drug targeting of CDH1 in lung cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther*. 9, 2171–2178 (2015).
187. Krohn A, Ahrens T, Yalcin A, *et al.* Tumor cell heterogeneity in Small Cell Lung Cancer (SCLC): phenotypical and functional differences associated with Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and DNA methylation changes. *PLoS One*. 9(6), e100249 (2014).
188. Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, *et al.* Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res*. 61(11), 4556–4560 (2001).
189. Nakata S, Sugio K, Uramoto H, *et al.* The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer*. 106(10), 2190–2199 (2006).
190. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, *et al.* 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res*. 61(9), 3581–3585 (2001).
191. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*. 59(1), 67–70 (1999).
192. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, *et al.* DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther*. 1(1), 61–67 (2001).
193. Liu L, Broaddus RR, Yao JC, *et al.* Epigenetic alterations in neuroendocrine tumors: methylation of RAS-association domain family 1, isoform A and p16 genes are associated with metastasis. *Mod Pathol*. 18(12), 1632–1640 (2005).
194. Soria J-C, Lee H-Y, Lee JI, *et al.* Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*. 8(5), 1178–1184 (2002).

195. Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene*. 20(27), 3563–3567 (2001).
196. Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, *et al.* RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Int J Cancer*. 106(1), 45–51 (2003).
197. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, *et al.* Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 63(12), 3352–3355 (2003).
198. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, *et al.* Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 10(5), e0123369 (2015).
199. Zhang H-T, Chen X-F, Wang M-H, *et al.* Defective expression of transforming growth factor beta receptor type II is associated with CpG methylated promoter in primary non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 10(7), 2359–2367 (2004).
200. Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, *et al.* Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer*. 107(1), 53–59 (2003).
201. Viré E, Brenner C, Deplus R, *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 439(7078), 871–874 (2006).
202. Sun X, Yi J, Yang J, *et al.* An integrated epigenomic-transcriptomic landscape of lung cancer reveals novel methylation driver genes of diagnostic and therapeutic relevance. *Theranostics*. 11(11), 5346–5364 (2021).
203. Smith LT, Lin M, Brena RM, *et al.* Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(4), 982–987 (2006).
204. Walter RFH, Rozynek P, Casjens S, *et al.* Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 function as possible biomarkers for the differential diagnosis of lung cancer. *PLoS One*. 13(5), e0195716 (2018).
205. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, *et al.* An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res*. 18(10), 2976–2986 (2012).
206. Liu J, Yang XY, Shi WJ. Identifying differentially expressed genes and pathways in two types of non-small cell lung cancer: adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*. 13(1), 95–102 (2014).
207. Gandara DR, Hammerman PS, Sos ML, Lara PN, Hirsch FR. Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*. 21(10), 2236–2243 (2015).
208. Jin M, Kawakami K, Fukui Y, *et al.* Different histological types of non-small cell lung cancer have distinct folate and DNA methylation levels. *Cancer Sci*. 100(12), 2325–2330 (2009).
209. Tessema M, Yingling CM, Picchi MA, *et al.* ANK1 Methylation regulates expression of MicroRNA-486-5p and discriminates lung tumors by histology and smoking status. *Cancer Lett*. 410, 191–200 (2017).
210. Hawes SE, Stern JE, Feng Q, *et al.* DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer*. 69(2), 172–179 (2010).

211. Castro M, Grau L, Puerta P, *et al.* Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Med.* 8, 86 (2010).
212. Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, Kozłowski M, Pankiewicz W, Milewski R. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochem Cytobiol.* 47(2), 275–280 (2009).
213. Chen R, Hong Q, Jiang J, *et al.* AGTR1 promoter hypermethylation in lung squamous cell carcinoma but not in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 14(4), 4989–4994 (2017).
214. Zhao X, Jen J, Peikert T, *et al.* Selection of Sensitive Methylation Markers for the Detection of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis.* 6(6), 1–7 (2015).
215. Yang Y, Wang M, Liu B. Exploring and comparing of the gene expression and methylation differences between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol.* 234(4), 4454–4459 (2019).
