

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Γ.Ν.Α.
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Φ. ΖΑΓΟΥΡΗ**

**Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Γ.Ν.Α
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΧΑΪΔΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ
ΥΠΕΥΘΥΝΗ: ΜΠΛΕΤΣΑ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
ΜΟΡΙΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΩΟΘΗΚΩΝ»**

**ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Γ.Ν.Α.**

ΑΘΗΝΑ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2024



ΟΡΚΟΣ
ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΔΡΟΛΑΘΝΑ ΗΙΤΡΩ
Ν ΚΑΙ ΔΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ Υ
ΓΙΕΙΔΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΔΑΝ
ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΠΑΣΔΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΚΟΥΜΕΝΩΣ
ΕΠΙΤΕΛΕΑΠΟΙΗΣΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥ
ΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΩΜΗ

ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΗΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΟΣΑΣΘΑΙ
ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΣΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑ ΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕ
ΝΟΣ ΤΟ ΕΣ ΟΥΤΕΩΝ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΩΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΘΑΙ ΑΡΤ
ΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΣΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΙΝ ΧΡΗΣΙΖΟΣΙ
ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕ
ΛΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑ
ΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑ ΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΜΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ
ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΑΒΑΣΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑ
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΙ ΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΟ ΙΗΤΡΙΚΟ ΑΛΛΟ ΔΕ
ΟΥΔΕΜΙ ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΙ
ΝΟΝΤΟΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙΘΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΔΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ ΟΥ ΔΟΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΟΗΓΗ
ΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΜΔΕ ΟΡΚΙΟΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΜΝΑ
ΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΘΘΟΡΙΟΝ ΔΟΣΩ ΑΓΝΟΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΟΣ ΔΙΑ
ΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ
ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑ
ΤΗΣΙ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΤΙΟΣ ΤΗΣ ΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΩΔΕΣ ΟΚΕΣ ΔΕ
ΑΥ ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΛΗΝΟΜΤΟΝ ΕΚ
ΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ
ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΟΦΘΑΙΣΙΟΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΠΥΛΑΙΚΕΙ
ΟΝ ΣΩΜΑΤΟΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΙ ΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ Α Δ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΗΗ ΚΑΙ ΙΑΩ Η ΔΚΟΥΣΩ
Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟΝ ΑΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΑΛΛΕΣΘΑΙ ΕΣΩ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥ
ΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΥ
ΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΚΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΩ
ΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΑΣΟΜΕΝΟ ΠΑΡΑ
ΤΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑ
ΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΚ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ
ΤΟΥΤΕΩΝ

Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου: 01/06/2020

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 25/06/2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

A. Επιβλέπων: Καθηγήτρια Φλώρα Ζαγουρή

B. Μέλος: Καθηγητής Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος

Γ. Μέλος: Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Χαϊδόπουλος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 25/09/2020

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 27/12/23

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα» (ΝΟΜΟΣ 5343/1932, Άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι ιδιαίτερη υποχρέωση να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες και την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας του ΕΚΠΑ Φλώρα Ζαγουρή για την ενθάρρυνσή της να εκπονήσω αυτή τη διατριβή, την καθημερινή καθοδήγησή της στην επαγγελματική και ακαδημαϊκή μου εξέλιξη αλλά κυρίως για την ενεργό παρουσία της ως μέντοράς μου σε όλη την πορεία μου των τελευταίων ετών. Η συνεχή προτροπή της για την παραγωγή ερευνητικού εκτός του κλινικού έργου αποτέλεσε κινητήριο δύναμη για να μετατρέπω την αγάπη μου για την Ογκολογία σε ερευνητικό έργο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω επίσης και στον Καθηγητή και Διευθυντή του Ογκολογικού Τμήματος της Θεραπευτικής Κλινικής κ. Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο για την συνεχή στήριξη στο κλινικό και ακαδημαϊκό μου έργο έως σήμερα καθώς δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της διατριβής αυτής χωρίς αυτόν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Χαϊδόπουλο για την συνεχή επίβλεψη και διόρθωση της διδακτορικής μου διατριβής, την κα. Μπλέτσα Γαρυφαλλιά και όλη την ομάδα του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου για την πολύτιμη αρωγή τους στη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, την ομάδα του Εργαστηρίου του Ογκολογικού Τμήματος «Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα» καθώς και την οικογένειά μου για την πολύτιμη στήριξή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	5
II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
Α. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	17
Β. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	17
Γ. SCREENING – ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	23
Δ. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ	25
Ε. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	26
ΣΤ. ΜΟΡΙΑ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	28
1. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	28
2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA	31
3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑ RNAs	34
4. BROMODOMAIN AND EXTRA TERMINAL DOMAIN (BET) ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	35
III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	47
1. ΣΚΟΠΟΣ.....	48
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	73
VII. ABSTRACT	75
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77

I. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ: ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ: ΒΛΑΣΙΟΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 30/07/1994

ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ

E-mail: aggandrikop@med.uoa.gr

ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Απρίλιος 2020 - σήμερα:** Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας (γενικό μέρος για Παθολογική Ογκολογία), Θεραπευτική Κλινική, Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα
- **Ιούνιος 2020 - σήμερα:** Υποψήφια Διδάκτωρ, Ογκολογικό Τμήμα Θεραπευτικής Κλινικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Παθολογική Ογκολογίας, Φ. Ζαγουρή)

ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ

- **Νοέμβριος 2019 – Απρίλιος 2020:** Επιστημονικός Συνεργάτης, Ογκολογικό Τμήμα, Θεραπευτική Κλινική, Γ.Ν.Αλεξάνδρα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες φάσης III
- **Δεκέμβριος 2018 – Νοέμβριος 2019:** Υποχρεωτική άσκηση υπηρεσίας υπαίθρου στο Π. Ι. Δάφνης, Κ.Υ. Κλειτορίας, Νομός Αχαΐας
- **Νοέμβριος 2018 – Δεκέμβριος 2018:** Τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στο Γ.Ν. Ανατολικής Αχαΐας Α.Ο.Μ. Καλαβρύτων στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Σεπτέμβριος 2012 – Ιούλιος 2018: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών (Εισαγωγή με πανελλήνιες εξετάσεις)

Πτυχίο Ιατρική Σχολής (Βαθμός: 7.88)

Οκτώβριος 2019: ALS (Advanced Life Support) provider – valid until 12/10/2022/
Σεμινάριο Ανανηπτών «Εξειδικευμένης Υποστήριξης της Ζωής σε Ενήλικες»

Ιούνιος 2018: ATLS (Advanced Trauma Life Support) provider – valid until 06/2022

Μάιος 2017 – Αύγουστος 2017: Ερευνητικό πρόγραμμα στην Αιματολογία / Ογκολογία στο **Johns Hopkins Hospital, Baltimore, USA**

Επιβλέπων: Καθηγητής Elias Zambidis

Ιούλιος 2016 – Αύγουστος 2016: Παρακολούθηση Κλινικής Καρδιολογίας στο **Hammersmith Hospital, Imperial College Healthcare NHS, London**

Επιβλέπων: Καθηγητής Petros Nihoyannopoulos

Σεπτέμβριος 2006 – Ιούλιος 2012: Γυμνάσιο - Λύκειο στο Πειραματικό Σχολείο Πανεπιστημίου Πατρών (**Experimental School of Patras University, ECPU**)

Αποφοίτηση με γενικό μέσο όρο: 19.7/20

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Άριστα (Proficiency of Cambridge, 06/2008, Proficiency of Michigan, 11/05/2008)

Γαλλικά: Πολύ καλά (Delf B2)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Νοέμβριος 2021: Υποτροφία για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής από την «Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος» (ΕΟΠΕ) στα πλαίσια των Ερευνητικών Προγραμμάτων της ΕΟΠΕ

(Αριθμός Πρωτοκόλλου: 8457)

ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οκτώβριος 2016 – τώρα: Μέλος του Σώματος Εθελοντών Σαμαρειτών, Διασωστών και Ναυαγοσωστών, Ε.Ε.Σ (Hellenic Red Cross)

Οκτώβριος 2015 – τώρα: Μέλος του «Άλμα Ζωής» “Hellenic Fighting Breast Cancer” Organization “Alma Zois”

ΞΕΝΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

I. Σε περιοδικά που είναι cited στο Pubmed: 35

1. **Andrikopoulou A**, Koutsoukos K, Chatziralli I, Theodossiadis P, Tsigoulis G, Tzartos J, Anastasakis A, Zagouri F, Dimopoulos MA. Intravenous rituximab and oral cyclophosphamide for the treatment of cancer-associated retinopathy in a patient with epithelial ovarian cancer: A case report. *Oncol Lett.* 2023 Jun 1;26(1):308. doi: 10.3892/ol.2023.13894. PMID: 37332336; PMCID: PMC10272954.
2. Skafida E, **Andrikopoulou A**, Terpos E, Markellos C, Moustafa S, Pectasides D, Dimopoulos MA, Zagouri F, Vassilopoulos D. Impact of CDK4/6 Inhibitors on Aromatase Inhibitor-Associated Musculoskeletal Syndrome (AIMSS) in the Adjuvant Setting. *Breast J.* 2023 May 31;2023:3614296. doi: 10.1155/2023/3614296. PMID: 37293258; PMCID: PMC10247331.
3. Svarna A, Liontos M, Reppas G, Fiste O, **Andrikopoulou A**, Dimopoulos MA, Zagouri F. What to expect from paraneoplastic syndromes of the nervous system in uterine cancer: A review of the literature. *Gynecol Oncol Rep.* 2023 Jan 16;45:101136. doi: 10.1016/j.gore.2023.101136. PMID: 36703705; PMCID: PMC9871060.
4. **Andrikopoulou A**, Liontos M, Skafida E, Koutsoukos K, Apostolidou K, Kaparelou M, Rouvalis A, Bletsas G, Dimopoulos MA, Zagouri F. Pembrolizumab in combination with bevacizumab and oral cyclophosphamide in heavily pre-treated platinum-resistant ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2023 Apr 3;33(4):571-576. doi: 10.1136/ijgc-2022-003941. PMID: 36604119.
5. **Andrikopoulou A**, Zografos E, Apostolidou K, Kyriazoglou A, Papatheodoridi AM, Kaparelou M, Koutsoukos K, Liontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F.

- Germline and somatic variants in ovarian carcinoma: A next-generation sequencing (NGS) analysis. *Front Oncol.* 2022 Dec 1;12:1030786. doi: 10.3389/fonc.2022.1030786. PMID: 36531003; PMCID: PMC9754718.
6. Zagouri F, Papatheodoridi A, Lontos M, Briasoulis A, Sklirou AD, Skafida E, Fiste O, Markellos C, **Andrikopoulou A**, Koutsoukos K, Kaparelou M, Gkogkou E, Trougakos IP, Dimopoulos MA, Terpos E. Assessment of Postvaccination Neutralizing Antibodies Response against SARS-CoV-2 in Cancer Patients under Treatment with Targeted Agents. *Vaccines (Basel).* 2022 Sep 5;10(9):1474. doi: 10.3390/vaccines10091474. PMID: 36146552; PMCID: PMC9505348.
 7. Zografos E, **Andrikopoulou A**, Papatheodoridi AM, Kaparelou M, Bletsas G, Lontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F. Multi-Gene Mutation Profiling by Targeted Next-Generation Sequencing in Premenopausal Breast Cancer. *Genes (Basel).* 2022 Jul 29;13(8):1362. doi: 10.3390/genes13081362. PMID: 36011273; PMCID: PMC9407588.
 8. Terpos E, Lontos M, Fiste O, Zagouri F, Briasoulis A, Sklirou AD, Markellos C, Skafida E, Papatheodoridi A, **Andrikopoulou A**, Koutsoukos K, Kaparelou M, Iconomidou VA, Trougakos IP, Dimopoulos MA. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Kinetics Postvaccination in Cancer Patients under Treatment with Immune Checkpoint Inhibition. *Cancers (Basel).* 2022 Jun 4;14(11):2796. doi: 10.3390/cancers14112796. PMID: 35681774; PMCID: PMC9179468.
 9. **Andrikopoulou A**, Chatzinikolaou S, Panourgias E, Kaparelou M, Lontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F. "The emerging role of capivasertib in breast cancer". *Breast.* 2022 Jun;63:157-167. doi: 10.1016/j.breast.2022.03.018. Epub 2022 Apr 1. PMID: 35398754; PMCID: PMC9011110.
 10. Marinopoulos S, Dimitrakakis C, Kalampalikis A, Zagouri F, **Andrikopoulou A**, Rodolakis A. Adjuvant Treatment of Elderly Breast Cancer Patients: Offer the Best Chances of Cure. *Breast Care (Basel).* 2022 Feb;17(1):71-80. doi: 10.1159/000513708. Epub 2021 Mar 4. PMID: 35355693; PMCID: PMC8914240.
 11. Kaparelou M, Lontos M, Katsimbri P, **Andrikopoulou A**, Papatheodoridi A, Kyriazoglou A, Bamias A, Zagouri F, Dimopoulos MA. Retrospective analysis of bevacizumab-induced arthralgia and clinical outcomes in ovarian cancer

- patients. Single center experience. *Gynecol Oncol Rep.* 2022 Mar 2;40:100953. doi: 10.1016/j.gore.2022.100953. PMID: 35265745; PMCID: PMC8898916.
12. **Andrikopoulou A**, Chatzinikolaou S, Kyriopoulos I, Bletsas G, Kaparelou M, Lontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F. The Mutational Landscape of Early-Onset Breast Cancer: A Next-Generation Sequencing Analysis. *Front Oncol.* 2022 Jan 21;11:797505. doi: 10.3389/fonc.2021.797505. PMID: 35127508; PMCID: PMC8813959.
 13. Lontos M, Svarna A, Theofanakis C, Fiste O, **Andrikopoulou A**, Kaparelou M, Koutsoukos K, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Dimopoulos MA, Zagouri F. What Has Changed in the Management of Uterine Serous Carcinomas? Two Decades of Experience. *Curr Oncol.* 2021 Nov 20;28(6):4862-4873. doi: 10.3390/curroncol28060410. PMID: 34898589; PMCID: PMC8628752.
 14. Lontos M, Zografos E, Zoumpourlis P, **Andrikopoulou A**, Svarna A, Fiste O, Kunadis E, Papatheodoridi AM, Kaparelou M, Koutsoukos K, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Dimopoulos MA, Zagouri F. *BRCAl/2* Mutation Types Do Not Affect Prognosis in Ovarian Cancer Patients. *Curr Oncol.* 2021 Nov 3;28(6):4446-4456. doi: 10.3390/curroncol28060377. PMID: 34898566; PMCID: PMC8628789.
 15. Lontos M, **Andrikopoulou A**, Koutsoukos K, Markellos C, Skafida E, Fiste O, Kaparelou M, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Dimopoulos MA, Zagouri F. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and chemotherapy response score as prognostic markers in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Ovarian Res.* 2021 Nov 1;14(1):148. doi: 10.1186/s13048-021-00902-0. PMID: 34724958; PMCID: PMC8561989.
 16. Lontos M, Terpos E, Markellos C, Zagouri F, Briasoulis A, Katsiana I, Skafida E, Fiste O, Kunadis E, **Andrikopoulou A**, Kaparelou M, Koutsoukos K, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Trougakos IP, Dimopoulos MA. Immunological Response to COVID-19 Vaccination in Ovarian Cancer Patients Receiving PARP Inhibitors. *Vaccines (Basel).* 2021 Oct 8;9(10):1148. doi: 10.3390/vaccines9101148. PMID: 34696256; PMCID: PMC8541338.
 17. Aravantinou-Fatorou A, **Andrikopoulou A**, Lontos M, Fiste O, Georgakopoulou VE, Dimopoulos MA, Gavriatopoulou M, Zagouri F. Pembrolizumab in endometrial cancer: Where we stand now. *Oncol Lett.* 2021 Dec;22(6):821. doi:

- 10.3892/ol.2021.13082. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34691248; PMCID: PMC8527559.
18. **Andrikopoulou A**, Terpos E, Chatzinikolaou S, Apostolidou K, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Zagouri F. TP53 mutations determined by targeted NGS in breast cancer: a case-control study. *Oncotarget*. 2021 Oct 12;12(21):2206-2214. doi: 10.18632/oncotarget.28071. PMID: 34676052; PMCID: PMC8522843.
 19. Lontos M, Terpos E, Kunadis E, Zagouri F, Briasoulis A, Skafida E, Fiste O, Markellos C, **Andrikopoulou A**, Gumeni S, Kaparelou M, Koutsoukos K, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Trougakos IP, Dimopoulos MA. Treatment with abiraterone or enzalutamide does not impair immunological response to COVID-19 vaccination in prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2022 Mar;25(1):117-118. doi: 10.1038/s41391-021-00455-9. Epub 2021 Oct 9. PMID: 34628475; PMCID: PMC8501917.
 20. Georgakopoulou R, Fiste O, Serghianis TN, **Andrikopoulou A**, Zagouri F, Gavriatopoulou M, Psaltopoulou T, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Occupational Exposure and Multiple Myeloma Risk: An Updated Review of Meta-Analyses. *J Clin Med*. 2021 Sep 16;10(18):4179. doi: 10.3390/jcm10184179. PMID: 34575290; PMCID: PMC8469366.
 21. **Andrikopoulou A**, Korakiti AM, Apostolidou K, Dimopoulos MA, Zagouri F. Immune checkpoint inhibitor administration during pregnancy: a case series. *ESMO Open*. 2021 Oct;6(5):100262. doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100262. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34487972; PMCID: PMC8426195.
 22. Zagouri F, Terpos E, Fiste O, Lontos M, Briasoulis A, Katsiana I, Skafida E, Markellos C, Kunadis E, **Andrikopoulou A**, Kaparelou M, Koutsoukos K, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Trougakos IP, Dimopoulos MA. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after first vaccination dose in breast cancer patients receiving CDK4/6 inhibitors. *Breast*. 2021 Dec;60:58-61. doi: 10.1016/j.breast.2021.08.017. Epub 2021 Aug 28. PMID: 34481366; PMCID: PMC8402928.
 23. **Andrikopoulou A**, Shalit A, Zografos E, Koutsoukos K, Korakiti AM, Lontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F. MicroRNAs as Potential Predictors of Response to CDK4/6 Inhibitor Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 16;13(16):4114. doi: 10.3390/cancers13164114. PMID: 34439268; PMCID: PMC8391635.

24. **Andrikopoulou A**, Fiste O, Apostolidou K, Skafida E, Markellos C, Lontos M, Kyriazoglou A, Dimopoulos MA, Zagouri F. CDK4/6 Inhibitors and Arthralgia: A Single Institution Experience. *Med Sci (Basel)*. 2021 Jun 5;9(2):42. doi: 10.3390/medsci9020042. PMID: 34198899; PMCID: PMC8293403.
25. Fountzilas E, Kotoula V, Koliou GA, Lontos M, Papadopoulou K, Giannoulatou E, Papanikolaou A, Tikas I, Chrisafi S, Mauri D, Chatzopoulos K, Fostira F, Pectasides D, Oikonomopoulos G, Aivazi D, **Andrikopoulou A**, Visvikis A, Aravantinos G, Zagouri F, Fountzilas G. Tumor Genotyping and Homologous Recombination Repair Gene Variants in Patients With Epithelial Ovarian Cancer: Is Pathogenic Enough? *Front Oncol*. 2021 Jun 1;11:683057. doi: 10.3389/fonc.2021.683057. PMID: 34141624; PMCID: PMC8204021.
26. Zografos E, Korakiti AM, **Andrikopoulou A**, Rellias I, Dimitrakakis C, Marinopoulos S, Giannos A, Keramopoulos A, Bredakis N, Dimopoulos MA, Zagouri F. Germline mutations in a clinic-based series of pregnancy associated breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2021 May 19;21(1):572. doi: 10.1186/s12885-021-08310-9. PMID: 34011307; PMCID: PMC8132440.
27. **Andrikopoulou A**, Apostolidou K, Chatzinikolaou S, Bletsas G, Zografos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Trastuzumab administration during pregnancy: an update. *BMC Cancer*. 2021 Apr 26;21(1):463. doi: 10.1186/s12885-021-08162-3. Erratum in: *BMC Cancer*. 2021 Dec 17;21(1):1340. PMID: 33902516; PMCID: PMC8074427.
28. Papageorgiou C, **Andrikopoulou A**, Dimopoulos MA, Zagouri F. Cardiovascular toxicity of breast cancer treatment: an update. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021 Jul;88(1):15-24. doi: 10.1007/s00280-021-04254-w. Epub 2021 Apr 17. PMID: 33864486.
29. Lontos M, Papatheodoridi A, **Andrikopoulou A**, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Zagouri F, Bamias A, Dimopoulos MA. Management of the Elderly Patients with High-Grade Serous Ovarian Cancer in the REAL-WORLD Setting. *Curr Oncol*. 2021 Mar 7;28(2):1143-1152. doi: 10.3390/currenol28020110. PMID: 33800101; PMCID: PMC8025751.
30. Georgakopoulou R, **Andrikopoulou A**, Sergentanis TN, Fiste O, Zagouri F, Gavriatopoulou M, Psaltopoulou T, Kastitis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Overweight/Obesity and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Signifi-

- cance. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2021 Jun;21(6):361-367. doi: 10.1016/j.clml.2021.01.008. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33582053.
31. **Andrikopoulou A**, Fiste O, Lontos M, Dimopoulos MA, Zagouri F. Aromatase and CDK4/6 Inhibitor-Induced Musculoskeletal Symptoms: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 26;13(3):465. doi: 10.3390/cancers13030465. PMID: 33530456; PMCID: PMC7865932.
 32. **Andrikopoulou A**, Lontos M, Koutsoukos K, Dimopoulos MA, Zagouri F. Clinical perspectives of BET inhibition in ovarian cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2021 Apr;44(2):237-249. doi: 10.1007/s13402-020-00578-6. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33469840.
 33. Koutsoukos K, **Andrikopoulou A**, Dedes N, Zagouri F, Bamias A, Dimopoulos MA. Clinical Perspectives of ERCC1 in Bladder Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 22;21(22):8829. doi: 10.3390/ijms21228829. PMID: 33266377; PMCID: PMC7700570.
 34. **Andrikopoulou A**, Zografos E, Lontos M, Koutsoukos K, Dimopoulos MA, Zagouri F. Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a): The Latest Research and Advances in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2021 Jun;21(3):e212-e219. doi: 10.1016/j.clbc.2020.08.006. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32917537.
 35. **Andrikopoulou A**, Lontos M, Koutsoukos K, Dimopoulos MA, Zagouri F. The emerging role of BET inhibitors in breast cancer. *Breast*. 2020 Oct;53:152-163. doi: 10.1016/j.breast.2020.08.005. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32827765; PMCID: PMC7451423.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Fiste O, Iliopoulou P, Tzannis K, Theofanakis C, Rouvali A, Markellos C, Kunadis E, Potiri E, Papanota AM, Papatheodoridi A, **Andrikopoulou A**, Svarna A, Kaparelou M, Koutsoukos K, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Zagouri F, Dimopoulos M, Lontos M. 77P The impact of COVID-19 on gynecological cancer diagnoses in Greece. *ESMO Open*. 2023 Feb;8(1):100807. doi: 10.1016/j.esmoop.2023.100807. Epub 2023 Feb 25.

PMCID: PMC9958202. **ESMO Gynaecological Cancers Congress 2023** (23-24 February 2023), Barcelona, Spain.

2. Zografos E, Papatheodoridi A, Georgitsi S, Kaparelou M, **Andrikopoulou A**, Papanota AM, Kunadis E, Dimopoulos MA, Zagouri F
Immunotherapy for neoadjuvant treatment of a clinic – based series of triple negative breast cancer patients
1st IMMUNO-model COST Action Conference, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC) – Auditorium, 1-2 June 2023
3. Flora Zagouri, Georgia-Angeliki Koliou, Foteinos Dimitrakopoulos, Christos Papadimitriou, Ioannis Binas, Angelos Koutras, Pavlos Papakostas, Christos Markopoulos, Vasileios Venizelos, Grigorios Xepapadakis, **Angeliki Andrikopoulou**, Charisios Karanikiotis, Amanda Psyrris, Dimitrios Bafaloukos, Paris Kosmidis, Gerasimos Aravantinos, Eleni Res, Davide Mauri, Anna Koumarianou, Kalliopi Petraki, Anna Tsipoura, Dimitrios Pectasides, Helen Gogas, George Fountzilias. Dose-dense sequential adjuvant chemotherapy in the trastuzumab era: Final long-term results of the hellenic cooperative oncology group phase III HE10/05 trial [abstract]. In: Proceedings of the 2021 **San Antonio Breast Cancer Symposium; 2021** Dec 7-10; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2022;82(4 Suppl):Abstract nr P1-12-01
4. **Andrikopoulou A**, Apostolidou K, Theofanakis C, Markellos C, Skafida E, Fiste O, Kaparelou M, Koutsoukos K, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Zagouri F, Dimopoulos MA, Lontos M
2022-RA-1607-ESGO Optimal time interval between neoadjuvant platinum-based chemotherapy and interval debulking surgery
International Journal of Gynecologic Cancer 2022;**32**:A353-A354.
10.1136/ijgc-2022-ESGO.755 **ESGO 2022, Oct 27-30, 2022** Berlin, Germany
5. Lontos M, Kunadis E, Svarna A, Skafida E, Fiste O, Markellos C, Zakopoulou R, Papatheodoridi A, **Andrikopoulou A**, Kaparelou M, Koutsoukos K, Zagouri F, Dimopoulos MA
Molecular testing for prostate cancer in Greek patients. 10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.170 Journal of Clinical Oncology 40, no. 6_suppl (February 20, 2022) 170-170. **2022 ASCO Genitourinary Cancers Symposium**
6. Lontos M, Papatheodoridi A, Kunadis E, Svarna A, Theofanakis C, Fiste O, Rouvali A, Goula K, Markellos C, Andrikopoulou A, Potiri E, Papanota AM,

Kaparelou M, Koutsoukos K, Thomakos N, Haidopoulos D, Rodolakis A, Zagouri F, Benoit Y, Dimopoulos MA Prognostic and predictive significance of CA-125 elimination rate constant K (KELIM) in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy in a real-world setting **ASCO 2023 Annual Meeting, June 2-6, 2023, Chicago, IL**

DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e17594 Journal of Clinical Oncology 41, no. 16_suppl (June 01, 2023) e17594-e17594.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ο ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ
Παπανώτα Α.Μ, Σβάρνα Α, Περγιαλιώτης Β, Φιστέ Ω, Μάρκελλος Χ, Κουνάδη Ε, Ποτήρη Ε, Ανδρικοπούλου Α, Παπαθεοδωρίδη Μ.Α, Κουτσούκος Κ, Καπαρέλου Μ, Γούλα Κ, Παυλάκη Α, Θωμάκος Ν, Χαϊδόπουλος Δ, Ροδολάκης Α, Ζαγουρή Φ, Δημόπουλος Μ.Α., Λιόντος Μ, **29^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας (ΕΣΚΟ)**, «Επιστήμη-Τεχνολογία-Άνθρωπος», 5-8 Απριλίου 2023
2. ΤΙΤΛΟΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ SARS-COV2 ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΔΟΣΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ
Χρήστος Μάρκελλος, Αγγελική Ανδρικοπούλου, Άλκηστις - Μαρία Παπαθεοδωρίδη, Ωραιάνθη Φιστέ, Έλενα Κουνάδη, Ευθυμία Σκαφίδα, Αλέξανδρος Μπριασούλης, Κωνσταντίνος Κουτσούκος, Μαρία Καπαρέλου, Μιχάλης Λιόντος, Ιωάννης Τρουγάκος, Μελέτιος - Αθανάσιος Δημόπουλος, Φλώρα Ζαγουρή
6^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογία (ΕΣΟ), 4-7 Μαΐου 2022, Θεσσαλονίκη
3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ: ΜΙΑ ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 1,470 ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ "Γ.Ν.Α.ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ"
Αγγελική Ανδρικοπούλου, Φλώρα Ζαγουρη, Μαρία Καπαρέλου, Κουτσούκος Κωνσταντίνος, Χρήστος Μάρκελλος, Έφη Σκαφίδα, Μαρία - Άλκηστις Παπαθεοδωρίδη, Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος, Μιχάλης Λιόντος
6^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογία (ΕΣΟ), 4-7 Μαΐου 2022, Θεσσαλονίκη

4. ΠΑ 10 Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ / ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΙΡΡΩΣΗ

Λαγκαδινού Μ., Ανδρικοπούλου Α., Κυριακοπούλου Ο., Ψαρομυάλου Κ., Δάβουλος Χ., Στεφανή Ε., Αβραμοπούλου Ε., Βελισσάρης Δ.

