



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΠΜΣ

ΣΤ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μεταβολές της δομής της χρωματίνης στον καρκίνο νεφρού»

Όν/μο: ΚΑΒΟΥΡΑΚΗΣ Ι. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Αρ. μητρώου: 20130598

Ιδιότητα: ΦΟΙΤΗΤΗΣ ΠΜΣ

Επιβλέπων ΜΔΕ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π. ΚΟΡΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:
Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση και Έρευνα»**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Π. ΚΟΡΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Χ. ΓΑΚΙΟΠΟΥΛΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Ι. ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ	ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΕΔΙΠ

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Στη μνήμη του πατέρα μου.

Στη μητέρα μου.

Στη μνήμη του αδερφού μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες στη Βιολόγο κα Ιωάννα Γιαννοπούλου, στην Καθηγήτρια κα Χαρά Γακιοπούλου και στην Καθηγήτρια κα Κορκολοπούλου Πηνελόπη για την επίβλεψη, διόρθωση και συνολική επιμέλεια της εργασίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
ABSTRACT	14
Εισαγωγή	15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ – ΙΣΤΟΝΕΣ – ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΑ 18	18
1.1. Οργάνωση της χρωματίνης και έκφραση γονιδίων	18
1.2. Η χρωματίνη στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου	19
1.3. Το νουκλεόσωμα	20
1.4. Εξελικτική διατήρηση των ιστονών	22
1.5. Συμπύκνωση του DNA	22
1.6. Δομή της χρωματίνης και έναρξη της μεταγραφής	25
1.7. Μη ιστόνες πρωτεΐνες	27
1.8. Μηχανισμοί δράσης των ATP-εξαρτώμενων συμπλόκων	28
2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	31
2.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	31
2.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	31
Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στη δομή	31
του γενετικού υλικού	
Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στην λειτουργία του	33
προϊόντος του γονιδίου	
Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση	34
στη φυσική κατάσταση του οργανισμού	
Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση	34
στην αλληλουχία της πρωτεΐνης	
Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στην κληρονομικότητα	35
2.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	36
2.2.1. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA Μεθυλίωση του DNA	38

2.2.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	40
ΤΟ ΤΟΠΙΟ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ DNA.....	41
2.2.2.1. ΚΥΡΙΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ...	42
Ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστονών.....	42
Μεθυλίωση και απομεθυλίωση ιστονών.....	45
2.2.2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ.....	48
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ	
Αναστολείς αποακετυλασών ιστονών (HIDACis).....	48
Αναστολείς ακετυλοτρανσφερασών ιστονών (HATis).....	49
Αναστολείς μεθυλοτρανσφερασών ιστονών (HMTis).....	49
Αναστολείς απομεθυλασών ιστονών (HDMTis).....	49
2.2.2.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ.....	49
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ	
Φωσφορυλίωση ιστονών.....	50
Ουμπικουτίνωση ιστονών.....	50
Σομοϋλίωση ιστονών.....	50
Άλλες τροποποιήσεις ιστονών.....	50
ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ	50
2.2.2.4. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ..	51
2.2.2.5. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ DNA.	51
ΙΣΤΟΝΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ	

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
--------------------------	-----------

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ	54
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	54
3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	54
3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	55
3.4. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ.....	55
3.5. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ.....	55
3.5.1. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα	55
3.5.2. Τα θηλώδη καρκινώματα.....	56
3.5.3. Τα χρωμόφοβα καρκινώματα	57
3.5.4. Τα ογκοκυτώματα.....	58

3.5.5. Όγκοι των αθροιστικών σωληναρίων	59
3.5.6 Μυελοειδές νεφρικό καρκίνωμα με έλλειψη SMARCB1 (INI-1).....	60
3.5.7. Καρκινώματα σχετιζόμενα με διαμετάθεση.....	61
3.5.8. ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης.....	61
3.5.9. Αταξινόμητα κακοήγη νεοπλάσματα.....	62
3.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ – ΕΚΤΙΜΗΣΗ – ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	62
3.7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	63
4. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	64
ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	
4.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΚΚ	64
4.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ.....	64
ΣΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΝΚΚ	
Το γονίδιο VHL.....	64
Το γονίδιο MET	66
Το γονίδιο FLCN	67
Το γονίδιο FH.....	68
Το γονίδιο SDH	70
Το γονίδια της Οζώδους Σκλήρυνσης (TSC1-TSC2).....	70
Το γονίδιο BAP-1	71
Το γονίδιο MiTF.....	71
Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ	71
ΜΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	
4.1.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ.....	73
ΣΤΟ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΝΚΚ	
4.1.3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ	73
ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	
Το γονίδιο BPRM1.....	73
Το γονίδιο BAP-1	74
Το γονίδιο SETD2	75
4.1.4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ	76
ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΦΥΛΕΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	
Το γονίδιο KDM6A.....	76
Το γονίδιο KDM5C	77

4.1.5. ΠΙΘΑΝΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	78
ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΙΣΤΟΝΩΝ/ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	
4.1.6. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ	79
ΙΣΤΟΝΕΣ ΣΤΟ ΝΚΚ	
4.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ	79
ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΚΚ	
4.2.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	79
4.2.1.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΣ ΝΚΚ	80
Το γονίδιο VHL	80
Το γονίδιο MET	80
Το γονίδιο FH και το γονίδιο Birt-Hogg-Dube γονίδια SDHB	80
Το γονίδιο PTEN	80
Τα γονίδια TSC.....	81
4.2.1.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΝΚΚ.....	81
Το γονίδιο SFRP1 (Secreted Frizzled Related Protein 1).....	82
Το γονίδιο SFRP2 (Secreted Frizzled Related Protein 2).....	83
Το γονίδιο SFRP5 (Secreted Frizzled Related Protein 5).....	83
Το γονίδιο WIF-1 (Wingless type Inhibitor Factor 1).....	84
Το γονίδιο DKK-1	84
Το γονίδιο Rap1GAP	85
Το γονίδιο KILLIN	85
Τα γονίδια miR-9-1 και miR-9-3.....	86
Το γονίδιο GREM1 (GREMLIN-1)	86
Το γονίδιο BTG3	87
Το γονίδιο XAF-1 (XIAPP Associated Factor 1)	87
Το γονίδιο APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1)	88
Το γονίδιο DAPK-1 (Death Associated Protein Kinase 1)	88
Το γονίδιο Nbk/Bik (Natural Born Killer)	89
Το γονίδιο HOXA5 (Homeobox A5).....	89
Το γονίδιο HOXB13.....	89
Το γονίδιο MSH2.....	90
Το γονίδιο DAL. 1/4.1B (Differentially expressed in	91
Adenocarcinoma of the Lung-1)	
Το γονίδιο SPINT2/HAI2 (Serine Peptidase Inhibitor Kunitz type 2) Bikunin..	91
Το γονίδιο γ-catenin/JUP (Junction Plakoglobin)	92

Το γονίδιο TCF21 (Transcription Factor 21).....	92
Το γονίδιο PCDH17 (ProtoCaDHerin 17)	93
Το γονίδιο HIC1 (Hypermethylated in cancer 1).....	93
Το γονίδιο LRRC3B (Leukine Rich Repeat Containing 3B).....	94
Το γονίδιο GATA5	94
Το γονίδιο RASSF1 (Ras Association domain containing protein 1).....	95
Το γονίδιο UNC5C.....	95
Το γονίδιο KRT19.....	96
Το γονίδιο GATA3	96
Το γονίδιο TIMP3 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase - 3)	96
Το γονίδιο TU3A.....	96
Το γονίδιο FHIT (Fragile Histidine Triad).....	97
Το γονίδιο DLK-1 (Delta like-1)	97
Το γονίδιο CX32 (Connexin 32)	98
Το γονίδιο ECAD (E-CADherin)	99
Το γονίδιο VHL (Von Hippel Lindau)	99
Το γονίδιο UQCRH.....	99
Το γονίδιο DACH1.....	100
Τα γονίδια p16INK4a – p14ARF.....	100
Το γονίδιο APC (Adenomatous Polyposis Coli).....	100
Το γονίδιο GSTP1 (Glutathione S Transferase Pi -1).....	101
Το γονίδιο MGMT (O6 Methyl Guanine Methyl Transferase)	101
Το γονίδιο RARβ2	101
Το γονίδιο BLU/ZMYND10 (Zinc finger MYND type containing 10.....	101
Το γονίδιο ABCG2.....	101
4.2.1.3. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ	102
ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
4.2.1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	103
ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΟΥ ΝΚΚ	
Μεθυλίωση του DNA και ογκογένεση στο νεφροκυτταρικό καρκίνο	103
Μεθυλίωση του DNA και μετάσταση του νεφροκυτταρικού καρκίνου	106
4.2.1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	107
ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΝΚΚ	
Μεθυλίωση του DNA και μελλοντικός κίνδυνος για ΝΚΚ – πρόληψη ΝΚΚ... ..	107
Μεθυλίωση του DNA και λήψη δειγμάτων	108

Μεθυλίωση του DNA και μοριακή διάγνωση του ΝΚΚ.....	108
Μεθυλίωση του DNA και ιστολογικοί υπότυποι του ΝΚΚ.....	109
Μεθυλίωση του DNA και πρόγνωση του ΝΚΚ.....	110
Μεθυλίωση του DNA και θεραπεία του ΝΚΚ	112
4.2.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ..	114
4.2.2.1. ΕΝΖΥΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .	115
ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ	
ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΟΥ ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.....	115
και της απόπτωσης στο ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και ρύθμιση της υποξίας στο ΝΚΚ.....	116
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και παθογένεση ΝΚΚ.....	117
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και επιθηλιομεσεγχυματική.....	117
μετατροπή στο ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και εξέλιξη – μετάσταση ΝΚΚ	118
4.2.2.2. ΕΝΖΥΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	118
ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ	118
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και κίνδυνος	119
ανάπτυξης-πρόληψη ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και διάγνωση	119
– ιστολογικοί υπότυποι ΝΚΚ	
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και πρόγνωση ΝΚΚ	121
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και θεραπεία ΝΚΚ.....	125
Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και αντίσταση.....	125
στα φάρμακα στο ΝΚΚ	
4.2.2.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA.....	125
ΣΤΟ ΝΚΚ	
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ	126
ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	
Η αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταβολισμού και των επιγενετικών....	126
μηχανισμών	
Ο μεταβολισμός και η τροποποίηση της ακετυλίωσης των ιστονών .	126
στο ΝΚΚ	

Ο μεταβολισμός στη διαμόρφωση της μεθυλίωσης του DNA	128
και των ιστονών στο ΝΚΚ.	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Το νουκλεόσωμα.....	18
Εικόνα 2 Μοντέλο των ουρών των ιστονών στο σχηματισμό της ίνας των 30nm.....	20
Εικόνα 3 Έλικα του DNA και οκταμερές ιστονών	21
Εικόνα 4 Δομική οργάνωση του νουκλεοσώματος.....	21
Εικόνα 5 Νουκλεόσωμα και χρωματίνη.....	24
Εικόνα 6 Συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης	26
Εικόνα 7 Περιοχές του DNA όπου τα νουκλεοσώματα ελλείπουν τελείως ή	26
υπάρχουν αλλαγμένα ή αναδιαμορφωμένα νουκλεοσώματα	
Εικόνα 8 Μοντέλο δράσης του συμπλόκου	30
αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF	
Εικόνα 9 Διάφοροι τύποι μεταλλάξεων	32
Εικόνα 10 Συνδυασμός γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών στην ρύθμιση της .	37
σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων	
Εικόνα 11 Περιβαλλοντικοί παράγοντες με επιγενετική επίδραση	37
Εικόνα 12 Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης	38
Εικόνα 13 Υπερμεθυλίωση των νησιδίων CpG από την DNA μεθυλτρανσφεράση...	39
Εικόνα 14 Μεθυλίωση της κυτοσίνης	39
Εικόνα 15 Εγγραφείς (writers), διαγραφείς (erasers)	41
και αναγνώστες (readers) στην επιγενετική και στην δομή της χρωματίνης	
Εικόνα 16 Εγγραφείς, διαγραφείς και αναγνώστες. Το τοπίο τροποποιήσεων	42
ιστονών και DNA	
Εικόνα 17 Μεταφορά ακετυλικής ομάδας σε αμινοξικό	43
κατάλοιπο λυσίνης ή αργινίνης	
Εικόνα 18 Ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστονών και επίδραση στην δομή.....	43
και λειτουργία της χρωματίνης	
Εικόνα 19 Ανοικτή και κλειστή διάταξη της χρωματίνης.....	45
Εικόνα 20 Θέση και δομή μεθυλιωμένων καταλοίπων.....	46
αμινοξέων σε ουρές ιστονών	

Εικόνα 21	Δομές που συνδέονται με τροποποιημένες ιστόνες	48
Εικόνα 22	Αλληλεπιδράσεις τροποποιήσεων ιστονών	51
Εικόνα 23	Μικροσκοπική εικόνα διαυγοκυτταρικού ΝΚΚ	56
Εικόνα 24	Μακροσκοπική εικόνα διαυγοκυτταρικού ΝΚΚ	56
Εικόνα 25	Θηλώδες ΝΚΚ.....	57
Εικόνα 26	Χρωμόφοβο ΝΚΚ.....	58
Εικόνα 27	Ογκοκύττωμα	58
Εικόνα 28	Όγκος του Bellini	59
Εικόνα 29	Μυελοειδές καρκίνωμα.....	59
Εικόνα 30	Καρκίνωμα σχετιζόμενο με διαμετάθεση	60
Εικόνα 31	ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης.....	62
Εικόνα 32	Η φυσιολογία του μονοπατιού VHL-HIF μαζί με την προτεινόμενη αιτιοπαθογένεια που οδηγεί στο μεταστατικό δκΝΚΚ	68
Εικόνα 33	Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου von Hippel-Lindau	66
Εικόνα 34	Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου Birt-Hogg-Dube	67
Εικόνα 35	Κλινικές εκδηλώσεις κληρονομικής λειομυωμάτωσης και ΝΚΚ	68
Εικόνα 36	Ογκογόνα μονοπάτια των μεταλλάξεων σε FH και SDH	69
Εικόνα 37	Η Γενετική βάση του καρκίνου του νεφρού. Μια μεταβολική νόσος.....	72
Εικόνα 38	Εντόπιση συχνά μεταλλαγμένων ή αρνητικά ρυθμισμένων γονιδίων..... τροποποιητών του επιγενώματος στο δκΝΚΚ	76
Εικόνα 39	Μεθυλιωμένα γονίδια στο νεφροκυτταρικό καρκίνο και η κατανομή τους στο γένωμα	82
Εικόνα 40	Μονοπάτια στο ΝΚΚ τα οποία επηρεάζονται από αλλαγές σε μοριακές σημάνσεις ιστονών, τροποποιήσεις ιστονών ή τους αναστολείς τους	114
Εικόνα 41	Επιγενετική ρύθμιση της ογκογένεσης και προόδου στο ΝΚΚ	130

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο νεφροκυτταρικός καρκίνος αποτελεί το 80-90% των κακοήθων όγκων του νεφρού και συνιστά ποσοστό 3% όλων των καρκίνων των ενηλίκων με περισσότερες από 300.000 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο παγκοσμίως, ενώ εμφανίζει αυξανόμενη επίπτωση και μειούμενη θνητότητα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών. Είναι κακοήθης νεοπλασματική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από ιστοπαθολογική, γενετική και μοριακή ετερογένεια που αντανακλώνται ως ένα βαθμό, στην ταξινόμηση, στην διαστρωμάτωση κινδύνου και στην επιλογή τύπου θεραπείας κυρίως της προχωρημένης νόσου. Είναι γνωστό ότι στην αιτιοπαθογένεια του νεφροκυτταρικού καρκίνου συμβάλλουν γενετικές και επιγενετικές μεταβολές. Οι γενετικές επηρεάζουν την αλληλουχία του DNA ενώ οι επιγενετικές συνιστούν κυρίως χημικές τροποποιήσεις στη χρωματίνη που αλλάζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να επηρεάζουν την αλληλουχία των βάσεων του DNA. Η επιγενετική ρύθμιση στο γένωμα των θηλαστικών γίνεται με τη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και τη γονιδιακή ρύθμιση από μη κωδικά RNAs. Η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών συνιστούν μεταβολές της δομής της χρωματίνης. Η απορρύθμιση ενός ή όλων τους φαίνεται ότι όχι μόνο συμβάλλει στην έναρξη, εξέλιξη, διήθηση και μετάσταση του νεφροκυτταρικού καρκίνου αλλά φαίνεται επίσης ότι αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας τόσο για βιοδείκτες κατάλληλους για πρώιμη διάγνωση, εκτίμηση πρόγνωσης και πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία όσο και στόχο νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Σε αυτή τη μελέτη, η ανάλυση των γενετικών και επιγενετικών μεταβολών της δομής της χρωματίνης στο νεφροκυτταρικό καρκίνο, οδηγεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους αυτές εμπλέκονται στην παθογένεση, εξέλιξη και μετάσταση της νόσου καθώς και την χρήση τους στη διάγνωση, ταξινόμηση, πρόγνωση και θεραπευτική προσέγγιση της νόσου.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ: νεφροκυτταρικός καρκίνος, μεταβολές δομής χρωματίνης

ABSTRACT

Renal cell carcinomas represent about 80-90 percent of all malignant kidney tumors and about 3 percent of all cancers in adults with more than 300.000 new cases each year worldwide. They appear increasing incidence and decreasing mortality during the last 50 years. Renal cell cancer is a malignant neoplastic disease characterized by histopathologic, genetic and molecular heterogeneity which impact to some degree on the classification, risk stratification and choice of therapy, mainly of the advanced disease. It is well known that genetic and epigenetic modifications contribute to the disease pathogenesis. The genetic modifications affect the DNA nucleotide sequence, while the epigenetic ones are mainly chemical changes in histones and DNA which modify the gene expression without affecting the nucleotide sequence of the DNA. The epigenetic regulation in the mammalian genome is achieved by the DNA methylation, the histone modifications and the regulation by non coding RNAs. DNA methylation and histone modifications are chromatin structure alterations. The deregulation of each or all of them appears not only to contribute to the initiation, progress, invasion and metastasis of renal cell cancer but also to be a promising field of research for biomarkers suitable for early detection, evaluation of prognosis and prediction of therapeutic response as well as target of new therapeutic interventions. In this study, we review the genetic and epigenetic modifications of the chromatin structure as they relate to the understanding of the molecular mechanisms implicated in the disease pathogenesis, progress and metastasis, diagnosis, classification, prognosis and therapeutic approach of renal cell cancer.