216. Teschendorff AE, Zhu T, Breeze CE, Beck S. EPISCORE: cell type deconvolution of bulk tissue DNA methylomes from single-cell RNA-Seq data. *Genome Biology.* 21(1), 221 (2020).
217. Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol.* 34(12), 1805–1811 (2010).
218. Carvalho RH, Hou J, Haberle V, *et al.* Genomewide DNA methylation analysis identifies novel methylated genes in non-small-cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol.* 8(5), 562–573 (2013).
219. Huang T, Li J, Zhang C, *et al.* Distinguishing Lung Adenocarcinoma from Lung Squamous Cell Carcinoma by Two Hypomethylated and Three Hypermethylated Genes: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 11(2), e0149088 (2016).
220. Shi Y-X, Wang Y, Li X, *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetic signatures in squamous cell lung cancer. *BMC Genomics.* 18(1), 901 (2017).
221. Zhang H, Jin Z, Cheng L, Zhang B. Integrative Analysis of Methylation and Gene Expression in Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Lung Carcinoma. *Front Bioeng Biotechnol.* 8, 3 (2020).
222. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, *et al.* Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 11(24 Pt 1), 8686–8698 (2005).
223. Walter K, Holcomb T, Januario T, *et al.* DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 18(8), 2360–2373 (2012).
224. Yu J, Hou M, Pei T. FAM83A Is a Prognosis Signature and Potential Oncogene of Lung Adenocarcinoma. *DNA Cell Biol.* 39(5), 890–899 (2020).
225. Yao S, Wu D, Chen J, Wang P, Lv X, Huang J. Hypermethylation of the G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) promoter inhibits binding of C/EBP α , and GRK6 knockdown promotes cell migration and invasion in lung adenocarcinoma cells. *FEBS Open Bio.* 9(4), 605–617 (2019).
226. Balgkouranidou I, Liloglou T, Lianidou ES. Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomark Med.* 7(1), 49–58 (2013).
227. Heinäniemi M, Nykter M, Kramer R, *et al.* Gene-pair expression signatures reveal lineage control. *Nat Methods.* 10(6), 577–583 (2013).
228. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 7(1), 21–33 (2006).
229. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 6(2), 107–116 (2006).
230. Teschendorff AE, Zheng SC, Feber A, Yang Z, Beck S, Widschwendter M. The multi-omic landscape of transcription factor inactivation in cancer. *Genome Med.* 8(1), 89 (2016).
231. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 339(6127), 1546–1558 (2013).

232. Jones A, Teschendorff AE, Li Q, *et al.* Role of DNA methylation and epigenetic silencing of HAND2 in endometrial cancer development. *PLoS Med.* 10(11), e1001551 (2013).
233. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, *et al.* Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 91(4), 332–339 (1999).
234. Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, *et al.* Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 6, 70 (2007).
235. Geng J, Sun J, Lin Q, *et al.* Methylation status of NEUROG2 and NID2 improves the diagnosis of stage I NSCLC. *Oncol Lett.* 3(4), 901–906 (2012).
236. Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, *et al.* Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res.* 10(7), 2284–2288 (2004).
237. Schmiemann V, Böcking A, Kazimirek M, *et al.* Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin Cancer Res.* 11(21), 7728–7734 (2005).
238. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, *et al.* Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer.* 108(2), 129–134 (2006).
239. van der Drift MA, Prinsen CFM, Knuiman GJ, Janssen JP, Dekhuijzen PNR, Thunnissen FBJM. Diagnosing peripheral lung cancer: the additional value of the Ras-association domain family 1A gene methylation and Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation analyses in washings in nondiagnostic bronchoscopy. *Chest.* 141(1), 169–175 (2012).
240. Destro A, Bianchi P, Alloisio M, *et al.* K-ras and p16(INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer.* 44(1), 23–32 (2004).
241. Belinsky SA, Grimes MJ, Casas E, *et al.* Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *Br J Cancer.* 96(8), 1278–1283 (2007).
242. Cirincione R, Lintas C, Conte D, *et al.* Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: a nested case-control study. *Int J Cancer.* 118(5), 1248–1253 (2006).
243. Hubers AJ, Brinkman P, Boksem RJ, *et al.* Combined sputum hypermethylation and eNose analysis for lung cancer diagnosis. *J Clin Pathol.* 67(8), 707–711 (2014).