5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στην Εσωτερική Παθολογία, 20-24 Φεβρουαρίου 2019, Ζάππειο Μέγαρο, Αθήνα

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

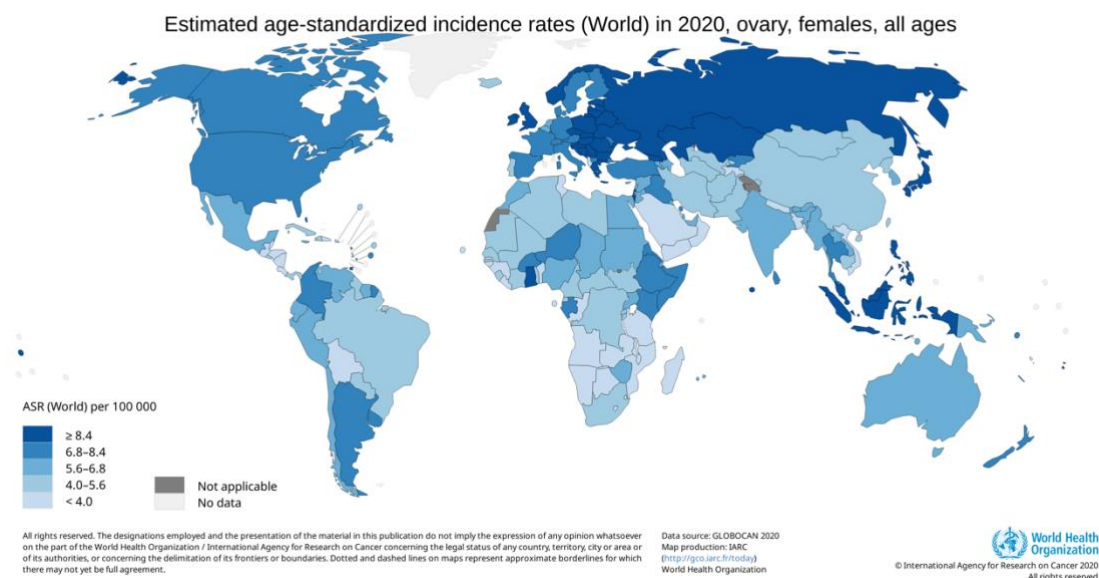
1. **Ομιλία με θέμα: “Η εκπαίδευση των νέων ογκολόγων στην Ελλάδα το 2023 - Ο ρόλος της ΕΑΚΟ στην εκπαίδευση των νέων ογκολόγων” 29^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας (29^ο ΕΣΚΟ), Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ), 5-8 Απριλίου 2023**
2. **Ομιλία με θέμα «Ανοσοθεραπεία και στοχεύουσες θεραπείες σε γηριατρικούς ασθενείς: υπάρχουν διαφορές στην αντιμετώπιση;» στο 3^ο Πανελληνίου Συνεδρίου «Παρόν και Μέλλον στην Ογκολογία», 9-11 Ιουνίου 2023, Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο Πανεπιστημίου Πατρών**
3. Ομιλία με θέμα «Η διαρκής αξία των πρωτοκόλλων παρακολούθησης – Καρκίνος στομάχου» στο 14^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Κλινικής Ογκολογίας, Ελληνική Εταιρεία Ερευνάς του Καρκίνου, 4-5 Νοεμβρίου 2022, The MET, Θεσσαλονίκη
4. Ομιλία με θέμα «Θρομβοπροφύλαξη σε συμπαγείς όγκους» στο 11^ο Συνέδριο της Ελληνικής και Διεθνούς Εταιρείας Μοριακά Στοχευμένων Εξατομικευμένων Θεραπειών (ΕΔΕΜΣΕΘ) με θέμα: Στοχευμένες Ανοσοθεραπείες σε συμπαγείς κακοήθειες και τα Highlights in Molecular-Oncology and Immuno-Oncology, 20-21 Μαΐου 2022, Καλαμάτα

II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί την όγδοη σε συχνότητα και την έβδομη σε θνητότητα κακοήθεια στον γυναικείο πληθυσμό για το 2020¹. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Π.Ο.Υ. για το 2020, υπολογίζεται ότι σημειώθηκαν 313.959 νέες περιπτώσεις καρκίνου ωοθηκών παγκοσμίως ενώ 207.252 γυναίκες απεβίωσαν από καρκίνο ωοθηκών¹. Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων θα αυξηθεί τα επόμενα έτη έως τις 446000 νέες περιπτώσεις το 2040. Σύμφωνα με δεδομένα του Π.Ο.Υ., στην Ελλάδα ο καρκίνος ωοθηκών αποτελεί την έκτη σε συχνότητα κακοήθεια στις γυναίκες ανεξαρτήτου ηλικίας με τις νέες περιπτώσεις να ανέρχονται στις 1020 το 2020¹. Ωστόσο, ο επιπολασμός του καρκίνου ωοθηκών ποικίλλει ανά τις γεωγραφικές περιοχές με τον μεγαλύτερη επίπτωση να σημειώνεται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη, την Βόρεια Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική (*Εικόνα 1*).

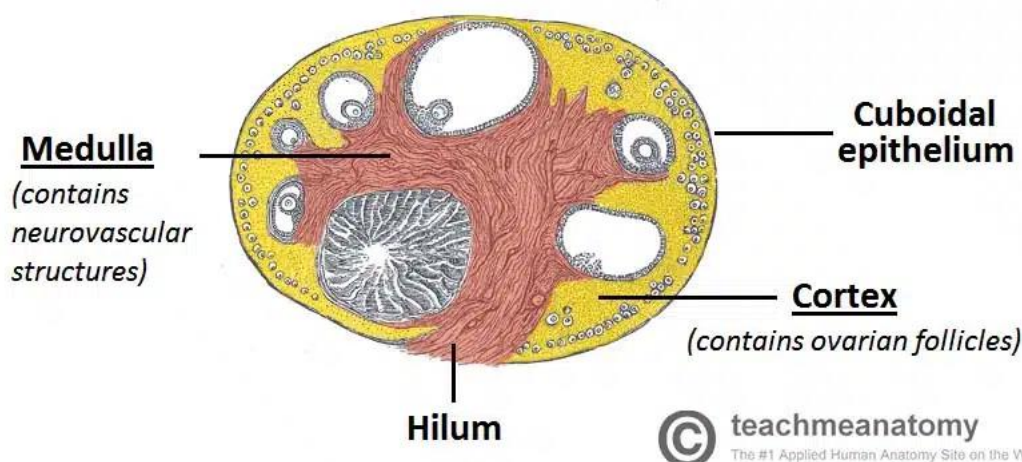


Εικόνα 1. Παγκόσμια επίπτωση του καρκίνου ωοθηκών σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ.

Β. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ιστολογικά, ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί μία ετερογενή νόσο ανάλογα με τα κύτταρα από τα οποία προέρχεται: επιθηλιακά κύτταρα, γεννητικά κύτταρα (ωοκύτταρα) και τα κύτταρα γεννητικής χορδής - στρώματος. Εμβρυολογικά, η ωοθήκη προ-

έρχεται από το διάμεσο μεσόδερμα και αρχίζει με την μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στις γεννητικές ακρολοφίες μεταξύ της 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας της ανάπτυξης^{2,3}. Η έκφραση του γονιδίου DAX-1, χωρίς την παρουσία του SRY οδηγεί την διαφοροποίηση της γονάδας σε ωθήκη. Η διαφοροποίηση της ωθήκης, η οποία καθυστερεί σε σχέση με του όρχεως, λαμβάνει χώρα από την 8^η έως την 10^η εβδομάδα της ανάπτυξης όπου οι αρχέγονες φυλετικές χορδές εισχωρούν στην μυελική περιοχή. Ανατομικά η ωθήκη αποτελείται από τρία μέρη: 1) τον φλοιό (cortex) στην εξωτερική επιφάνεια, που αποτελείται από τα ωοθυλάκια ή/και ωχρά σωμάτια σε διάφορες φάσεις ωρίμανσης, κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει ένα ωοκύτταρο περιβαλλόμενο από κοκκιώδη κύτταρα, και το στρώμα, που αποτελείται από στρωματικά κύτταρα προσομοιάζοντα με ινοβλάστες που συνδέονται με τα ωοθυλάκια και βοηθούν στην ωρίμασή τους και στηρικτικές ίνες (κολλαγόνου και δικτυωτές) 2) τον μυελό (medulla), που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και πλούσιο αγγειακό και νευρικό δίκτυο που εισέρχεται μέσω της πύλης της ωθήκης και 3) την επιφάνεια, που αποτελείται από απλή στοιβάδα κυβοειδών κυττάρων, γνωστό ως «βλαστικό επιθήλιο» (*Εικόνα 2*).



Εικόνα 2. Ανατομία της ωθήκης. Ιστοσελίδα: The Ovaries - Structure - Ligaments - Vascular Supply – Function, <https://teachmeanatomy.info/pelvis/female-reproductive-tract/ovaries/>

Σύμφωνα με την ανατομία της ωθήκης, προκύπτει μία ετερογενής ομάδα καρκινωμάτων με διαφορετική ιστολογική προέλευση. Σύμφωνα με τη ταξινόμηση WHO του 2020, ο μη επιθηλιακός καρκίνος ωθηκών, που αποτελεί και την μειονότητα των κακοήθων όγκων (~ 10%), διακρίνεται σε α) όγκους εκ γεννητικών κυττάρων (~ 5%), που περιλαμβάνει το δυσγερμίνωμα, τους όγκους εκ λεκιθικού ασκού, το χοριοκαρκίνωμα, το ώριμο κυστικό τεράτωμα (δερμοειδής κύστη) και το καρκινοειδές stromal (stroma ovarii), μία σπάνια μορφή τερατώματος που αποτελείται >50% από θυρεο-

ειδικό ιστό^{4,5}; β) τους στρωματικούς όγκους (~ 3-5%), που προκύπτουν είτε από το στρώμα των ωοθηκών (π.χ. από κύτταρα Leydig) είτε από τις γεννητικές χορδές (π.χ. από κύτταρα Sertoli, κοκκιοκυτταρικός όγκος) είτε είναι μεικτοί στρωματικοί-εκ γεννητικών χορδών (π.χ. όγκοι από κύτταρα Sertoli-Leydig); γ) οι μεσεγγυματογενείς όγκοι (π.χ. λειομυοσαρκώματα), δ) οι μεικτοί επιθηλιακοί και μεσεγγυματογενείς όγκοι (~2-4%) (π.χ. καρκινοσαρκώματα) και άλλοι τύποι όπως το μικροκυτταρικό καρκίνωμα της ωοθήκης υπερασβεστιαϊκού τύπου (<1%)^{4,5}. Αν και αυτή η ομάδα των μη επιθηλιακών καρκινωμάτων αποτελεί μόνο το 5% των κακοήθων όγκων των ωοθηκών στις νεαρές ηλικίες αυτό το ποσοστό ανέρχεται στο 80%⁵. Η κλινική εικόνα και η ηλικία εμφάνισης διαφέρουν μεταξύ των ιστολογικών τύπων. Για παράδειγμα, οι στρωματικοί όγκοι αναπτύσσονται συνήθως σε μία ευρεία ηλικιακή ομάδα, αφορούν συνήθως ετερόπλευρους όγκους και παράγουν ορμόνες που μπορούν να επιφέρουν αρρενοποίηση ή υπερπλασία του ενδομητρίου^{5,6}. Ο κοκκιοκυτταρικός όγκος της ωοθήκης απαντάται σε δύο ηλικιακές ομάδες, είτε στις πρώτες τρεις δεκαετίες της ζωής στον νεανικό τύπο (juvenile granulosa cell tumor) είτε στα 50-55 έτη στον τύπο των ενηλίκων (adult granulosa cell tumors) ενώ προκαλεί συμπτώματα κυρίως από την έκκριση οιστρογόνων (μητρορραγία, υπερπλασία ενδομητρίου, πρώιμη ήβη στους νέους) ή πιο σπάνια από την υπερέκκριση ανδρογόνων (υπετρίχωση, αρρενοποίηση)⁶.

Ο επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών αποτελεί την μεγαλύτερη πλειοψηφία των όγκων καθώς απαντάται περίπου στο 90% των περιπτώσεων^{4,7}. Ο επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών διακρίνεται σε επτά κύριους ιστολογικούς υπότυπους:

α) Τα ορώδη καρκινώματα (~ 80%) που αποτελούν την πλειοψηφία των καρκινωμάτων των ωοθηκών. Ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης, διακρίνονται σε υψηλού βαθμού κακοήθειας (high-grade serous carcinoma, HGSC) (70%) και χαμηλού βαθμού κακοήθειας (low grade serous carcinoma, LGSC) (<5%) που αποτελούν δύο διακριτές οντότητες με διαφορετικά μοριακά, ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά^{4,7}. Τα ορώδη καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας παρουσιάζουν σχεδόν στην πλειοψηφία τους (~ 95%) μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53, οι οποίες μπορεί να προκύψουν είτε μέσω σημειακών μεταλλάξεων (π.χ. αντικατάστασης βάσης) είτε μέσω μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου και μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα είτε την καταστολή της φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης p53 (loss-of-function) είτε να προσδίδουν ογκογόνο λειτουργία (gain-of-function)^{8,9}. Επίσης τα ορώδη καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας είναι αυτά που κυρίως

έχουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 (~30%), είτε γαμετικές (~15-20%) είτε σωματικές (~6-7%) αλλά και σε ένα ποσοστό συμβαίνει επιγενετική σιγή του γονιδίου BRCA1 μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του (~10%)^{10,11}. Μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 αλλά και σε άλλα γονίδια του επιδιορθωτικού μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination repair, HRR) οδηγούν σε ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης (HR deficiency) σχεδόν στις μισές περιπτώσεις ορώδους καρκινώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας (~48%). Η ανεπάρκεια αυτή μπορεί να προκύψει από μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό όπως στα Fanconi Anemia (FA) γονίδια (PALB2, FANCA, FANCI, FANCL and FANCC), στα RAD γονίδια (RAD50, RAD51, RAD51C, RAD54L) καθώς και σε άλλα γονίδια που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό (ATM, ATR, CHEK1,2 κλπ.)^{10,11}. Η ανεπάρκεια αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά ως στόχος με αναστολείς των poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) πρωτεϊνών που έχουν εγκριθεί πλέον στον προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών^{12,13}.

Αντίθετα, τα χαμηλής διαφοροποίησης (low-grade) καρκινώματα ωοθηκών (<5%) αποτελούν μία διαφορετική οντότητα ορώδων καρκινωμάτων. Τα LGSC συνήθως χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο μονοπάτι MAPK (KRAS [25%], BRAF [8%], NRAS [8%]), ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 είναι πολύ σπάνιες¹⁴. Αντίθετα με τα υψηλής κακοήθειας καρκινώματα, τα LGSCs αναπτύσσονται συνήθως είτε από όγκους οριακής κακοήθειας (serous borderline tumors) είτε από καλοήθεις όγκους των ωοθηκών, ενώ η πρόγνωση είναι καλύτερη.

β) Τα ενδομητριοειδή καρκινώματα (ECs) των ωοθηκών (~10%) συνήθως διαγιγνώσκονται σε νεότερη ηλικία από τα HGSCs (~55 έτη), πιο συχνά σε αρχικό στάδιο FIGO I/II και σχετίζονται με ενδομητρίωση¹⁵. Σε προηγούμενες μελέτες η ενδομητρίωση έχει ανιχνευθεί έως και στο 53% των ενδομητριοειδών όγκων, ενώ αντίθετα αποτελούν το 60% των όγκων που διαγιγνώσκονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση^{16,17}. Οι συνηθέστερες μεταλλάξεις που απαντώνται στα ενδομητριοειδή καρκινώματα είναι οι εξής: CTNNB1 [30-50%], PIK3CA [15-40%], ARID1A [30-35%], PTEN [20-30%] and KRAS [10-30%] ενώ οι μεταλλάξεις ARID1A ανευρίσκονται και σε κύστες ενδομητρίωσης και μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση¹⁴. Σε ένα ποσοστό 10-20% οι όγκοι αυτοί σχετίζονται με ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-high).

γ) Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα ωοθήκης (clear cell ovarian carcinomas, OCCCs) αποτελούν περίπου το 10% των καρκίνων των ωοθηκών, εάν και η επίπτωσή τους ποικίλλει σημαντικά ανά γεωγραφική περιοχή (π.χ. στους Ιάπωνες ανέρχεται στο 25%)⁷. Και αυτοί οι όγκοι σχετίζονται με την ενδομητρίωση όπως και ο ενδομητριοειδής ιστολογικός τύπος (15% των όγκων ωοθηκών σε ασθενείς με ενδομητρίωση) και ως εκ τούτου υπάρχει αλληλοεπικάλυψη στο είδος των συχνότερα ανευρισκόμενων μεταλλάξεων¹⁷. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα είναι στα γονίδια ARID1A [50-75%], PIK3CA [40-50%] και KRAS [15%] ενώ μόλις το 3% παρουσιάζει παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας¹⁴. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα της ωοθήκης διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο συνήθως, ωστόσο εάν η διάγνωση γίνει σε προχωρημένο στάδιο νόσου (FIGO III/IV) η πρόγνωση είναι χειρότερη από ότι στα ορώδη καρκινώματα υψηλής κακοήθειας⁷.

δ) Τα βλεννώδη καρκινώματα της ωοθήκης (~ 3%) απαντώνται σε νεότερες ηλικιακές ομάδες (<40 ετών), διαγιγνώσκονται στο στάδιο I στο 80% των περιπτώσεων και στο 80% είναι δευτεροπαθή είναι μεταστατικοί όγκοι από άλλες πρωτοπαθείς εστίες (ΓΕΣ, πάγκρεας, ενδομήτριο κ.λπ.)¹⁸. Χαρακτηριστικά υπέρ των πρωτοπαθών βλεννωδών νεοπλασμάτων της ωοθήκης είναι το μέγεθος >10 cm και οι μονόπλευρες βλάβες. Ιστολογικά προέρχονται από βλεννώδεις οριακής κακοήθειας όγκους είτε από όγκους του Brenner με εντερικού τύπου κύτταρα. Το μοριακό τους προφίλ χαρακτηρίζεται κυρίως από απενεργοποίηση του CDKN2A (76%) και μεταλλάξεις του KRAS (64%) που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, ενώ συχνά υπάρχει ενίσχυση του HER2 υποδοχέα (20%) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά¹⁴. Η ενίσχυση του HER2 είναι συνήθως αλληλοαποκλειόμενη με τις KRAS μεταλλάξεις και συχνά συνυπάρχουν με τις TP53 μεταλλάξεις¹⁴.

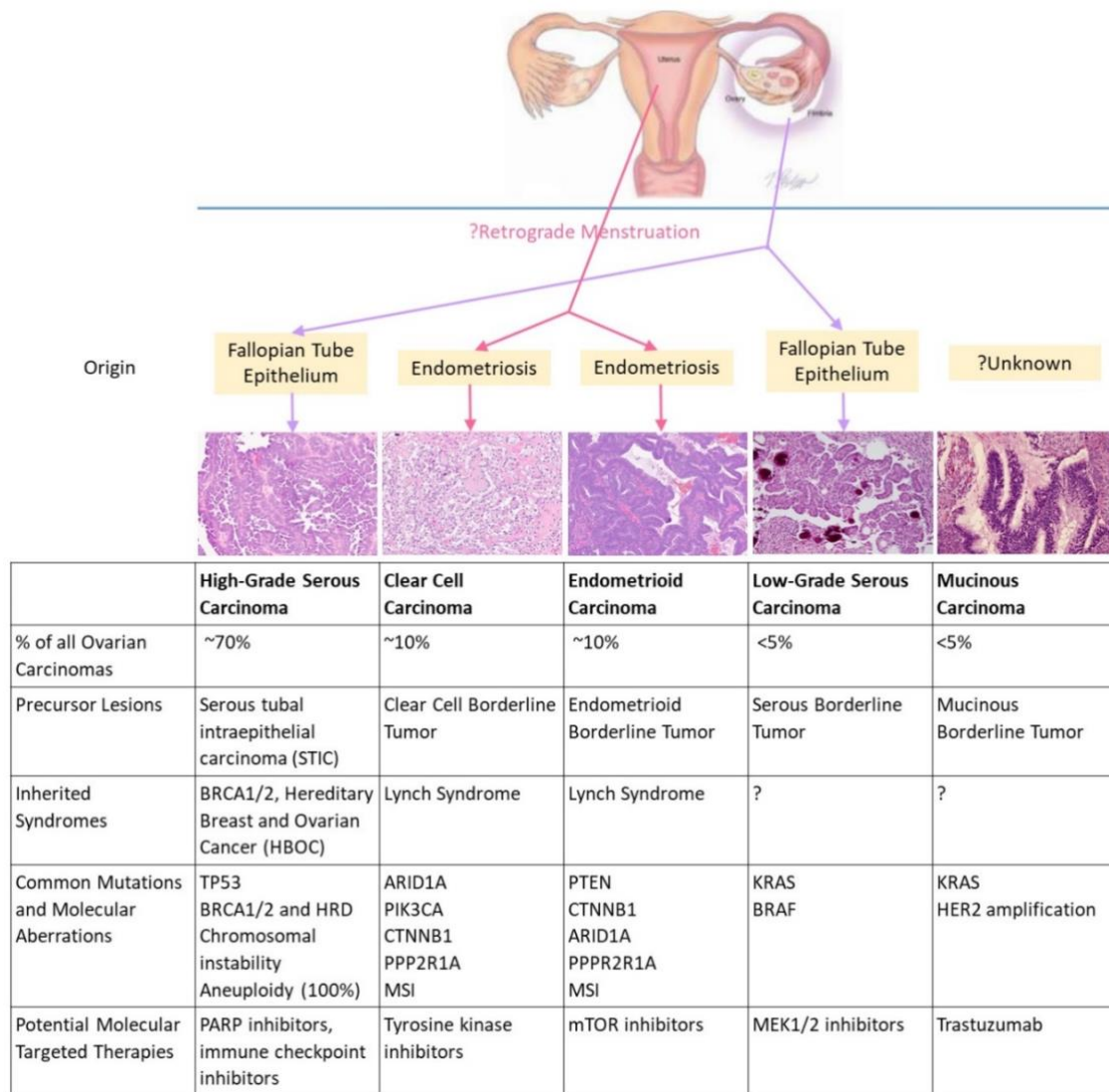
ε) Όγκοι Brenner (2-3%), σπάνιοι όγκοι που ταξινομούνται περαιτέρω σε: καλοήγη, οριακής κακοήθειας (borderline) και κακοήγη¹⁹. Αποτελούνται από μεταβατικό επιθήλιο τύπου ουροθηλιακού σε πυκνό ινώδες στρώμα και θεωρούνται ότι προέρχονται από εστίες μεταβατικού επιθηλίου παρασαλπγγικά, γνωστές ως κυτταρικές φωλεές Walthard¹⁹. Στο μεγαλύτερο ποσοστό (95%) είναι καλοήθεις, ενώ σε ένα πολύ μικρότερο ποσοστό είναι οριακής κακοήθειας (5%) και κακοήθεις (<1%). Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι στην πέμπτη και έκτη δεκαετία, ενώ κυρίως προκαλούνται χωροκατακτητικά συμπτώματα όπως κοιλιακός πόνος, δυσφορία και πιο σπάνια

κολπική αιμόρροια. Η ανοσοϊστοχημεία συνήθως είναι θετική για p63 και GATA3, ενώ η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDKN2A που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16 θεωρείται πρόδρομο γεγονός κατά την κακοήθη εξέλιξη αυτών των όγκων^{19,20}.