KEY WORDS : Renal cell cancer, chromatin modifications

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων επιτυγχάνεται με την ορθή έκφραση των γονιδίων, η οποία προϋποθέτει την κατάλληλη αποθήκευση των γενετικών πληροφοριών. Αυτή η αποθήκευση γίνεται στον πυρήνα του κυττάρου με την μορφή της χρωματίνης, η οποία αποτελείται από το DNA και πρωτεΐνες (ιστόνες και μη ιστόνες). Η λειτουργική της υποδιαίρεση σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη, αντικατοπτρίζει τη φάση του κύκλου της ζωής του κυττάρου και το βαθμό λειτουργίας του μεταγραφικού μηχανισμού.

Η δομή της χρωματίνης μπορεί να υποστεί γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις. Οι γενετικές είναι γονιδιακές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δηλαδή μεταβολές των γενετικών πληροφοριών του DNA, ενώ οι επιγενετικές συνιστούν χημικές τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών, χωρίς αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις δηλαδή, μεταβάλλουν το προϊόν του γονιδίου χωρίς αλλαγή στην γενετική πληροφορία, ενώ μπορούν να διατηρηθούν και να κληρονομηθούν από γενιά σε γενιά.

Οι τροποποιήσεις της δομής της χρωματίνης, μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα ενεργοποίηση ή καταστολή της έκφρασης γονιδίων τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια), η σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους (μόρια προσκόλλησης), η απόπτωση, η επιδιόρθωση του DNA και άλλες. Οι μεταβολές αυτές στα προϊόντα των γονιδίων, μπορούν να έχουν σαν συνέπεια την δημιουργία κυττάρων με πλεονέκτημα επιβίωσης, πολλαπλασιασμού, τοπικής διήθησης και μετάστασης, δηλαδή με νεοπλασματικό φαινότυπο, οδηγώντας επομένως στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί την συντριπτική πλειοψηφία των κακοήθων όγκων του οργάνου, εμφανίζει διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση και ποικιλία ιστολογικών υπότυπων με διακριτά μορφολογικά, γενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Οι γενετικές και επιγενετικές μεταβολές στη δομή της χρωματίνης στο νεφροκυτταρικό καρκίνο, οδηγούν σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες ευνοούν την ογκογένεση, την τοπική διήθηση, την εξέλιξη και μετάσταση της νόσου. Επίσης, μπορεί να αποτελέσουν βιοδείκτες κατάλληλους για εκτίμηση μελλοντικού κινδύνου και πρώιμη ανίχνευση της νόσου, μοριακή διάγνωση και καθορισμό ιστολογικών υπότυπων καθώς και για εκτίμηση της πρόγνωσης και της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να συνοψίσει τις γενετικές και επιγενετικές μεταβολές της δομής της χρωματίνης που παρατηρούνται στο νεφροκυτταρικό καρκίνο και να επισημάνει πιθανές εφαρμογές της, τόσο στην έρευνα της αιτιολογίας και της φυσικής ιστορίας της νόσου (ογκογένεση, εξέλιξη, μετάσταση), όσο και στην πρόληψη, διάγνωση και πρόγνωσή

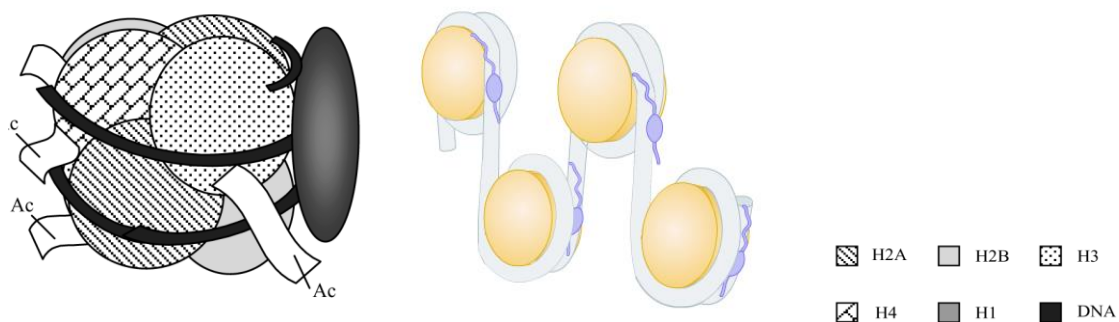
της (μοριακή διάγνωση-καθορισμός ιστολογικού υπότυπου, πρόγνωση, μελλοντικός κίνδυνος.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΙΣΤΟΝΕΣ – ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΑ

1.1. Οργάνωση της χρωματίνης και έκφραση γονιδίων

Κάθε στιγμή στα κύτταρα των θηλαστικών χιλιάδες γονίδια ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται σύμφωνα με μια συγκροτημένη και πολύπλοκη διαδικασία. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων. Εκτός από την ανάγκη για ορθή έκφραση των γονιδίων τα κύτταρα των θηλαστικών αντιμετωπίζουν επίσης την ανάγκη για αποθήκευση των πρωτεϊνών και του DNA στα ενδότερα του πυρήνα. Λύση αυτού του προβλήματος της φύσης είναι η δομή οργάνωσης ανώτερης τάξης (σε σχέση με αυτή του DNA) που καλείται χρωματίνη. Τα βασικά δομικά συστατικά της χρωματίνης είναι τα νουκλεοσώματα που αποτελούνται από 146 ζεύγη βάσεων του DNA. Τα ζεύγη αυτά είναι τυλιγμένα γύρω από ένα οκταμερές που περιέχει 4 ζεύγη από πυρηνικές ιστόνες τις H2A, H2B, H3 και H4 ^{1,2}. (Εικόνες 1 και 4). Τα νουκλεοσώματα βρίσκονται με τη σειρά τους τυλιγμένα με τη βοήθεια της συνδετικής ιστόνης H1 και άλλων πρωτεϊνών σε ένα οργανωμένο νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (Εικόνα1). ³⁻⁵



Εικόνα 1: Το νουκλεόσωμα. Αποτελείται από δύο ζεύγη των πυρηνικών ιστονών H2A, H2B, H3 και H4 και επίσης από 146 ζεύγη βάσεων δίκλωνου DNA τυλιγμένου γύρω από το οκταμερές των ιστονών περίπου 1.75 φορές. Το αμινοτελικό άκρο των ιστονών προβάλλει από το νουκλεόσωμα. Η ιστόνη H1 συνδέεται με το συνδετικό DNA και σταθεροποιεί το χρωμόσωμα. Αριστερά από: He H.& Lehning N.: *Global effects of histone modifications. Briefings in functional genomics and proteomics. VOL.2, No3 234-243, 2003.* Δεξιά από : Watson et al. *Molecular Biology of the Gene. 6th edition.*

Η χρωματίνη μπορεί να διαιρεθεί λειτουργικά σε δύο υποκατηγορίες την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη είναι ένα είδος συμπυκνωμένης χρωματίνης που βρίσκεται για παράδειγμα σε ειδικές χρωματοσωματικές δομές όπως τα κεντρομερή και τα τελομερή. Μόνο το 1,5% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί γονίδια ⁵ και ελάχιστο τμήμα από αυτές τις κωδικεύουσες αλληλουχίες βρίσκεται στην ετεροχρωματίνη. Η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των γονιδίων απαντάται στην ευχρωματίνη που υφίσταται συνεχώς ρυθμιστικές δομικές αλλαγές έτσι ώστε να ενεργοποιηθούν ή να κατασταλούν συγκεκριμένα γονίδια. ⁶⁻⁸

Συνεπώς η έκφραση των γονιδίων δεν περιλαμβάνει απλώς την λειτουργία του συνολικού μεταγραφικού μηχανισμού και συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, αλλά επίσης εξαρτάται από πρωτεΐνες που είναι ικανές να μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης.

1.2. Η χρωματίνη στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Το ευκαρυωτικό DNA είναι ισχυρά συνδεδεμένο με μια ομάδα μικρών βασικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες. Πράγματι, οι ιστόνες (που έχουν εξαιρετικά βασικές ιδιότητες διότι το ένα τέταρτο των αμινοξικών καταλοίπων της κάθε μίας είναι είτε, αργινίνη είτε λυσίνη) αποτελούν το ήμισυ της μάζας ενός ευκαρυωτικού χρωμοσώματος. Το σύμπλεγμα του DNA ενός κυτάρου και των συνδεδεμένων με αυτό πρωτεϊνών ονομάζεται χρωματίνη. ^{9,10}

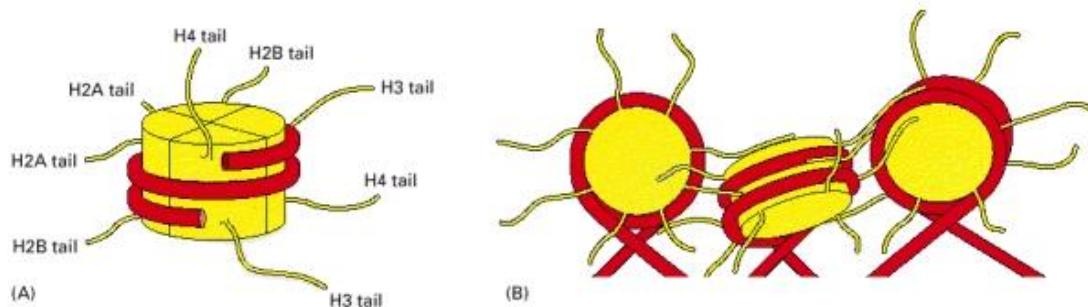
Η χρωματίνη υφίσταται σε διαφορετικές δομές στις διάφορες φάσεις του κύκλου της ζωής ενός κυτάρου. Στους μεσοφασικούς πυρήνες βρίσκεται σε μια πιο χαλαρή κατάσταση. Στην κατάσταση αυτή τα ένζυμα και οι άλλες πρωτεΐνες που απαιτούνται για την έκφραση των γονιδίων και την αντιγραφή του DNA μπορούν να προσπελάσουν το DNA.

Καθώς τα χρωμοσώματα προετοιμάζονται για να εισέλθουν στην μίτωση, η ίνα της χρωματίνης συσπειρώνεται περισσότερο και προσλαμβάνει όλο και πιο συμπαγή δομή μέχρις ότου σχηματισθεί το πολύ συμπυκνωμένο μιτωτικό χρωμόσωμα. Στα μιτωτικά χρωμοσώματα, το DNA έχει ήδη αντιγραφεί και η μεταγραφή έχει σταματήσει. Όπως θα δούμε σε λίγο, η ικανότητα του ευκαρυωτικού κυτάρου να μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης χρησιμοποιείται επίσης κατά τη διάρκεια της μεσόφασης ως ένας μηχανισμός για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων. Προκειμένου να τον κατανοήσουμε είναι

απαραίτητο να διαλευκάνουμε πώς ακριβώς επιτυγχάνεται το «πακετάρισμα» του DNA.^{9,11}

1.3. Το νουκλεόσωμα.

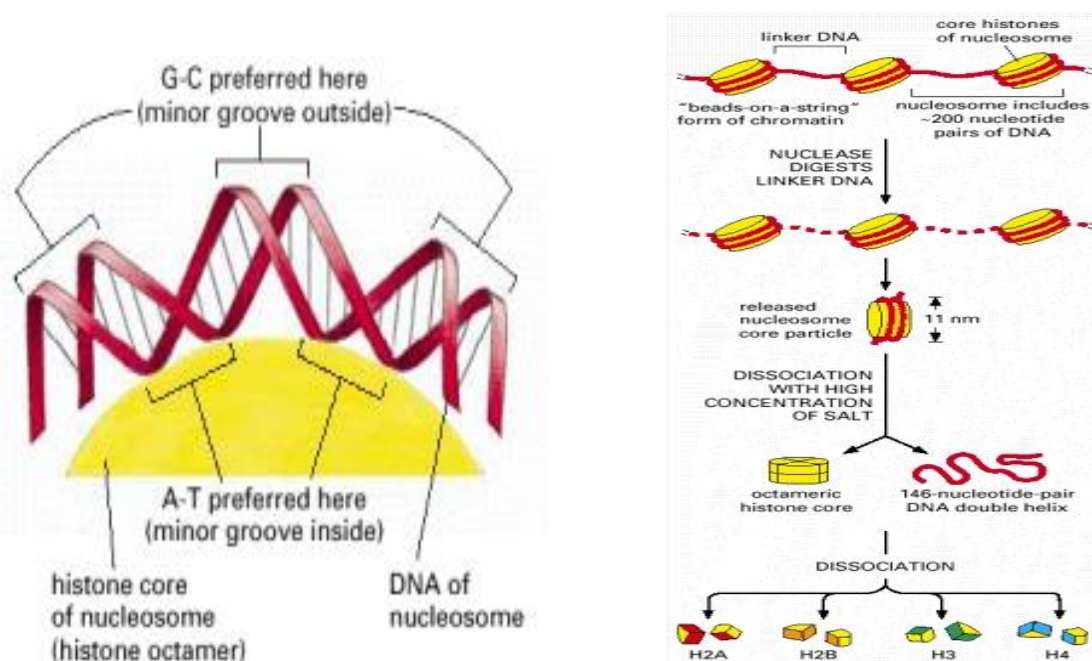
Το πρώτο και βασικό επίπεδο συσπείρωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Οι τέσσερις τύποι ιστονών που αποτελούν τον πρωτεϊνικό πυρήνα του είναι ομόλογοι και παρόμοιοι ως προς τη δομή τους. Οι οκτώ ιστόνες στον πυρήνα είναι διατεταγμένες σε ένα τετραμερές (H3)₂(H4)₂ και ένα ζεύγος διμερών H2A-H2B. Το τετραμερές και τα διμερή συναντώνται για να σχηματίσουν μια αριστερόστροφη υπερσπειρωμένη δομή γύρω από την οποία τυλίγεται το DNA. Επιπλέον, κάθε ιστόνη έχει μια αμινοτελική ουρά, η οποία εκτείνεται έξω από την κεντρική δομή (Εικόνες 1 και 2). Οι ουρές αυτές είναι εύκαμπτες και περιέχουν έναν αριθμό καταλοίπων λυσινών και αργινινών. Όπως θα δούμε, οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις αυτών των ουρών παίζουν ουσιώδη ρόλο στη ρύθμιση της χημικής συγγένειας των ιστονών για το DNA και άλλων ιδιοτήτων.^{9,12}



Εικόνα 2: Μοντέλο των ουρών των ιστονών στο σχηματισμό της ίνας των 30nm. (A) Τα σημεία εξόδου των ουρών των ιστονών από κάθε υπομονάδα, τα οποία προβάλλουν από κάθε νουκλεόσωμα. (B) Υποθετικό μοντέλο το οποίο δείχνει πώς οι ουρές των ιστονών μπορούν να βοηθήσουν το πακετάρισμα των νουκλεοσωμάτων στην ίνα των 30nm. Μοντέλο βασισμένο (1) σε πειραματικές αποδείξεις ότι οι ουρές των ιστονών βοηθούν στο σχηματισμό της ίνας των 30nm, (2) στην κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος, η οποία έδειξε ότι οι ουρές ενός νουκλεοσώματος έρχονται σε επαφή με τον πυρήνα ιστονών γειτονικού χρωμοσώματος και (3) σε αποδείξεις ότι οι ουρές των ιστονών αλληλεπιδρούν με το DNA. Από : *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.