244. Leng S, Do K, Yingling CM, *et al.* Defining a gene promoter methylation signature in sputum for lung cancer risk assessment. *Clin Cancer Res.* 18(12), 3387–3395 (2012).
245. Wang Y-C, Lu Y-P, Tseng R-C, *et al.* Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest.* 111(6), 887–895 (2003).
246. Fujii M, Fujimoto N, Hiraki A, *et al.* Aberrant DNA methylation profile in pleural fluid for differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* 103(3), 510–514 (2012).
247. Li H, Xu Y, Wan B, *et al.* The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients. *Transl Lung Cancer Res.* 8(4), 429–449 (2019).
248. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. *Int J Mol Sci.* 22(12), 6288 (2021).
249. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 63(3), 315–321 (2009).
250. Zhang Y, Wang R, Song H, *et al.* Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 303(1), 21–28 (2011).

251. Yang J, Shen Y, Liu B, Tong Y. Promoter methylation of BRMS1 correlates with smoking history and poor survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 74(2), 305–309 (2011).
252. Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, Field JK, Kristiansen G, Soltermann A. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol*. 21(2), 93–104 (2012).
253. Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn*. 10(4), 481–488 (2010).
254. Hsu H-S, Chen T-P, Hung C-H, *et al*. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer*. 110(9), 2019–2026 (2007).
255. Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, *et al*. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 11(7), 2466–2470 (2005).
256. Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, *et al*. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol*. 6(10), 1632–1638 (2011).
257. Liu Y, An Q, Li L, *et al*. Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis*. 24(12), 1897–1901 (2003).
258. Bearzatto A, Conte D, Frattini M, *et al*. p16(INK4A) Hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 8(12), 3782–3787 (2002).
259. Suga Y, Miyajima K, Oikawa T, *et al*. Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 20(5), 1137–1142 (2008).
260. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 11(6), 426–437 (2011).
261. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer*. 49(1), 1–12 (2005).
262. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, *et al*. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther*. 9, 6549–6559 (2016).
263. Wielscher M, Vierlinger K, Kegler U, Ziesche R, Gsur A, Weinhäusel A. Diagnostic Performance of Plasma DNA Methylation Profiles in Lung Cancer, Pulmonary Fibrosis and COPD. *EBioMedicine*. 2(8), 929–936 (2015).
264. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 489(7417), 519–525 (2012).

265. Ooki A, Maleki Z, Tsay J-CJ, *et al.* A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA. *Clin Cancer Res.* 23(22), 7141–7152 (2017).
266. Hulbert A, Jusue-Torres I, Stark A, *et al.* Early Detection of Lung Cancer using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clin Cancer Res.* 23(8), 1998–2005 (2017).
267. Xu W, Lu J, Zhao Q, *et al.* Genome-Wide Plasma Cell-Free DNA Methylation Profiling Identifies Potential Biomarkers for Lung Cancer. *Dis Markers.* 2019, 4108474 (2019).
268. Teschendorff AE, Yang Z, Wong A, *et al.* Correlation of Smoking-Associated DNA Methylation Changes in Buccal Cells With DNA Methylation Changes in Epithelial Cancer. *JAMA Oncol.* 1(4), 476–485 (2015).
269. Gao Q, Lin YP, Li BS, *et al.* Unintrusive multi-cancer detection by circulating cell-free DNA methylation sequencing (THUNDER): development and independent validation studies. *Ann Oncol.* 34(5), 486–495 (2023).
270. He J, Wang B, Tao J, *et al.* Accurate classification of pulmonary nodules by a combined model of clinical, imaging, and cell-free DNA methylation biomarkers: a model development and external validation study. *The Lancet Digital Health* [Internet]. 0(0) (2023).
271. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, *et al.* Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 60(21), 5954–5958 (2000).
272. Dogan MV, Shields B, Cutrona C, *et al.* The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genomics.* 15, 151 (2014).
273. Tsaprouni LG, Yang T-P, Bell J, *et al.* Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics.* 9(10), 1382–1396 (2014).
274. Zaghlool SB, Al-Shafai M, Al Muftah WA, Kumar P, Falchi M, Suhre K. Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. *Clin Epigenetics.* 7(1), 6 (2015).