στ) Καρκινোসάρκωμα της ωοθήκης (1-4%), γνωστός και ως μικτός μεσοδερμικός όγκος του Müller (malignant mixed mesodermal tumor, MMMT) είναι επιθετικοί όγκοι με μεικτά κακοήθη επιθηλιακά και μεσεγχυματογενή (σαρκωματοειδή) στοιχεία. Απαντάται κυρίως στην έκτη δεκαετία και σε προχωρημένο στάδιο (FIGO III-IV)²¹. Σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση καθώς οι περισσότεροι ασθενείς υποτροπιάζουν εντός έτους και η πενταετής επιβίωση είναι λιγότερη από 30%²¹. Το καρκινোসάρκωμα εκφράζει δείκτες τόσο επιθηλιακής (Cytokeratin, EMA) όσο και μεσεγχυματογενούς (π.χ. vimentin, desmin) προέλευσης^{4,21}.

ζ) Τέλος, το mesonephric-like αδενοκαρκίνωμα, πολύ σπάνιοι όγκοι που προέρχονται από εμβρυικά υπολείμματα του μεσονεφρικού πόρου⁴. Χαρακτηρίζεται από υψηλή πιθανότητα υποτροπής και μεταστατική ικανότητα. Οι όγκοι αυτοί παρουσιάζουν πολύ συχνά KRAS μεταλλάξεις (συνήθως G12V ή G12D), ανοσοϊστοχημικά θετική χρώση για PAX8, GATA3 και TTF1, ενώ δεν παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια (proficient mismatch repair, MMRp)^{4,22}.

Σύμφωνα με ένα δυϊστικό μοντέλο ταξινόμησης του καρκίνου ωοθηκών, οι όγκοι ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, στους όγκους Τύπου I (χαμηλής κακοήθειας ορώδη καρκινώματα, χαμηλής κακοήθειας ενδομητριοειδή, διαυγοκυτταρικά και βλεννώδη καρκινώματα) που έχουν κοινή προέλευση από πρόδρομες βλάβες όπως η ενδομητρίωση και οι όγκοι οριακής κακοήθειας και οι όγκοι Τύπου II (υψηλής κακοήθειας καρκινώματα ωοθήκης, υψηλής κακοήθειας ενδομητριοειδή καρκινώματα και αδιαφοροποίητα καρκινώματα) που διαγιγνώσκονται πιο συχνά σε προχωρημένα στάδια FIGO III/IV (75%), χαρακτηρίζονται από πιο επιθετική συμπεριφορά και φέρουν πολύ συχνά μεταλλάξεις TP53 (>95%) και BRCA ενώ σπάνια φέρουν άλλες μεταλλάξεις²³. Η *Εικόνα 3* συνοψίζει την ιστολογική και μοριακή ταξινόμηση του επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών.



Εικόνα 3. Ιστολογική ταξινόμηση του επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών
Histological Classification of Ovarian Carcinoma; <http://www.bccancer.bc.ca/books/ovary-epithelial-carcinoma/histological-classification-of-ovarian-carcinoma>; Accessed: 05/08/2023

Γ. SCREENING - ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι κατευθυντήριες οδηγίες τόσο της Αμερικανικής Εταιρίας Ογκολογίας (ASCO) όσο και στις Ευρωπαϊκής Εταιρίας (ESMO) δεν υποστηρίζουν την εφαρμογή μέτρων διαλογής (screening) στον γενικό πληθυσμό. Πολλές προοπτικές μελέτες προσπάθησαν να εξετάσουν την χρήση του διακολπικού υπερήχου (U/S) και του καρκινικού δείκτη CA-125 ως μέτρα διαλογής στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες²⁴⁻²⁶. Οι μελέτες αυτές έδειξαν αύξηση της διάγνωσης του καρκίνου ωοθηκών σε πρωϊότερο στάδιο και ελαφρά επιμήκυνση της συνολικής επιβίωσης, ωστόσο καμία διαφορά ως προς την συνολική θνητότητα²⁴⁻²⁶. Ως εκ τούτου, ο προληπτικός έλεγχος για καρκίνο ωοθηκών

δεν περιλαμβάνεται στο πρόγραμμα πληθυσμιακού ελέγχου τόσο στην Ευρώπη όσο και στην χώρα μας. Συστηματική ανασκόπηση των μελετών αυτών από το U.S. Preventative Services Task Force έδειξε πως ο ετήσιος προληπτικός έλεγχος με διακολπικό υπέρηχο και μέτρηση CA-125 δεν μείωσε την θνητότητα από καρκίνο ωοθηκών σε γυναίκες μετρίου κινδύνου άνω των 45 ετών²⁷. Επιπρόσθετα, η τιμή του δείκτη CA-125 είναι αυξημένη μόνο στο 50% των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών αρχικού σταδίου και στο 85% σε προχωρημένα στάδια²⁸.

Αναφορικά με την διάγνωση, η νόσος στα αρχικά στάδια συνήθως είναι ασυμπτωματική ενώ σε προχωρημένα στάδια τα συμπτώματα είναι συνήθως μη ειδικά. Τα κύρια συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν επιγαστρική δυσφορία, φούσκωμα, διαταραχές στις κενώσεις ή στην ούρηση, οσφυαλγία, κόπωση, απώλεια βάρους^{26,29}. Σε μία μελέτη 1709 γυναικών με καρκίνο ωοθηκών, το 72% παρουσίασε συμπτώματα διάρκειας τριών μηνών ή περισσότερο από την διάγνωση ενώ το 35% ανέφερε πως η συμπτωματολογία ξεκίνησε πάνω από έξι μήνες²⁹. Πιο σπάνια, ο καρκίνος ωοθηκών μπορεί να εκδηλωθεί μέσω παρανεοπλασματικού νοσήματος όπως είναι η υποξεία παρεγκεφαλική εκφύλιση ή η δερματομυοσίτιδα είτε ως μεταναστευτική θρομβοφλεβίτιδα (σύνδρομο Trousseau).

Η αρχική διερεύνηση των συμπτωμάτων περιλαμβάνει μέτρηση του δείκτη CA-125 και διενέργεια υπερήχου κοιλίας/πυέλου ή/και διακολπικού υπερήχου²⁶. Ειδικά ο υπέρηχος έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία καθώς βοηθά στη διαφορική διάγνωση των κακοήθων ωοθηκικών όγκων από τους καλοήθεις και στην ανίχνευση ασκτικής συλλογής^{7,26,29,30}. Ο διακολπικός υπέρηχος έχει βοηθήσει στην απεικόνιση των ωοθηκικών σε σχέση με τον υπέρηχο κοιλίας. Συγκεκριμένα, ο διακολπικός υπέρηχος έχει 86 % με 94% ευαισθησία και 94% με 96% ειδικότητα στην διαφορική διάγνωση καλοήθων και κακοήθων ωοθηκικών μαζών²⁹. Έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένα συστήματα βαθμονόμησης που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των όγκων στις ωοθήκες με βάση τα υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα το International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) Simple Rules που κατηγοριοποιεί τους όγκους των ωοθηκών με βάση πέντε καλοήθη (ομοιόμορφο σχήμα, παρουσία συμπαγών στοιχείων με μεγαλύτερη διάμετρο <7mm, παρουσία ακουστικής σκιάς, χαμηλή αιμάτωση κ.λπ.) και πέντε κακοήθη (π.χ. ακανόνιστο σχήμα, ασκτική συλλογή, πλούσια αιμάτωση κ.λπ.) χαρακτηριστικά³¹. Το σύστημα αυτό βαθμονόμησης αναπτύχθηκε με βάση κλινικά και απεικονιστικά δεδομένα υπερήχων από 1066 γυναίκες σε εννέα κέντρα σε πέντε χώρες (Ιταλία, Βέλγιο, Σουηδία, Ηνωμένο Βασίλειο και Γαλλία) και επιβεβαιώθηκε σε πολλές

μελέτες³¹. Όπως προαναφέρθηκε, η τιμή του CA-125 ανευρίσκεται αυξημένη στο 80% των καρκίνων ωοθηκών συνολικά, αλλά μόνο στο 50% αυτών αρχικού σταδίου^{7,28,29}. Συνεπώς, η μέτρηση του CA-125 πρέπει να διενεργείται πάντα στην αρχική διερεύνηση, ωστόσο η φυσιολογική τιμή δεν αποκλείει την νόσο. Υψηλή τιμή CA-125 μπορεί να σχετίζεται με καλοήθεις παθήσεις (π.χ. ενδομητρίωση, κύστες ωοθηκών, φλεγμονώδης νόσος της πυέλου) ή με άλλες κακοήθειες (καρκίνος μαστού, πνεύμονα, παγκρέατος)⁷. Έχουν μελετηθεί και άλλοι καρκινικοί δείκτες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην διερεύνηση του καρκίνου ωοθηκών, όπως η ανθρώπινη πρωτεΐνη επιδιδυμίδας 4 (HE4, Human epididymis protein 4), μία γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται αυξημένη στο ένα τρίτο των καρκίνων ωοθηκών που έχουν φυσιολογική τιμή CA-125 και που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση της υποτροπής και της προόδου νόσου^{29,30}. Για τους άλλους μη επιθηλιακούς ιστολογικούς τύπους μπορεί να γίνει έλεγχος με άλλους δείκτες όπως η ινχιπίνη A/B (inhibin A/B) για τους στρωματικούς όγκους και η α-φετοπρωτεΐνη (AFP) και η β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-HCG) για τους όγκους εκ γεννητικών κυττάρων^{29,30}. Συχνά πραγματοποιείται μέτρηση των καρκινικών δεικτών CEA και CA19-9 όταν είναι αμφίβολη η προέλευση του ωοθηκικού όγκου εάν προέρχεται από το γαστρεντερικό ή πρόκειται για πρωτοπαθές βλεννώδες νεόπλασμα της ωοθήκης⁷. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να διενεργηθεί έλεγχος με γαστροσκόπηση και κολonosκόπηση, ειδικά εάν ο λόγος CA-125/CEA είναι ≤ 25 .

Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου ωοθηκών και τον καθορισμό της εξαιρεσιμότητας της νόσου διενεργείται έλεγχος με αξονική τομογραφία (CT) άνω-κάτω κοιλίας^{26,28}. Έλεγχος με CT θώρακος πραγματοποιείται για την διερεύνηση για πλευριτική συλλογή ή παρουσία νόσου πάνω από το διάφραγμα. Ο έλεγχος με μαγνητική τομογραφία (MRI) δεν περιλαμβάνεται στον έλεγχο ρουτίνας για τη σταδιοποίηση και συστήνεται κυρίως για τη διερεύνηση ωοθηκικών όγκων που δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν πρόκειται για καλοήθεις ή κακοήθεις^{28,30}.

Δ. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Ο καρκίνος ωοθηκών σχετίζεται με πολλές γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι κυριότερες μεταλλάξεις εντοπίζονται στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 και σχετίζονται με 40-60% και 15-30% δια βίου κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου ωοθηκών αντίστοιχα^{32,33}. Οι φορείς των μεταλλάξεων αυτών χαρακτηρίζονται και από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης

καρκίνου μαστού, παγκρέατος και προστάτη. Σε αυτή την ομάδα ασθενών τόσο η Ευρωπαϊκή όσο και η Αμερικάνικη Εταιρία συστήνουν την διενέργεια προφυλακτικής σαλπινγο-ωοθηκεκτομής στα 35-40 έτη για τους φορείς BRCA1 παθογόνου μετάλλαξης και στα 40-45 έτη για αυτούς με BRCA2 μετάλλαξη όπου η επίπτωση του καρκίνου ωοθηκών καθυστερεί δέκα έτη³³. Ακόμη και σε αυτόν τον υψηλού κινδύνου πληθυσμό παραμένει αμφίβολο ωστόσο εάν ο προληπτικός έλεγχος με διακολπικό υπέρηχο και CA-125 βελτιώνει την επιβίωση³³. Εκτός από τις μεταλλάξεις BRCA1/2, άλλες παθογόνες μεταλλάξεις που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο ωοθηκών είναι οι μεταλλάξεις BRIP1, PALB2, RAD51C, RAD51D. Ως εκ τούτου, προφυλακτική σαλπινγο-ωοθηκεκτομή συστήνεται και σε φορείς μεταλλάξεων BRIP1 και RAD51C/D στα 45-50 έτη καθώς ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών είναι 5-15% και 10-20% αντίστοιχα³³. Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου ωοθηκών που φέρουν παθογόνες μεταλλάξεις υπάρχουν δεδομένα για διάγνωση σε πρωϊμότερο στάδιο και πλήρη εξαίρεση του όγκου από την διενέργεια προληπτικού ελέγχου με CA-125 και διακολπικού υπερήχου. Ωστόσο, ακόμη και σε αυτόν τον υψηλού κινδύνου πληθυσμό δεν υπήρχε διαφορά στην συνολική επιβίωση και επιπρόσθετα τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρο χειρουργείο πριν την τεκνοποίηση και πριν την ενδεδειγμένη ηλικία για προφυλακτική σαλπινγο-ωοθηκεκτομή.

E. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η *Εικόνα 4* απεικονίζει την σταδιοποίηση του καρκίνου ωοθηκών κατά σύστημα ταξινόμησης TNM και FIGO σύμφωνα με την 8^η έκδοση American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging System.

TNM and FIGO Staging System for Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer (8th ed., 2017)

Primary Tumor (T)

TNM	FIGO	TNM	FIGO
TX		T2	II
T0			
T1	I	T2a	IIA
T1a	IA	T2b	IIB
T1b	IB	T3	III
T1c	IC	T3a	IIIA2
T1c1	IC1	T3b	IIIB
T1c2	IC2	T3c	IIIC
T1c3	IC3		

American Joint Committee on Cancer (AJCC)

TNM and FIGO Staging System for Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer (8th ed., 2017)

Regional Lymph Nodes (N)

TNM	FIGO
NX	
N0	
N0(i+)	
N1	IIIA1
N1a	IIIAli
N1b	IIIAlii

Distant Metastasis (M)

TNM	FIGO
M0	
M1	IV
M1a	IVA
M1b	IVB

TNM and FIGO Staging System for Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer (8th ed., 2017)

	T	N	M
Stage I	T1	N0	M0
Stage IA	T1a	N0	M0
Stage IB	T1b	N0	M0
Stage IC	T1c	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage IIA	T2a	N0	M0
Stage IIB	T2b	N0	M0
Stage IIIA1	T1/T2	N1	M0
Stage IIIA2	T3a	NX/N0/N1	M0
Stage IIIB	T3b	NX/N0/N1	M0
Stage IIIC	T3c	NX/N0/N1	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1
Stage IVA	Any T	Any N	M1a
Stage IVB	Any T	Any N	M1b

Εικόνα 4. Σταδιοποίηση κατά TNM και FIGO του καρκίνου ωοθηκών; AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition (2017) published by Springer International Publishing.

ΣΤ. ΜΟΡΙΑ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο όρος «επιγενετική» χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Βρετανό βιολόγο Conrad Waddington το 1942 για να περιγράψει τις αλλαγές που αλλάζουν τη λειτουργία του DNA χωρίς να τροποποιούν την αλληλουχία του³⁴. Γενικά, οι «επιγενετικές τροποποιήσεις» αποτελούνται από τρεις κύριους μηχανισμούς:

- α) την τροποποίηση των ιστονών
- β) την μεθυλίωση του DNA
- γ) τα μη κωδικοποιούντα RNAs

Συμπερασματικά, οι επιγενετικές αλλαγές του γονιδιώματος αποτελούν τις διεργασίες που επηρεάζουν την τελική έκφραση των γονιδίων χωρίς να αλλάζουν την αλληλουχία του DNA, δημιουργώντας την «γέφυρα» μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου.

1. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το DNA «πακετάρεται» ως χρωματίνη με τη βοήθεια μορίων ιστόνης. Η βασική λειτουργική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα που αποτελείται από ένα οκταμερές από δύο αντίγραφα τεσσάρων ιστονών (H3, H4, H2A και H2B) γύρω από το οποίο τυλίγονται 145 με 147 ζεύγη βάσεων DNA³⁵. Μία ακόμη ιστόνη, γνωστή ως ιστόνη-συνδέτης H1, προσδένεται στο εξωτερικό του νουκλεοσώματος, σταθεροποιεί την δομή του οκταμερούς ιστονών-DNA κρατώντας στην θέση του το DNA που περιτυλίγεται γύρω από το σύμπλοκο ιστόνης³⁶. Αυτό το σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης, η χρωματίνη, βοηθά στην διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος αλλά και στην διεκπεραίωση της αντιγραφής, της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA³⁵. Εν συνεχεία, η χρωματίνη αναδιπλώνεται σε ακόμη πιο περίπλοκες δομές και σχηματίζει τελικά το χρωμόσωμα. Η δομή της χρωματίνης πρέπει να είναι δυναμική και να μπορεί να αναδιαμορφώνεται έτσι ώστε να επηρεάζει την ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA που περιέχει. Κάθε μόριο ιστόνης διαθέτει ένα σφαιρικό κομμάτι που σχηματίζει τον πυρήνα του νουκλεοσώματος και ένα αμινοτελικό άκρο πλούσιο σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης. Αυτή η αμινο-τελική «ουρά» των ιστονών προεξέχει από το νουκλεόσωμα και υφίσταται επιγενετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational modifications, PTMs)³⁵. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι ιστόνες περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, μεθυλίωση, ουβικουιτινυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση, απαμίνωση

αλλά και διεργασίες που έχουν ανακαλυφθεί πιο πρόσφατα όπως η προπιονυλίωση και η βουτυρυλίωση των ιστονών³⁶. Οι επιγενετικές αυτές τροποποιήσεις των ιστονών κυρίως πραγματοποιούνται στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών και είναι προσβάσιμες στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος, ωστόσο μπορεί να συμβούν και στην σφαιρική περιοχή των ιστονών στο εσωτερικό του. Οι επιγενετικές αυτές τροποποιήσεις των ιστονών οδηγούν σε αναδιαμόρφωση (remodelling) της χρωματίνης όπως π.χ. συμπύκνωση της χρωματίνης που δεν επιτρέπει την μεταγραφή γονιδίων. Για παράδειγμα, η δι- ή τρι-μεθυλίωση της ιστόνης H4K20 συμπυκνώνει την δομή της χρωματίνης εμποδίζοντας την μεταγραφή γονιδίων³⁶. Άλλη περιοχή της ιστόνης που υφίσταται τροποποίηση είναι η σφαιρική πλάγια επιφάνεια που αποτελεί το εξωτερικό του οκταμερούς και έχει άμεση επαφή με το DNA, όπως είναι η μεθυλίωση του K79 ή η ακετυλίωση του K56 της ιστόνης H3³⁶. Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών είναι: α) η ακετυλίωση, β) η μεθυλίωση και η γ) φωσφορυλίωση της ιστόνης. Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών είναι μία δυναμική διαδικασία που πραγματοποιείται από δύο ομάδες ενζύμων: τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (histone acetyltransferases, HATs) και τις αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases, HDACs)³⁷. Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών μεταφέρουν μία ακετυλομάδα από το ακετυλο-συνένζυμο Α στα κατάλοιπα λυσίνης στην αμινοτελική ουρά των ιστονών, ενώ αντίθετα οι αποακετυλάσες την αφαιρούν. Με αυτήν την τροποποίηση, το αρνητικό φορτίο της ακετυλομάδας εξουδετερώνει το θετικό φορτίο των καταλοίπων λυσίνης «χαλαρώνοντας» την σύνδεση μεταξύ DNA και ιστόνης. Η εξασθένηση αυτή της αλληλεπίδρασης DNA-ιστόνης καθιστά το DNA πιο προσβάσιμο από μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιώντας τη μεταγραφή. Αντίστροφα, οι αποακετυλάσες των ιστονών αποκαθιστούν το θετικό φορτίο της λυσίνης σταθεροποιώντας εκ νέου την δομή της χρωματίνης – ως εκ τούτου θεωρούνται «καταστολείς της μεταγραφής»³⁷. Επίσης, οι ακετυλιωμένες λυσίνες λειτουργούν ως θέση πρόσδεσης που αναγνωρίζεται από μία περιοχή των μεταγραφικών παραγόντων, την «βρωμομονάδα» όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια. Η φωσφορυλίωση των ιστονών αποτελεί τη δεύτερη κύρια τροποποίηση που υφίστανται οι ιστόνες και πραγματοποιείται στα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης κυρίως στο αμινο-τελικό άκρο των ουρών κυρίως της ιστόνης H1 αλλά και της H3 από το οκταμερές³⁷. Η επεξεργασία αυτή καταλύεται από κινάσες που μεταφέρουν μία φωσφορυλομάδα από ATP σε μία ομάδα υδροξυλίου της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος-στόχου³⁷. Με την φωσφορυλίωση της ιστόνης προστίθεται αρνητικό φορτίο σε αυτήν με αποτέλεσμα να επηρεά-

ζεται και σε αυτή την περίπτωση η δομή της χρωματίνης. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης εδράζονται στο αμινοτελικό άκρο των ουρών των ιστονών, ωστόσο υπάρχουν και κάποιες θέσεις εντός της σφαιρικής κεντρικής περιοχής όπως η φωσφορυλίωση του Y41 στην ιστόνη H3. Με την φωσφορυλίωση ρυθμίζεται η γονιδιακή έκφραση και με την αποφωσφορυλίωση επιτυγχάνεται η αποσιώπηση γονιδίων μέσω της συμπύκνωσης της χρωματίνης («ετεροχρωματίνης»). Τέλος, η μεθυλίωση των ιστονών κυρίως επιτελείται με μεταφορά μεθυλομάδας στα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών H3 και H4. Σε αντίθεση με την φωσφορυλίωση και την ακετυλίωση ωστόσο, η μεθυλίωση δεν μεταβάλλει το ηλεκτρικό τους φορτίο. Η μεθυλίωση διακρίνεται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: στη μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης που δύναται να μόνο-, δι- ή τρι-μεθυλιωθεί και στη μεθυλίωση της αργινίνης, που ανευρίσκεται μόνο σε μόνο- ή διμεθυλιωμένη μορφή. Η διαδικασία της μεθυλίωσης καταλύεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (histone methyltransferases, HMTs) και η αντίστροφη διαδικασία από τις απομεθυλάσες των ιστονών (histone demethylases, HDMs). Η μεταφορά της μεθυλομάδας πραγματοποιείται προς την S-αδενοσυλο-μεθειονίνη της λυσίνης και της αργινίνης. Οι περισσότερες μεθυλοτρανσφεράσες μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών, ωστόσο υπάρχουν κάποια ένζυμα π.χ. το ένζυμο Dot1 που μεθυλιώνει κατάλοιπα στην σφαιρική κεντρική περιοχή της ιστόνης. Επίσης, οι μεθυλοτρανσφεράσες είναι ένζυμα εκλεκτικά, δηλαδή κάθε ένζυμο μεθυλιώνει μία συγκεκριμένη περιοχή και ως ένα συγκεκριμένο βαθμό μεθυλίωσης π.χ. προς την μονο-, δι ή τριμεθυλιωμένη μορφή. Έχουν πλέον αναγνωριστεί ένζυμα απομεθυλασών που καταλύουν την αντίστροφη διαδικασία της αφαίρεσης μεθυλομάδας από μεθυλιωμένα κατάλοιπα όπως η lysine-specific demethylase 1 (LSD1) σε μεθυλιωμένα κατάλοιπα H3K4me1/2 ή η JMJD2 που έχει την ικανότητα απομεθυλίωσης τριμεθυλιωμένης λυσίνης H3K9me3 and H3K36me3³⁷. Στην πραγματικότητα οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν ένα πολύ πιο περίπλοκο γεγονός από τα ανωτέρω. Για παράδειγμα, κάποιες θέσεις ιστόνης δύναται είτε να μεθυλιωθούν είτε να ακετυλιωθούν με αντίθετο αποτέλεσμα στην έκφραση γονιδίων³⁸. Η ακετυλίωση της H3K9 συμβαίνει κυρίως σε εκκινητές γονιδίων και ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση οδηγεί σε συμπύκνωση την χρωματίνης και καταστολή της έκφρασης³⁸. Ωστόσο, πολλές φορές οι επιγενετικές τροποποιήσεις δεν έχουν αντίθετα αποτελέσματα αλλά αποτελούν προαπαιτούμενα στάδια για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, όπως για παράδειγμα οι επιγενετικές αλλαγές στα κατάλοιπα

λυσίνης στις ιστόνες H2A, H3 και H4³⁸. Είναι πλέον φανερό ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η ομοιοστάση του κυττάρου εξαρτάται από την προσεκτική ισορροπία των επιγενετικών τροποποιήσεων άρα και των ενζύμων που τις επιτελούν. Εάν αυτή η ισορροπία καταστραφεί, απορρυθμίζεται η γονιδιακή έκφραση με αποτέλεσμα την ογκογένεση. Για παράδειγμα, η ανεξέλεγκτη μεθυλίωση από την μεθυλοτρανσφεράση της οικογένειας COMPASS SET1A έχει ογκογόνο δράση και έχει συσχετιστεί με μία πληθώρα συμπαγών νεοπλασμάτων³⁵. Αντίστοιχα, η μειωμένη ακετυλίωση H4K16ac έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση³⁵. Λόγω της συμβολής αυτής των ενζύμων των ακετυλοτρανσφερασών, αποακετυλασών και των βρωμοπρωτεϊνών στην καρκινογένεση, αποτελούν θεραπευτικό στόχο για αντινεοπλασματικά φάρμακα. Ο HDAC αναστολέας βορινοστάτη (Zolinza) ήταν ο πρώτος FDA εγκεκριμένος αναστολέας για το υποδόριο λέμφωμα T-κυττάρου, ενώ ακολούθησαν και άλλοι αναστολείς όπως ο pan-HDAC αναστολέας πανομπινοστάτη (panobinostat, Farydak) που αρχικά εγκρίθηκε για την θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και ο αναστολέας givinostat που αποτελεί «ορφανό» φάρμακο για την μυϊκή δυστροφία Becker³⁵. Πολλά φάρμακα έχουν αναπτυχθεί για τις πρωτεΐνες bromodomain and extra terminal domain (BET) (BET inhibitors) όπως θα αναλυθεί παρακάτω αναλυτικά. Άλλες επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών περιλαμβάνουν την ουβικιτίνωση, την ADP-ριβοζυλίωση, η βιοτυνιλίωση και άλλες οι οποίες δεν θα αναλυθούν περαιτέρω³⁷.