Η χρωματίνη που απεικονίζεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζει την εικόνα χαντρών σε μια κλωστή, με κάθε χάντρα να έχει διάμετρο περίπου 100Å⁰. Ο όρος «νουκλεοσωμάτιο» αναφέρεται σε έναν πυρήνα νουκλεοσώματος μαζί με ένα γειτονικό συνδετικό DNA. Ο σχηματισμός των νουκλεοσωμάτων μετατρέπει ένα μόριο DNA σε μια ίνα χρωματίνης με μήκος ίσο με το ένα τρίτο περίπου του αρχικού μήκους και αποτελεί το

πρώτο στάδιο πακεταρίσματος του DNA. Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες που περιέχουν μεγάλο ποσοστό θετικά φορισμένων αμινοξέων (λυσίνη και αργινίνη). Τα θετικά φορτία βοηθούν τις ιστόνες να συνδεθούν ισχυρά με τον αρνητικά φορισμένο σακχαροφωσφωρικό σκελετό του DNA, άσχετα από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Πάνω στο DNA, τα νουκλεοσωμάτια απέχουν μεταξύ τους περίπου 200 ζεύγη νουκλεοτιδίων (τα 146 από αυτά αντιστοιχούν σε DNA περιελιγμένο γύρω από τον πυρήνα των ιστονών και τα υπόλοιπα στο συνδετικό DNA που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε γειτονικούς πυρήνες νουκλεοσωματίων) (Εικόνα 4, δεξιά). Οι ιστόνες βρίσκονται σε τεράστιες ποσότητες (περίπου 60 εκατομμύρια μόρια κάθε είδους ανά κύτταρο) και η συνολική τους μάζα στην χρωματίνη είναι περίπου ίση με τη μάζα του DNA.^{9,13}



Εικόνα 3 (αριστερά) : Η έλικα του DNA σχηματίζει 1.65 στροφές γύρω από το οκταμερές των ιστονών. Το σχήμα σε κλίμακα, δείχνει πως η ελάχιστη αύλακα του DNA συμπιέζεται στο εσωτερικό της στροφής. Προτιμώμενες θέσεις ζευγών βάσεων (A-T, C-G) στις αύλακες, εσωτερικά και εξωτερικά του οκταμερούς των ιστονών. Από : *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.

Εικόνα 4 (δεξιά) : Δομική οργάνωση του νουκλεοσώματος. Το νουκλεόσωμα περιέχει ένα πρωτεϊνικό πυρήνα που αποτελείται από οκτώ υπομονάδες ιστονών. Το μήκος του DNA που είναι τυλιγμένο γύρω από τον πυρήνα των ιστονών έχει μήκος 146 ζευγών νουκλεοτιδίων, αρκετό για να τον τυλίξει 1.65 φορές. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, ο πρωτεϊνικός πυρήνας απελευθερώνεται από την χρωματίνη μετά από πέψη του συνδετικού DNA από μια νουκλεάση. Από : *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.

Το DNA σχηματίζει μια αριστερόστροφη υπερέλικα, καθώς τυλίγεται γύρω από το εξωτερικό του οκταμερούς των ιστονών. Ο πρωτεϊνικός πυρήνας σχηματίζει επαφές με την εσωτερική επιφάνεια της υπερέλικας σε πολλά σημεία, ιδιαίτερα κατά μήκος του φωσφοδιεστερικού κορμού και της μικρής αύλακας του DNA (Εικόνα 3, αριστερά). Νουκλεοσώματα σχηματίζονται σε όλες σχεδόν τις θέσεις του DNA, αν και μερικές αλληλουχίες προτιμούνται διότι οι αποστάσεις μεταξύ των δινουκλεοτιδίων είναι κατάλληλα ρυθμισμένες ώστε να ευνοείται η κάμψη γύρω από τον πυρήνα των ιστονών. Η ιστόνη H1 η οποία έχει μια διαφορετική δομή από τις άλλες ιστόνες, σφραγίζει το νουκλεόσωμα στη θέση όπου εισέρχεται και εξέρχεται το συνδετικό DNA. (Εικόνα 1).

1.4. Εξελικτική διατήρηση των ιστονών.

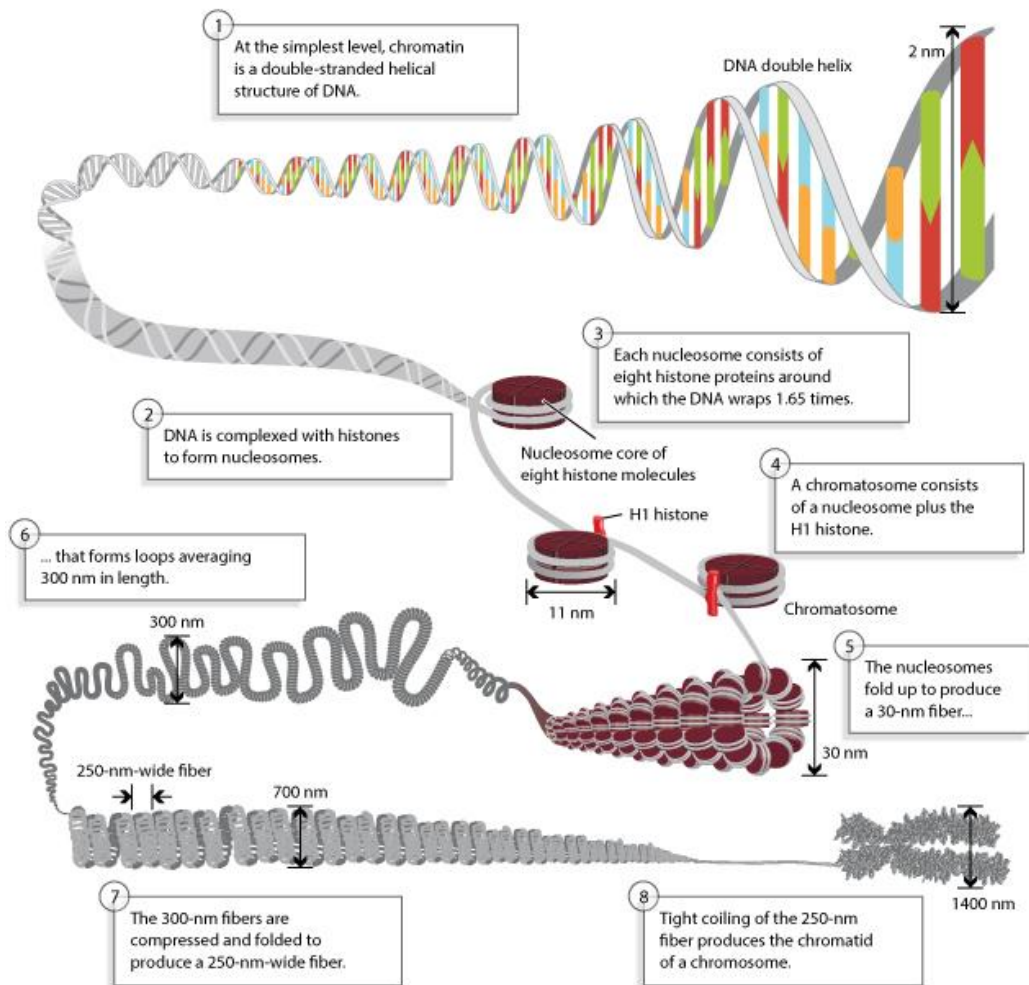
Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των ιστονών, συμπεριλαμβανομένων των αμινοτελικών ουρών, είναι εντυπωσιακά συντηρημένες από τους ζυμομύκητες μέχρι τον άνθρωπο. Οι εξελικτικά διατηρημένες ιστόνες που σχηματίζουν τον πυρήνα του νουκλεοσωματίου ανήκουν στις πλέον συντηρημένες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες : για παράδειγμα, οι αλληλουχίες των αμινοξέων της ιστόνης H4 των μπιζελιών και της αγελάδας διαφέρουν μεταξύ τους μόνο σε δύο αμινοξέα. Επίσης, ιστόνες βρέθηκαν σε αρχαιοβακτήρια, ένα φυλογενετικό βασίλειο διαφορετικό από εκείνα των φυτών και των ζώων. Αυτή η εντυπωσιακή εξελικτική διατήρηση αντικατοπτρίζει τον ζωτικό δομικό ρόλο των ιστονών στον σχηματισμό της χρωματίνης.^{9,13}

1.5 Συμπύκνωση του DNA.

Η περιέλιξη του DNA γύρω από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος συμβάλλει στη συσκευασία του μειώνοντας τη γραμμική του έκταση (Εικόνα 5). Μια έκταση γραμμικού DNA 200 bp έχει μήκος περίπου 680 \AA . Τυλίγοντας αυτό το DNA γύρω από το οκταμερές των ιστονών μειώνει το μήκος σε περίπου 100 \AA ως προς τη μεγάλη διάσταση του νουκλεοσώματος. Έτσι, το DNA συμπυκνώνεται κατά επτά φορές. Ωστόσο, ανθρώπινα χρωμοσώματα κατά τη μετάφαση, τα οποία είναι εξαιρετικά συμπυκνωμένα, έχουν βαθμό συμπύκνωσης 104 φορές. Είναι σαφές ότι το νουκλεόσωμα είναι μόνο το πρώτο βήμα συμπύκνωσης του DNA. Ποιο είναι το επόμενο βήμα : Τα νουκλεοσώματα από μόνα τους παίρνουν μια ελικοειδή διάταξη πάχους περίπου 360 \AA σχηματίζοντας μια σειρά από στοιβαγμένα στρώματα που το κάθε ένα απέχει από το άλλο περίπου 110 \AA . Η αναδίπλωση

αυτών των ινών των νουκλεοσωμάτων σε θηλιές συμπυκνώνει ακόμη περισσότερο το DNA. Η συστροφή του DNA γύρω από τον πυρήνα των ιστονών κατά έναν αριστερόστροφο ελικοειδή τρόπο επιπλέον αποθηκεύει αρνητικά υπερσπειράματα. Εάν το DNA ενός νουκλεοσώματος τεντωθεί, θα αποπεριελιχθεί. Αυτή η αποπεριέλιξη είναι ακριβώς ότι χρειάζεται για να ξεχωρίσει τους δύο κλώνους του DNA κατά την αντιγραφή και τη μεταγραφή.^{9,12}

Η εξέταση του περιεχομένου μεσοφασικών πυρήνων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μετά από ήπια λύση τους) αποκάλυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της χρωματίνης υφίσταται υπό μορφή μιας ίνας διαμέτρου περίπου 30 nm. Αν αυτή η χρωματίνη υποβληθεί σε κατάλληλη επεξεργασία ώστε να αποπτυχωθεί μερικώς, τότε κατά την εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο θα φαίνεται σαν μια σειρά από «χάντρες σ' ένα κορδόνι». ^{9,11} Στα ζωντανά κύτταρα, η χρωματίνη σπάνια υιοθετεί αυτή την εκτεταμένη μορφή σαν «χάντρες σε κορδόνι». Αντίθετα τα νουκλεοσώματα στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο και σχηματίζουν μια πιο συμπαγή δομή, την ίνα των 30nm. Η συσκευασία των νουκλεοσωμάτων στην ίνα των 30nm στηρίζεται σε ένα πέμπτο είδος ιστόνης την ιστόνη H1 (Εικόνες 1 και 5) η οποία φέρνει τα νουκλεοσώματα κοντά το ένα στο άλλο σε μια κανονική επαναληπτική συστοιχία. ^{9,13} Η αλληλεπίδραση μορίων ιστόνης H1 οργανώνει τα νουκλεοσώματα σε οκταμερή. Η δομή αυτή μεταπίπτει στην ίνα των 11 nm με απομάκρυνση των H1 μορίων και πιστεύεται πως κάτι τέτοιο είναι το πρώτο βήμα προκειμένου να εκφραστεί μία περιοχή του γονιδιώματος. (Εικόνα 5) ^{9,14}



Εικόνα 5: Τα χρωμοσώματα συντίθενται από DNA σφικτά περιελιγμένο γύρω από τις ιστόνες. Το DNA των χρωμοσωμάτων συσκευάζεται εντός του πυρήνα με τη βοήθεια των ιστονών οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες που προσκολλώνται στο αρνητικά φορτισμένο DNA και σχηματίζουν συμπλέγματα τα οποία καλούνται νουκλεοσώματα. Καθένα από αυτά συντίθεται από DNA τυλιγμένο 1.65 φορές γύρω από οκτώ υπομονάδες ιστονών. Τα νουκλεοσώματα συμπύσσονται για να σχηματίσουν μια ίνα χρωματίνης 30nm, η οποία σχηματίζει θηλειές μήκους περίπου 300nm, οι οποίες συμπιέζονται και διπλώνονται για να σχηματίσουν μια ίνα πλάτους 250nm η οποία συσπειρώνεται σφικτά στην χρωματίδα του χρωμοσώματος. © 2013 *Nature Education* Adapted from Pierce, Benjamin. *Genetics: A Conceptual Approach*, 2nd ed. All rights reserved. Από Annunziato A.T. DNA packaging : Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1(1):26 2008.

Το κορδόνι είναι το DNA και κάθε χάντρα είναι ο "πυρήνας" του νουκλεοσωματίου που περιέχει DNA περιελιγμένο σχεδόν δύο φορές γύρω από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα.^{9,11}

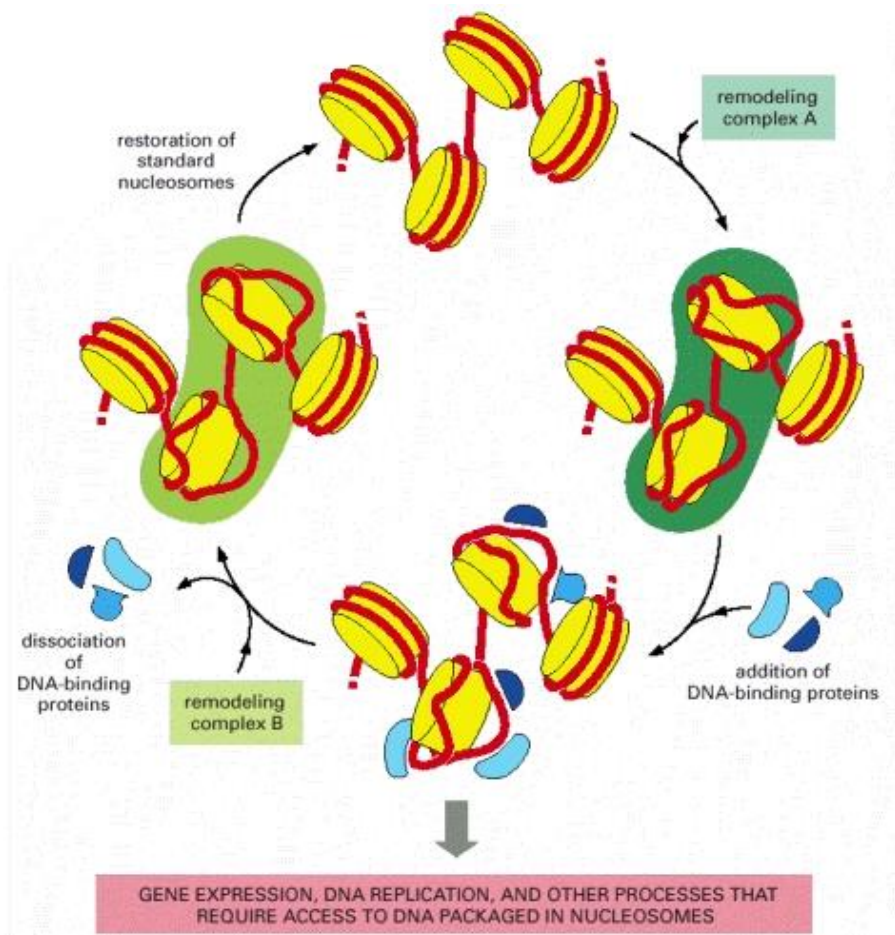
1.6. Δομή της χρωματίνης και έναρξη της μεταγραφής.