275. Guida F, Sandanger TM, Castagné R, *et al.* Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Hum Mol Genet.* 24(8), 2349–2359 (2015).
276. Riboli E, Kaaks R. The EPIC Project: rationale and study design. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol.* 26 Suppl 1, S6-14 (1997).
277. Milne RL, Fletcher AS, MacInnis RJ, *et al.* Cohort Profile: The Melbourne Collaborative Cohort Study (Health 2020). *International Journal of Epidemiology.* 46(6), 1757–1757i (2017).
278. Fasanelli F, Baglietto L, Ponzi E, *et al.* Hypomethylation of smoking-related genes is associated with future lung cancer in four prospective cohorts. *Nat Commun.* 6, 10192 (2015).
279. Hallmans G, Agren A, Johansson G, *et al.* Cardiovascular disease and diabetes in the Northern Sweden Health and Disease Study Cohort - evaluation of risk factors and their interactions. *Scand J Public Health Suppl.* 61, 18–24 (2003).
280. Zhang Y, Yang R, Burwinkel B, *et al.* F2RL3 methylation in blood DNA is a strong predictor of mortality. *Int J Epidemiol.* 43(4), 1215–1225 (2014).
281. Zhang Y, Schöttker B, Ordóñez-Mena J, *et al.* F2RL3 methylation, lung cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.* 137(7), 1739–1748 (2015).

282. Zhang Y, Breitling LP, Balavarca Y, Holleczeck B, Schöttker B, Brenner H. Comparison and combination of blood DNA methylation at smoking-associated genes and at lung cancer-related genes in prediction of lung cancer mortality. *Int J Cancer*. 139(11), 2482–2492 (2016).
283. Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, *et al*. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum Mol Genet*. 22(5), 843–851 (2013).
284. Wang L, Aakre JA, Jiang R, *et al*. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA. *J Thorac Oncol*. 5(6), 778–785 (2010).
285. Richmond RC, Hemani G, Tilling K, Davey Smith G, Relton CL. Challenges and novel approaches for investigating molecular mediation. *Hum Mol Genet*. 25(R2), R149–R156 (2016).
286. Battram T, Richmond RC, Baglietto L, *et al*. Appraising the causal relevance of DNA methylation for risk of lung cancer. *International Journal of Epidemiology*. 48(5), 1493–1504 (2019).
287. Ou S-HI, Ziogas A, Zell JA. Prognostic factors for survival in extensive stage small cell lung cancer (ED-SCLC): the importance of smoking history, socioeconomic and marital statuses, and ethnicity. *J Thorac Oncol*. 4(1), 37–43 (2009).
288. Smolle E, Pichler M. Non-Smoking-Associated Lung Cancer: A distinct Entity in Terms of Tumor Biology, Patient Characteristics and Impact of Hereditary Cancer Predisposition. *Cancers (Basel)*. 11(2), 204 (2019).
289. Zhang Y, Elgizouli M, Schöttker B, Holleczeck B, Nieters A, Brenner H. Smoking-associated DNA methylation markers predict lung cancer incidence. *Clin Epigenetics*. 8, 127 (2016).
290. Baglietto L, Ponzi E, Haycock P, *et al*. DNA methylation changes measured in pre-diagnostic peripheral blood samples are associated with smoking and lung cancer risk. *Int J Cancer*. 140(1), 50–61 (2017).
291. Liu Y, Lan Q, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia*. 8(1), 46–51 (2006).
292. Vaissière T, Hung R, Zaridze D, *et al*. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 69(1), 243–252 (2009).
293. Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, *et al*. Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res*. 63(16), 4842–4848 (2003).
294. Wu J-Y, Wang J, Lai J-C, *et al*. Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol*. 15(11), 3272–3277 (2008).
295. Damiani LA, Yingling CM, Leng S, Romo PE, Nakamura J, Belinsky SA. Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. *Cancer Res*. 68(21), 9005–9014 (2008).
296. Lin R-K, Hsieh Y-S, Lin P, *et al*. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *J Clin Invest*. 120(2), 521–532 (2010).