2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ο δεύτερος επιγενετικός μηχανισμός και έχει μελετηθεί εκτενώς τα προηγούμενα χρόνια. Αποτελεί την μετατροπή του νουκλεοτιδίου κυτοσίνη του DNA σε 5-μεθυλοκυτοσίνη μετά την μεταφορά μίας μεθυλομάδας (-CH₃) στον ⁵C του πυριμιδινικού δακτυλίου της από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs)³⁹. Η μεθυλίωση αυτή μπορεί να συμβεί είτε σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs) κατά μήκος του γονιδιώματος είτε σε περιοχές πλούσιες σε CpGs («νησίδες CpGs»), όπως στους υποκινητές των γονιδίων. Στο γενετικό υλικό των θηλαστικών βρίσκονται έως και 50 εκατομμύρια δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs) εκ των οποίων το 70-80% είναι μεθυλιωμένες⁴⁰. Η μεθυλίωση αυτή του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος εξασφαλίζει τη χρωμοσωμική σταθερότητα, την αποφυγή χρωμοσωμικών μεταθέσεων και τη καταστολή της κινητικότητας των μεταθετών στοιχείων (ακολουθίες DNA που

μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο γονιδίωμα προκαλώντας μεταλλάξεις). Αντίθετα, οι περισσότερες μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs) βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs), τις «νησίδες CpGs» που εντοπίζονται κυρίως στο υποκινητές γονιδίων λειτουργώντας ως θέση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν τουλάχιστον 29000 νησίδες CpGs που εντοπίζονται στους υποκινητές έως και του 50% των γονιδίων⁴⁰. Όταν οι νησίδες CpGs στο εσωτερικό των υποκινητών είναι μεθυλιωμένες οι υποκινητές στην πλειοψηφία τους αδρανοποιούνται. Υπάρχουν τρεις DNA μεθυλοτρανσφεράσες, η DNMT1 που συντηρεί την μεθυλίωση κατά την αντιγραφή του DNA και η DNMT3a και DNMT3b που κάνουν de novo μεθυλίωση³⁹. Στα θηλαστικά έχουν επίσης ανιχνευθεί και άλλες δύο DNA μεθυλοτρανσφεράσες, η DNMT2 και η DNMT3L, ωστόσο δεν συμμετέχουν στην μεθυλίωση του γονιδιώματος³⁹. Όλες οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες έχουν μία ρυθμιστική περιοχή στο αμινοτελικό άκρο και μια καταλυτική περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο που μεταφέρει μία μεθυλομάδα από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM) στην κυτοσίνη. Αντίστροφα, η απομεθυλίωση του DNA συμβαίνει είτε παθητικά όταν η DNMT1 αδυνατεί να διατηρήσει την μεθυλίωση κατά τον διπλασιασμό του DNA είτε ενεργητικά μέσω της δράσης των DNA απομεθυλασών. Η μεθυλίωση DNA στους υποκινητές των γονιδίων (νησίδες CpGs) έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική τους σιγή και την αναστολή έκφρασης της γενετικής πληροφορίας, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου, στην απενεργοποίηση του X χρωσώματος και στο μηχανισμό της γονιδιακής αποτύπωσης. Η μεθυλίωση του DNA προκαλεί καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με πολλούς μηχανισμούς. Αρχικά, αναστέλλεται η πρόσδεση διάφορων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι c-myc, CREB/ATF, E2F, and NF-kB^{39,40}. Επιπρόσθετα, η μεθυλίωση του DNA επιστρατεύει τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) μέσω ειδικών πρωτεϊνών, των methyl-CpG binding domain proteins (MBDs) με αποτέλεσμα την δημιουργία ετεροχρωματίνης (συμπυκνωμένη χρωματίνη) και άρα την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης^{39,40}.

Η διαταραχή της μεθυλίωσης του DNA, είτε πρόκειται για υπομεθυλίωση είτε για υπερμεθυλίωση έχει συσχετιστεί με καρκίνο^{39,41}. Το 1983, οι Feinberg και Vogelstein πρώτοι παρατήρησαν ότι υπάρχει διάχυτη υπομεθυλίωση του DNA στις δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες καρκινικών κυττάρων⁴¹. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται διάχυτη απώλεια της μεθυλίωσης του γονιδιώματος που οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Επίσης, εμφανίζεται υπερμεθυλίωση (απενεργοποίη-

ση) υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αρχικά, με την μείωση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος υπάρχει μεγαλύτερη διακίνηση των μεταθετών στοιχείων σε τυχαίες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα οδηγώντας σε γενωμική αστάθεια και δημιουργία μεταλλάξεων³⁹. Η καθολική υπομεθυλίωση του DNA έχει συσχετιστεί με την επιθετικότητα πολλών νεοπλασμάτων, όπως του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, των ωθηκών, του καρκίνου του μαστού και του πολλαπλού μυελώματος⁴⁰. Παράλληλα, η απώλεια της DNA μεθυλίωσης μπορεί να επανενεργοποιήσει το γονιδίωμα ιών που έχει ενσωματωθεί στο ανθρώπινο και έχει επιτυχώς κατασταλεί μέσω της μεθυλίωσής του. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε λοίμωξη τόσο από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) όσο και από τον ιό Epstein-Barr (EBV)³⁹. Αντίστροφα, η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί επίσης να οδηγήσει στην καρκινογένεση. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (RB) ήταν το πρώτο παράδειγμα γονιδίου που περιγράφηκε⁴⁰. Άλλα γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια που έχει αποδειχτεί πως αποσιωπώνται μέσω DNA μεθυλίωσης είναι το γονίδιο VHL στο καρκίνο νεφρού, το APC στον καρκίνο παχέος εντέρου, το BRCA1 στον καρκίνο μαστού αλλά και μία λίστα άλλων γονιδίων (p53, RASSF1A, p14ARF, CDKN2A, p16, p21, TIMP3 κ.λπ.)⁴⁰. Για την διαταραχή της μεθυλίωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα έχει ενοχοποιηθεί η DNMT1 καθώς υπερεκφράζεται σε αυτά, ωστόσο φαίνεται πως το φαινόμενο είναι πιο πολύπλοκο και δυνητικά εμπλέκονται και οι DNMT3B και DNMT3L⁴⁰. Δεδομένου του καταλυτικού ρόλου τους στην γονιδιακή έκφραση και στην καρκινογένεση, οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες έχουν αποτελέσει θεραπευτικό στόχο. Αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferase inhibitors, DNMTis) έχουν αναπτυχθεί από παλιά και κάποιοι έχουν λάβει έγκριση από τον FDA, όπως η 5-αζακυτιδίνη (Vidaza) and 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (Dacogen) για τη θεραπεία του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ), καθώς και η κλοφαραβίνη (Evoltra) που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε παιδιατρικούς ασθενείς. Οι DNMTis μπορούν να διακριθούν σε νουκλεοσιδικά ανάλογα, που ενσωματώνονται στο DNA και δημιουργούν σύμπλοκα με τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες εμποδίζοντας την λειτουργία τους και σε και μη νουκλεοσιδικά ανάλογα.

3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑ RNAs (miRNAs ή siRNAs (micro ή small interference) ή non coding RNAs (ncRNAs))

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα έως και το 98% του DNA είναι "παρεμβαλλόμενο" και δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες (non-coding RNAs, ncRNAs). Το μεταγραφόμενο αυτό RNA που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη διακρίνεται αδρά σε μικρές (κάτω από 200 νουκλεοτίδια) (small ncRNAs) και μεγαλύτερες αλληλουχίες (long ncRNAs)⁴².

Το μη κωδικοποιούν RNA αυτό έχει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της ακολουθίας, της δομής και της έκφρασης των αγγελιοφόρων RNA (mRNAs), καθορίζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση. Τα small non-coding RNAs διακρίνονται σε διάφορους τύπους μικρών αλληλουχιών RNAs όπως είναι τα small interfering RNAs (siRNAs), τα microRNAs (miRNAs) και τα PIWI-interacting RNAs (piRNAs)⁴².

Το μικρό-RNA (miRNA) έχει συμπληρωματική νουκλεοτιδική αλληλουχία ~22 νουκλεοτιδίων με το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) με αποτέλεσμα να συνδέεται με την 3' UTR περιοχή του και να καταστέλλει την μετάφρασή του. Τα miRNAs μεταγράφονται αρχικά από την RNA Polymerase II ως πρωτογενή miRNA μετάγραφο (pri-miRNAs) τα οποία εν συνεχεία τροποποιούνται περαιτέρω σε pre-miRNAs⁴³. Το pre-miRNA αυτό εξάγεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνης-5 και μετατρέπεται σε RNA διπλής έλικας (dsRNA) το οποίο τελικά διασπάται σε μικρότερα δίκλιωνα dsRNAs μήκους 20-25 ζευγών βάσεων από την RNase III enzyme Dicer, η μία έλικα των οποίων ενσωματώνεται στην 3'-UTR περιοχή του mRNA⁴³. Η σύνδεση αυτή καταστέλλει τόσο την μετάφραση του mRNA-στόχου και οδηγεί στην αποδόμησή του. Τα 800 με 1000 μικρομόρια RNA (miRNAs), που έχουν μέχρι σήμερα αναγνωριστεί, ρυθμίζουν περίπου το ένα τρίτο του ανθρώπινου μεταγραφώματος (transcriptome). Τα small interfering RNAs (siRNAs) προκύπτουν επίσης από την αποδόμηση δίκλωνων dsRNAs από το ένζυμο Dicer ωστόσο με την διαφορά ότι δεν προέρχονται από την μεταγραφή γονιδίων του ξενιστή. Τα miRNAs και τα siRNAs στη συνέχεια δημιουργούν σύμπλοκο με το RNA-induced silencing complex (RISC) που οδηγεί σε καταστροφή του συμπλόκου RISC-siRNA- mRNA και αποδόμηση του mRNA στόχου.

Τα long ncRNAs αποτελούνται από αλληλουχίες τουλάχιστον 200 νουκλεοτιδίων, έχουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά και αποτελούν το 81.8% του συνολικού μη κωδικοποιούντος RNA⁴⁴. Τα long ncRNAs ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων μέσω πολλών μηχανισμών, όπως μέσω πρόσδεσης στους εκκινητές γονιδίων ή μέσω ρύθμισης της δομής της χρωματίνης μέσω του ελέγχου συμπλόκων ανα-

διοργάνωσης της χρωματίνης (chromatin remodeling complexes), όπως του polycomb repressive complex 2 (PRC2)⁴³. Ταυτόχρονα συμβάλλουν σε μετα-μεταγραφικές διαδικασίες όπως στη σταθερότητα του mRNA στο κυτταρόπλασμα ή στη λειτουργία των miRNAs. Το μη κωδικοποιούν RNA μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση με πολλούς μηχανισμούς. Ο έλεγχος της έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) καθώς και των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων αποτελούν κάποιους από αυτούς⁴⁴.

4. BROMODOMAIN AND EXTRA TERMINAL DOMAIN (BET) ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η ακετυλίωση των ιστονών είναι μία διαδικασία που πρωτοπεριγράφηκε το 1964 από τον Vincent Allfrey και την ομάδα του. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών καταλύεται από δύο είδη ενζύμων, τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (histone acetyltransferases, HATs) και τις αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases, HDACs). Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών μεταφέρουν μία ακετυλομάδα από το ακετυλο-συνένζυμο A στην ε-αμινομάδα καταλοίπων λυσίνης στο N-τελικό άκρο των ιστονών και οι αποακετυλάσες την αφαιρούν. Η ακετυλίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ DNA και ιστόνης και τη διευκόλυνση της πρόσβασής του από μεταγραφικούς παράγοντες. Η ακετυλιωμένη χρωματίνη είναι «χαλαρή» και ονομάζεται ευχρωματίνη, ενώ είναι μεταγραφικά ενεργή. Αντίθετα, η υποακετυλιωμένη χρωματίνη βρίσκεται σε μία συμπυκνωμένη μορφή που ονομάζεται ετεροχρωματίνη και δεν δύναται να μεταγραφεί εύκολα. Οι δύο αυτές κατηγορίες ενζύμων συμπερασματικά λειτουργούν ως επιγενετικοί «γραφείς» και «διορθωτές». Μία τρίτη κατηγορία ενζύμων που συμβάλλουν καταλυτικά στην ακετυλίωση των ιστονών ωστόσο αποτελούν οι bromodomain and extra-terminal (BET) domain πρωτεΐνες που λειτουργούν ως «αναγνώστες» της ακετυλίωσης. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν μία περιοχή βρωμομονάδας αποτελούν μία οικογένεια 46 πρωτεϊνών που διαθέτουν 61 διαφορετικές βρωμομονάδες⁴⁵. Σε αυτές περιλαμβάνονται HATs και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τις HATs (όπως η πρωτεΐνη KAT2A), μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών, όπως η ASH1L και η mixed lineage leukaemia protein (MLL), ελικάσες, όπως οι πρωτεΐνες SMARCA (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulators of chromatin subfamily A), μεταγραφικοί ενεργοποιητές και διαμεσολαβητές, η bromodomain-containing protein 9 (BRD9) και οι bromodomain and extra-terminal (BET) domain πρωτεΐνες⁴⁵. Ανεξάρτητα από τις

τελική μονάδα⁴⁶. Οι BET πρωτεΐνες αναγνωρίζουν και προσδένονται σε ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης μέσω των βρωμομονάδων BD1 και BD2 στο αμινοτελικό τους άκρο. Συγκεκριμένα, επιστρατεύονται στους ενισχυτές (super-enhancers) ογκογονιδίων και ενεργοποιούν την έκφραση τους. Οι super-enhancers είναι περιοχές του γονιδιώματος που περιέχουν πολλαπλούς ενισχυτές γονιδίων όπου προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες και συνενεργοποιητές. Αυτές οι περιοχές βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε γονίδια που υπερεκφράζονται. Οι BET πρωτεΐνες εντοπίζονται στους super-enhancers γονιδίων και λειτουργούν ως υπόστρωμα για την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων⁴⁷. Απόδειξη του φαινομένου αυτού είναι πως όταν αναστέλλονται μειώνεται η έκφραση σημαντικών ογκογονιδίων όπως είναι τα MYC, BCL2, BCL6, PAX5, CDK4 και CDK6⁴⁸. Ειδικά η πρωτεΐνη BRD4 επιστρατεύει τον παράγοντα επιμήκυνσης της μεταγραφής b (PTEF-b) σε θέσεις ενεργού μεταγραφής και τον ενεργοποιεί φωσφορυλιώνοντας κομμάτι της CDK9 κινάσης του⁴⁶. Εν συνεχεία, ο παράγοντας PTEF-b ενεργοποιεί την RNA πολυμεράση II μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης 2 (Ser2) στο καρβοξυτελικό της άκρο. Συνεπώς, η πρωτεΐνη BRD4 είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφής μέσω της έμμεσης ενεργοποίησης της RNA PolII. Εκτός από τον παράγοντα PTEF-b, η πρωτεΐνη BRD4 σχετίζεται και με άλλες πρωτεΐνες όπως η ATAD5, η μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών NSD3, η απομεθυλάση της ιστόνης JMJD6 και CHD4⁴⁹. Αντίστοιχα, η BET πρωτεΐνη BRD2 ρυθμίζει την έκφραση των E2F-εξαρτώμενων γονιδίων που καθορίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση χωρίς να αλληλεπιδρά με τον παράγοντα PTEF-b. Τέλος, η πρωτεΐνη BRD3 προσδέεται μέσω της BD1 βρωμομονάδας της στον ακετυλιωμένο GATA1 μεταγραφικό παράγοντα και ρυθμίζει την μεταγραφή μέσω του E2F-Rb μονοπατιού⁵⁰.

Ο καταλυτικός ρόλος των BET πρωτεϊνών στη μεταγραφή οδήγησε στην ανάπτυξη BET αναστολέων (BET inhibitors, BETis) που αναστέλλουν την λειτουργία τους⁴⁶. Ο αναστολέας JQ1 είναι ο αναστολέας που έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα που προσδένεται στα ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης λειτουργώντας ανταγωνιστικά ως προς το BRD4 στην θέση πρόσδεσής του στην χρωματίνη. Ένας αριθμός εκλεκτικών και μη BET αναστολέων έχουν αναπτυχθεί από τότε, συμπεριλαμβανομένων των I-BET 762, OTX-015, ABBV-075, I-BET 151⁵⁰. Οι BET αναστολείς μειώνουν την έκφραση γονιδίων καταλυτικών για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως τα MYC, BCL2, CDK6, επάγουν παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και περιορίζουν την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για αυτοανανέωση μέσω αναστολής του WNT

σηματοδοτικού μονοπατιού⁵⁰. Ταυτόχρονα, οι BET αναστολές καταστέλλουν το γονίδιο της καρβονικής ανυδράσης 9 (CA9) που ενεργοποιείται στην υποξία και ως εκ τούτου καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων αγγειογένεσης που εκφράζονται σε συνθήκες υποξίας. Γενικά, η αντινεοπλασματική δράση των αναστολέων BET είναι αρκετά πολύπλοκη και βασίζεται στην αναστολή πολλών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ογκογένεση.

Οι BET πρωτεΐνες εκφράζονται σε άλλο ποσοστό σε διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Για παράδειγμα, στον καρκίνο μαστού οι πρωτεΐνες BRD2 και BRD4 παρουσιάζουν ενίσχυση ή υπερέκφραση στο 12% και 17% του τριπλά αρνητικού καρκίνου μαστού αντίστοιχα⁵¹. Παράλληλα, η πρωτεΐνη BRD4 φαίνεται πως έχει καταλυτικό ρόλο στον ορμονοευαίσθητο καρκίνο μαστού. Αντίστοιχα, ο ρόλος των BET πρωτεϊνών είναι ακόμη πιο ισχυρός στον καρκίνο ωοθηκών. Η ενίσχυση του BRD4 απαντάται περίπου στο 18-19% στον καρκίνο ωοθηκών, που αποτελεί υψηλότερο ποσοστό συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου⁵²⁻⁵⁴. Ανάλυση από τον The Cancer Genomic Atlas (TCGA) παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα BRD4 mRNA στο 9% των καρκίνων ωοθηκών, συμβατά με την ενίσχυση του BRD4 γονιδίου⁵⁴. Δεδομένα από τον TCGA επίσης αποδεικνύουν πως ενεργοποίηση του μονοπατιού NSD3-CHD8-BRD4 συμβαίνει στο 18% του HGSC⁵⁵. Η NSD3 είναι μία μεθυλοτρανσφεράση που κωδικοποιείται από το WHSC1L1 γονίδιο και λειτουργεί ως ικρίωμα για την πρόσδεση του BRD4 στην CHD8 πρωτεΐνη αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και διατηρεί ενεργή την μεταγραφή πολλών ογκογονιδίων. Το μονοπάτι NSD3-CHD8-BRD4 αποτελεί ένα μονοπάτι επιγενετικής τροποποίησης δυνητικά στοχεύσιμο. Ενίσχυση του γονιδίου BRD2 απαντάται στο 1.3% του καρκίνου ωοθηκών, ενώ ενίσχυση του γονιδίου BRD3 σε ακόμη μικρότερο ποσοστό ίσο με το 0.8% των ωοθηκικών όγκων⁵⁶. Η έκφραση της πρωτεΐνης BRDT ήταν μηδενική στον καρκίνο ωοθηκών. Τέλος, η έκφραση του BRD4 είναι υψηλή στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών που δεν φέρουν BRCA μεταλλάξεις και απαντώνται στο 18% αυτών, εν αντιθέσει με τα BRCA-μεταλλαγμένα όπου δεν παρατηρείται υπερέκφραση⁵⁷. Οι γενετικές BRCA μεταλλάξεις ανιχνεύονται στο 15-17% των ορωδών καρκινωμάτων ωοθηκών, ενώ έχει φανεί πως είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις CCNE1 που ανευρίσκονται στο 30% των επαρκών στον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) καρκινωμάτων. Ο φαινότυπος του «BRCA-μεταλλαγμένου» χαρακτηρίζεται κυρίως από γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα 3 και 8, ενώ γονιδιακές ενισχύσεις στο χρωμόσωμα 19 είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις BRCA. Όντως, οι μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα 3 και 8 ανευ-

ρίσκονται κυρίως στους «BRCA-μεταλλαγμένους» όγκους, ενώ οι ενισχύσεις γονιδίων στο χρωμόσωμα 19, όπως των CCNE1 (19q12), BRD4 (19p13.1) και PAK4 (19q13.2) κυρίως ανευρίσκονται στους BRCA μη μεταλλαγμένους όγκους. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στην δυνατότητα στόχευσης άλλων γονιδίων στους BRCA μη μεταλλαγμένους όγκους που δεν έχουν όφελος από τους PARP αναστολείς όπως το BRD4 και το CCNE1. Όντως φαίνεται πως η αναστολή των BET πρωτεϊνών διαταράσσει την επάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) και άρα την απάντηση στη βλάβη του DNA στα BRCA μη μεταλλαγμένα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών.

Οι BET αναστολείς βρίσκονται σε μελέτες φάσης I/II σε αιματολογικές και συμπαγείς κακοήθειες τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα. Δεδομένα από κυτταρικές σειρές δείχνουν ότι θεραπεία με τον BET αναστολέα JQ1 αναστέλλει τον ορμονοεξαρτώμενο (E2-mediated) πολλαπλασιασμό ER-θετικών κυτταρικών σειρών με ορμονοεξαρτώμενο τρόπο^{58,59}. Ειδικότερα, ο αναστολέας JQ1 αναστέλλει τόσο το ογκογονίδιο MYC όσο και άλλα ορμονοεξαρτώμενα γονίδια, όπως τα pS2, GREB1 and XBP1^{59,60}. Η θεραπεία με JQ1 μπλοκάρει την πρόοδο της RNA πολυμεράσης II από τους εκκινητές γονιδίων προς την κωδικοποιούμενη περιοχή και άρα την μεταγραφική διαδικασία. Η συσσώρευση της πρωτεΐνης BRD4 στο γονιδίωμα έχει συσχετιστεί με ενεργό μεταγραφή όπως υποδεικνύει η αύξηση των ιστονών H3K27ac και H3K4me3 και της RNA πολυμεράσης II. Ειδικότερα, στον ορμονοευαίσθητο καρκίνο μαστού οι πρωτεΐνες BRD3 και BRD4 δημιουργούν ένα σύμπλεγμα που προσδένεται στις ακετυλιωμένες ιστόνες και λειτουργεί σαν ικρίωμα για την πρωτεΐνη WHSC1 προκειμένου να έχει πρόσβαση στον εκκινητή του υποδοχέα οιστρογόνων (ESR1). Ο αναστολέας JQ1 αναστέλλει τη δημιουργία αυτού του συμπλόκου στον ESR1 εκκινητή εμποδίζοντας τη μεταγραφή των εξαρτώμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων⁵⁰. Αντίστοιχη αντινεοπλασματική δράση παρουσίασε ο BET αναστολέας JQ1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη, ιδιαίτερα ευνοχοάντοχων, καθώς και σε κυτταρικές σειρές τριπλά αρνητικού καρκίνου μαστού. Εν αντιθέσει με τις ER-θετικές κυτταρικές σειρές, στα τριπλά αρνητικά καρκινικά κύτταρα μαστού η αναστολή του MYC ποικίλλει κατόπιν αναστολής των BET πρωτεϊνών με JQ1. Αντίθετα, η BET αναστολή στα τριπλά αρνητικά κύτταρα μαστού οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης πολλών μεταγραφικών παραγόντων, όπως των Forkhead box M1 (FOXM1), Lim domain only 4 (LM04) και DEP domain containing 1 (DEPDC) και κυρίως του μεταγραφικού παράγοντα LIN9^{61,62}. Ο μεταγραφικός παράγοντας LIN9 ελέγχει την διεκπεραίωση της μίτωσης και υπερκφράζεται στο

66% των τριπλά αρνητικών όγκων. Επίσης, η θεραπεία με JQ1 αναστέλλει την μεταγραφή των aurora kinase A (AURKA) και aurora kinase B (AURKB) που καταλύουν την επιτυχή διαδικασία της μίτωσης⁶³. Τέλος, η αναστολή των BET πρωτεϊνών προσδίδει ένα φαινότυπο «BRCA-μετάλλαξης» στο κύτταρο καθώς παρεμβάλλεται στην πρόσδεση του BRD4 στους εκκινητές των BRCA1 και RAD51 γονιδίων. Η αναστολή αυτή οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, (HR) αλλά και της δημιουργίας μονής έλικας DNA από την πρωτεΐνη BRCA1 κατόπιν βλάβης του DNA⁶⁴. Αυτός ο BRCA-μεταλλαγμένος φαινότυπος δημιουργεί μία ευαισθησία στην θεραπεία με πλατίνα και με PARP αναστολείς. Τέλος, η αναστολή των BET πρωτεϊνών συνδέεται με την καταστολή της απάντησης στην υποξία και της αγγειογένεσης⁶⁵. Συγκεκριμένα, ο αναστολέας JQ1 αναστέλλει την έκφραση πολλών γονιδίων επαγόμενων από την υποξία, όπως του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1, της καρβονικής ανυδράσης 9 (CA9) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF-A)⁶⁵.