Η έναρξη της μεταγραφής στα ευκαρυωτικά κύτταρα γίνεται περίπλοκη επειδή το ευκαρυωτικό DNA συσκευάζεται στη χρωματίνη. Μπορούν άραγε οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση να προσπελάσουν το DNA που είναι συσκευασμένο σε νουκλεοσωμάτια; Πώς επηρεάζεται η έναρξη της μεταγραφής από τη δομή αυτή του DNA; ^{9,15}

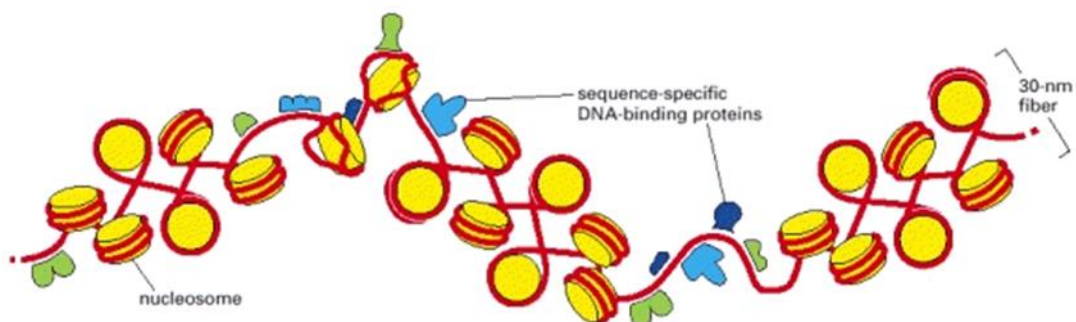
Όπως προαναφέραμε, η χρωματίνη με γονίδια που εκφράζονται φαίνεται ότι βρίσκεται σε ανοικτή δομή. Ωστόσο, το DNA εξακολουθεί να είναι συσπειρωμένο σε νουκλεοσωμάτια. Η παρουσία των νουκλεοσωματίων γενικά δεν παρακωλύει το στάδιο επιμήκυνσης της μεταγραφής, επειδή η RNA πολυμεράση μπορεί να διαπεράσει ένα νουκλεοσωμάτιο προκαλώντας μόνο μια παροδική διαταραχή στη δομή του. Τα νουκλεοσωμάτια μπορούν, όμως, να αναστείλουν την έναρξη της μεταγραφής αν βρίσκονται πάνω σ' έναν υποκινητή, πιθανόν επειδή παρεμποδίζουν την πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων ή της RNA πολυμεράσης στο DNA. ^{9,15}

Επειδή τα νουκλεοσωμάτια είναι τοποθετημένα στο DNA ανά τακτές αποστάσεις χωρίς κάποια προφανή ειδική σχέση με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων είναι πιθανό να βρίσκονται και σε περιοχές υποκινητών. Τα νουκλεοσωμάτια που βρίσκονται στις περιοχές αυτές εκτοπίζονται μόλις ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του γονιδίου, με αδιευκρίνιστο έως τώρα μηχανισμό. Ενδεχομένως το κύτταρο διαθέτει εξειδικευμένες πρωτεΐνες, το έργο των οποίων είναι να εκτοπίζουν τα νουκλεοσωμάτια από τους υποκινητές και να ανοίγουν το δρόμο για την πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι πριν αρχίσει η μεταγραφή, οι ιστόνες που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή θα μπορούσαν να υποστούν χημική τροποποίηση με συνέπεια να αποσταθεροποιούνται τα αντίστοιχα νουκλεοσωμάτια. ^{9,15}

Τα νουκλεοσωμάτια που σχηματίζονται πάνω σε ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA θα μπορούσαν επίσης να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων παρεμποδίζοντας την πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Αυτό, ωστόσο, δεν φαίνεται να ισχύει πάντα. Μολονότι μερικές ρυθμιστικές αλληλουχίες βρίσκονται εκτεθειμένες σε περιοχές του DNA χωρίς νουκλεοσωμάτια, εντούτοις ορισμένες άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες προσδένονται στις αντίστοιχες αλληλουχίες του DNA, έστω και αν αυτές είναι ενσωματωμένες σ' ένα νουκλεοσωμάτιο (Εικόνα 6 και 7).



Εικόνα 6 : Διαφορετικά συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης αποσταθεροποιούν και επανασηματίζουν (σε κάποιες περιπτώσεις το ίδιο σύμπλεγμα καταλύει και τις δύο αντιδράσεις) τανουκλεοσώματα. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA θα μπορούσαν να λειτουργήσουν στην έκφραση γονιδίων, στην αντιγραφή του DNA ή στην επιδιόρθωση του DNA και σε κάποιες περιπτώσεις η σύνδεσή τους θα μπορούσε να οδηγήσει στην αποσύνδεση του ιστονικού πυρήνα για το σχηματισμό περιοχών ελεύθερου ιστονών DNA όπως φαίνεται στην επόμενη εικόνα. Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. Alberts B. Johnson A. Lewis J. (Adapted from A. Travers, Cell 96:311-314, 1999)



Εικόνα 7: Περιοχές του DNA στην ίνα των 30nm όπου τα νουκλεοσώματα ελλείπουν τελείως ή υπάρχουν αλλαγμένα ή αναδιαμορφωμένα νουκλεοσώματα. Από : Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Alberts B, Johnson A., Lewis J. et al.

Το κύτταρο διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς που εξασφαλίζουν ότι η μεταγραφή μπορεί να αρχίζει σε DNA που είναι συσπειρωμένο σε νουκλεοσωμάτια. Ωστόσο, είναι επίσης σαφές ότι οι πιο συμπαγείς μορφές της χρωματίνης (όπως εκείνες που υπάρχουν στα μιτωτικά χρωμοσώματα, τα αδρανή χρωμοσώματα X και άλλες ετεροχρωματινικές περιοχές των μεσοφασικών χρωμοσωμάτων) "ανθίστανται" στην έναρξη της μεταγραφής. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι όταν το DNA είναι τόσο σφιχτά διπλωμένο είναι και απροσπέλαστο από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση.^{9,15}

Αν και αρχικά θεωρήθηκε μάλλον ένας στατικός μηχανισμός του πακεταρίσματος της χρωματίνης, το σύμπλεγμα του πυρήνα του νουκλεοσώματος, σήμερα αναγνωρίζεται ως ένα από τα συστατικά ρυθμιστικά κλειδιά του γενώματος. Επίσης, τώρα διαπιστώνουμε ότι τα νουκλεοσώματα, αντί για στατικά συμπλέγματα πρωτεϊνών είναι στην πραγματικότητα δυναμικά και ότι η σύνθεση και χωροθέτηση τους είναι κρίσιμες για τη ρύθμιση του γενώματος. Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της χρήσης και της χωροθέτησης του νουκλεοσώματος επιτρέπει στο κύτταρο να ρυθμίζει σωστά την προσβασιμότητα των διαφόρων πρωτεϊνών και των συμπλεγμάτων τους στο DNA και έτσι να ρυθμίζει προγράμματα έκφρασης γονιδίων. Μια ποικιλία ρυθμιστικών συμπαραγόντων όπως αναδιαμορφωτές χρωματίνης, σαπερόνες, και γενικοί ρυθμιστικοί παράγοντες, λειτουργούν τόσο ανεξάρτητα όσο και συνεργιστικά έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ακριβής οργάνωση και σύνθεση των συστοιχιών νουκλεοσωμάτων σε συγκεκριμένους γενωμικούς τόπους. Αυτό το δυναμικό περιβάλλον πιθανά υπάρχει έτσι ώστε το γονιδίωμα μπορεί να ανταποκρίνεται και να προσαρμόζεται ταχέως τόσο σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως επίσης να είναι ικανό να ανακάμπτει γρήγορα μετά από δραστηριότητες που αποδιοργανώνουν την χρωματίνη, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή.¹⁶

1.7 Μη ιστονικές πρωτεΐνες.

Οι ιστόνες αντιπροσωπεύουν τον κύριο όγκο των πρωτεϊνών στη χρωματίνη. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της χρωματίνης, που περιγράφονται συλλογικά ως μη ιστονικές πρωτεΐνες, αντιπροσωπεύουν ένα μικρό αλλά εξαιρετικά ετερογενές κλάσμα. Οι μη ιστονικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν ένζυμα εμπλεκόμενα στον μεταβολισμό, την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την μεταγραφική ρύθμιση του DNA και των ιστονών. Περιλαμβάνουν, επίσης, τις πρωτεΐνες ικριώματος που οργανώνουν τις ανώτερες δομές της χρωματίνης και την ομάδα πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (High Mobility Group proteins), οι οποίες είναι

πολύ φορτισμένες πρωτεΐνες με ποικίλες λειτουργίες στην γονιδιακή ρύθμιση και τη δομική οργάνωση, που λειτουργούν κυρίως σαν μεταγραφικοί παράγοντες¹⁷. Από αυτούς, η οικογένεια HMG14/17 των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με νουκλεόσωμα εμπλέκεται και/ή στη συντήρηση δομικών χαρακτηριστικών ειδικών της ενεργού χρωματίνης¹⁸ και θεωρείται ότι βοηθάει την αποσυσπείρωση των ανώτερων δομών της χρωματίνης¹⁹. Συνδέονται με την εσωτερική πλευρά του DNA του νουκλεοσώματος, αλλάζοντας την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο DNA και στο οκταμερές των ιστονών και ίσως εμπλέκονται στη διαδικασία που επιφέρει ειδικές διαμορφώσεις σε περιοχές του γονιδιώματος που είναι σε εξέλιξη μεταγραφή γονιδίων²⁰. Η οικογένεια των HMGI/Y πρωτεϊνών, των οποίων ο ακριβής ρόλος δεν είναι γνωστός, δεσμεύονται κατά προτίμηση στο επαναλαμβανόμενο πλούσιο σε AT DNA, και όπως η ιστόνη H1, μπορούν να είναι φωσφορυλιωμένες κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες. Η κύρια επίδραση των HMG πρωτεϊνών στη συσκευασία του DNA και στην ενεργοποίηση της αντιγραφής είναι να εισαγάγουν τις οξείες κάμψεις στο DNA. Αυτό μπορεί να απαιτείται στη συσκευασία του DNA για τις ιδιαίτερες τρισδιάστατες διαμορφώσεις, ενώ σε ένα μεταγραφικό πλαίσιο μπορεί να φέρει τους ρυθμιστικούς παράγοντες επί των διαφορετικών θέσεων πιο κοντά, όπως συμβαίνει στον παράγοντα SRY (Sex-determining Region Y factor) ή στο ενισχυόσωμα (enhanceosome)¹⁹. Συνοπτικά, εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της ρύθμισης μεταγραφής γονιδίων, αντιγραφής του DNA, οργάνωσης της ετεροχρωματίνης, ενσωμάτωσης ρετροϊών στα χρωμοσώματα και επαγωγής νεοπλασματικής μετατροπής και μεταστατικής εξέλιξης κυττάρων^{21,22}. Μια άλλη κατηγορία μη ιστονικών πρωτεϊνών, που καλούνται πρωταμίνες, διευκολύνουν την συσκευασία του DNA στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Αυτές οι πρωτεΐνες ευθυγραμμίζουν τις μείζονες αύλακες των γειτονικών δίκλωνων DNA και διπλώνουν το DNA σε μια ιδιαίτερα συμπαγή σειρά παράλληλων ινών.¹⁹

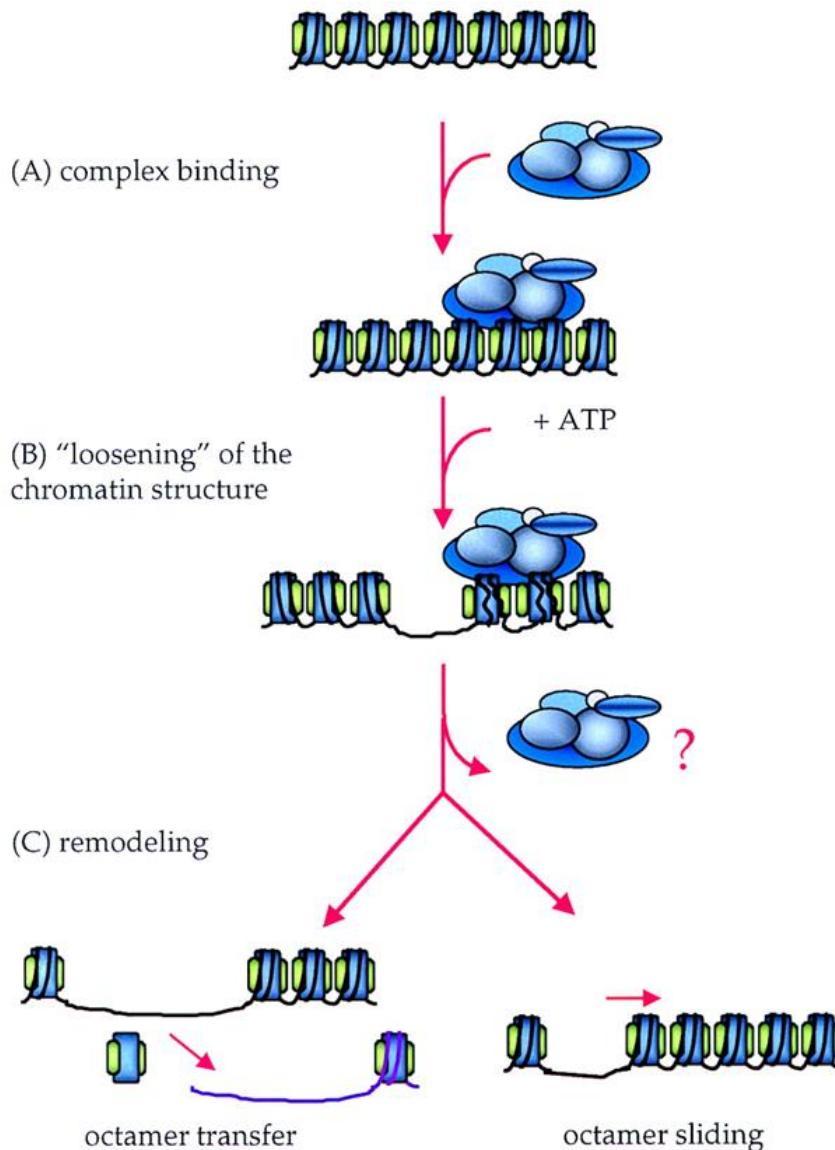
1.8. Σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και ο μηχανισμός δράσης τους.

Τα νουκλεοσώματα βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα σε μια καλά περιελιγμένη γύρω από το νουκλεόσωμα μορφή και σε μια παροδικά αποπεριελιγμένη κατάσταση. Η μετάπτωση από την μια κατάσταση στην άλλη είναι τυχαία και γρήγορη. Το DNA παραμένει προσδεμένο στο οκταμερές των ιστονών για περίπου 250 msec πριν αποπεριελιχθεί τυχαία και επαναπεριελιχθεί μέσα σε 10-15 msec. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης πιθανώς βοηθούν το DNA να αποπεριελιχθεί παγιδεύοντας την αποπεριελιγμένη κατάσταση και εμποδίζοντας την επιστροφή στην

περιελιγμένη μορφή. Η υδρόλυση του ATP χρησιμοποιείται έτσι ώστε να δημιουργηθεί μηχανική δύναμη η οποία θα απελευθερώσει μια μικρή περιοχή του DNA (Εικόνες 6 και 7).²³

Η τροποποίηση της χρωματίνης επιτελείται από μεγάλα μοριακά συμπλέγματα, τα οποία υδρολύουν ATP ώστε να παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την αντίδραση. Οι κύριες κατηγορίες είναι η SWI/SNF (Εικόνα 8) και η ISW (η ταξινόμηση γίνεται με βάση την υπομονάδα που έχει ενεργότητα ATPασης).²³

Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι αλλαγή της θέσης του οκταμερούς σε σχέση με το DNA.²³ Η δράση των τροποποιητικών συμπλόκων εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή. Η αλληλεπίδραση των τροποποιητικών συμπλόκων με τους μεταγραφικούς παράγοντες είναι ένα καθοριστικό γεγονός στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από την χρωματίνη. Ένας μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους με στιγμιαία πρόσδεση και αποβολή, ενώ όλη η δράση του εντοπίζεται στην πρόσδεση συμπλόκων που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης. Κλασσικά παραδείγματα: hsp70 (drosophila), σύστημα PHO, υποδοχέας στεροειδών ορμονών. Η αλλαγή στην χωροθέτηση των νουκλεοσωμάτων επιτρέπει την πρόσδεση παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του γονιδίου.²³



Εικόνα 8: Μοντέλο δράσης του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF. Η σύνδεση του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης με την χρωματίνη είναι ATP εξαρτώμενη. (A) Με την πρόσθεση ATP η διαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων αλλάζει σαν επακόλουθο της αλλαγής των αλληλεπιδράσεων ιστονών-DNA. (B) Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. (C) η οποία μπορεί να λάβει χώρα ενώ το σύμπλεγμα είναι ακόμη συνδεδεμένο ή μπορεί να συνεχίζεται και μετά την απελευθέρωσή του από την χρωματίνη (φαίνεται με ερωτηματικό). Η αναδιαμόρφωση που συμβαίνει μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα μεταφορά του οκταμερούς ιστονών σε διαφορετικά τμήματα του DNA με trans επίδραση ή ολίσθηση των οκταμερών με cis επίδραση (π.χ. σε διαφορετική θέση στο ίδιο μόριο DNA). Οι ακριβείς συνέπειες της αναδιαμόρφωσης εξαρτώνται από το ακριβές περιεχόμενο των νουκλεοσωμάτων σε ένα συγκεκριμένο υποκινητή και δυνατόν να αφορούν σε ενεργοποίηση είτε σε καταστολή της μεταγραφής.

Από : M. Vignali, A. H. Hassan, K. E. Neely, and J. L. Workman. ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. doi: 10.1128/MCB.20.6.1899-1910.2000 *Mol. Cell. Biol.* March 2000 vol. 20 no.6,1899-1910.