297. O’Hagan HM, Wang W, Sen S, *et al*. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell*. 20(5), 606–619 (2011).
298. Vaz M, Hwang SY, Kagiampakis I, *et al*. Chronic Cigarette Smoke-Induced Epigenomic Changes Precede Sensitization of Bronchial Epithelial Cells to Single-Step Transformation by KRAS Mutations. *Cancer Cell*. 32(3), 360-376.e6 (2017).

299. Pesek M, Kopeckova M, Benesova L, *et al.* Clinical significance of hypermethylation status in NSCLC: evaluation of a 30-gene panel in patients with advanced disease. *Anticancer Res.* 31(12), 4647–4652 (2011).
300. Satelli A, Rao PS, Thirumala S, Rao US. Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *Int J Cancer.* 129(4), 799–809 (2011).
301. Bakulski KM, Dou J, Lin N, London SJ, Colacino JA. DNA methylation signature of smoking in lung cancer is enriched for exposure signatures in newborn and adult blood. *Sci Rep.* 9(1), 4576 (2019).
302. Chen Y, Widschwendter M, Teschendorff AE. Systems-epigenomics inference of transcription factor activity implicates aryl-hydrocarbon-receptor inactivation as a key event in lung cancer development. *Genome Biology.* 18(1), 236 (2017).
303. Boule LA, Winans B, Lambert K, *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor during development enhances the pulmonary CD4+ T-cell response to viral infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 309(3), L305–L313 (2015).
304. Beamer CA, Shepherd DM. ROLE OF THE ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR) IN LUNG INFLAMMATION. *Semin Immunopathol.* 35(6), 10.1007/s00281-013-0391-7 (2013).
305. Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, *et al.* Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biology.* 13(10), R97 (2012).
306. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine.* 41, 711–716 (2019).
307. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 80(14), 2969–2974 (2020).
308. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H, *et al.* Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res.* 66(3), 1371–1375 (2006).
309. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CPE, *et al.* Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22(2), 271–282 (2012).
310. Li J, Zhang Z, Dai Z, *et al.* RASSF1A Promoter Methylation and Kras2 Mutations in Non Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia.* 5(4), 362–366 (2003).
311. Liu Y, Gao W, Siegfried JM, Weissfeld JL, Luketich JD, Keohavong P. Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers. *BMC Cancer.* 7, 74 (2007).
312. Tew BY, Durand JK, Bryant KL, *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis of KRAS mutant cell lines. *Sci Rep.* 10(1), 10149 (2020).
313. Zhang Y-L, Yuan J-Q, Wang K-F, *et al.* The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 7(48), 78985–78993 (2016).
314. Xu Z, Qin F, Yuan L, *et al.* EGFR DNA Methylation Correlates With EGFR Expression, Immune Cell Infiltration, and Overall Survival in Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol.* 11, 691915 (2021).
315. Li X-Y, Wu J-Z, Cao H-X, *et al.* Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* 29(5), 1975–1982 (2013).
316. Rønneberg JA, Fleischer T, Solvang HK, *et al.* Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. *Mol Oncol.* 5(1), 61–76 (2011).
317. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490(7418), 61–70 (2012).
318. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(2), 710–715 (2000).

319. Ma MZ, Lin R, Carrillo J, *et al.* Δ DNMT3B4-del Contributes to Aberrant DNA Methylation Patterns in Lung Tumorigenesis. *EBioMedicine*. 2(10), 1340–1350 (2015).
320. Parry A, Rulands S, Reik W. Active turnover of DNA methylation during cell fate decisions. *Nat Rev Genet*. 22(1), 59–66 (2021).
321. Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, *et al.* A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res*. 22(5), 837–849 (2012).
322. Cheung WKC, Nguyen DX. Lineage factors and differentiation states in lung cancer progression. *Oncogene*. 34(47), 5771–5780 (2015).
323. Licchesi JDF, Westra WH, Hooker CM, Herman JG. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clin Cancer Res*. 14(9), 2570–2578 (2008).
324. Landi MT, Synnott NC, Rosenbaum J, *et al.* Tracing Lung Cancer Risk Factors Through Mutational Signatures in Never-Smokers. *Am J Epidemiol*. 190(6), 962–976 (2021).