Στον καρκίνο ωοθηκών, υπάρχουν ισχυρά δεδομένα για την αντινεοπλασματική δράση των BET αναστολέων. Δεδομένα από κυτταρικές σειρές υποδεικνύουν την *in vitro* δραστηριότητα των BET αναστολέων σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, ακόμα και σε ανθεκτικές στη χημειοθεραπεία σειρές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα από καρκίνο ωοθηκών χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευαισθησία στη θεραπεία με BET αναστολείς από τα καρκινικά κύτταρα άλλων συμπαγών όγκων⁶⁶. Ένας μηχανισμός της αντινεοπλασματικής δράσης των BET αναστολέων στον καρκίνο ωοθηκών είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και η επαγωγή απόπτωσης όπως περιγράφηκε. Η παρατεταμένη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα να υποστούν είτε απόπτωση είτε κυτταρική γήρανση (senescence). Η θεραπεία με BET αναστολείς οδηγεί σε καταστολή των ρυθμιστικών παραγόντων του κυτταρικού κύκλου Cyclin D1 και CDK4/6, αλλά αύξηση των παραγόντων p21 and p16 που αναστέλλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου^{67,68}. Εκτός από την κυτταρική ανάπτυξη, οι BET αναστολείς επηρεάζουν καθολικά και τις άλλες κυτταρικές λειτουργίες στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών. Συγκεκριμένα, η αναστολή των BET πρωτεϊνών επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό μέσω αναστολής του μονοπατιού της αερόβιας γλυκόλυσης⁶⁹. Η εφαρμογή του BET αναστολέα JQ1 οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης και φωσφορυλίωσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης A (LDHA) και άρα της παραγωγής γαλακτικού οξέος⁶⁹. Ακόμη, η BET αναστολή διαταράσσει την απάντηση στο οξειδωτικό στρες. Η θεραπεία με JQ1 σε κυτταρικές σειρές

καρκίνου ωοθηκών οδήγησε σε διαταραχή της φυσιολογικής μιτοχονδριακής λειτουργίας και στρες του ενδοπλασματικού δικτύου όπως φανερώνει η αύξηση των δεικτών ενδοπλασματικού στρες PERK, BiP and Calnexin⁶⁹. Η γλυκόλυση και η απάντηση στο οξειδωτικό στρες είναι ζωτικές λειτουργίες για την επιβίωση του κυττάρου και αποτελούν δύο από τους κύριους μηχανισμούς της κυτταροτοξικότητας των BET αναστολέων. Ένας άλλος μηχανισμός αντινεοπλασματικής δράσης των BET αναστολέων στα κύτταρα καρκίνου ωοθηκών είναι η τροποποίηση μονοπατιών τυροσινικής κινάσης. Ειδικότερα, αυξάνουν την έκφραση κινασών που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια Hippo, RIP και TGF-β, ενώ παράλληλα καταστέλλουν τις κινάσες Aurora A and B που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο⁶⁷.

Η αναστολή των BET πρωτεϊνών οδήγησε στην αναστολή της έκφρασης πολλών ογκογονιδίων με κύριο εκπρόσωπο το MYC που εξαρτάται από την πρωτεΐνη BRD4. Ακόμη και κύτταρα καρκίνου ωοθηκών ανθεκτικά σε χημειοθεραπεία που όμως χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του MYC παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία στην θεραπεία με BET αναστολείς⁷⁰. Η παρατήρηση αυτή είναι πολύ σημαντική δεδομένου ότι ενίσχυση του MYC γονιδίου απαντάται στην πλειονότητα των πρωτοπαθών (74%), μεταστατικών (78%) και υποτροπιάζοντων χημειοανθεκτικών (82%) ωοθηκικών όγκων⁷⁰. Ωστόσο, η καταστολή του γονιδίου MYC δεν παρατηρείται πάντοτε μετά την θεραπεία με BET αναστολείς στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, γεγονός που υποδεικνύει πως επηρεάζεται η έκφραση και άλλων γονιδίων. Άλλα γονίδια που ρυθμίζονται από το BRD4 και αναστέλλονται από BET αναστολείς είναι το E2F1 και το VEGF, όπως προαναφέρθηκε. Σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, η θεραπεία με BET αναστολείς επηρεάζει το ογκογόνο μονοπάτι JAK/STAT μέσω καταστολής των πρωτεϊνών JAK2 και STAT5⁷¹. Ακόμη, η θεραπεία με BET αναστολείς καταστέλλει το μεταγραφικό παράγοντα Forkhead Box M1 (FOXM1) που καταλύει την ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών ενζύμων των βλαβών του DNA DNAPol, POLE2 and BRCA2 αλλά και ρυθμίζει την δομή της χρωματίνης ώστε να καταστεί δυνατή η επιδιόρθωση. Επιπρόσθετα, ο παράγοντας FOXM1 εμπλέκεται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στην G1/S και G2/M μετάβαση μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων σχετιζόμενων με τον κυτταρικό κύκλο όπως η Cyclin B, Cyclin D1, Aurora kinase A και B (AURKA, AURKB) και η polo-like kinase 1 (PLK1). Δεδομένα του TCGA δείχνουν πως υπάρχει τροποποίηση της έκφρασης του FOXM1 στο 87% των περιπτώσεων HGSC. Η θεραπεία με τον BET αναστολέα JQ1 καταστέλλει τόσο τον παράγοντα

FOXM1 αλλά και την έκφραση των γονιδίων-στόχων του Cyclin B, PLK1, AURKA και AURKB σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών⁷².

Ένας τρίτος μηχανισμός αντινεοπλασματικής δράσης των BET αναστολέων στον καρκίνο ωοθηκών είναι το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματινής SWI/SNF που αποτελείται από τις πρωτεΐνες υπομονάδες SMARCA4, SMARCA2, ARID1A, ARID1B, SMARCB1, SMARCC1 and SMARCC2⁵². Το σύμπλοκο SWI/SNF έχει ογκοκατασταλτική δράση μέσω της αλληλεπίδρασής του με σημαντικά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως τα RB, BRCA1, MYC και BRD4. Οι BET αναστολές μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση BRD4 - SWI/SNF σε κύτταρα καρκίνου ωοθηκών και καταστέλλουν την έκφραση των πρωτεϊνών-μελών του συμπλόκου SWI/SNF, συμπεριλαμβανομένων των SMARCC2 and SMARCE1^{52,73}. Μία άλλη υπομονάδα του συμπλόκου SWI/SNF είναι η πρωτεΐνη ARID1A που προσδένεται εκλεκτικά σε περιοχές DNA πλούσιες σε ζεύγη αδενίνης-θυμίνης και έχει ογκοκατασταλτική δράση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο ARID1A απαντώνται έως και στο 46% των διανογocυτταρικών και στο 30% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων ωοθηκών. Η θεραπεία με BET αναστολές αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ARID1A-μεταλλαγμένων διανογocυτταρικών όγκων, αλλά όχι των μη μεταλλαγμένων. Αυτό το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα που έδειξαν μία ευαισθησία στους BET αναστολές εξαρτώμενη από την ύπαρξη ARID1A μετάλλαξης⁷³. Ένας άλλος τρόπος δράσης των BET αναστολέων στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών είναι η καταστολή του ογκογονιδίου Neuregulin 1 (NRG1). Το γονίδιο NRG1 είναι ένας αυξητικός παράγοντας που περιλαμβάνει μία υπομονάδα τύπου epidermal growth factor (EGF) που διεγείρει τον ErbB, κυρίως τον ErbB3 (HER3) στον καρκίνο ωοθηκών. Στον καρκίνο ωοθηκών, υπάρχει υπερέκφραση της NRG1, ιδιαίτερα στον ορώδη ιστολογικό τύπο και η δράση του διαμεσολαβείται από τον ErbB3. Οι BET αναστολές καταστέλλουν την έκφραση της NRG1, ειδικά σε κύτταρα με υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών BRD4 και NRG1⁵². Τέλος, οι BET αναστολές περιορίζουν την μεταστατική ικανότητα των ωοθηκικών καρκινικών κυττάρων και την κυτταρική διασπορά μέσω καταστολής του μονοπατιού STAT3⁶⁸. Η καταστολή της φωσφορυλίωσης του STAT3 οδηγεί σε απενεργοποίηση του STAT3 μονοπατιού και μείωση της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων. Παράλληλα με την καταστολή του STAT3 μονοπατιού, οι BET αναστολές αναστέλλουν την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) μέσω μείωσης της έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin και της αύξησης των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin και των μεταγραφικών παραγόντων Twist and Snail⁷⁴. Η

επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή διαμεσολαβείται από την κυτταροκίνη TGF- β μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής των Twist and Snail. Αυτός ο μεσεγχυματικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία, ιδιαίτερα στην πλατίνα που αποτελεί και τη βασική θεραπεία του καρκίνου ωοθηκών. Ακόμη, οι BET αναστολείς καταστέλλουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9 που είναι απαραίτητες για την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση. Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες διευκολύνουν την προσκόλληση στο περιτόναιο και την μεταστατική ικανότητα των όγκων των ωοθηκών μέσω διάσπασης της φιβρονεκτίνης και της βιτρονεκτίνης της εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Τέλος, ένας ακόμη μηχανισμός αντινεοπλασματικής δράσης των BET αναστολέων είναι η καταστολή της έκφρασης του PD-L1 στα κύτταρα τόσο τα καρκινικά όσο και του ανοσοποιητικού συστήματος⁷⁵. Η έκφραση του γονιδίου D274 που κωδικοποιεί τον συνδέτη PD-L1 καταστέλλεται από την θεραπεία με JQ1 μέσω αναστολής της πρόσδεσης του BRD4 στον CD274 εκκινητή. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώθηκαν και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα εκτός από κυτταρικές σειρές.

Οι BET αναστολείς είναι δραστικά αντινεοπλασματικά φάρμακα ως μονοθεραπεία σε προκλινικές μελέτες και μελέτες φάσης I/II μέσω των προαναφερόμενων μηχανισμών. Ωστόσο, η θεραπεία με BET αναστολείς μπορεί να λειτουργήσει συνεργικά με άλλα νεότερα ογκολογικά φάρμακα στον καρκίνο ωοθηκών. Αρχικά, αυξάνουν την ευαισθησία στους αναστολείς των PARP πρωτεϊνών^{56,64,76}. Συγκεκριμένα, οι BET αναστολείς εμποδίζουν την πρόσδεση των πρωτεϊνών BRD2/3/4 στους υποκινητές των γονιδίων BRCA1 και RAD51 καταστέλλοντας έτσι την μεταγραφή τους. Αυτή η καταστολή των πρωτεϊνών BRCA1 και RAD51 που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) προσδίδει έναν «BRCA-μεταλλαγμένο» φαινότυπο στα καρκινικά κύτταρα που δεν φέρουν BRCA μεταλλάξεις και άρα υψηλότερη ευαισθησία στους PARP αναστολείς. Ακόμη, οι BET αναστολείς καταστέλλουν την μεταγραφή και άλλων γονιδίων, όπως του WEE1 και της πρωτεΐνης 1 πρόσδεσης στην τοποϊσομεράση IIβ (TOPBP1) εκτός από τα γονίδια BRCA1 και RAD51⁷⁶. Η σύγχρονη καταστολή των γονιδίων WEE1 και TOPBP1 στα καρκινικά κύτταρα που δεν φέρουν BRCA μεταλλάξεις από τους BET αναστολείς δημιουργεί ευαισθησία στην θεραπεία με PARP αναστολείς. Η TOPBP1 είναι μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA που λαμβάνει θέση πλησίον του BRCA1 και συμμετέχει στην δημιουργία του RAD51 συμπλόκου σε περίπτωση βλάβης του DNA. Δεδομένα δείχνουν πως ο BET αναστολέας JQ1 δρα συνεργικά με τον PARP αναστολέα Olaparib σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών και ζωικά

μοντέλα χωρίς BRCA μεταλλάξεις μέσω διαταραχής της μετάβασης G2/M και άρα καταστροφής της μίτωσης. Όντως, ο αναστολέας JQ1 μειώνει την έκφραση τόσο του γονιδίου WEE1 όσο και του TOPBP1 *in vitro* και *in vivo* μέσω αναστολής της πρόσδεσης του BRD4 στους αντίστοιχους εκκινητές. Συμπερασματικά, οι BET αναστολείς (JQ1, I-BET762, OTX015) και οι αναστολείς PARP έχουν δείξει συνεργική δράση σε προκλινικές μελέτες τόσο σε κύτταρα με ανεπάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR-deficient) όσο και σε αυτά με επαρκή ομόλογο ανασυνδυασμό (HR-proficient)^{64,76}. Ένα ακόμη αντινεοπλασματικό φάρμακο που δρα συνεργικά με τους BET αναστολείς σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών είναι το αντίσωμα έναντι του HER2 υποδοχέα Lapatinib μέσω αναστολής του μονοπατιού της Neuregulin 1 (NRG1)⁵². Ωστόσο, ο συνδυασμός απέβη πολύ τοξικός σε ζωϊκά μοντέλα. Μία πολύ σημαντική ιδιότητα των BET αναστολέων είναι η δημιουργία ευαισθησίας στην θεραπεία με πλατίνα ακόμη και σε πλατινοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι η καταστολή της αφυδρογονάσης της ακεταλδεϋδης (ALDH) από τους BET αναστολείς, η οποία φυσιολογικά αυξάνεται από τη θεραπεία με σισπλατίνη^{77,78}. Ένας άλλος μηχανισμός αύξησης της ευαισθησίας στην πλατίνα από τους BET αναστολείς μπορεί να είναι η μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2 και Survivin. Η καταστολή του BCL-2 ευαισθητοποιεί εκ νέου χημειοανθεκτικά κύτταρα στην θεραπεία με σισπλατίνη⁷⁹. Τέλος, η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων BRCA1 και RAD51 και άρα της φυσιολογικής λειτουργίας του ομόλογου ανασυνδυασμού που επιφέρουν οι BET αναστολείς οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στην πλατίνα που προκαλεί βλάβες στην διπλή έλικα του DNA. Άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα που δρουν συνεργικά με τους BET αναστολείς είναι οι MEK αναστολείς όπως το Trametinib^{80,81}, οι αναστολείς των Aurora κινασών⁶³ αλλά και άλλοι αναστολείς κινασών όπως ο αναστολέας Ponatinib που στοχεύει πολλές τυροσινικές κινάσες ταυτόχρονα όπως τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF)⁶⁶. Οι μελέτες των BET αναστολέων με άλλους κυτταροτοξικούς παράγοντες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κλινικές μελέτες των ΒΕΤ αναστολέων στον καρκίνο ωοθηκών και σε άλλους συμπαγείς όγκους

ΜΕΛΕΤΗ	ΦΑΣΗ	ΦΑΡΜΑΚΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
NCT05071937	II	ZEN-3694 Talazoparib	Ovarian cancer	Recruiting
NCT04840589	I	ZEN-3694 Nivolumab +/- Ipilimumab	Advanced solid tumors (including platinum-resistant/refractory ovarian cancer)	Recruiting
NCT02711137	I/II	INCB057643 +/- Gemcitabine Paclitaxel Rucaparib Abiraterone Ruxolitinib Azacitidine	Advanced solid tumors and hematologic malignancies (CRPC, BC, HGSC, CRC, Glioblastoma multiforme, Ewing sarcoma, Pancreatic adenocarcinoma, AML, MDS)	Terminated (due to safety issues)
NCT02419417	I/II	BMS-986158 Nivolumab	SCLC, TNBC, Ovarian cancer BRCAwt	Completed
NCT02431260	I/II	INCB054329	CRPC, BC, CRC, Ovarian, Pancreatic, AML, MDS, Lymphoma	Terminated (due to PK variability)
NCT05327010 (ComBET trial)	II	ZEN-3694 Talazoparib	Advanced solid tumors	Recruiting
NCT05252390	I/II	NUV-868 Olaparib Enzalutamide	Ovarian, Pancreatic, TNBC, Prostate cancer	Recruiting
NCT03292172	I	RO6870810 Atezolizumab	Advanced Ovarian Cancer, TNBC	Terminated (due to portfolio prioritization)
NCT01987362	I	RO6870810	Advanced Solid Tumors	Completed
NCT02391480	I	Mivebresib (ABBV-075)	Advanced solid tumors and hematologic malignancies	Completed
NCT02369029	I	BAY1238097	Advanced Malignancies	Completed
NCT02259114	I	Birabresib (MK-8628)	Advanced Solid Tumors	Completed

NCT02698176	I	Birabresib (MK-8628)	NUT Midline Carcinoma (NMC), TNBC, NSCLC, CRPC	Terminated (due to limited efficacy and not due to safety reasons)
NCT01587703	I	Molibresib (GSK525762)	NUT Midline Carcinoma (NMC), TNBC, ER+BC SCLC, CRPC, GIST	Completed
NCT03266159	II	Molibresib (GSK525762) Trametinib	SCLC, Ras-mutated CRC, Ras-mutated NSCLC, Ras pathway activated solid tumors	Withdrawn (to fully evaluate impact of changing practice in target population)
NCT02516553	I	BI 894999	SCLC, CRPC, CRC, NUT midline carcinoma	Recruiting
NCT02683395	I	PLX51107	Advanced Solid tumors and Hematologic malignancies	Terminated (Business Decision)
NCT02630251	I	GSK2820151	Advanced Solid Tumors	Terminated (due to development of another BET Inhibitor GSK525762)
NCT03035591	I/II	ODM-207	Advanced Solid Tumors	Completed
NCT05950464	I	ZEN-3694 M1774 ATR inhibitor	Recurrent Endometrial and Ovarian cancer	Not yet recruiting

III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο προσδιορισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης BRD4 στα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το ασκτικό υγρό ασθενών με προχωρημένο (σταδίου III/IV) υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνο ωοθηκών κατά την διάγνωση. Εν συνεχεία, τα επίπεδα έκφρασης BRD4 θα συσχετιστούν με τα δεδομένα επιβίωσης τόσο ως προς το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) όσο και ως προς τη συνολική επιβίωση (OS).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Συνολικά, έγινε συλλογή ασκитικού υγρού από 28 ασθενείς με υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών (HGSC) είτε κατά την διαγνωστική/θεραπευτική παρακέντηση είτε κατά την λαπαροσκόπηση στο Νοσοκομείο «Γ.Ν.Α.Αλεξάνδρα». Η παρακέντηση της ασκитικής συλλογής έγινε κατά τη διάγνωση δηλαδή πριν οι ασθενείς λάβουν θεραπεία και απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο III/IV. Οι ασθενείς αυτές διεγνώσθησαν με προχωρημένο HGSC στην Γυναικολογική Πτέρυγα του «Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα» και κατόπιν έλαβαν θεραπεία στο Ογκολογικό Τμήμα του «Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα». Όλες οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης για την λήψη και επεξεργασία του βιολογικού υλικού και των προσωπικών τους δεδομένων. Επίσης, το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και του Επιστημονικού Συμβουλίου του «Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα» κατά την 11^η/22.10.2020 Συνεδρίαση (αριθμός 725/14-10-2020). Τέλος, η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

A) Συλλογή του δείγματος

Το ασκитικό υγρό ελήφθη κατόπιν παρακέντησης ασκитικής συλλογής είτε κατά τη διαγνωστική / θεραπευτική παρακέντηση είτε κατά την λαπαροσκόπηση ασθενών με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών σταδίου III/IV που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία. Έγινε απομόνωση ~ 200ml ασκитικού υγρού (τριών δοχείων urobox) το οποίο εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκε με Ficoll για την απομόνωση των μονοκυττάρων (PBMCs). Εν συνεχεία, το ίζημα διατηρήθηκε στους -80 °C. Στο εργαστήριο του Ερευνητικού τμήματος του «ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ» έγινε παραλαβή 28 δειγμάτων ασκитικού υγρού γυναικών που είχαν συλλεχθεί στο διάστημα του έτους 2020 και 2021. Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν σε φιαλίδια κρυοσυντήρησης σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση τους στο χώρο του εργαστηρίου. Όλα τα δείγματα συνοδεύονταν από έντυπο συγκατάθεσης των ασθενών

και έχουν ληφθεί με τήρηση όλων των αρχών δεοντολογίας και βέλτιστης ιατρικής τεχνικής συλλογής και συντήρησης. Κάθε δείγμα μελετήθηκε για την έκφραση των γονιδίων BRD4 και GAPDH με την μέθοδο της RT-qPCR καθώς επίσης και για την μέτρηση της πρωτεΐνης BRD4 με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

B) Απομόνωση ολικού RNA από το ασκитικό υγρό

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα του ασκитικού υγρού χρησιμοποιήθηκε το KIT NucleoSpin RNA Blood (Macherey-Nagel GmbH) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Γ) Αξιολόγηση ποιότητας και ποσότητας ολικού RNA

Ακολούθησε ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση του εκχυλισμένου RNA για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Η ποσοτικοποίηση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φθορισμόμετρου Qubit™ Flex Fluorometer (Invitrogen Ltd., Life Technologies, UK) και του Qubit™ RNA BR Assay kit (Invitrogen Ltd., Thermo Fisher Scientific, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον ποιοτικό έλεγχο του ολικού RNA τα δείγματα υπεβλήθησαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1,2% και εν συνεχεία έγινε χρήση της χρωστικής Midori Green Direct (Nipon Genetics, Europe GmbH). Τα δείγματα που θεωρήθηκαν ότι περιέχουν ακέραιο RNA και δεν έχουν πρόσμιξη με DNA έφεραν δύο ευδιάκριτες ζώνες στις 4500bp και 2000bp που αντιστοιχούν στο 28s και 18s ριβοσωμικό RNA. Σε περιπτώσεις που παρατηρήθηκε η ύπαρξη DNA ακολούθησε ένα δεύτερο βήμα πέψης του DNA με την χρήση του ενζύμου DNase I (Invitrogen Ltd., Thermo Fisher Scientific, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα δείγματα υπεβλήθησαν εκ νέου σε ηλεκτροφόρηση όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση του DNA. Όλα τα δείγματα προχώρησαν στο επόμενο στάδιο προσδιορισμού της έκφρασης γονιδίων στόχων με την μέθοδο one step RT-qPCR.

Δ) One-step RT-qPCR

Με την μέθοδο one step RT-qPCR, προσδιορίστηκε η έκφραση του γονιδίου BRD4 ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Γονίδιο (gene)	Εκκινητής (primer)	Αλληλουχία (sequence 5'→3')	References
BRD4	BRD4_F	CCATGGACATGAGCACAATC	Wu T et al., 2015
	BRD4_R	TGGAGAACATCAATCGGACA	
GAPDH	GAPDH_F	TTCACCACCATGGAGAAGGC	
	GAPDH_R	CCCTTTTGGCTCCACCCT	

Για την ανίχνευση των μεταγράφων των γονιδίων BRD4 και GAPDH χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Cobas Z 480 (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland). Οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X) (KAPA BIOSYSTEMS) που επιτρέπει την μετατροπή του mRNA σε cDNA και την ενίσχυση του παραγόμενου cDNA με PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) σε ένα σωληνάριο αντίδρασης. Η αντίδραση της One-Step RT-qPCR για την ανίχνευση των mRNA των γονιδίων BRD4 και GAPDH πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl για κάθε μετάγραφο αντίστοιχα. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε 75ng ολικού RNA, 200nM από τον κάθε εκκινητή, 5μl μείγματος αντίδρασης (KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X), 0,2mM dUTP και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 10μl. Σε κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αντίστροφης μεταγραφής του mRNA στόχου στους 42°C για 5min. Στην συνέχεια έγινε επώαση του cDNA στους 95°C για 3min και ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 10 sec, υβριδοποίησης στους 60°C για 20 sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 1 sec. Τέλος, η αντίδραση περιλάμβανε ένα τελικό στάδιο κατασκευής καμπύλης τήξης των ενισχυμένων προϊόντων που κυμαίνεται από 65°C έως 97°C. Η συλλογή των αποτελεσμάτων έγινε στους 72°C στα 510nm σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο προσδιορισμός της απόδοσης των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία One-Step RT-qPCR, χρησιμοποιώντας σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις ολικού RNA (75ng – 0.075ng) και με τις συνθήκες που περιγράφηκαν ανωτέρω. Η απόδοση κάθε εκκινητή προσδιορίστηκε στο 100%. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με την μέθοδο DCT: $\Delta Ct = Ct Brd4 - Ct GAPDH$, RQ (Σχετική Ποσοτικοποίηση) = $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Για την αντίδραση One-Step RT-qPCR:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Primer (Forward) 10 μ mol	200nM
Primer (Reverse) 10 μ mol	200nM
dUTP (10mM)	0.2mM
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X	1X
50X KAPA RT Mix	1X
RNA template	75ng
ddH ₂ O	Up to 10 μ l

Ε) Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα ασκитικού υγρού

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από τα δείγματα ασκитικού υγρού χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο λύσης κυττάρων Cell Extraction Buffer (Invitrogen Ltd., Life Technologies, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο για την αναστολή των πρωτεασών (Sigma – Aldrich). Τα δείγματα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου λύσης, φυγοκεντρήθηκαν στις 800rpm και τα κύτταρα πλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα PBS. Εν συνεχεία, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 5ml παγωμένου PBS και φυγοκεντρήθηκαν στις 800rpm.