2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

2.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

2.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Κάθε μόνιμη αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος ενός οργανισμού, ιού ή εξωχρωμοσωμικού DNA ή άλλων γενετικών στοιχείων ονομάζεται μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις επισυμβαίνουν : αυτόματα, κατά τη διάρκεια αντιγραφής του DNA, κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης του DNA ενώ επάγονται και από μεταλλαξιογόνους παράγοντες (ακτινοβολία και χημικούς παράγοντες) ²⁴

Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στη δομή του γενετικού υλικού

Μικρής κλίμακας μεταλλάξεις ή σημειακές : επηρεάζουν ένα γονίδιο σε ένα μόνο ή λίγα νουκλεοτίδια (Εικόνα 9a).

Οι μεταλλάξεις αντικατάστασης συχνά προκαλούνται από χημικά ή δυσλειτουργία στην αντιγραφή του DNA και ταξινομούνται σαν μεταπτώσεις (transitions) ή αμφιμετατροπές (transversions). Πιο συχνή είναι η μετάπτωση, στην οποία γίνεται αντικατάσταση πουρίνης από πουρίνη ή πυριμιδίνης από πυριμιδίνη, ενώ λιγότερο συχνή είναι η αμφιμετατροπή κατά την οποία αντικαθίσταται πουρίνη από πυριμιδίνη ή αντίστροφα. ²⁴

Σημειακές μεταλλάξεις (point mutations) είναι τροποποιήσεις ζευγών βάσεων του DNA εντός του ίδιου γονιδίου και όταν συμβαίνουν εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου (coding region) μπορούν να ταξινομηθούν σε τρία είδη :

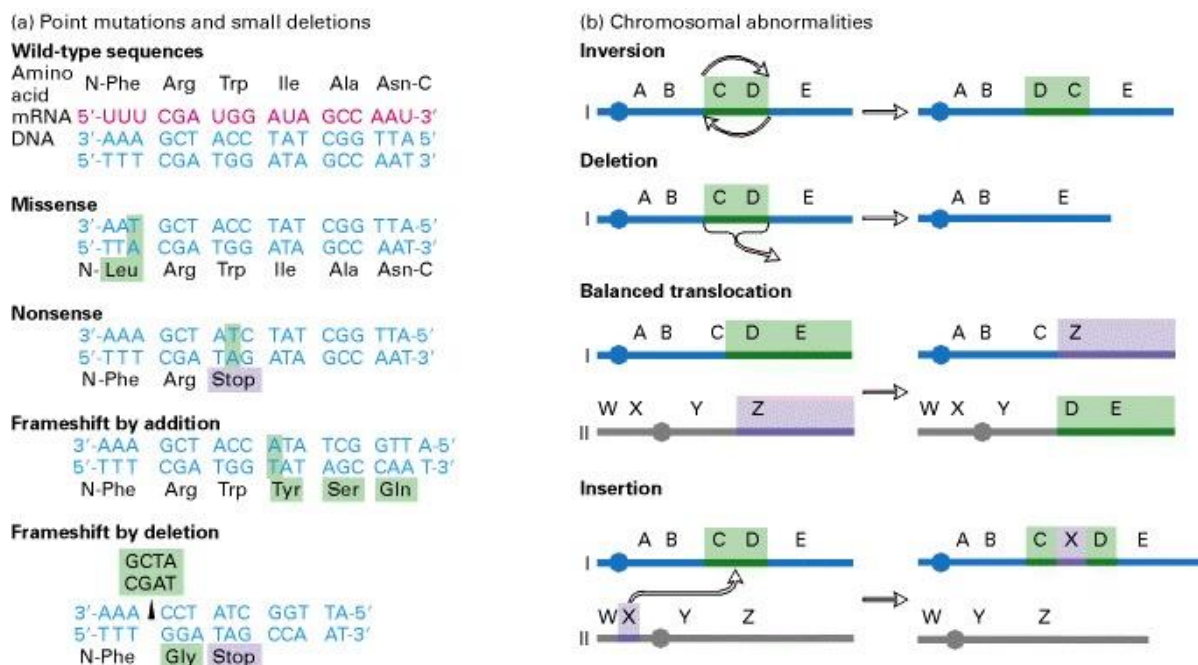
Σιωπηλές ή συνώνυμες μεταλλάξεις (silent or synonymous mutations) που κωδικοποιούν το ίδιο ή παρόμοιο αμινοξύ και δεν επηρεάζουν την πρωτεϊνική αλληλουχία ή λειτουργία.

Παρανοηματικές ή μη συνώνυμες μεταλλάξεις (missense or non synonymous mutations) που κωδικοποιούν διαφορετικό αμινοξύ..

Μη νοηματικές μεταλλάξεις (nonsense mutation) που κωδικοποιούν κωδικόνιο λήξης (stop codon), άρα οδηγούν σε πρόωρη λήξη της μετάφρασης και μπορούν να ελαττώσουν το μήκος της πρωτεΐνης (truncating mutation). ²⁴

Στις μεταλλάξεις προσθήκης προστίθενται ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια στο DNA. Συνήθως προκαλούνται από μεταθετά στοιχεία ή λάθη κατά την αντιγραφή. Μπορούν να

αλλάζουν το μάτισμα (splicing) του mRNA (splice site mutation) ή το πλαίσιο ανάγνωσης (frameshift mutation), με αποτέλεσμα σημαντική μεταβολή στο προϊόν του γονιδίου. Σημειακές απαλοιφές απομακρύνουν ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια από το DNA. Όπως οι προσθήκες, μπορούν να αλλάξουν το πλαίσιο ανάγνωσης.²⁴



Εικόνα 9 : Διάφοροι τύποι μεταλλάξεων. (a) Σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες περιλαμβάνουν αλλαγή σε ένα ζεύγος βάσεων και μικρές απαλοιφές γενικά επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία ενός μόνο γονιδίου. Μια πεπτιδική αλληλουχία αγρίου τύπου και τα DNA και mRNA που την κωδικοποιούν φαίνονται στην κορυφή. Αλλαγμένα νουκλεοτίδια και κατάλοιπα αμινοξέων χρωματίζονται με πράσινο. Οι παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) οδηγούν σε αλλαγή ενός μεμονωμένου αμινοξέος στην κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη. Σε μια μη νοηματική μετάλλαξη (nonsense mutation) αλλαγή στη βάση νουκλεοτιδίων οδηγεί στο σχηματισμό κωδικονίου λήξης (χρωματίζεται μωβ). Αυτό καταλήγει σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης δημιουργώντας έτσι μια μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνη. Οι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου περιλαμβάνουν την πρόσθεση ή απαλοιφή οποιουδήποτε αριθμού νουκλεοτιδίων δεν είναι πολλαπλάσιος του τρία, δημιουργώντας μια αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης. Συνεπώς, εντελώς άσχετα κατάλοιπα αμινοξέων ενσωματώνονται στην πρωτεΐνη πριν το κωδικόνιο λήξης. (b) Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν αλλαγές σε μεγάλα τμήματα του DNA. Πιθανότατα, αυτές οι ανωμαλίες οφείλονται σε λάθη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης θραύσεων στην διπλή έλικα του DNA. Τα χρωμοσώματα (I ή II) απεικονίζονται σαν μονές παχιές γραμμές με τις περιοχές που εμπλέκονται στην συγκεκριμένη ανωμαλία να απεικονίζονται με πράσινο ή μωβ χρώμα. Οι αναστροφές συμβαίνουν όταν μια θραύση επανενώνεται στο σωστό χρωμόσωμα αλλά με λάθος προσανατολισμό, οι απαλοιφές όταν ένα τμήμα του DNA χάνεται, διαμεταθέσεις όταν οι θραύσεις επανενώνονται στα λάθος χρωμοσώματα και προσθήκες ή ενθέσεις όταν ένα τμήμα από ένα χρωμόσωμα προστίθεται σε άλλο χρωμόσωμα. From: Section 8.1, Mutations: Types and Causes. Molecular Cell Biology. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman; 2000.

Μεγάλης κλίμακας μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες : περιλαμβάνουν αλλαγές στη δομή των χρωμοσωμάτων (Εικόνα 9b).

Ενισχύσεις ή διπλασιασμοί γονιδίων οδηγούν σε πολλαπλά αντίγραφα χρωμοσωμικών περιοχών.

Απαλοιφές μεγάλων χρωμοσωμικών περιοχών, οδηγούν σε απώλειες γονιδίων σε αυτές τις περιοχές.

Μεταλλάξεις που το αποτέλεσμα τους είναι η αναδιάταξη προηγούμενων ξεχωριστών τμημάτων DNA για το σχηματισμό συγχωνευμένων γονιδίων περιλαμβάνουν:

- Χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις (translocations) δηλαδή ανταλλαγές γενετικών τμημάτων από μη ομόλογα χρωμοσώματα.

- Διάμεσες απαλοιφές (interstitial deletions) είναι ενδοχρωμοσωμικές απαλοιφές που απομακρύνουν ένα τμήμα DNA από ένα χρωμόσωμα, συμπλησιάζοντας, προηγουμένως απομακρυσμένα γονίδια.

- Χρωμοσωμικές αναστροφές συνιστούν αναστροφή του προσανατολισμού ενός τμήματος χρωμοσώματος.

Απώλεια ετεροζυγωτίας είναι απώλεια ενός αλληλίου, είτε με απαλοιφή, είτε με γενετικό ανασυνδυασμό σε ένα οργανισμό που είχε προηγουμένως δύο διαφορετικά αλλήλια.²⁴

Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στη λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου.

Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας ή αδρανοποιητικές (Loss of function or inactivating mutations), έχουν σαν αποτέλεσμα λιγότερη ή καθόλου λειτουργία στο προϊόν του γονιδίου (μερικώς ή πλήρως αδρανοποιημένο). Όταν το αλλήλιο έχει πλήρη απώλεια λειτουργίας (null allele) συνήθως καλείται αμορφική μετάλλαξη (amorph) στο σχήμα Muller's morphs. Φαινότυποι που σχετίζονται με τέτοιες μεταλλάξεις είναι συχνά υπολειπόμενοι (recessive). Εξαιρέσεις παρατηρούνται όταν ο οργανισμός είναι απλοειδικός (haploid) ή όταν η ελαττωμένη παρουσία ενός φυσιολογικού προϊόντος γονιδίου δεν είναι αρκετή για ένα φυσιολογικό φαινότυπο (haploinsufficiency).²⁴

Μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας ή ενεργοποιητικές (Gain of function or activating mutations) είναι αυτές που αλλάζουν το προϊόν του γονιδίου, έτσι ώστε η δράση του να είναι ισχυρότερη (ενισχυμένη δράση) ή αντικαθίσταται από διαφορετική και μη φυσιολογική λειτουργία. Όταν δημιουργείται το νέο αλλήλιο, ένας ετεροζυγώτης που περιέχει το νεοδημιουργηθέν αλλήλιο όπως επίσης και το γνήσιο, θα εκφράζει το νέο αλλήλιο. Η ιδιότητα αυτή καθορίζει τις μεταλλάξεις αυτές, σαν επικρατείς φαινότυπους. Στο σχήμα Muller's

morphs μπορεί να είναι υπερμορφική (hypermorph) ή νεομορφική (neomorph). Επικρατούσες αρνητικές μεταλλάξεις (Dominant negative or antimorphic mutations) είναι αυτές που έχουν ένα αλλαγμένο προϊόν γονιδίου το οποίο δρά ανταγωνιστικά στο φυσικού τύπου (wild type) αλλήλιο. Αυτές οι μεταλλάξεις συχνά καταλήγουν σε αλλαγμένη μοριακή λειτουργία (συχνά αδρανή) και χαρακτηρίζονται από επικρατούντα ή ημιεπικρατούντα φαινότυπο. Στους ανθρώπους εμπλέκονται στον καρκίνο (π.χ. μετάλλαξη στα p53, ATM, CEBPA, PPARγ).

Υπομορφικό (hypomorph) κατά την ταξινόμηση του Muller είναι μεταλλαγμένο αλλήλιο με μια μείωση στη λειτουργία του γονιδίου μέσω ελαττωμένης γονιδιακής έκφρασης (πρωτεΐνη, RNA) ή ελαττωμένης λειτουργικής απόδοσης (αλλά όχι μια πλήρης απώλεια)²⁵ συγκριτικά με το φυσικού τύπου αλλήλιο. Το νεομορφικό γονίδιο (neomorph) χαρακτηρίζεται από τον έλεγχο σύνθεσης νέου πρωτεϊνικού προϊόντος. Η θανάσιμη ή θανατηφόρος μετάλλαξη (lethal mutation) οδηγεί στο θάνατο των οργανισμών που τη φέρουν. Η αντίστροφη μετάλλαξη ή αναστροφή (back mutation or reversion) είναι σημειακή μετάλλαξη που αποκαθιστά τη γνήσια (original) αλληλουχία και επομένως το γνήσιο φαινότυπο.²⁴

Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στη φυσική κατάσταση του οργανισμού.

Επιβλαβής μετάλλαξη (harmful or deleterious mutation) ονομάζεται αυτή που επιδεινώνει, ενώ επωφελής μετάλλαξη ή μετάλλαξη πλεονεκτήματος (beneficial or advantageous mutation), αυτή που βελτιώνει τη φυσική κατάσταση του οργανισμού ο οποίος την φέρει.

Μια ουδέτερη μετάλλαξη (neutral) δεν έχει ούτε επιβλαβή ούτε ευνοϊκή επίδραση στη φυσική κατάσταση του οργανισμού που την φέρει.

Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στην αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Μετάλλαξη μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου (frameshift mutation) (Εικόνα 9a) προκαλείται από προσθήκη σε ή απαλοιφή από μια αλληλουχία DNA, αριθμού νουκλεοτιδίων που δεν διαιρείται ακριβώς με το τρία. Εξαιτίας της αντιστοιχίας της τριπλέτας με κωδικόνια, προσθήκη ή απαλοιφή μπορεί να διαταράξει το πλαίσιο ανάγνωσης ή την ομαδοποίηση των κωδικονίων, καταλήγοντας σε τελείως διαφορετική μετάφραση από την αρχική (original). Όσο νωρίτερα στην αλληλουχία DNA συμβαίνει τόσο περισσότερο τροποποιημένη είναι η πρωτεΐνη. Αντίθετα, οι προσθήκες ή απαλοιφές αριθμού

νουκλεοτιδίων που διαιρούνται ακριβώς με το τρία, ονομάζονται μεταλλάξεις εντός πλαισίου (in frame mutation).²⁴

Μη νοηματική μετάλλαξη (nonsense mutation) είναι σημειακή μετάλλαξη σε ακολουθία DNA που καταλήγει σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης ή μη νοηματικό (nonsense) κωδικόνιο στο μεταγραφικό mRNA και πιθανά σε ένα ελαττωμένου μήκους (truncated) και μη λειτουργικό πρωτεϊνικό προϊόν.²⁴ (Εικόνα 9a)

Παρανοηματικές (missense) ή μη συνώνυμες μεταλλάξεις είναι τύποι σημειακών μεταλλάξεων όπου ένα μεμονωμένο νουκλεοτίδιο αλλάζει για να προκαλέσει υποκατάσταση με διαφορετικό αμινοξύ. Αυτό μπορεί να καταστήσει την τελική πρωτεΐνη μη λειτουργική.²⁴ (Εικόνα 9a)

Ουδέτερη μετάλλαξη (neutral mutation) είναι αυτή που συμβαίνει στο κωδικόνιο ενός αμινοξέος και καταλήγει σε διαφορετικό αλλά χημικά παρόμοιο αμινοξύ. Η ομοιότητα συνήθως είναι αρκετή, ώστε μικρή ή καθόλου αλλαγή δεν αντανakλάται στην πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, αλλαγή από AAA σε AGA, θα κωδικοποιήσει αργινίνη, ένα μόριο χημικά παρόμοιο με τη λυσίνη.²⁴

Σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations) είναι μεταλλάξεις όπου μεταβάλλεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία χωρίς αλλαγή στην ακολουθία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης. Άν το αλλαγμένο αμινοξύ είναι επαρκώς παρόμοιο με το αρχικό (original) υπάρχει αλλαγή στην ακολουθία των αμινοξέων, αλλά δεν αλλάζει η λειτουργία της πρωτεΐνης. Μπορεί να συμβαίνουν σε μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη, ή συμβαίνουν σε ένα κωδικόνιο με ένα τρόπο που δεν αλλάζει την ακολουθία αμινοξέων.²⁴

Ταξινόμηση των μεταλλάξεων με βάση την επίδραση στην κληρονομικότητα

Σε πολυκυττάριους οργανισμούς με διαφοροποιημένα αναπαραγωγικά κύτταρα, οι μεταλλάξεις μπορούν να υποδιαιρεθούν σε γαμετικές μεταλλάξεις (germline mutations), που μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους μέσω των αναπαραγωγικών (γεννητικών) κυττάρων και σωματικές μεταλλάξεις (somatic mutations), που καλούνται και επίκτητες (acquired mutations), οι οποίες αφορούν κύτταρα εκτός της γεννητικής σειράς και οι οποίες συνήθως δεν μεταβιβάζονται στους απογόνους. Μια γαμετική μετάλλαξη προκαλεί μια ιδιοσυστασιακή μετάλλαξη (constitutional mutation) στους απογόνους, δηλαδή μια μετάλλαξη που υπάρχει σε κάθε κύτταρο, η οποία μπορεί επίσης να συμβεί σύντομα μετά τη γονιμοποίηση ή να συνεχιστεί από μια προηγούμενη ιδιοσυστασιακή μετάλλαξη σε γονέα.