ΣΤ) Προσδιορισμός πρωτεΐνης BRD4 με την μέθοδο ELISA

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης BRD4 χρησιμοποιήθηκε το KIT Human BRD4 (Bromodomain-containing protein 4 Elisa Kit (Assay Genie)) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Για τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Multiscan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

Ζ) Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές του BRD4 κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες σύμφωνα με τη τριτογενή κατανομή σε χαμηλή, μεσαία και υψηλή έκφραση. Οι καμπύλες επιβίωσης σχεδιάστηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier και οι διαφορές στα ποσοστά επιβίωσης εξετάστηκαν με ανάλυση Log-rank. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο λογισμικού SPSS (version 23) (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Για όλες τις

αναλύσεις, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με p κάτω από το όριο 0,05 ($P < 0.05$). Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν καταγράφηκαν σε μία ηλεκτρονική βάση δεδομένων και περιλαμβάνουν: ηλικία κατά τη διάγνωση, ιστολογικός τύπος, στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση, πρωτογενές (primary) ή δευτερεύον (secondary) χειρουργείο, επίπεδο κυτταρομείωσης κατά το χειρουργείο (debulking), δεδομένα επιβίωσης, νεοεπικουρική/επικουρική θεραπεία, είδος χημειοθεραπείας, είδος θεραπείας συντήρησης, γραμμές θεραπείας κλπ. Το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα σε μήνες από την διάγνωση έως την υποτροπή της νόσου, ενώ το διάστημα συνολικής επιβίωσης (OS) ορίστηκε ως το διάστημα από την διάγνωση έως το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) Χαρακτηριστικά ασθενών

Τα βασικά χαρακτηριστικά των 28 ασθενών που συμπεριελήφθησαν στην μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Μέση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 66 έτη (42-86) ενώ όλες οι γυναίκες είχαν διαγνωσθεί με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών υψηλής κακοήθειας σταδίου FIGO IIIc. Το 36% των ασθενών (10/28) υπεβλήθη σε πρωτογενή κυτταρομείωση (PDS), ενώ η πλειονότητα των ασθενών (43%; 12/28) υπεβλήθησαν σε χειρουργείο ενδιάμεσης κυτταρομείωσης (IDS). Η πλειονότητα των γυναικών ήταν σε καλή γενική κατάσταση (performance status) κλίμακας ECOG 0-1 (89%; 25/28) ενώ μόνο τρεις ασθενείς παρουσίαζαν performance status ECOG 2. Αναφορικά με το μοριακό προφίλ, έγινε έλεγχος για σωματικές μεταλλάξεις BRCA1/2 σε όλες τις γυναίκες και για ανεπάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR-deficiency) στις περισσότερες. Το 78% των ασθενών (22/28) δεν έφερε σωματικές μεταλλάξεις BRCA1/2, ενώ το 18% (5/28) έφερε BRCA1 μετάλλαξη και μία γυναίκα (4%; 1/28) έφερε σωματική μετάλλαξη BRCA2. Όλες οι ασθενείς έλαβαν αρχική θεραπεία (front-line) με το συνδυασμό πακλιταξέλη και καρβοπλατίνη. Η πλειοψηφία των γυναικών έλαβε θεραπεία συντήρησης με PARP αναστολείς (64%; 18/28) μετά την ολοκλήρωση της νέο-/επικουρικής χημειοθεραπείας με πλατίνα, ενώ το 43% (12/28) έλαβε θεραπεία συντήρησης με μπεβασιζουμάμπη (Avastin) είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τον PARP αναστολέα Olaparib κατόπιν των θετικών αποτελεσμάτων της μελέτης φάσης 3 PAOLA-1¹³. Το μέσο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) στην αρχική θεραπεία με πλατίνα ήταν 11 μήνες (1-33). Οι περισσότερες ασθενείς υποτροπίασαν με περιτοναϊκές εμφυτεύσεις (71%; 20/28), με λεμφαδένες (39%; 11/28) και οι υπόλοιπες με ασκτική συλλογή, πλευριτική συλλογή κ.ά.

Πίνακας 2. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών

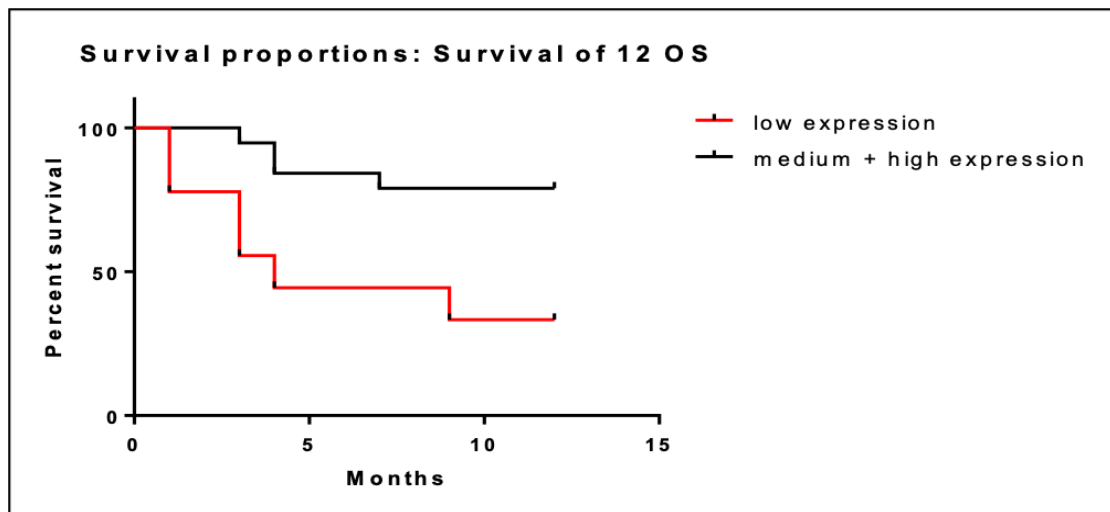
Characteristic	Total N= 28, n (%)
Age at diagnosis, median (range), years	66 (42-86)
Histology	
High-Grade Serous carcinoma	28 (100%)
Other	0 (0)
Initial Stage (FIGO)	
IIIc	28 (100%)
IV	0 (0)
Family History	
Yes	7 (25%)
No	21 (75%)
Debulking Surgery	
Primary Debulking Surgery	10 (36%)
Interval Debulking Surgery	12 (43%)
No surgery	6 (21%)
ECOG Performance status	
0/1	25 (89%)
2/3	3 (11%)
Progression-free survival on first-line chemotherapy, median (range), months	11 (1 – 33)
Sites at relapse	
Peritoneum	20 (71%)
Lymph node	11 (39%)
Mediastinum	0 (0)
Other	7 (25)
Prior bevacizumab treatment	12 (43%)
Prior PARP inhibitor treatment	18 (64%)
BRCA mutations	
BRCA1 somatic	5 (18%)
BRCA2 somatic	1 (4%)
Wild-type	22 (78%)

B) Έκφραση γονιδίου BRD4 και συνολική επιβίωση (OS)

Έγινε κατηγοριοποίηση των ασθενών σε τρεις υποομάδες: σε χαμηλή έκφραση BRD4 (low expression, <0.130), σε μέση έκφραση BRD4 (medium expression, 0,130 – 0,354) και σε υψηλή έκφραση (high expression, 0,354 - 1,56). Στους 12 μήνες, οι ασθενείς (n=9) με χαμηλή έκφραση BRD4 είχαν μέση συνολική επιβίωση 6.3 μήνες (95% CI; 3.3 – 9.3), ενώ οι ασθενείς με μέση/υψηλή έκφραση BRD4 είχαν μέση συνολική επιβίωση 10.4 μήνες (95% CI; 9.0 – 11.8). Τα αντίστοιχα δεδομένα συνολικής επιβίωσης στους 12 μήνες φαίνονται στον Πίνακα 3. Η χαμηλή έκφραση BRD4 σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση στους 12 μήνες συγκριτικά με τη μέση/υψηλή έκφραση BRD4 (95% CI: 1,75 - 30,49; $P = 0,008$). Στην Εικόνα 6 απεικονίζονται οι καμπύλες Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης των δύο υποομάδων στους 12 μήνες.

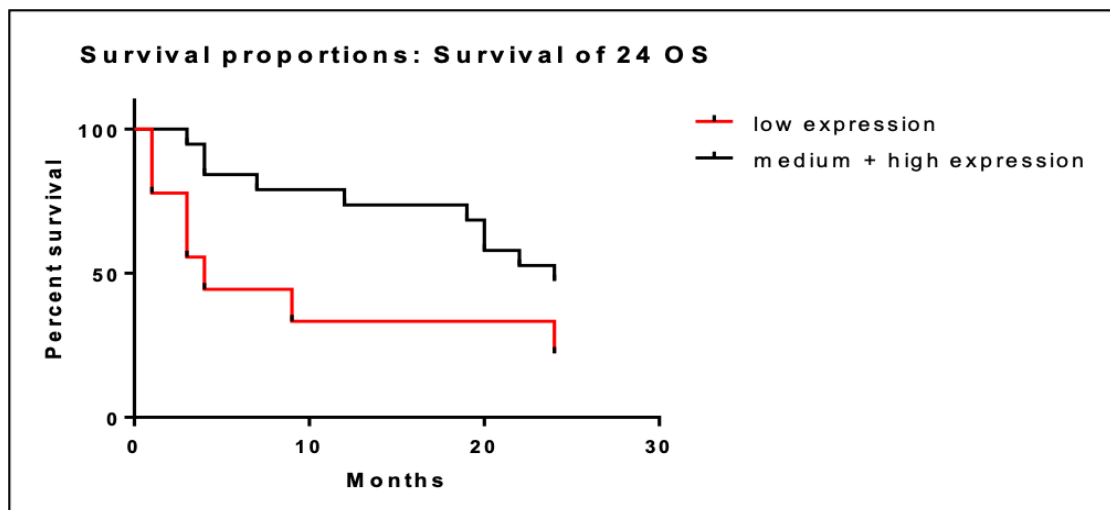
Πίνακας 3. Συνολική επιβίωση στους 12 μήνες ανάλογα με την έκφραση γονιδίου BRD4

Means and Medians for Survival Time								
BRD4	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
low	6,333	1,523	3,347	9,319	4,000	1,491	1,078	6,922
medium	10,421	,719	9,012	11,830				
high								
Overall	9,107	,780	7,579	10,635				



Εικόνα 6. Καμπύλη συνολικής επιβίωσης στους 12 μήνες των ασθενών με χαμηλή έκφραση BRD4 (κόκκινη γραμμή) έναντι των ασθενών με μέση/υψηλή έκφραση (μαύρη γραμμή)

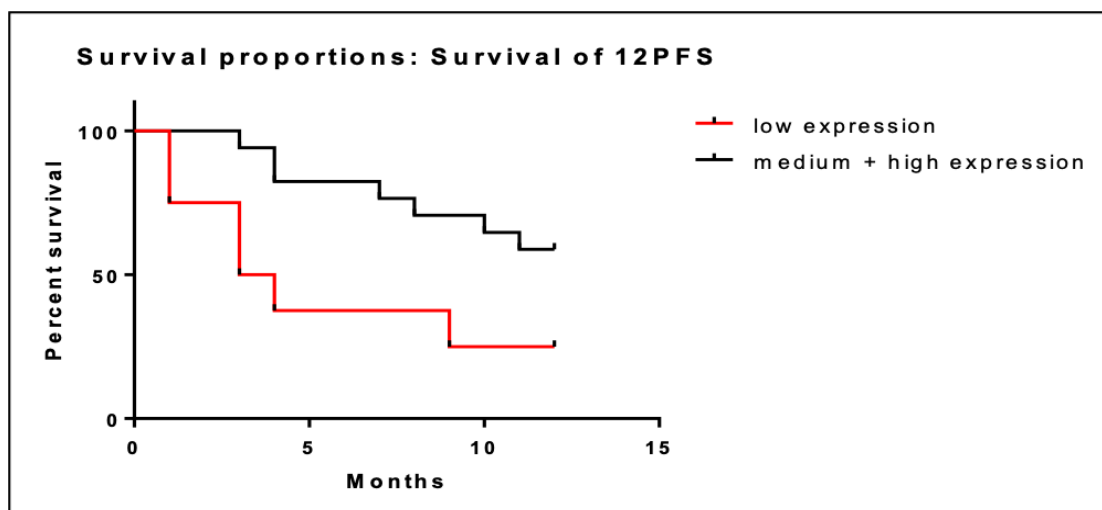
Η ίδια συσχέτιση της έκφραση του γονιδίου BRD4 έγινε και για την συνολική επιβίωση στους 24 μήνες. Στους ασθενείς με χαμηλή έκφραση BRD4 (n=9) η μέση συνολική επιβίωση στα 2 έτη ήταν 10.3 μήνες (95% CI; 3.3 – 17.3) έναντι 18.5 μήνες (95% CI; 14.8 – 22.2) στους ασθενείς με μέση/υψηλή έκφραση BRD4. Και σε αυτή την ανάλυση η χαμηλή έκφραση BRD4 σχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση στα δύο έτη (Εικόνα 7), ωστόσο η σχέση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (95% CI; 0,96 - 9,2; $P = 0,065$).



Εικόνα 7. Καμπύλη συνολικής επιβίωσης στους 24 μήνες των ασθενών με χαμηλή έκφραση BRD4 (κόκκινη γραμμή) έναντι των ασθενών με μέση/υψηλή έκφραση (μαύρη γραμμή)

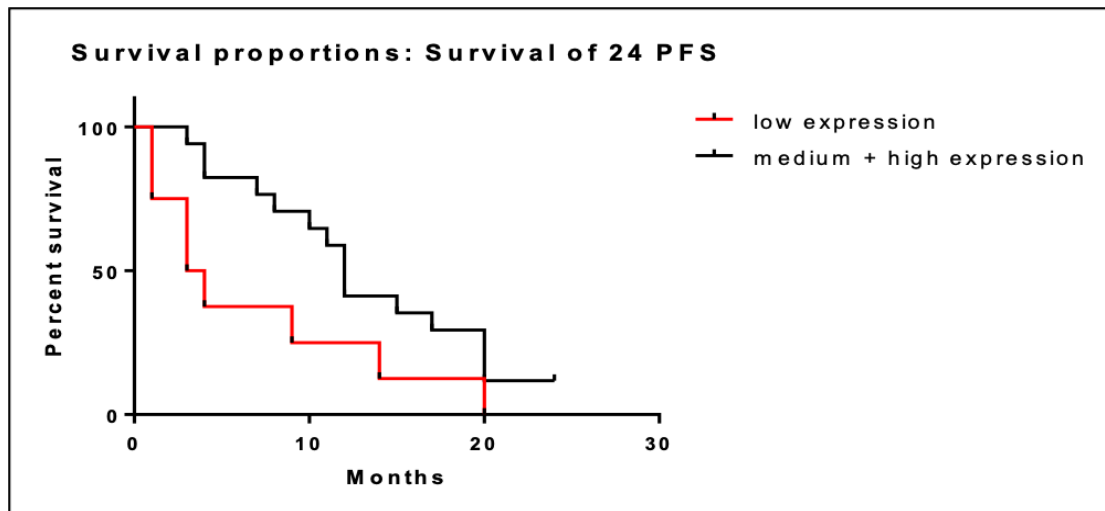
Γ) Έκφραση γονιδίου BRD4 και διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS)

Δεδομένα για το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) διατίθενται για τις 25 ασθενείς. Συνολικά, 8 από τις 25 ασθενείς χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση BRD4 και 17 ασθενείς από μέση/υψηλή έκφραση. Και ως προς το PFS στους 12 μήνες, η χαμηλή έκφραση BRD4 συνδέθηκε με χειρότερη πρόγνωση (5.6 μήνες; 95% CI; 2.6 – 8.6) έναντι της μέσης/υψηλής έκφρασης BRD4 (9.8 μήνες; 95% CI; 8.3 – 11.3). Οι καμπύλες PFS στους 12 μήνες για τις δύο υποομάδες ασθενών απεικονίζονται στην **Εικόνα 8**. Η σχέση της χαμηλής έκφρασης BRD4 με μικρότερο PFS στους 12 μήνες ήταν στατιστικά σημαντική (95% CI; 1,2 - 16,5; $P = 0,03$).



Εικόνα 8. Καμπύλη PFS στους 12 μήνες των ασθενών με χαμηλή έκφραση BRD4 (κόκκινη γραμμή) έναντι των ασθενών με μέση/υψηλή έκφραση (μαύρη γραμμή).

Η ίδια ανάλυση ως προς το PFS πραγματοποιήθηκε στους 24 μήνες. Και στην ανάλυση αυτή, η έκφραση του BRD4 ήταν ανάλογη του PFS στα δύο έτη. Στην χαμηλή έκφραση του BRD4 το μέσο PFS στα δύο έτη ήταν 6.9 μήνες (95% CI; 2.1 – 11.7) έναντι των 13.1 μηνών (95% CI; 10.0 – 16.3) στην μέση/υψηλή έκφραση BRD4. Η συσχέτιση αυτή του PFS στα δύο έτη με την έκφραση BRD4 ήταν στατιστικά σημαντική (95% CI; 1,1 - 8,6; $P = 0,048$). Οι καμπύλες Kaplan-Meier του PFS στα δύο έτη απεικονίζονται στην **Εικόνα 9**.

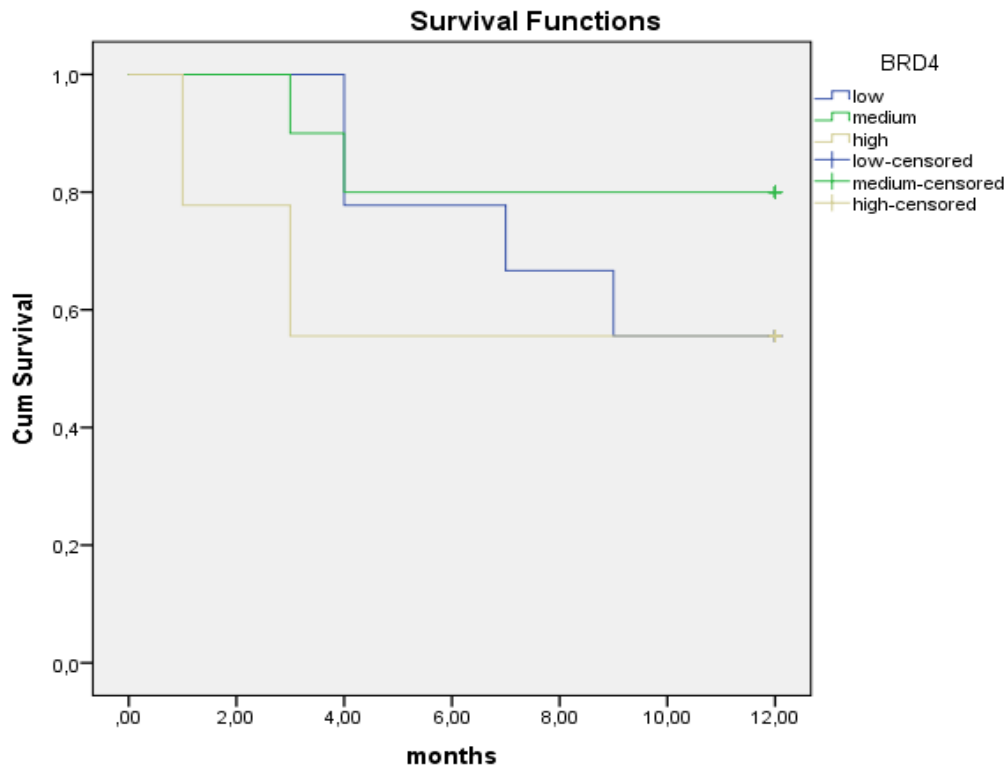


Εικόνα 9. Καμπύλη PFS στους 24 μήνες σε χαμηλή έκφραση BRD4 (κόκκινη γραμμή) έναντι σε μέση/υψηλή έκφραση (μαύρη γραμμή).

Δ) Έκφραση πρωτεΐνης BRD4 και συνολική επιβίωση (OS)

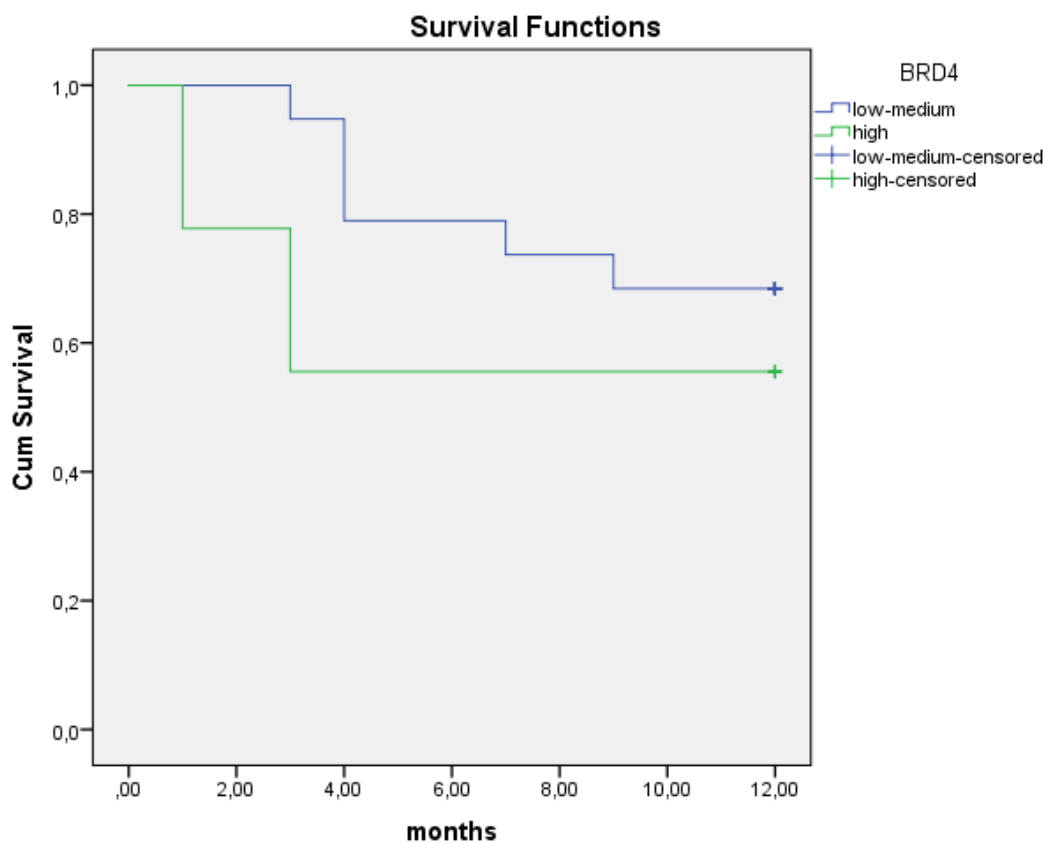
Επαναλάβαμε την ίδια ανάλυση ανάλογα με τα δεδομένα συνολικής επιβίωσης και τα επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 μέσω της μεθόδου ELISA. Η μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης BRD4 όπως αυτή μετρήθηκε με την μέθοδο ήταν 201.4 pg/ml. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν εκ νέου σε τρεις υποομάδες με χαμηλό επίπεδο πρωτεΐνης (low < 102 pg/ml), μέσο επίπεδο (medium: 102 - 323 pg/ml) και υψηλό επίπεδο πρωτεΐνης (high > 323 - 1298).

Στους 12 μήνες, αναλύθηκε η μέση συνολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλή, μέση και υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης BRD4, ωστόσο δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση (Εικόνα 10). Παρατηρήθηκε όμως πως τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 συσχετίστηκαν με χειρότερη πρόγνωση (7.6 μήνες; 95% CI; 4.3 – 10.8) στους 12 μήνες συγκριτικά με τα μέσα επίπεδα (10.3 μήνες; 95% CI; 8.2 – 12.4) και τα χαμηλά επίπεδα (9.3 μήνες; 95% CI; 7.2 – 11.5).