Οι διπλοειδικοί οργανισμοί (diploid organisms) περιέχουν δυο αντίγραφα από κάθε γονίδιο, ένα πατρικό και ένα μητρικό αλληλίο. Με βάση την παρουσία μετάλλαξης σε κάθε χρωμόσωμα, μπορούμε να τις ταξινομήσουμε σε :

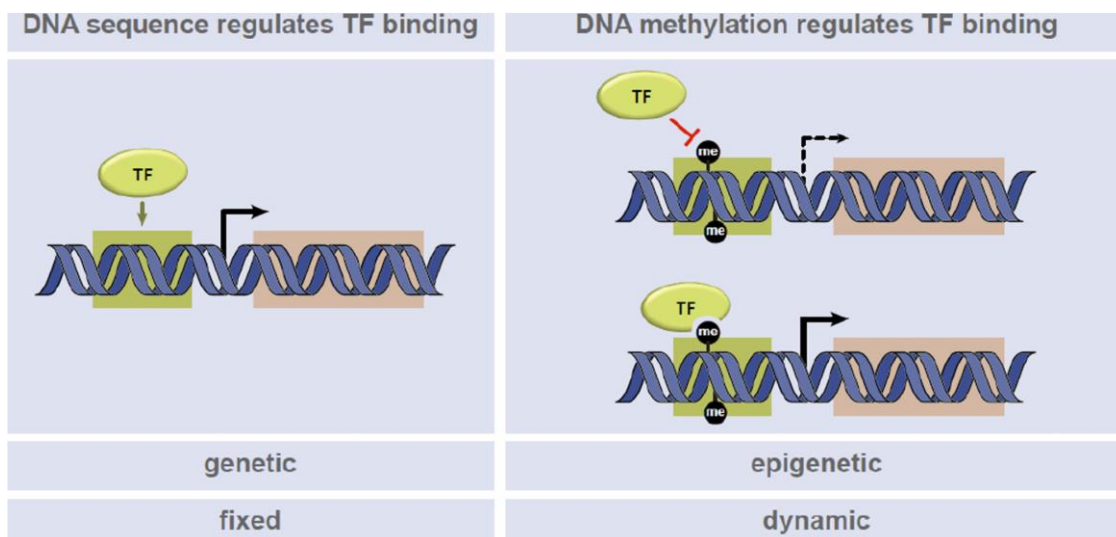
- Ετερόζυγη μετάλλαξη όταν η μετάλλαξη αφορά ένα μόνο αλληλίο. ²⁴
- Ομόζυγη μετάλλαξη όταν συμβαίνει και στα δυο αλληλία (πατρικό και μητρικό)²⁴.
- Σύνθετες ετερόζυγες μεταλλάξεις ή γενετικός συνδυασμός (Compound heterozygous mutations or genetic compound), όταν υπάρχουν δυο διαφορετικές μεταλλάξεις στα μητρικά και πατρικά αλληλία. ²⁴

Φυσικού τύπου ή ομόζυγος μη μεταλλαγμένος οργανισμός (wild-type or homozygous non-mutated organism), είναι αυτός στον οποίο κανένα αλληλίο δεν είναι μεταλλαγμένο. ²⁴

Εξαρτημένη (ή υπό όρους) μετάλλαξη (conditional mutation) είναι αυτή στην οποία, ένα μεταλλαγμένο αλληλίο προκαλεί ένα μεταλλαγμένο φαινότυπο σε ένα μόνο συγκεκριμένο περιβάλλον που καλείται περιοριστικό (restrictive condition), αλλά προκαλεί φυσικού τύπου φαινότυπο σε διαφορετικό περιβάλλον το οποίο καλείται επιτρεπτικό (permissive condition)²⁶. Οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να είναι θερμοκρασία, χημικά, φώς ή μεταλλάξεις σε άλλα τμήματα του γενώματος. Οι εξαρτημένες μεταλλάξεις έχουν εφαρμογές στην έρευνα αφού επιτρέπουν τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων. ²⁴

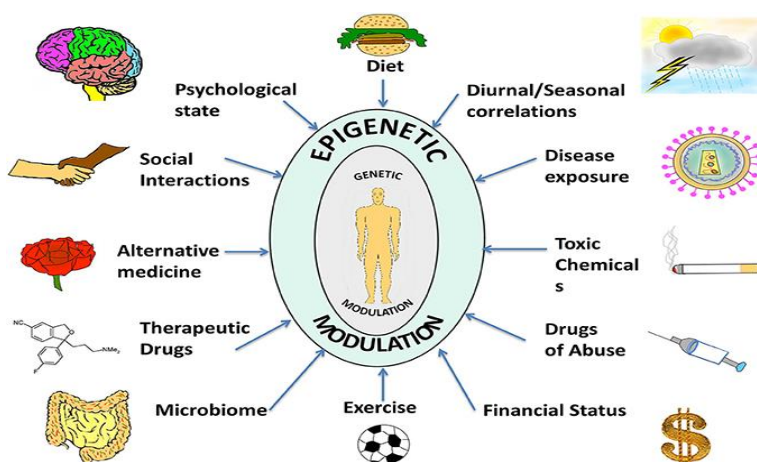
2.2 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης δεν περιλαμβάνουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και εξηγούν πώς το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων χωρίς αλλαγή στις αλληλουχίες των βάσεων του DNA αυτών των γονιδίων (Εικόνες 10, 11). Δύνανται να διατηρηθούν και να κληρονομηθούν κατά την κυτταρική διαίρεση και από γενιά σε γενιά. Παραδείγματα επιγενετικής ρύθμισης γονιδίων : σχηματισμός ετεροχρωματίνης στα κεντρομερή, απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αποσιώπηση (silencing) γονιδίων από καρκινογόνες ουσίες κ.α. Συνοπτικά, η επιγενετική, με την ευρεία έννοια του όρου, αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου, τροποποιώντας το τελικό προϊόν του γονιδίου χωρίς αλλαγή της ακολουθίας του DNA, προσφέροντας ένα είδος μεταγραφικού ελέγχου που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων. ²⁷⁻²⁹

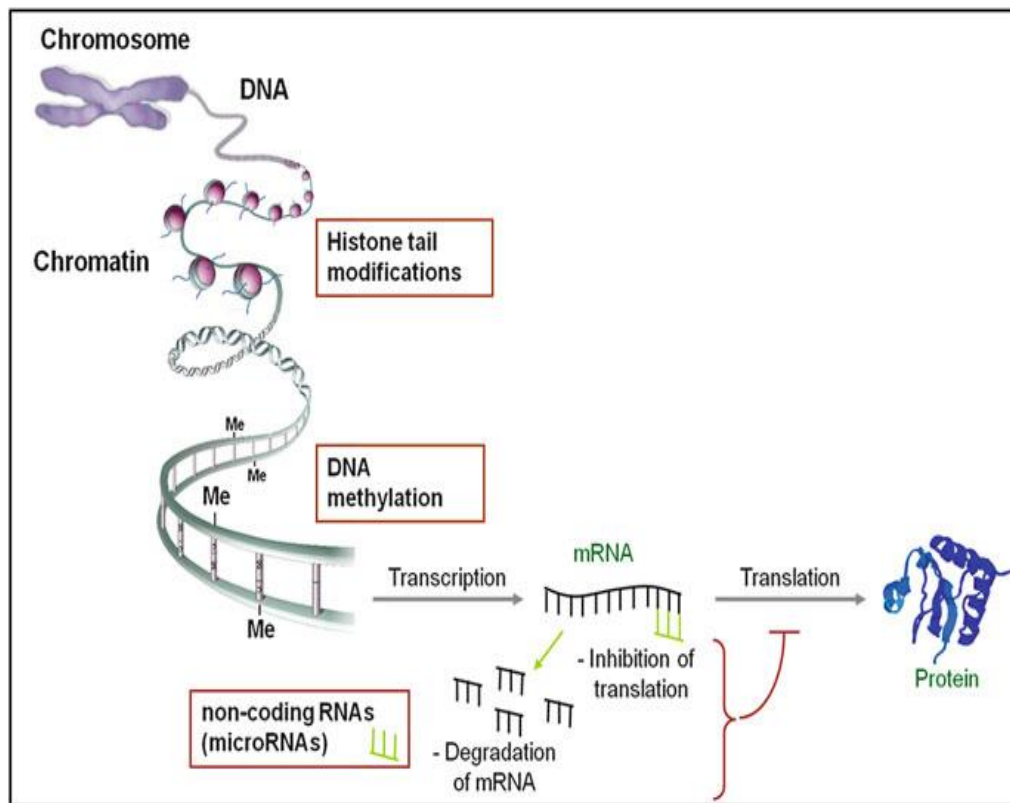


Εικόνα 10: Συνδυασμός γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών ρυθμίζουν τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων. (Αριστερά) Σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο κατάλληλο μοτίβο DNA αλληλουχίας ρυθμίζει το αποτέλεσμα της μεταγραφής. (Δεξιά) Η σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα στα μεθυλιωμένα μοτίβα της DNA αλληλουχίας ρυθμίζει θετικά και αρνητικά το αποτέλεσμα της μεταγραφής. Scott B. Rothbart and Brian D. Strahl. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 August ; 1839(8): 627–643. doi:10.1016/j.bbaggm.2014.03.001.

Η επιγενετική ρύθμιση στο γονιδίωμα των θηλαστικών γίνεται με τη μεθυλίωση του DNA, τις τροποποιήσεις των ιστονών και τη γονιδιακή ρύθμιση από μη κωδικά RNAs. (Εικόνα 12) Η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών συνιστούν μεταβολές στην δομή της χρωματίνης.



Εικόνα 11: Περιβαλλοντικοί παράγοντες με επιγενετική επίδραση. Η επιγενετική όπως και η γενετική πληροφορία κληρονομείται αλλά σε αντίθεση με την γενετική πληροφορία είναι αναστρέψιμη (επιγενετική πλαστικότητα) και δύναται να επηρεαστεί από διάφορα ερεθίσματα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες.



Εικόνα 12: Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης. Από : Γιαννοπούλου Α. Ιωάννα:

Επιγενετικά φαινόμενα στον καρκίνο IV: microRNAs: Διαγνωστική και Προγνωστική/ Προβλεπτική σημασία. ΠΜΣ Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο. 2016.

2.2.1. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA

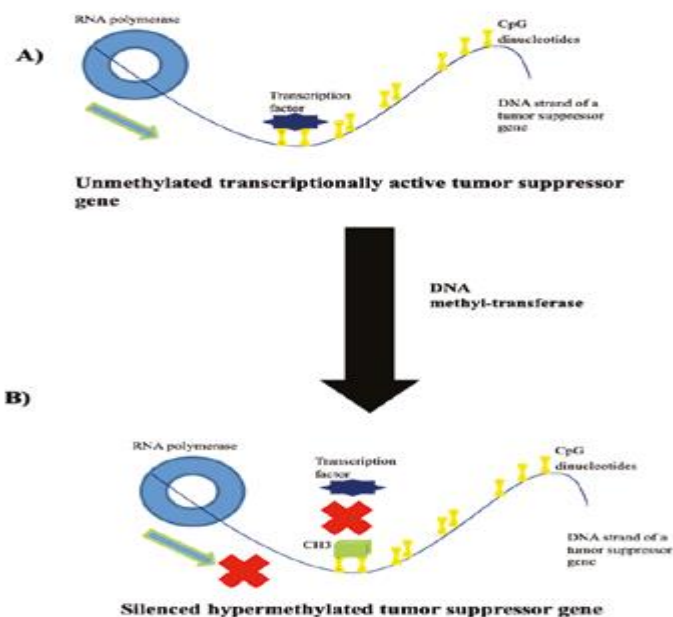
ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Είναι η προσθήκη μεθυλικής ομάδας στο DNA, συγκεκριμένα στον 5' C του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης και δημιουργία 5' μεθυλοκυτοσίνης. (Εικόνα 14) Παρατηρείται συνήθως σε δινοκλεοτίδια CpG. Το 90% των δινοκλεοτιδίων CpG είναι μεθυλωμένα σε κύτταρα θηλαστικών. Παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Μεθυλίωση του DNA (σχηματισμός νησίδων 5' mCpG) οδηγεί σε απενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων. (Εικόνα13)

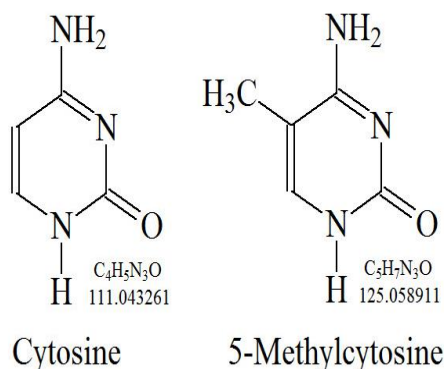
Μη μεθυλωμένα νουκλεοτίδια CpG σχηματίζουν ομάδες στην 5' ρυθμιστική περιοχή ενεργών γονιδίων (CG νησίδες). Σε καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται υπερμεθυλίωση (απενεργοποίηση) υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Υπάρχουν 3 DNA μεθυλτρασφεράσες (DNMTs) στα θηλαστικά, ένζυμα τα οποία μεταφέρουν την μεθυλομάδα. Οι DNMT3a και DNMT3b δημιουργούν de novo μεθυλίωση

ενώ η DNMT1 συντηρεί τη μεθυλίωση. Όλες έχουν μια ρυθμιστική περιοχή στο N-τελικό και μια καταλυτική περιοχή στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης.²⁷⁻²⁹



Εικόνα 13 : Υπερμεθυλίωση των νησιδίων CpG από την DNA μεθυλτρανσφεράση. (A) Η σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα στην έλικα του DNA επάγει την έναρξη της μεταγραφής και της γονιδιακής έκφρασης από την RNA πολυμεράση. (B) Μεθυλίωση του νησιδίου CpG αποτρέπει τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα και την επακόλουθη μεταγραφή του DNA και γονιδιακή έκφραση. Από : Alfredo Harb-De la Rosa, Mathew Acker, Sanjaya Swain, Murugesan Manoharan. The role of epigenetics in kidney malignancies. *Central European Journal of Urology* 2015 68:157-164.



Εικόνα 14 : Μεθυλίωση της κυτοσίνης. Ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα εμποδίζοντας την πρόσδεση παραγόντων μεταγραφής. Τα ήδη ενεργά γονίδια δεν μεθυλιώνονται. Από : Καθηγητής Κων. Ε. Βοργιάς. Δομή και ιδιότητες του DNA. Χημική τροποποίηση βάσης και μεταγραφική ενεργότητα. *Μοριακή Βιολογία* κεφ.1 (2014) https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/DNA_Chromatin.pdf.

2.2.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Οι ιστόνες επιτελούν το μεγαλύτερο μέρος του λειτουργικού τους ρόλου άμεσα, μέσω πληθώρας ειδικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις οποίες υπόκεινται. Οι κύριοι και περισσότερο μελετημένοι μηχανισμοί των τροποποιήσεων αυτών είναι η ακετυλίωση και η μεθυλίωση ενώ εναλλακτικοί, η φωσφορυλίωση, η ουμπικουιλίνωση, η σομοϋλίωση και άλλοι που αναφέρονται παρακάτω.³⁰ Οι τροποποιήσεις αυτές, στις οποίες αναφερόμαστε συχνά και ως "μοριακή σήμανση των ιστονών" (histone marks), είναι το αποτέλεσμα της ομοιοπολικής προσθήκης χημικών ομάδων σε συγκεκριμένα κατάλοιπα των διαφόρων πρωτεϊνών του οκταμερούς και συμβολίζονται με χαρακτηριστικό τρόπο που περιλαμβάνει:

- Το μόριο της ιστόνης, που αφορά η σήμανση (π.χ. H3, H4).

- Το κατάλοιπο, στο οποίο συμβαίνει η τροποποίηση που συμβολίζεται με το αμινοξύ στο μονογράμματο κώδικα, ακολουθούμενο από έναν αριθμό που αντιστοιχεί στη θέση του στην πρωτοταγή αλληλουχία της ιστόνης (π.χ. K4: λυσίνη-4, S12: σερίνη-12) τη χημική ομάδα της προσθήκης (π.χ. me = μεθυλίωση, ac=ακετυλίωση, ph=φωσφορυλίωση κλπ).