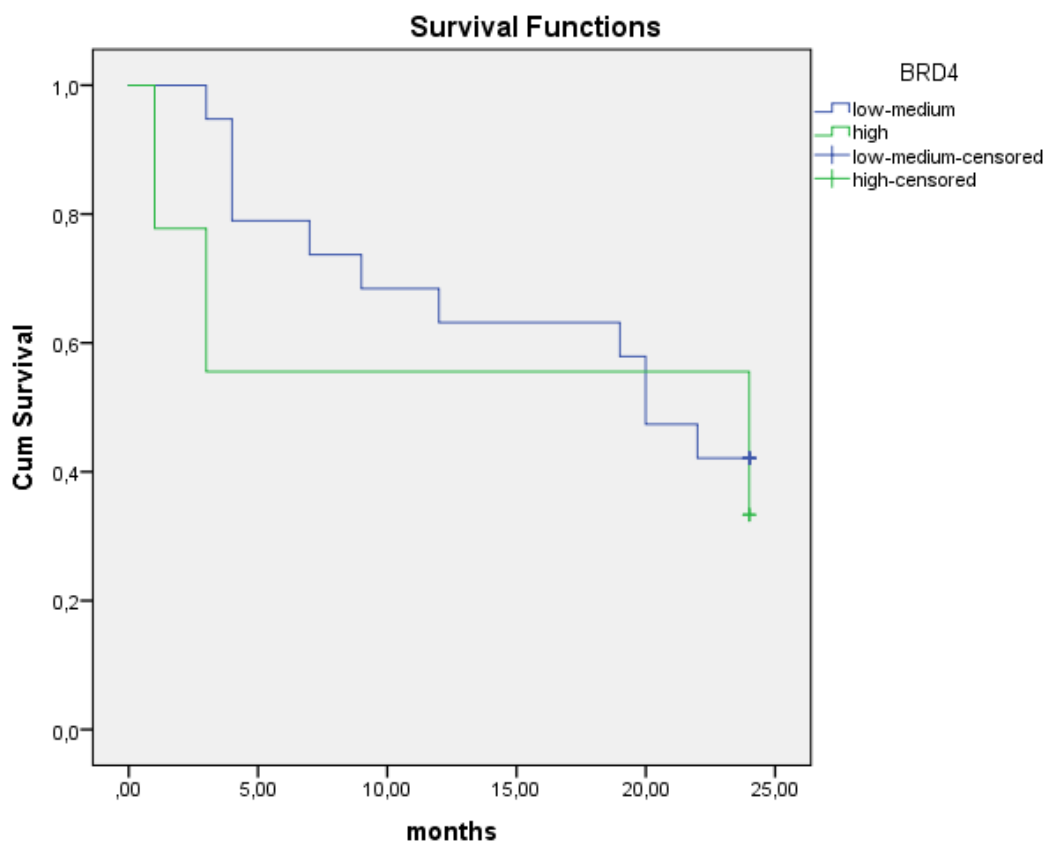
Εικόνα 10. Kaplan-Meier για τη συνολική επιβίωση (OS) στους 12 μήνες σε ασθενείς με χαμηλή (μπλε γραμμή), μέση (πράσινη γραμμή) και υψηλή (κίτρινη γραμμή) έκφραση πρωτεΐνης BRD4

Ως εκ τούτου, προχωρήσαμε στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε δύο ομάδες με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 στην ELISA έναντι μέσα/χαμηλά επίπεδα. Κατά την ανάλυση αυτών των δύο υποομάδων, προέκυψε πως η μέση συνολική επιβίωση στο ένα έτος είναι 9.8 μήνες (95% CI; 8.3 – 11.4) στους ασθενείς με χαμηλή/μέση έκφραση πρωτεΐνης BRD4 έναντι 7.6 μήνες (95% CI; 4.3 – 10.8) στους ασθενείς με υψηλή έκφραση πρωτεΐνης BRD4. Συνεπώς, παρατηρήθηκε μία τάση για χειρότερη πρόγνωση σε υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης BRD4, ωστόσο αυτή η σχέση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0.3$) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Kaplan-Meier καμπύλες για τη συνολική επιβίωση (OS) στους 12 μήνες σε ασθενείς με χαμηλή / μέση (μπλε γραμμή) έναντι υψηλή (πράσινη γραμμή) έκφραση πρωτεΐνης BRD4

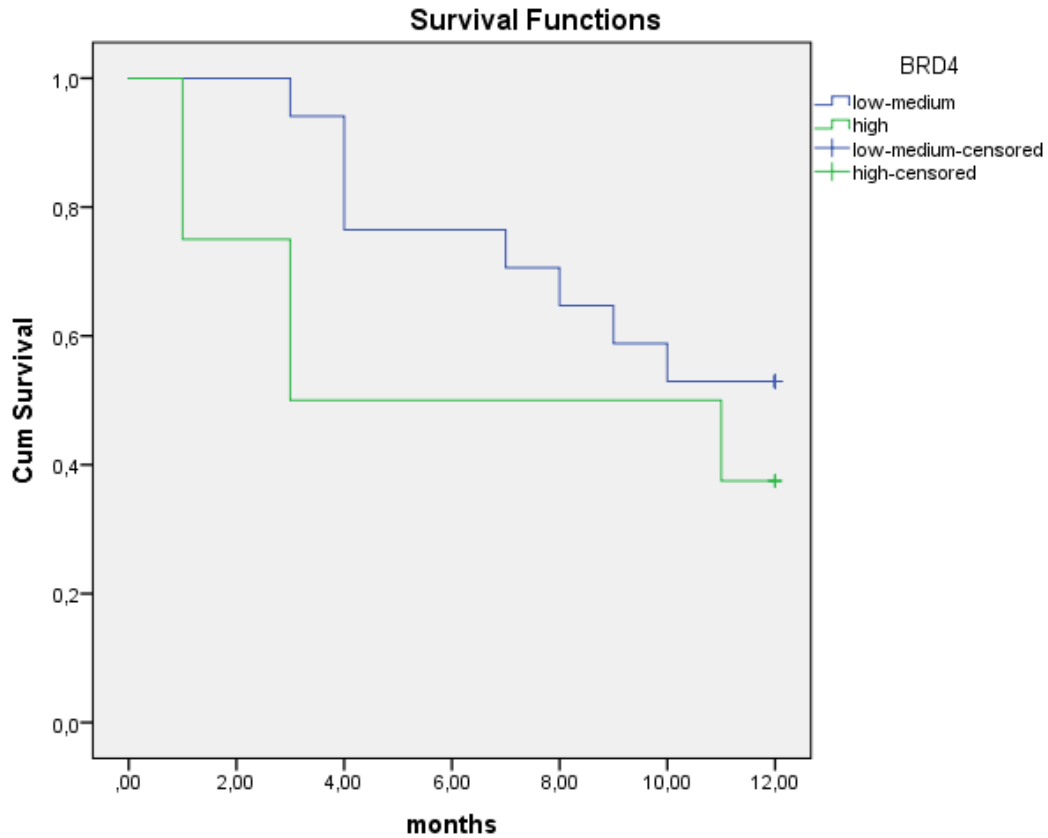
Αντίστοιχη ανάλυση έγινε και για την συνολική επιβίωση στα δύο έτη ανάλογα με την έκφραση της πρωτεΐνης BRD4. Το μέσο OS για την ομάδα ασθενών με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 ήταν 14.2 μήνες (95% CI; 6.4 – 22.1) έναντι 16.6 μήνες (95% CI; 12.9 – 20.4) για τους ασθενείς με μέσα/χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης ($P=0.56$). Και εδώ η συσχέτιση επιπέδων πρωτεΐνης BRD4 και συνολικής επιβίωσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Kaplan-Meier για τη συνολική επιβίωση (OS) στους 24 μήνες σε ασθενείς με χαμηλή/μέση (μπλε γραμμή) έναντι υψηλή (πράσινη γραμμή) έκφραση πρωτεΐνης BRD4

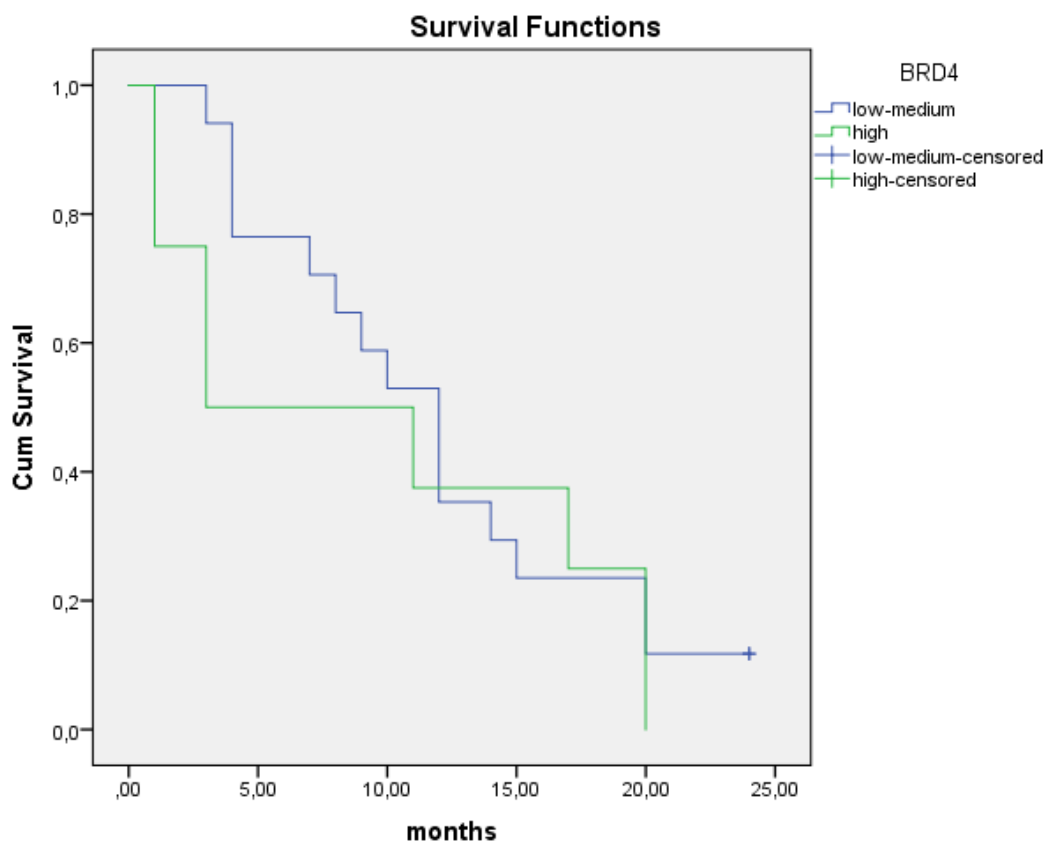
Ε) Έκφραση πρωτεΐνης BRD4 και διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS)

Εν συνεχεία, εξετάσαμε τα επίπεδα της πρωτεΐνης BRD4 σε σχέση με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) στο ένα και στα δύο έτη από τη διάγνωση. Στους 12 μήνες, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 είχαν μέσο PFS 6.9 μήνες (95% CI; 3.5 – 10.3) ενώ σε μέσα/χαμηλά επίπεδα το αντίστοιχο PFS ήταν 9.2 μήνες (95% CI; 7.6 – 10.9) ($P=0.29$). Και εδώ παρατηρήθηκε μία τάση για βραχύτερο PFS σε υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης BRD4, ωστόσο όχι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Kaplan-Meier για το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) στους 12 μήνες σε ασθενείς με χαμηλή/μέση (μπλε γραμμή) έναντι υψηλή (πράσινη γραμμή) έκφραση πρωτεΐνης BRD4

Αντίστοιχα ήταν τα δεδομένα της ανάλυσης του PFS στα δύο έτη ανάλογα με τα διάφορα επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 (Εικόνα 14). Το μέσο PFS ήταν 9.5 μήνες (95% CI; 3.6 – 15.4) σε υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης και 11.9 μήνες (95% CI; 8.7 – 15.1) σε μέσα/χαμηλά επίπεδα ($P=0.47$).



Εικόνα 14. Kaplan-Meier για το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) στους 24 μήνες σε ασθενείς με χαμηλή/μέση (μπλε γραμμή) έναντι υψηλή (πράσινη γραμμή) έκφραση πρωτεΐνης BRD4

ΣΤ) Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου BRD4 και επίπεδα πρωτεΐνης BRD4

Τέλος, εξετάσαμε την σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης BRD4 αναφορικά με την έκφραση του γονιδίου BRD4. Παρατηρήθηκε μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση της έκφρασης του γονιδίου με τα επίπεδα της πρωτεΐνης όπως φαίνεται στην *Εικόνα 15*, ωστόσο η σχέση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0.065$).

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου του αυξημένου ενδιαφέροντος σχετικά με τα μόρια επιγενετικής τροποποίησης και τις BET πρωτεΐνες αλλά και την πρόσφατη ανάπτυξη των BET αναστολέων, η μελέτη της έκφρασης τόσο του γονιδίου του BRD4 που κωδικοποιεί την κύρια BET πρωτεΐνη αλλά και της έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης είναι μεγάλης κλινικής σημασίας. Οι BET πρωτεΐνες που λειτουργούν ως «αναγνώστες» της ακετυλίωσης των καταλοίπων λυσίνης επιστρατεύονται στους ενισχυτές (super-enhancers) ογκογονιδίων και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη BRD4 που αποτελεί την καλύτερα μελετημένη BET πρωτεΐνη ενεργοποιεί έμμεσα την RNA πολυμεράση II και άρα την έναρξη της μεταγραφής πολλών ογκογονιδίων και γονιδίων σημαντικών για ζωτικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων. Φάρμακα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες αυτές, οι BET αναστολείς, αποτελούν μία μεγάλη ομάδα νέων φαρμάκων (I-BET 762, OTX- 015, ABBV-075, I-BET 151) που αναστέλλουν την καρκινογένεση μέσω πολλών μηχανισμών: 1) επάγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση μέσω μείωσης της έκφρασης γονιδίων καταλυτικών για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως τα MYC, BCL2, CDK6, 2) εμποδίζουν την πρόοδο της RNA πολυμεράσης II από τους εκκινητές γονιδίων προς την κωδικοποιούμενη περιοχή και άρα την μεταγραφική διαδικασία, 3) καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων αγγειογένεσης όπως της καρβονικής ανυδράσης 9 (CA9) που εκφράζονται σε συνθήκες υποξίας, 4) αναστέλλουν την μεταγραφή των Aurora κινασών A (AURKA) και B (AURKB) που καταλύουν την επιτυχή διαδικασία της μίτωσης, 5) τροποποιούν μονοπάτια τυροσινικής κινάσης, 6) αναστέλλουν του μονοπάτι της αερόβιας γλυκόλυσης μέσω καταστολής της έκφρασης και φωσφορυλίωσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης A (LDHA), 7) διαταράσσουν την απάντηση στο οξειδωτικό στρες μέσω διαταραχής της φυσιολογικής μιτοχονδριακής λειτουργίας, 8) αναστέλλουν ογκογόνα μονοπάτια όπως το μονοπάτι JAK/STAT, 9) αναστέλλουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον Forkhead Box M1 (FOXM1) που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση επιδιορθωτικών ενζύμων όπως των DNAPol, POLE2 and BRCA2 και τέλος 10) εμποδίζουν την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) μέσω μείωσης της έκφρασης επιθηλιακών δεικτών π.χ. E-cadherin, αύξησης μεσεγχυματικών π.χ. αλλά και καταστολής των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9. Απαραίτητο ωστόσο για να κατανοήσουμε την ποικιλότητα δράση των BET αναστολέων στον καρκίνο ωοθηκών είναι η μελέτη

της λειτουργίας και της έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου τους, της πρωτεΐνης BRD4. Ως εκ τούτου, μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου BRD4 και πως αυτή μεταφράζεται σε πρωτεΐνη σε καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το ασκитικό υγρό ασθενών με προχωρημένο ορώδες καρκίνωμα ωθηκών σταδίου III C που δεν είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία ώστε τα αποτελέσματα να μην έχουν αλλοιωθεί. Από όσο γνωρίζουμε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η μελέτη μας είναι η πρώτη που εξετάζει την έκφραση του BRD4 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από ασκитικό υγρό και όχι σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωθηκών. Η μέθοδος αυτή δημιουργεί μία αναπόφευκτη δυσκολία: αυτή της συλλογής του βιολογικού υλικού αλλά και της επιπρόσθετης διαδικασίας απομόνωσης των κυττάρων και της προσπάθειας συντήρησης του στις βέλτιστες συνθήκες. Η διεξαγωγή της ίδιας μελέτης σε κυτταρικές σειρές θα ήταν ενδεχομένως πιο εύκολη στην υλοποίηση, ωστόσο ενδεχομένως λιγότερο αντιπροσωπευτική ως προς τα αποτελέσματά της. Το ασκитικό υγρό αποτελεί ιδιαίτερο βιολογικό υλικό, πιο δύσκολο στο χειρισμό και στην επεξεργασία από άλλα βιολογικά δείγματα όπως το αίμα. Παράλληλα, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την έκφραση τόσο του γονιδίου του BRD4 όσο και την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή έγινε με σκοπό να αποφύγουμε ενδεχόμενες διαφορές ως προς την παραγωγή πρωτεΐνης από το μετάγραφο του γονιδίου. Τα κύρια αποτελέσματα της μελέτης μας είναι τα εξής:

A) Η χαμηλή έκφραση του γονιδίου BRD4 σχετίζεται με χειρότερη μέση επιβίωση στους 12 μήνες συγκριτικά με τη μέση/υψηλή έκφραση BRD4 (95% CI: 1,75 - 30,49; $P = 0,008$).

B) Η τάση για χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του γονιδίου BRD4 έναντι της μέσης/υψηλής έκφρασης υπήρχε και στα 2 έτη, ωστόσο μη στατιστικά σημαντική (10.3 μήνες έναντι 18.5 μήνες (95% CI; 0,96 - 9,2; $P = 0,065$).

Γ) Τόσο στο ένα έτος όσο και στα δύο έτη, η χαμηλή έκφραση BRD4 συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με μικρότερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS) (95% CI; 1,2 - 16,5; $P = 0,03$) και (95% CI; 1,1 - 8,6; $P = 0,048$) αντίστοιχα.

Δ) Τα επίπεδα της πρωτεΐνης BRD4 δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική σχέση τόσο με το OS όσο και με το PFS είτε στο ένα είτε στα δύο έτη. Ωστόσο, υπήρχε μία τάση για αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων πρωτεΐνης BRD4 και της πρόγνωσης.

Αναφορικά με την έκφραση του γονιδίου BRD4, υπάρχουν δεδομένα που σχετίζουν την υψηλή έκφραση BRD4 με καλό προγνωστικό δείκτη στους συμπαγείς

όγκους⁸² ή αποτυγχάνουν να δείξουν κάποια συσχέτιση⁸³. Παράλληλα, υπάρχουν δεδομένα στον καρκίνο ωοθηκών πως η ενίσχυση του BRD4 μπορεί να συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση^{52,54,57,84}. Αυτή η απόκλιση μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς λόγους. Αρχικά, η ενίσχυση του BRD4 γονιδίου συμβαίνει κυρίως σε όγκους που δεν φέρουν BRCA1/2 μεταλλάξεις, όπως προαναφέρθηκε⁵⁷. Οι ορώδεις όγκοι υψηλής κακοήθειας των ωοθηκών μπορούν να διακριθούν αδρά σε δύο κατηγορίες: στους BRCA-μεταλλαγμένους που χαρακτηρίζονται κυρίως από γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα 3 και 8 και στους BRCA-μη μεταλλαγμένους που φέρουν γονιδιακές ενισχύσεις στο χρωμόσωμα 19, όπως στα γονίδια CCNE1 (19q12), BRD4 (19p13.1) και PAK4 (19q13.2)⁵⁷. Επομένως, για να γίνει σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πρέπει να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη BRCA1/2 μεταλλάξεων που επιφέρει μία πολύ καλύτερη πρόγνωση. Εκτός από τις BRCA1/2 μεταλλάξεις που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν και να αλλοιώσουν τα αποτελέσματά μας, πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν και η ύπαρξη μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια. Επιπρόσθετα, ο προγνωστικός ρόλος της έκφρασης του BRD4 μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η ενίσχυση του γονιδίου BRD4 και η έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης δεν σχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση σε μελέτη 579 ασθενών με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών υψηλής κακοήθειας⁸³. Ωστόσο, η ταυτόχρονη ενίσχυση των γονιδίων CCNE1 και BRD4 σχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση στην αντίστοιχη ομάδα ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε για κανένα γονίδιο μόνο του ανεξάρτητα⁸³. Πράγματι, σε μελέτες που έχουν δείξει πως η υπερέκφραση του BRD4 αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη υπήρχε ταυτόχρονη ενίσχυση του γονιδίου CCNE1^{53,54}. Αυτό υποδηλώνει πως η ενίσχυση άλλων γονιδίων εκτός του BRD4 με προγνωστική σημασία για τον καρκίνο ωοθηκών μπορεί να αλλοιώσει ή/και να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μελέτης και ως εκ τούτου πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Ένας άλλος λόγος που εξηγεί τα αποτελέσματά μας είναι πως το γονίδιο BRD4 κωδικοποιεί δύο ισομορφές, το BRD4 long (BRD4-L) και το BRD4 short (BRD4-S)^{52,85}. Μελέτες έχουν δείξει πως χρειάζεται καλή αναλογία μεταξύ των δύο ισομορφών για να επιτευχθεί η σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των δύο ισομορφών μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στο κύτταρο. Για παράδειγμα, υπάρχουν δεδομένα πως η BRD4-S ισομορφή έχει σχεδόν ταυτόσημη αμινοξυτελική περιοχή με την BRD4-L ωστόσο δεν διαθέτει την C-τελική περιοχή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στα ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών από την BRD4-L και να βρίσκονται σε διαφορετικές

θέσεις μέσα στον πυρήνα⁸⁶. Οι δύο αυτές ισομορφές έχουν διαφορετική δράση όσον αφορά την ανάπτυξη μεταστάσεων: η BRD4-L μειώνει το μεταστατικό δυναμικό ενώ η BRD4-S προάγει την ανάπτυξη μεταστάσεων^{87,88}. Επίσης, οι δύο ισομορφές αναστέλλονται με διαφορετική ισχύ από τους BET αναστολείς με την BRD4-L ισομορφή να αναστέλλεται περισσότερο⁸⁶. Ως εκ τούτου, η θεραπεία με BET αναστολείς μπορεί να αναστείλει ισχυρά την BRD4-L και να προκαλέσει παλίνδρομη αύξηση της έκφρασης της BRD4-S. Συνεπώς, οι δύο ισομορφές BRD4 έχουν συχνά αντίθετες λειτουργίες και προγνωστικό ρόλο στην καρκινογένεση. Για παράδειγμα, η BRD4-S έχει ογκογόνο δράση στον καρκίνο μαστού εν αντιθέσει με την BRD4-L ισομορφή που έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο^{87,89}. Η BRD4-S έχει φανεί πως λειτουργεί σαν αναστολέας του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (DNA damage repair, DDR) καθώς συνδέεται σταθερά στο DNA και εμποδίζει την προσβασιμότητά του από την μηχανή του συστήματος επιδιόρθωσης⁹⁰. Αντίθετα, η ισομορφή BRD4-L προσδένεται σε περιοχές με βλάβη του DNA και λειτουργεί ως υπόστρωμα για την πρόσδεση των DDR πρωτεϊνών. Αυτή η διαφορά μπορεί να αποτελεί μία εξήγηση για τα αποτελέσματα της έρευνας μας καθώς δεν έχει γίνει διάκριση του είδους της ισομορφής της BRD4 πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται. Είναι ουσιώδης η μελέτη της κάθε μίας ανεξάρτητα εκ των δύο ισομορφών της BRD4 πρωτεΐνης στον καρκίνο ωοθηκών και η συσχέτιση τους τόσο με την πρόγνωση όσο και με την ανταπόκριση στην θεραπεία με BET αναστολείς⁹⁰. Τέλος, παρατηρήσαμε μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση της έκφρασης του γονιδίου BRD4 και της πρωτεΐνης. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA της BRD4-L ισομορφής έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης⁹¹. Αντίθετα, η έκφραση του BRD4-S mRNA σχετίζεται ανάλογα με την έκφραση της BRD4-S πρωτεΐνης⁹¹. Συνεπώς, παραμένει αμφίβολη η σχέση των επιπέδων του BRD4 mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης και ίσως εάν υπάρχει αρνητική συσχέτιση να εξηγεί και τα αποτελέσματά μας.

Παράλληλα, αξιοσημείωτη είναι η πληθώρα των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίσταται η πρωτεΐνη BRD4. Αρχικά, η πρωτεΐνη BRD4 υφίσταται ουβικουιτινυλίωση από την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης (Ubiquitin protein ligase) SPOP (Speckle-Typepox protein) που μεταφέρει την ενεργοποιημένη ουβικουιτίνη από το ένζυμο E2 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) προκειμένου να αποικοδομηθεί. Μεταλλάξεις στο γονίδιο SPOP δύνανται είτε να αυξάνουν είτε να μειώνουν την ευαισθησία στη θεραπεία με BET αναστολείς⁹². Η ουβικουιτινυλίωση καθορίζει την σταθερότητα της BRD4 πρωτεΐνης ενώ η συσσώρευση της BRD4 πρωτεΐνης οδηγεί σε αντοχή

στους BET αναστολείς. Αντίστροφα, η πολυουβικουϊνίωση της πρωτεΐνης BRD4 μπορεί να αναστραφεί με την δράση του DUB3 (De-UBiquitinating enzymes), μία ειδικής στην επεξεργασία ουβικουϊνικής πρωτεάσης (ubiquitin specific processing protease 17, USP17)⁹². Το ένζυμο DUB3 συνδέεται στην BRD4 και προκαλεί την απόουβικουϊτινυλίωση και άρα την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Η DUB3 σταθεροποιεί το BRD4 μέσω αποουβικουϊτινυλίωσης και προάγει την καρκινική ανάπτυξη. Άλλη τροποποίηση της πρωτεΐνης του BRD4 αποτελεί η φωσφορυλίωσή της. Η φωσφορυλίωση του BRD4 καταλύεται από το ένζυμο κινάση II της καζεΐνης (CK2) και την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)⁹². Η φωσφορυλίωση της BRD4 πρωτεΐνης καταλύεται σε δύο θέσεις, μία στο N-αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N-terminal phosphorylation site, NPS) και μία στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal phosphorylation site, CPS). Η αμινοτελική υπομονάδα είναι ζωτικής σημασίας για την πρόσδεση του BRD4 στην ακετυλιωμένη ιστόνη και την επιστράτευση μεταγραφικών παραγόντων στα γονίδια-στόχους. Η φωσφορυλίωση της BRD4 από την CK2 αυξάνει στην σταθερότητα και την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης αλλά και προάγει την ογκογόνο δράση της. Ταυτόχρονα, η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 9 (CDK9) προσδένεται στην πρωτεΐνη BRD4 μέσω της καρβοξυτελικής υπομονάδας. Η φωσφορυλίωση της BRD4 πρωτεΐνης από την CDK9 κινάση αυξάνεται με την επιστράτευση του παράγοντα P-TEFb από την BRD4 καθώς η CDK9 είναι ετεροδιμερές του P-TEFb. Αντίστροφα, η αποφωσφορυλίωση του BRD4 από την PP2A στην NPS υπομονάδα οδηγεί σε διαταραχή της συσχέτισής της τόσο με την βρωμομονάδα BD2 όσο και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η καταστολή της φωσφατάσης PP2A και η επακόλουθη υπερφωσφορυλίωση του BRD4 μπορεί να επανενεργοποιήσει την έκφραση του MYC και να οδηγήσει σε αντίσταση στους BET αναστολείς⁹². Συνεπώς, η απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου BRD4 από την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αυτών. Όπως παρατηρήσαμε, η έκφραση του γονιδίου BRD4 και της πρωτεΐνης είναι αντιστρόφως ανάλογες και αυτό το φαινόμενο μπορεί δυνητικά να εξηγηθεί από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης BRD4. Ακόμη, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να εξηγήσουν την διαφορά στον προγνωστικό ρόλο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου από τα επίπεδα της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, στον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού η υπερφωσφορυλίωση του BRD4 και όχι η υπερέκφραση έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση ⁹³.