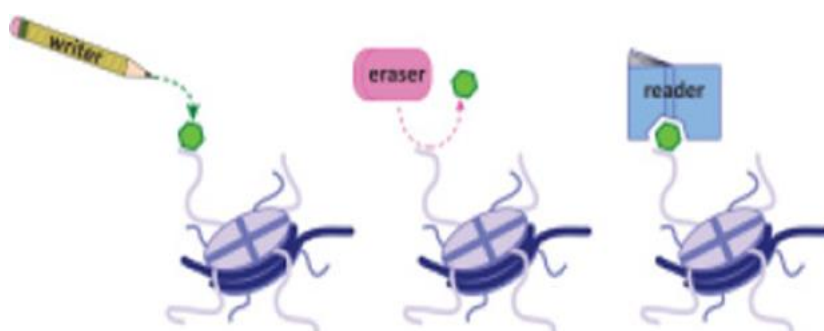
- Τον αριθμό των ομάδων της προσθήκης που μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος της ομάδας (π.χ. me1: μονο-μεθυλίωση, me3: τρι-μεθυλίωση). Ο σημαντικότερος ρόλος των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε επιγενετικό επίπεδο αναδείχθηκε αρχικά στο πλαίσιο της οργάνωσης του DNA σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη, καθώς παρατηρήθηκε συσχέτιση αυτών των περιοχών του γονιδιώματος με τον εμπλουτισμό του υποκείμενου DNA σε αντίστοιχες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε, στις αρχές της δεκαετίας του 2000, στη διατύπωση της έννοιας του "κώδικα των ιστονών", σύμφωνα με τον οποίο, διαφορετική σήμανση (marking) των ιστονών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές διαμορφώσεις της χρωματίνης και κατά συνέπεια να προσδώσει διαφορετική προσβασιμότητα σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες κ.ά.

Συγκεκριμένες τροποποιήσεις που αφορούν π.χ. στη μεθυλίωση της λυσίνης-4 της ιστόνης H3 (H3K4me3) τείνουν έτσι να συμβαίνουν σε περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστικό ρόλο όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές, ενώ, αντίθετα, μεθυλίώσεις σε άλλα κατάλοιπα της ίδιας ιστόνης (π.χ. H3K27me3) σχετίζονται συχνότερα με κατασταλτική λειτουργία. Η μελέτη τους σε επίπεδο γονιδιωματικής κλίμακας γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με μεθόδους Ανοσοκατακρήμνισης Χρωματίνης με Αλληλούχιση (ChIPSeq), που εκμεταλλεύονται την ύπαρξη μια μεγάλης γκάμας αντισωμάτων που είναι απόλυτα εξειδικευμένα για ισομορφές ιστονών. Το αποτέλεσμα αυτών των προσεγγίσεων είναι, ανάλογα με το βαθμό διακριτικής ικανότητας, χρωμοσωμικοί χάρτες που περιγράφουν το σχετικό εμπλουτισμό μιας συγκεκριμένης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης κατά μήκος

του γονιδιώματος, είτε κορυφές εμπλουτισμού (peaks) του είδους που προκύπτουν από την ανάλυση ChIP μεταγραφικών παραγόντων.

Ο μεγάλος αριθμός συνδυασμών επιγενετικών σημάτων που μπορεί να συνυπάρχουν σ'ένα νουκλεόσωμα (με οκτώ ιστονικά μόρια και εκατοντάδες πιθανές θέσεις τροποποιήσεων) οδηγεί εκ των πραγμάτων στη συνδυαστική ανάλυση πολλών τροποποιήσεων ταυτόχρονα από το ίδιο δείγμα.³¹

Αποφασιστικό βήμα στην κατανόηση των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών έχει γίνει με την αναγνώριση πρωτεϊνών που ενσωματώνουν (εγγραφείς), απομακρύνουν (διαγραφείς), και συνδέουν (αναγνώστες) μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στις ιστόνες και στο DNA.³² (Εικόνες 15-16)

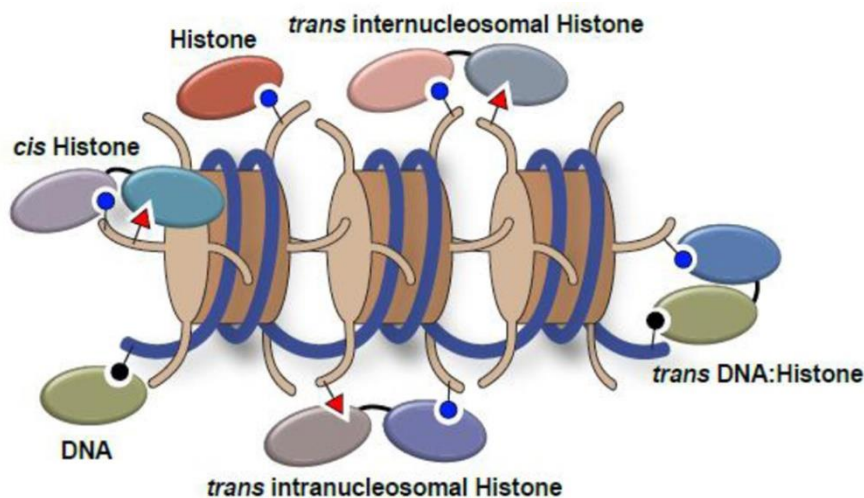


Εικόνα 15. Εγγραφείς (writers), διαγραφείς (erasers), και αναγνώστες (readers) στην Επιγενετική και στην δομή της χρωματίνης. Από : *EpiCypher*.

ΤΟ ΤΟΠΙΟ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ DNA.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μία βασική για την κυτταρική επιβίωση και προσαρμογή σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες διαδικασία. Η δομή της χρωματίνης πρέπει να ρυθμίζεται σωστά από επιγενετικούς ρυθμιστές για την κατάλληλη γονιδιακή έκφραση. Αυτοί οι ρυθμιστές ταξινομούνται σε εγγραφείς, αναγνώστες και διαγραφείς ανάλογα με το ρόλο τους. Οι επιγενετικοί εγγραφείς είναι ένζυμα που προσθέτουν λειτουργικές ομάδες (επιγενετική σήμανση) στο DNA και στις ιστόνες, οι οποίες αναγνωρίζονται από επιγενετικούς αναγνώστες. Οι περισσότερες επιγενετικές σημάσεις είναι αναστρέψιμες με την δράση επιγενετικών διαγραφών, οι οποίοι μπορούν να τις απομακρύνουν και να αναστρέψουν τις επιδράσεις τους. Οι εγγραφείς και διαγραφείς μπορούν να περιέχουν τμήματα αναγνωστών που επιτρέπουν διαδικασία «ανάγνωσης-εγγραφής» ή «ανάγνωσης-διαγραφής». Το σύστημα αλληλεπίδρασης των 3 επιγενετικών ρυθμιστών ελέγχει την μεταγραφή των γονιδίων και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι

ελαττώματα αυτού του συστήματος επάγουν την έναρξη και πρόοδο αρκετών καρκίνων συμπεριλαμβανομένου του ΝΚΚ. ³³



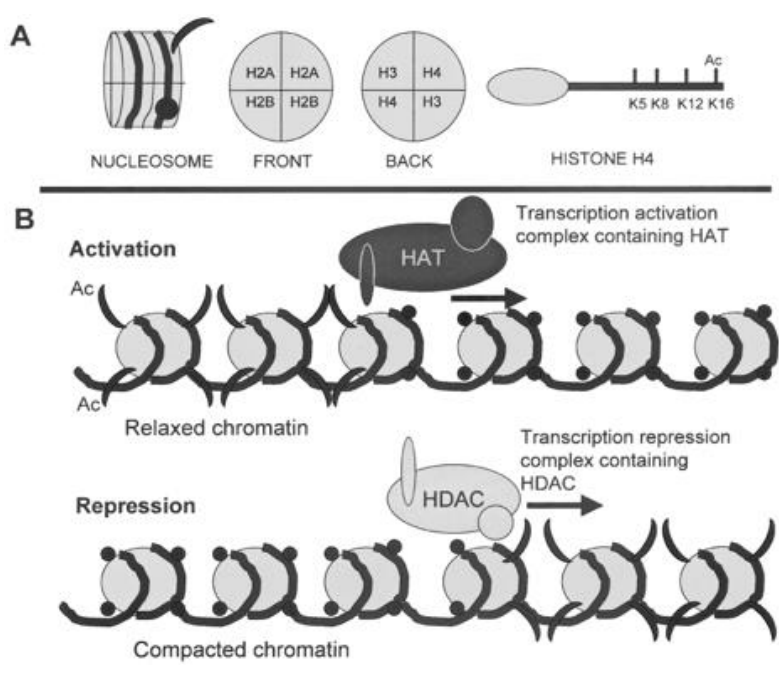
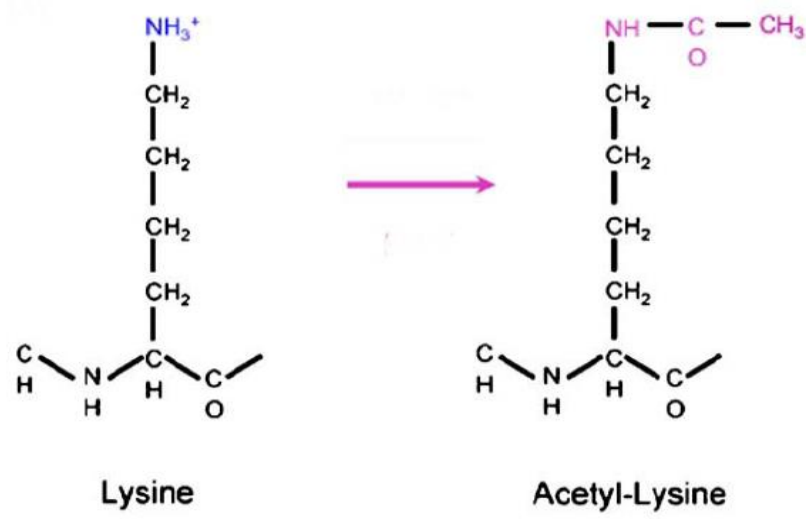
Εικόνα 16: Εγγραφείς, διαγραφείς, αναγνώστες. Το τοπίο των τροποποιήσεων ιστονών και DNA. Απομονωμένες και συνδεδεμένες πρωτεϊνικές δομές συντονίζουν την προσθήκη (εγγραφείς), την απομάκρυνση (διαγραφείς), και την σύνδεση (αναγνώστες) των τροποποιήσεων του DNA (μαύροι κύκλοι) και των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών (μπλέ κύκλοι και κόκκινα τρίγωνα) δημιουργώντας ένα δυναμικό και μεταβλητό περιβάλλον στη χρωματίνη. Οι cis αλληλεπιδράσεις αναφέρονται σε πολυδύναμα γεγονότα που συμβαίνουν στην ίδια ιστόνη. Οι trans αλληλεπιδράσεις αναφέρονται σε πολυδύναμα γεγονότα που συμβαίνουν σε γειτονικές ή συζευγμένες ιστόνες και DNA είτε στο ίδιο νουκλεόσωμα είτε σε γειτονικά νουκλεοσώματα. Trans αλληλεπιδράσεις σε απομακρυσμένα νουκλεοσώματα (εγγύτητα σε 3 διαστάσεις) δεν απεικονίζονται. Πολυδύναμες αλληλεπιδράσεις που διευκολύνονται από την ιδιότητα ως τμήμα μακρομοριακού συμπλέγματος επίσης δεν απεικονίζονται. Από : Scott B. Rothbart and Brian D. Strahl. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 August ; 1839(8): 627–643. doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.001.

2.2.2.1. ΚΥΡΙΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστονών.

Η ακετυλίωση αποτελεί την πιο συχνή τροποποίηση των ιστονών. Είναι η μεταφορά ακετυλικής ομάδας σε αμινοξικό κατάλοιπο Λυσίνης ή Αργινίνης και δημιουργία ε-N-ακετυλολυσίνης ή ε-N-ακετυλοαργινίνης (Εικόνα 17, 19). Έτσι εξουδετερώνεται το θετικό φορτίο των αμινοξέων λυσίνης και αργινίνης, χαλαρώνουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ουρών των ιστονών, ελαττώνεται η συγγένειά τους (affinity) για το DNA, αλλάζοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιστονών ανάμεσα σε παρακείμενα νουκλεοσώματα όπως επίσης τις αλληλεπιδράσεις των ιστονών με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες με τη δημιουργία νέων επιφανειών σύνδεσης. Σαν αποτέλεσμα έχουμε λιγότερο συμπυκνωμένη (χαλαρή)

χρωματίνη, ευκολότερα προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες και RNA πολυμεράση.³⁴



Εικόνα 17 (πάνω): Μεταφορά ακετυλικής ομάδας σε αμινοξικό κατάλοιπο Λυσίνης ή Αργινίνης και δημιουργία ε-N-ακετυλο-λυσίνης ή ε-N-ακετυλο-αργινίνης. Από : Αναδιάρθρωση της χρωματίνης. Chromatin remodeling. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Τμήμα Βιολογίας. Μαθήματα Βιολογίας.

<http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL412/documents/Lecture5.pdf>

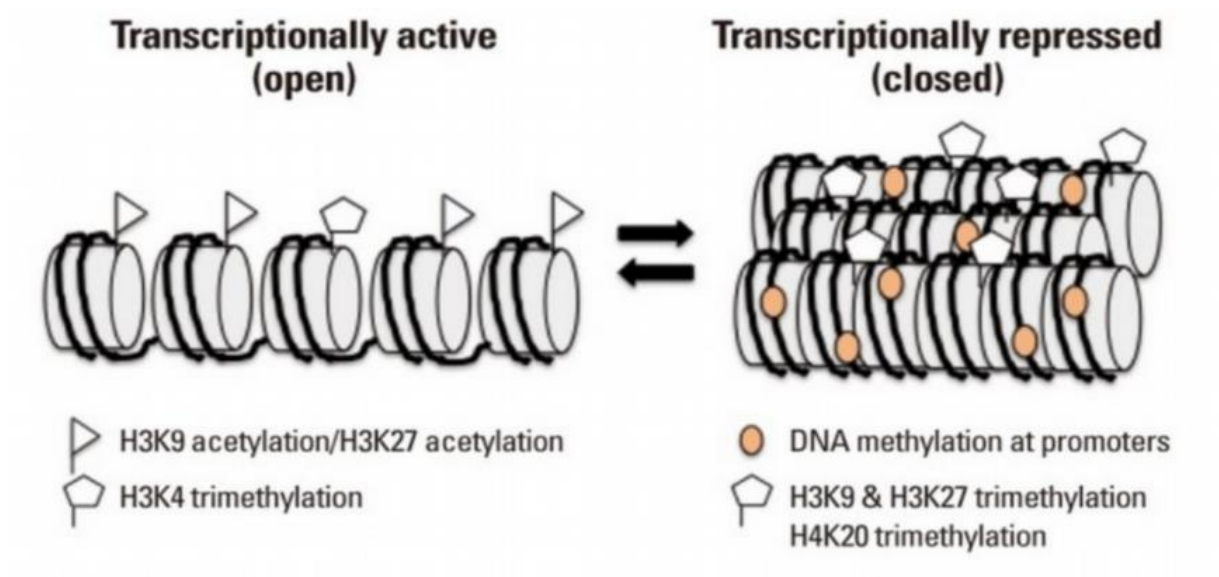
Εικόνα 18 (κάτω): Ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστονών και επίδραση στη δομή και λειτουργία της χρωματίνης. Από: Sebastiano Battaglia: Oncology for Scientists. Chromosome structure, replication, transcription, translation. Από: *Biochemical Journal* (2003) Volume 370, 737-749.

Η ακετυλίωση ιστονών σχετίζεται με ενεργοποίηση ενώ η αποακετυλίωση με καταστολή της μεταγραφής²⁷⁻²⁹. Οι ακετυλιωμένες ιστόνες συνήθως έχουν σαν αποτέλεσμα μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη (Εικόνες 16,18), ενώ οι αποακετυλιωμένες ιστόνες μεταγραφικά ανενεργή χρωματίνη³⁴. Οι πιο καλά μελετημένες ακετυλίωσεις ιστονών αφορούν στις H3K9 και H3K14 (Ιστόνη 3 στις λυσίνες 9 και 14)²⁷⁻²⁹. Το πρότυπο ακετυλίωσης (στην ιστόνη H2, H3 και H4) επηρεάζεται από δυο τάξεις ενζύμων : τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs, Histone Acetyl Transferases) και αποακετυλάσες ιστονών (HDACs, Histone Deacetylases). Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs) ακετυλιώνουν λυσίνη/αργινίνη ενώ οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) αποακετυλιώνουν λυσίνη/αργινίνη²⁷⁻²⁹.