Η μελέτη μας σαφώς χαρακτηρίζεται από κάποιους περιορισμούς. Αρχικά, ο κυριότερος περιορισμός είναι ο μικρός αριθμός των ασθενών. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η συλλογή και η επεξεργασία ασκитικού υγρού αποτελεί μία δύσκολη διαδικασία καθώς το ασκитικό υγρό έχει κάποιες ιδιαιτερότητες ως βιολογικό υλικό. Ακόμη, δεν έχει πραγματοποιηθεί έλεγχος για άλλες μεταλλάξεις που ενδεχομένως επηρεάζουν την πρόγνωση των ασθενών όπως π.χ. μεταλλάξεις σε HRR γονίδια. Ως εκ τούτου, άλλες μεταλλάξεις με πιθανή προγνωστική σημασία δεν έχουν συνυπολογιστεί στην ανάλυση. Τέλος, όλοι οι ασθενείς ήταν ίδιου σταδίου νόσου FIGO IIIc – ακόμη και αν η αντιμετώπιση των ασθενών αυτών είναι η ίδια δεν κατάφεραν όλοι οι ασθενείς να χειρουργηθούν ή να πετύχουν μέγιστη κυτταρομείωση.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Οι ασθενείς με HGSC stHIC με μέση/υψηλή έκφραση του επιγενετικού παράγοντα BRD4 είχαν καλύτερη επιβίωση στους 12 μήνες συγκριτικά με αυτούς με χαμηλή έκφραση
- Παρομοίως, η χαμηλή έκφραση BRD4 σχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση στα δύο έτη ωστόσο μη στατιστικά σημαντική (OS: 10 μήνες έναντι 18.5 μήνες).
- Και ως προς το PFS στους 12 και στους 24 μήνες, η χαμηλή έκφραση BRD4 συνδέθηκε με χειρότερη πρόγνωση με στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P = 0,03$ και $P = 0,048$ αντίστοιχα).
- Αντίστροφα, σε επίπεδο πρωτεΐνης υπήρχε μία τάση για χειρότερη πρόγνωση στους ασθενείς με υψηλή έκφραση πρωτεΐνης BRD4 έναντι αυτούς με μέσα / χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης τόσο ως προς το OS όσο και ως προς το PFS.
- Στους 12 μήνες, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης BRD4 είχαν χειρότερη πρόγνωση (7.6 μήνες (95% CI; 4.3 – 10.8) έναντι 9.8 μήνες (95% CI; 8.3 –11.4)) έστω και αν η σχέση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0.3$). Ομοίως, ανάλογη σχέση παρατηρήθηκε και στα 2 έτη (14.2 μήνες έναντι 16.6 μήνες ($P=0.56$)).
- Κατά τη συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου και της πρωτεΐνης BRD4, παρατηρήθηκε μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση ωστόσο μη στατιστικά σημαντική ($P=0.065$).

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΟΒΑΘΡΟ: Η ακετυλίωση των ιστονών είναι μία από τις κύριες επιγενετικές διεργασίες και καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs), τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) και τις bromodomain and extra-terminal (BET) domain πρωτεΐνες που λειτουργούν ως «αναγνώστες» της ακετυλίωσης. Κύριος εκπρόσωπος αυτής της ομάδας των BET πρωτεϊνών είναι η πρωτεΐνη BRD4 που ρυθμίζει την έκφραση πολλών ογκογονιδίων όπως του MYC, πολλών επιδιορθωτικών γονιδίων του DNA όπως των BRCA1 και RAD51 και είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφής μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα επιμήκυνσης θετικής μεταγραφής b (PTEF-b) και άρα της RNA πολυμεράσης II. Η συμμετοχή αυτή των BET πρωτεϊνών και ιδιαίτερα του BRD4 στην ογκογένεση οδήγησε στην δημιουργία νέων φαρμάκων, των BET αναστολέων που βρίσκονται σε μελέτες φάσης I/II στον καρκίνο ωοθηκών. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση της έκφρασης του BRD4 τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης με την επιβίωση ασθενών με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών υψηλής κακοήθειας προχωρημένου σταδίου.

ΜΕΘΟΔΟΣ: Έγινε συλλογή ασκитικού υγρού από 28 ασθενείς με υψηλής κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών (HGSC) προχωρημένου σταδίου IIIc/IV είτε κατά την διαγνωστική / θεραπευτική παρακέντηση είτε κατά την λαπαροσκόπηση στο Νοσοκομείο «Γ.Ν.Αλεξάνδρα» προ της λήψης θεραπείας. Εν συνεχεία, το ασκитικό υγρό φυγοκεντρήθηκε και αναλύθηκε για έκφραση των γονιδίων BRD4 και GAPDH με την μέθοδο της RT-qPCR καθώς επίσης και για την μέτρηση της πρωτεΐνης BRD4 με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA). Ακολούθως, έγινε συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου και της πρωτεΐνης BRD4 τόσο με τη συνολική επιβίωση όσο και με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου στο ένα και στα δύο έτη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ: Οι ασθενείς με μέση / υψηλή έκφραση του γονιδίου BRD4 παρουσιάζουν καλύτερη μέση συνολική επιβίωση στους 12 μήνες συγκριτικά με την χαμηλή έκφραση (10.4 μήνες (95% CI; 9.0 – 11.8) έναντι 6.3 μήνες (95% CI; 3.3 – 9.3) ($P = 0,008$). Ανάλογη συσχέτιση παρατηρήθηκε και στα δύο έτη ωστόσο μη στατιστικά σημαντική (18.5 μήνες (95% CI; 14.8 – 22.2) έναντι 10.3 μήνες (95% CI; 3.3 – 17.3) ($P = 0,065$). Αναφορικά με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS), η μέση /

υψηλή έκφραση του γονιδίου BRD4 σχετίστηκε με καλύτερη πρόγνωση τόσο στο ένα (9.8 έναντι 5.6 μήνες; $P = 0,03$) όσο και στα δύο έτη (13.1 έναντι 6.9 μήνες; $P = 0,048$). Εν συνεχεία μελετήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης BRD4 και παρατηρήθηκε η αντίστροφη σχέση. Τα υψηλά επίπεδα BRD4 στην ELISA σχετίστηκαν μη σημαντικά με χειρότερη πρόγνωση στο ένα ($P=0.3$) και στα δύο έτη ($P=0.56$). Αξίζει να σημειωθεί πως η έκφραση του γονιδίου BRD4 φαίνεται να έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η μέση / υψηλή έκφραση του γονιδίου BRD4 συνδέεται με καλύτερη επιβίωση στους ασθενείς με HGSC προχωρημένου σταδίου. Αντίστροφα, σε επίπεδο πρωτεΐνης η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης BRD4 φάνηκε να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τη μέση / χαμηλή έκφραση. Η έκφραση του BRD4 είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης είτε σε επίπεδο γονιδίου φαίνεται πως σχετίζεται με την πρόγνωση και μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο με τους BET αναστολείς.

VII. ABSTRACT

BACKGROUND: Histone acetylation is one of the main epigenetic modifications and is mediated by histone acetyltransferases (HATs), histone deacetylases (HDACs) and bromodomain and extra-terminal (BET) domain proteins that serve as the ‘readers’ of DNA acetylation. BRD4 is the most thoroughly studied member of BET protein family that regulates the expression of key oncogenes including MYC and DNA repair genes like BRCA1 and RAD51. BRD4 catalyzes the initiation of transcription via recruiting positive transcription elongation factor (PTEF-b) to sites of active transcription and thus indirectly activating RNA PolII. The catalytic role of BET proteins to tumorigenesis led to the development of BET inhibitors that are currently under investigation in Phase I/II clinical trials. The purpose of this study was to investigate the prognostic role of BRD4 gene and protein expression in patients with advanced high grade ovarian carcinoma (HGSC).

METHODS: Ascitic fluid was obtained from 28 patients with HGSC FIGO stage IIIc /IV during diagnostic/therapeutic paracentesis or laparoscopy performed at “Alexandra University Hospital” before the initiation of chemotherapy. Ascitic fluid was centrifuged and analyzed for BRD4 and GAPDH gene expression via RT-qPCR. BRD4 protein level was then quantified via ELISA immunoassay. Kaplan Meier curves were performed to explore the association of BRD4 gene and protein expression with survival in terms of OS and PFS.

RESULTS: Patients with intermediate/high BRD4 gene expression demonstrated better one-year overall survival compared to those with low expression (10.4 months (95% CI; 9.0 – 11.8) versus 6.3 months μήνες (95% CI; 3.3 – 9.3) ($P = 0,008$). The same trend was noted at two-year survival although not statistically significant (18.5 months (95% CI; 14.8 – 22.2) versus 10.3 months (95% CI; 3.3 – 17.3) ($P = 0,065$). In terms of PFS, intermediate/high BRD4 gene expression was associated with a favorable prognosis both at one-year analysis (9.8 versus 5.6 months; $P = 0,03$) and at two years (13.1 versus 6.9 months; $P = 0,048$). In contrast, high BRD4 protein expression was associated with an adverse prognosis at one-year survival ($P=0.3$) and at two-year

survival analysis ($P=0.56$). Of note, BRD4 gene expression was found to be inversely associated to BRD4 protein level although this association was not significant.

CONCLUSION: In conclusion, intermediate/high BRD4 gene expression was associated with better survival in advanced HGSC. In contrast, high BRD4 protein expression was associated to an adverse prognosis compared to intermediate / low protein expression in the same setting. It seems that BRD4 gene and protein expression both correlate to survival in ovarian cancer and are potentially druggable targets with BET inhibitors.

IX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home>. Accessed October 10, 2021.
2. Overland MR, Li Y, Derpinghaus A, et al. Development of the human ovary: Fetal through pubertal ovarian morphology, folliculogenesis and expression of cellular differentiation markers. *Differentiation*. 2023;129:37-59. doi:10.1016/J.DIFF.2022.10.005
3. Baker-Rand H, Edey K. Nonepithelial ovarian cancers. *Obstet Gynaecol*. 2021;23(3):177-186. doi:10.1111/TOG.12755
4. Pathology Outlines - WHO classification. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarytumorwhoclassif.html?callback=in&code=ZTFKNWM2N2ETNTKXMC0ZMTG2LTK1ODQTYTZJYZU0M2UIZTDH&state=7514236e2b094ff38ce366a72f63e200>. Accessed July 13, 2023.
5. Ray-Coquard I, Morice P, Lorusso D, et al. Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:iv1-iv18. doi:10.1093/annonc/mdy001
6. Young RH. Ovarian sex cord-stromal tumours and their mimics. *Pathology*. 2018;50(1):5-15. doi:10.1016/J.PATHOL.2017.09.007
7. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6):vi24-vi32. doi:10.1093/annonc/mdt333
8. Tuna M, Ju Z, Yoshihara K, Amos CI, Tanyi JL, Mills GB. Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers. *Br J Cancer*. 2020;122(3):405-412. doi:10.1038/S41416-019-0654-8
9. Brachova P, Thiel KW, Leslie KK. The Consequence of Oncomorphic TP53 Mutations in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):19257. doi:10.3390/IJMS140919257
10. Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-615. doi:10.1038/nature10166
11. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian

- cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1137. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0714
12. A G-M, B P, I V, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2391-2402.
doi:10.1056/NEJMOA1910962
 13. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-2428.
doi:10.1056/NEJMOA1911361/SUPPL_FILE/NEJMOA1911361_DATA-SHARING.PDF
 14. Molecular Pathology, An Issue of Surgical Pathology Clinics, EBook - Βιβλία Google.
https://books.google.gr/books?id=gH49EAAAQBAJ&pg=PA420&lpg=PA420&dq=mutations+lgsc&source=bl&ots=rPYkFhq5WP&sig=ACfU3U2d0i1ZM7hUsNQZZZX0xjMW4aoBiA&hl=el&sa=X&ved=2ahUKewjDt4OS69f3AhWiSfEDHe_8CJEQ6AF6BAgOEAM#v=onepage&q=mutations lgsc&f=false.
Accessed May 15, 2022.
 15. JD S, RJ K. Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003;17(4):909-925. doi:10.1016/S0889-8588(03)00061-3
 16. O Dzatic-Smiljkovic, M Vasiljevic, M Djukic, R Vugdelic, J Vugdelic. Frequency of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Exp Obs Gynecol* . 2011;38(4):394-398.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268283/>. Accessed November 6, 2021.
 17. RB N. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(1):280-294. doi:10.1067/MOB.2003.408
 18. Babaier A, Ghatage P. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. *Diagnostics.* 2020;10(1). doi:10.3390/DIAGNOSTICS10010052
 19. Costeira F de S, Félix A, Cunha TM. Brenner tumors. *Br J Radiol.* 2022;95(1130):20210687. doi:10.1259/BJR.20210687
 20. Kuhn E, Ayhan A, Shih IM, Seidman JD, Kurman RJ. The pathogenesis of atypical proliferative Brenner tumor: an immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Mod Pathol.* 2014;27(2):231-237.
doi:10.1038/MODPATHOL.2013.142
 21. Boussios S, Karathanasi A, Zakyntinakis-Kyriakou N, et al. Ovarian carcinosarcoma: Current developments and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;134:46-55. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2018.12.006

22. da Silva EM, Fix DJ, Sebastiao APM, et al. Mesonephric and mesonephric-like carcinomas of the female genital tract: molecular characterization including cases with mixed histology and matched metastases. *Mod Pathol* 2021 348. 2021;34(8):1570-1587. doi:10.1038/s41379-021-00799-6
23. RJ K, IeM S. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 2011;42(7):918-931. doi:10.1016/J.HUMPATH.2011.03.003
24. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10022):945. doi:10.1016/S0140-6736(15)01224-6
25. Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO) | Division of Cancer Prevention. <https://prevention.cancer.gov/major-programs/prostate-lung-colorectal-and-ovarian-cancer-screening-trial-plco>. Accessed August 6, 2023.
26. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019;393(10177):1240-1253. doi:10.1016/S0140-6736(18)32552-2
27. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018;319(6):595-606. doi:10.1001/JAMA.2017.21421
28. ESMO Interactive Guidelines. https://interactiveguidelines.esmo.org/esmo-web-app/gl_toc/index.php?GL_id=83. Accessed August 9, 2023.
29. DOUBENI CA, DOUBENI ARB, MYERS AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*. 2016;93(11):937-944. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2016/0601/p937.html>. Accessed August 11, 2023.
30. NCCN Guidelines - Ovarian Cancer/Fallopian Tube Cancer/Primary Peritoneal Cancer. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1453>. Accessed August 6, 2023.
31. IOTA Simple Rules and SRrisk calculator to diagnose ovarian cancer | Iota Group. <https://www.iotagroup.org/research/iota-models-software/iota-simple-rules-and-srrisk-calculator-diagnose-ovarian-cancer>. Accessed August 12, 2023.
32. Chen J, Bae E, Zhang L, et al. Penetrance of Breast and Ovarian Cancer in

- Women Who Carry a BRCA1/2 Mutation and Do Not Use Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy: An Updated Meta-Analysis. *JNCI cancer Spectr.* 2020;4(4). doi:10.1093/JNCICS/PKAA029
33. Hereditary Syndromes | ESMO. <https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/hereditary-syndromes/risk-reduction-screening-hereditary-breast-ovarian-cancer-syndromes>. Accessed August 9, 2023.
 34. Yang Y, Zhang M, Wang Y. The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Cent.* 2022;2(4):277-290. doi:10.1016/J.JNCC.2022.09.002
 35. Zhao Z, Shilatifard A. Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol* 2019 201. 2019;20(1):1-16. doi:10.1186/S13059-019-1870-5
 36. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 2016;32(1):42-56. doi:10.1016/J.TIG.2015.10.007
 37. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011 213. 2011;21(3):381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
 38. Murr R. Interplay Between Different Epigenetic Modifications and Mechanisms. *Adv Genet.* 2010;70(C):101-141. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60005-8
 39. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Adv Genet.* 2010;70(C):27-56. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
 40. Gokul G, Khosla S. DNA methylation and cancer. *Subcell Biochem.* 2013;61:597-625. doi:10.1007/978-94-007-4525-4_26/COVER
 41. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nat* 1983 3015895. 1983;301(5895):89-92. doi:10.1038/301089a0
 42. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell.* 2012;150(1):12-27. doi:10.1016/J.CELL.2012.06.013
 43. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol.* 2016;937:3-17. doi:10.1007/978-3-319-42059-2_1
 44. Saw PE, Xu X, Chen J, Song EW. Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology. *Sci China Life Sci.* 2021;64(1):22-50. doi:10.1007/S11427-020-1700-9/METRICS

45. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: Epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(5):337-356. doi:10.1038/nrd4286
46. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature.* 2010;468(7327):1067-1073. doi:10.1038/nature09504
47. Chaidos A, Caputo V, Karadimitris A. Inhibition of bromodomain and extra-terminal proteins (BET) as a potential therapeutic approach in haematological malignancies: Emerging preclinical and clinical evidence. *Ther Adv Hematol.* 2015;6(3):128-141. doi:10.1177/2040620715576662
48. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell.* 2013;153(2):320-334. doi:10.1016/j.cell.2013.03.036
49. Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, et al. The Brd4 Extraterminal Domain Confers Transcription Activation Independent of pTEFb by Recruiting Multiple Proteins, Including NSD3. *Mol Cell Biol.* 2011;31(13):2641-2652. doi:10.1128/mcb.01341-10
50. Andrikopoulou A, Liontos M, Koutsoukos K, Dimopoulos MA, Zagouri F. The emerging role of BET inhibitors in breast cancer. *Breast Off J Eur Soc Mastology.* 2020;53:152. doi:10.1016/J.BREAST.2020.08.005
51. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, et al. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell.* 2015;163(2):506-519. doi:10.1016/j.cell.2015.09.033
52. Rhyasen GW, Yao Y, Zhang J, et al. BRD4 amplification facilitates an oncogenic gene expression program in high-grade serous ovarian cancer and confers sensitivity to BET inhibitors. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200826. doi:10.1371/journal.pone.0200826
53. Zhang Z, Ma P, Jing Y, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy in ovarian cancer by downregulating foxm1. *Theranostics.* 2016;6(2):219-230. doi:10.7150/thno.13178
54. UCAR D, LIN DI. Amplification of the bromodomain-containing protein 4 gene in ovarian high-grade serous carcinoma is associated with worse prognosis and survival. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(6):1291-1294. doi:10.3892/mco.2015.622
55. Jones D, Lin D. Amplification of the NSD3-BRD4-CHD8 pathway in pelvic high-grade serous carcinomas of tubo-ovarian and endometrial origin. *Mol Clin*

- Oncol.* 2017;7(2):301. doi:10.3892/mco.2017.1289
56. Wilson AJ, Stubbs M, Liu P, Ruggeri B, Khabele D. The BET inhibitor INCB054329 reduces homologous recombination efficiency and augments PARP inhibitor activity in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;149(3):575-584. doi:10.1016/j.ygyno.2018.03.049
 57. Goundiam O, Gestraud P, Popova T, et al. Histo-genomic stratification reveals the frequent amplification/overexpression of *CCNE 1* and *BRD 4* genes in non-BRCAness high grade ovarian carcinoma. *Int J Cancer.* 2015;137(8):1890-1900. doi:10.1002/ijc.29568
 58. Sengupta S, Biarnes MC, Clarke R, Jordan VC. Inhibition of BET proteins impairs estrogen-mediated growth and transcription in breast cancers by pausing RNA polymerase advancement. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;150(2):265-278. doi:10.1007/s10549-015-3319-1
 59. Nagarajan S, Hossan T, Alawi M, et al. Bromodomain Protein BRD4 Is Required for Estrogen Receptor-Dependent Enhancer Activation and Gene Transcription. *Cell Rep.* 2014;8(2):460-469. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.016
 60. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell.* 2011;146(6):904-917. doi:10.1016/j.cell.2011.08.017
 61. Pérez-Peña J, Serrano-Heras G, Montero JC, Corrales-Sánchez V, Pandiella A, Ocaña A. In silico analysis guides selection of BET Inhibitors for triple-negative breast cancer treatment. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(8):1823-1833. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0004
 62. Sahni JM, Gayle SS, Webb BM, et al. Mitotic vulnerability in triple-negative breast cancer associated with LIN9 is targetable with BET inhibitors. *Cancer Res.* 2017;77(19):5395-5408. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1571
 63. Sahni JM, Gayle SS, Bonk KLW, et al. Bromodomain and extraterminal protein inhibition blocks growth of triple-negative breast cancers through the suppression of Aurora kinases. *J Biol Chem.* 2016;291(45):23756-23768. doi:10.1074/jbc.M116.738666
 64. Yang L, Zhang Y, Shan W, et al. Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition. *Sci Transl Med.* 2017;9(400). doi:10.1126/scitranslmed.aal1645
 65. Da Motta LL, Ledaki I, Purshouse K, et al. The BET inhibitor JQ1 selectively

- impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer. *Oncogene*. 2017;36(1):122-132.
doi:10.1038/onc.2016.184
66. Bauer K, Berger D, Zielinski CC, Valent P, Grunt TW. Hitting two oncogenic machineries in cancer cells: Cooperative effects of the multi-kinase inhibitor ponatinib and the BET bromodomain blockers JQ1 or dBET1 on human carcinoma cells. *Oncotarget*. 2018;9(41):26491-26506.
doi:10.18632/oncotarget.25474
 67. Kurimchak AM, Shelton C, Duncan KE, et al. Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep*. 2016;16(5):1273-1286. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.091
 68. Liu A, Fan D, Wang Y. The BET bromodomain inhibitor i-BET151 impairs ovarian cancer metastasis and improves antitumor immunity. *Cell Tissue Res*. 2018;374(3):577-585. doi:10.1007/s00441-018-2906-y
 69. Qiu H, Jackson AL, Kilgore JE, et al. JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6(9):6915-6930.
doi:10.18632/oncotarget.3126
 70. Designed Research; C ADSL, Bonazzoli E, Zammataro L, Performed Research; B SWZ, Bignotti E, Zanotti L. Mutational landscape of primary, metastatic, and recurrent ovarian cancer reveals c-MYC gains as potential target for BET inhibitors. August 2018. doi:10.1073/pnas.1814027116
 71. Bagratuni T, Mavrianou N, Gavalas NG, et al. JQ1 inhibits tumour growth in combination with cisplatin and suppresses JAK/STAT signalling pathway in ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2020;126:125-135.
doi:10.1016/j.ejca.2019.11.017
 72. Momeny M, Eyvani H, Barghi F, et al. Inhibition of bromodomain and extraterminal domain reduces growth and invasive characteristics of chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 2018;29(10):1011-1020. doi:10.1097/CAD.0000000000000681
 73. Berns K, Caumanns JJ, Hijmans EM, et al. ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene*. 2018;37(33):4611-4625. doi:10.1038/s41388-018-0300-6
 74. Teng L, Peng S, Guo H, et al. Conditioned media from human ovarian cancer endothelial progenitor cells induces ovarian cancer cell migration by activating

- epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(11):518-523. doi:10.1038/cgt.2015.45
75. Zhu H, Bengsch F, Svoronos N, et al. BET Bromodomain Inhibition Promotes Anti-tumor Immunity by Suppressing PD-L1 Expression. *Cell Rep.* 2016;16(11):2829-2837. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.032
 76. Karakashev S, Zhu H, Yokoyama Y, et al. BET Bromodomain Inhibition Synergizes with PARP Inhibitor in Epithelial Ovarian Cancer. *Cell Rep.* 2017;21(12):3398-3405. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.095
 77. Yokoyama Y, Zhu H, Lee JH, et al. BET inhibitors suppress ALDH activity by targeting ALDH1A1 super-enhancer in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2016;76(21):6320-6330. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0854
 78. Landen CN, Goodman B, Katre AA, et al. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(12):3186-3199. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0563
 79. Dai Y, Jin S, Li X, Wang D. The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017;8(1):1354-1368. doi:10.18632/oncotarget.13817
 80. Jing Y, Zhang Z, Ma P, et al. Concomitant BET and MAPK blockade for effective treatment of ovarian cancer. *Oncotarget.* 2016;7(3):2545-2554. doi:10.18632/oncotarget.6309
 81. Kurimchak AM, Shelton C, Herrera-Montavez C, Duncan KE, Chernoff J, Duncan JS. Intrinsic resistance to MEK inhibition through BET protein-mediated kinome reprogramming in NF1-deficient ovarian cancer. *Mol Cancer Res.* 2019;17(8):1721-1734. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-1332
 82. Suzuki C, Yamada A, Adachi S, et al. Bromodomain-containing Protein 4 Is a Favourable Prognostic Factor in Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2021;41(7):3597-3606. doi:10.21873/ANTICANRES.15148
 83. Petersen S, Wilson AJ, Hirst J, et al. CCNE1 and BRD4 co-amplification in high-grade serous ovarian cancer is associated with poor clinical outcomes. *Gynecol Oncol.* 2020;157(2):405. doi:10.1016/J.YGYNO.2020.01.038
 84. Sung CO, Song IH, Sohn I. A distinctive ovarian cancer molecular subgroup characterized by poor prognosis and somatic focal copy number amplifications at chromosome 19. *Gynecol Oncol.* 2014;132(2):343-350. doi:10.1016/J.YGYNO.2013.11.036

85. Wu SY, Lee CF, Lai HT, et al. Opposing Functions of BRD4 Isoforms in Breast Cancer. *Mol Cell*. 2020;78(6):1114-1132.e10.
doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.04.034
86. Alsarraj J, Faraji F, Geiger TR, et al. BRD4 Short Isoform Interacts with RRP1B, SIPA1 and Components of the LINC Complex at the Inner Face of the Nuclear Membrane. *PLoS One*. 2013;8(11):e80746.
doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0080746
87. Crawford NPS, Alsarraj J, Lukes L, et al. Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(17):6380.
doi:10.1073/PNAS.0710331105
88. Alsarraj J, Walker RC, Webster JD, et al. Deletion of the proline-rich region of the murine metastasis susceptibility gene Brd4 promotes epithelial-to-mesenchymal transition- and stem cell-like conversion. *Cancer Res*. 2011;71(8):3121-3131. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4417
89. Fernandez P, Scaffidi P, Markert E, Lee JH, Rane S, Misteli T. Transformation resistance in a premature aging disorder identifies a tumor-protective function of BRD4. *Cell Rep*. 2014;9(1):248-260. doi:10.1016/J.CELREP.2014.08.069
90. Drumond-Bock AL, Bieniasz M. The role of distinct BRD4 isoforms and their contribution to high-grade serous ovarian carcinoma pathogenesis. *Mol Cancer*. 2021;20(1):145. doi:10.1186/S12943-021-01424-5
91. Ana Luiza D-B, Luyao W, Lin W, et al. Increased expression of BRD4 isoforms long (BRD4-L) and short (BRD4-S) promotes chemotherapy resistance in high-grade serous ovarian carcinoma. *Genes Cancer*. 2023;14:56-76.
doi:10.18632/GENESANDCANCER.233
92. Liu N, Ling R, Tang X, Yu Y, Zhou Y, Chen D. Post-Translational Modifications of BRD4: Therapeutic Targets for Tumor. *Front Oncol*. 2022;12:1. doi:10.3389/FONC.2022.847701
93. Sanz-álvarez M, Cristóbal I, Luque M, et al. Expression of Phosphorylated BRD4 Is Markedly Associated with the Activation Status of the PP2A Pathway and Shows a Strong Prognostic Value in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1-11. doi:10.3390/CANCERS13061246