Οι Ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs) υποδιαιρούνται στην οικογένεια GNAT (GCN5(General Control Nonrepressed 5) related N-AcetylTransferases), στην οικογένεια MYST (MOZ, Ybf2(Sas3), Sas2, Tip60) και στην οικογένεια CBP/p300. Οι οικογένειες GNAT και CBP/p300, περιέχουν βρωμοτομείς (bromodomains) οι οποίοι συνδέονται με ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης και HAT περιοχές (HAT domains) 160 και 500 καταλοίπων αντίστοιχα. Η οικογένεια MYST περιέχει χρωμοτομείς (chromodomains) οι οποίοι συνδέονται με μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης, ενώ οι HAT περιοχές τους έχουν μήκος περίπου 250 κατάλοιπα³⁵. Οι ακετυλοτρανσφεράσες (HATs) προσδένονται στις ακετυλιωμένες ιστόνες μέσω του βρωμοτομέα (bromodomain) και προσελκύουν μεταγραφικούς παράγοντες σε ενισχυτές ή υποκινητές γονιδίων ενώ μεταγραφικοί παράγοντες και ένζυμα τροποποιητικά της χρωματίνης συνδέονται απευθείας στις ακετυλιωμένες ιστόνες μέσω των δικών τους βρωμοτομέων και επάγουν μεταγραφή γονιδίων ή περαιτέρω χαλάρωση χρωματίνης αντίστοιχα ²⁷⁻²⁹. Μελέτες έχουν δείξει ότι ένα μικρό ποσοστό αυτών των ενζύμων όχι μόνο δρουν στις ιστόνες αλλά επίσης επηρεάζουν μη-ιστονικές πρωτεΐνες όπως p53 και Rb. ³⁴

Οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) ταξινομούνται σε τάξης 1 (HDACs 1, 2, 3 και 8 και εντοπίζονται στον πυρήνα), τάξης 2 (HDACs 4, 5, 6, 7 και 9 και εντοπίζονται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος), τάξης 3 (Σιρτουΐνες) και τάξης 4 (HDAC 11). Οι τάξεις 1, 2 και 4 είναι ομόλογες σε δομή και ακολουθία και η καταλυτική τους δράση εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ψευδαργύρου. Ωστόσο οι Σιρτουΐνες δεν έχουν δομική ή ομοιότητα ακολουθίας με τις HDACs άλλων τάξεων και απαιτούν NAD⁺ για την καταλυτική τους δραστηριότητα. ³⁴

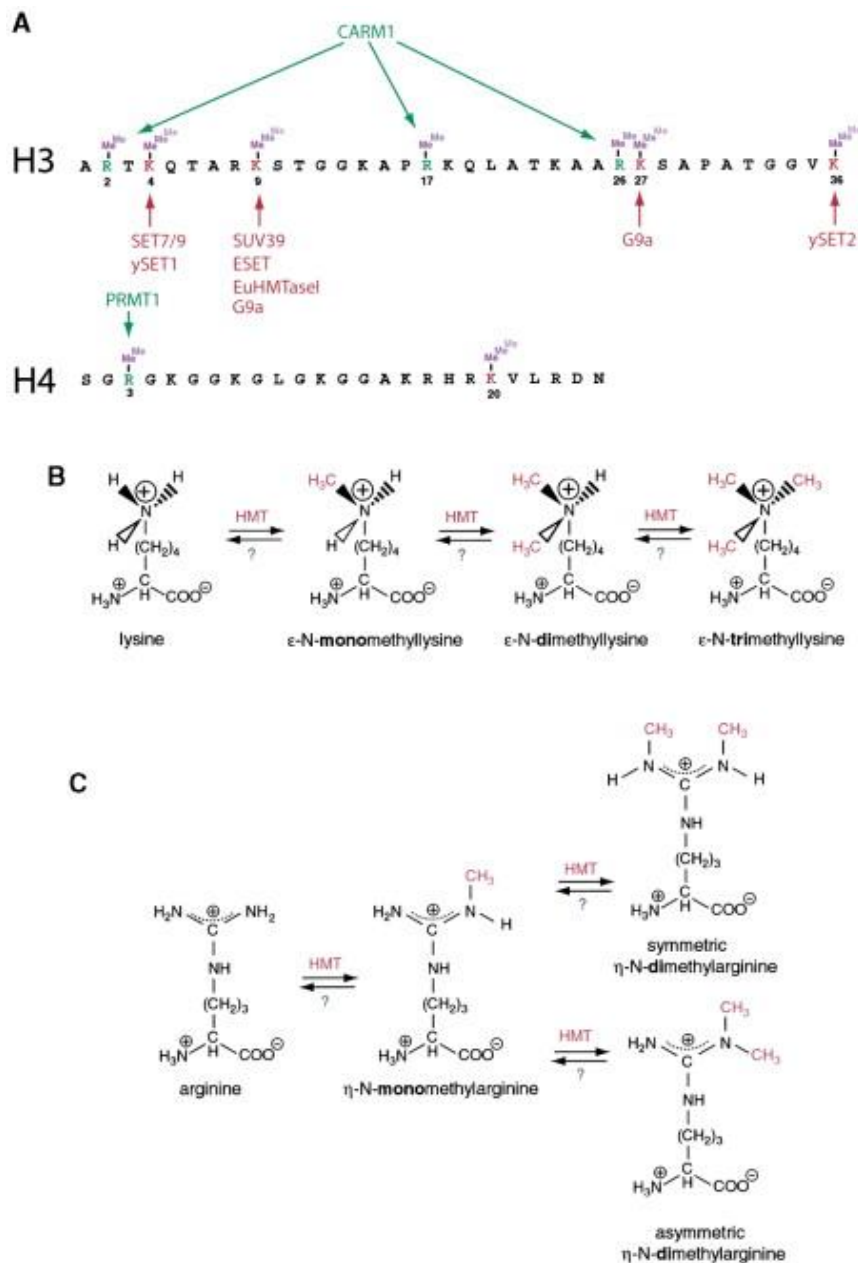
Αναστολείς που έχουν αναπτυχθεί ενάντια στα ένζυμα επιγενετικής τροποποίησης, περιλαμβάνουν αναστολείς των HATs και HDACs που είναι είτε ειδικής τάξης ή παν-αναστολείς (pan-HDACs) και θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο.³⁴



Εικόνα 19 : Ανοιχτή (αριστερά) και κλειστή (δεξιά) διάταξη της χρωματίνης. Οι σχετικές αποστάσεις μεταξύ νουκλεοσωμάτων αλλά και οι επιγενετικοί δείκτες όπως η μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών είναι τα στοιχεία που διαφοροποιούν την προσβασιμότητα της χρωματίνης σε πρωτεϊνικούς παράγοντες (Lindroth & Park, 2013) (CC BY-NC 3.0). Νικολάου Χ, Χουβαρδάς Π. : *Υπολογιστική Βιολογία*. Αρχές και μέθοδοι ανάλυσης βιολογικών δεδομένων. Δομή της χρωματίνης. Εκδόσεις Κάλλιπος. 2015

Μεθυλίωση και απομεθυλίωση ιστονών.

Μεθυλίωση είναι η τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης (K) ή αργινίνης (A) με προσθήκη μίας, δύο ή τριών μεθυλικών ομάδων και έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγή των αλληλεπιδράσεων του νουκλεοσώματος με πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε ιστόνες (Εικόνα 20)²⁷⁻²⁹. Αντίθετα με την ακετυλίωση μια, δυο, ή τρεις μεθυλομάδες μπορούν να προστεθούν. Κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να μονο-,δι- ή τριμεθυλιωθούν ενώ κατάλοιπα αργινίνης μπορούν μόνο να μονο- ή διμεθυλιωθούν.[38] Μεθυλιώσεις ιστονών σχετίζονται με ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο (Εικόνα 19).³⁴ Η αύξηση του ποσοστού της μεθυλίωσης, εντατικοποιεί την ενεργοποίηση ή καταστολή σε αυτή τη θέση.³⁸

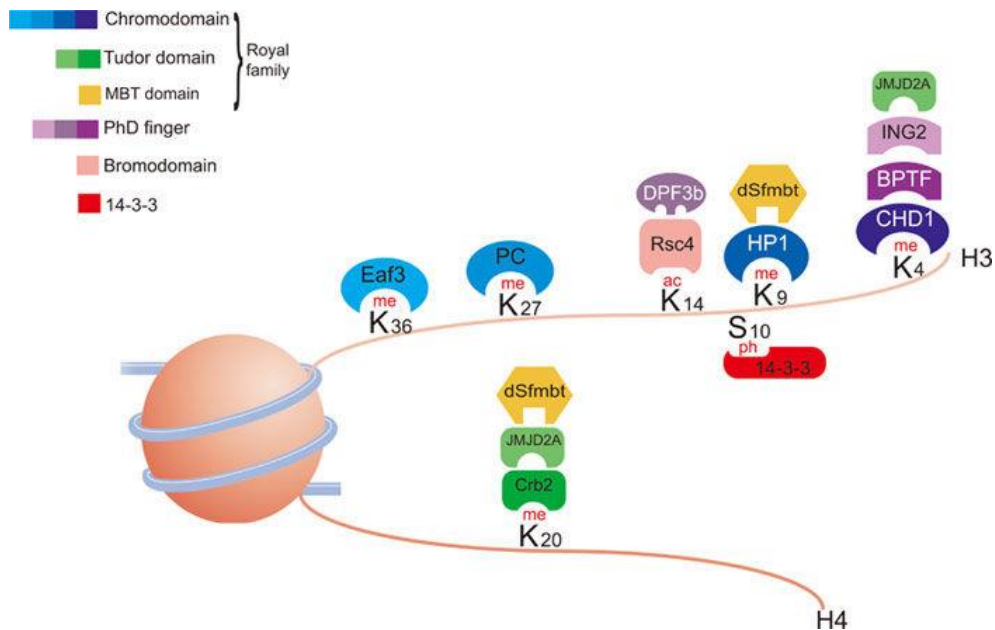


Εικόνα 20: Θέση και δομή μεθυλιωμένων καταλοίπων αμινοξέων σε ουρές ιστονών. (Α) Γνωστές θέσεις μεθυλίωσης στις N-τελικές ουρές των ιστονών H3 και H4. Κατάλοιπα λυσίνης που βρέθηκαν μεθυλιωμένα, απεικονίζονται κόκκινα και κατάλοιπα αργινίνης απεικονίζονται πράσινα. Τα κατάλοιπα λυσίνης μπορεί να μονο-, δι- ή τριμεθυλιωθούν. Επίσης φαίνονται οι γνωστές μεθυλτρανσφεράσες ιστονών και οι προτιμώμενες θέσεις που αυτές μεθυλιώνουν. (Β) Η χημική δομή της λυσίνης και τα μεθυλιωμένα της παράγωγα. Φαίνεται η δράση των μεθυλτρανσφερασών ιστονών (HMTs). Η πιθανή αναστρεψιμότητα της αντίδρασης από τις απομεθυλάσες απεικονίζεται με ερωτηματικά. (Γ) Χημική δομή της αργινίνης και των μεθυλιωμένων της παραγώγων. Φαίνεται η δράση των μεθυλοτρανσφερασών (HMTs). Οι πιθανές αντιδράσεις απομεθυλίωσης απεικονίζονται με ερωτηματικά. Οι δύο μορφές στις οποίες μπορεί να βρεθεί η διμεθυλαργινίνη είναι η συμμετρική ή η ασύμμετρη. Από : Andrew J. Bannister, Robert Schneider, Tony Kouzarides. Histone Methylation. Dynamic or Static? *Cell*. Volume 109, Issue 7, p801–806, 28 June 2002.

Οι μεθυλτρανσφεράσες ιστονών (Histone Methyltransferases, HMTs) μεθυλιώνουν ενώ οι απομεθυλάσες ιστονών (Histone Demethylases, HDMs) απομεθυλιώνουν αμινοξικά κατάλοιπα ιστονών.²⁷⁻²⁹ Οι μεθυλτρανσφεράσες (HMTs) για κατάλοιπα λυσίνης είναι ένζυμα από την οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν το τμήμα SET (SET domain) και περιλαμβάνουν τις SUV39H1, SUV39H2, SET7 και SET9. Συγκεκριμένα, ένζυμα αυτής της οικογένειας μπορούν να μεθυλιώνουν ιστόνες και μη ιστονικές πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένων p53 και του μεταγραφικού παράγοντα ERα). Η μεθυλίωση μπορεί να οδηγήσει είτε σε μεταγραφική καταστολή (π.χ. H3K9 μεθυλίωση από SUV39H1 και SUV39H2) ή ενεργοποίηση (π.χ. H3K4 μεθυλίωση από SET7/9).³⁴

Η μεθυλίωση της H3K4 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων μέσω πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και ενζύμων. Η μεθυλίωση της H3K9 οδηγεί σε απενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων με πρόσδεση της ετεροχρωματίνης πρωτεΐνης -1 (Heterochromatin Protein-1, HP1) μέσω του χρωμοτομέα (chromodomain) (Εικόνα 21). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σκιωδών χρωμοτομέων (chromoshadow domain) της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης -1 οδηγούν σε συμπύκνωση της χρωματίνης, η οποία γίνεται λιγότερο ή καθόλου προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες και RNA πολυμεράση με αποτέλεσμα καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ²⁷⁻²⁹. Η μεθυλίωση στην H3 έχει δύο ξεχωριστές δράσεις: στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) έχει ενεργοποιητικό ρόλο ενώ στο ριβοσωμικό DNA (rDNA) δρα κατασταλτικά. Το ευρύτερα μελετημένο φαινόμενο της καταστολής είναι η αποσιώπηση του X χρωμοσώματος στα θηλυκά εξαιτίας αυξημένων επιπέδων μεθυλίωσης ιστονών H3K27Me3 και H3K9Me2. Τα κατάλοιπα αργινίνης στις ιστόνες μπορούν να μεθυλιωθούν από την τάξη πρωτεϊνών PRMT1 (Protein arginine Methyltransferase-1) όπως το σύμπλεγμα CARM1 (Co-activator associated arginine methyltransferase-1) στα κατάλοιπα 2, 17 και 26 της ιστόνης H3. Πρόσφατες μελέτες αναγνώρισαν επίσης απομεθυλάσες αργινίνης όπως το PADI4 (Peptidyl Arginine Deiminase type 4) που μετατρέπουν μεθυλαργινίνη σε κιτρουλλίνη με απομάκρυνση ιμινομάδας που σχετίζεται με μεθυλο-κατάλοιπο. ³⁴

Μια από τις πρώτες απομεθυλάσες ιστονών (HDMTs) που ανακαλύφθηκαν είναι η LSD1 (Lysine Specific Demethylase-1) ενώ ακολούθησε η ανακάλυψη της JARID1 (Jumonji AT-Rich Interactive Domain) και JMJC (Jumonji C domain περιέχουσα οικογένεια HDMTs). Οι απομεθυλάσες JMJC ενεργούν σε H3K4, H3K9, H3K27 και H3K36 ή H3K20 και εξαρτώνται από Fe²⁺ και α-κετογλουταρικό για τη δράση τους. Μπορούν να απομεθυλιώσουν μονο-, δι- ή τριμεθυλιωμένα κατάλοιπα, ωστόσο η LSD1 κυρίως δρά σε μονο- ή διμεθυλιωμένα κατάλοιπα. ³⁴



Εικόνα 21 : Δομές που συνδέονται με τροποποιημένες ιστόνες. Παραδείγματα πρωτεϊνών με δομές που συνδέονται με ειδικό τρόπο με τροποποιημένες ιστόνες όπως απεικονίζεται. Απο Review: [Andrew J Bannister & Tony Kouzarides](#): Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* volume 21, pages381–395 (2011) doi:10.1038/cr.2011.22 (picture updated from Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128:693–705).

2.2.2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ

Πρόκειται για χημικές ουσίες, οι οποίες μεταβάλλουν τη δράση των ενζύμων που τροποποιούν ιστόνες. Είναι ετερογενής ομάδα τόσο αναφορικά με τη χημική τους δομή και το μηχανισμό δράσης, όσο και με τα ένζυμα ή ομάδες ενζύμων που στοχεύουν.

Αναστολείς αποακετυλασών ιστονών (Histone DeAcetylase inhibitors, HDACis)

Είναι οι περισσότερο ευρέως μελετημένοι αναστολείς τροποποιητών ιστονών. Αυτοί που αναπτύχθηκαν για τις τάξεις 1, 2 και 4 των HDACs διαιρέθηκαν σε 4 τάξεις βασισμένες στη δομή τους : υδροξαμικά οξέα (π.χ. rapobinostat), κυκλικά πεπτιδία (π.χ. romidepsin), λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (π.χ. βαλπροϊκό οξύ) και βενζαμίδες (π.χ. entinostat). Αυτοί οι αναστολείς μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σύμφωνα με την ειδικότητά τους για συγκεκριμένες τάξεις αποακετυλασών, προσθέτοντας έτσι στην πολυπλοκότητα των ειδικών για κάθε τάξη έναντι των παν-αναστολέων.³⁴

Οι παράγοντες που αναπτύχθηκαν για τις τάξεις 3 HDACs / Σιρτουΐνες, περιλαμβάνουν τόσο ενεργοποιητές όσο και αναστολείς. Ενεργοποιητές των Σιρτουϊνών, όπως η ρεσβερατρόλη και η συνθετικά απομονωμένη STR1720, θεωρείται ότι παρέχουν θεραπευτικό όφελος για διαβήτη τύπου 2, καρδιαγγειακή νόσο, νευροεκφύλιση, φλεγμονή

και καρκίνο. Αναστολείς Σιρτουϊνών όπως η salermide και το FK866 έχουν αποτελεσματικότητα στις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και δρουν μέσω p53-εξαρτώμενων ή p53-ανεξάρτητων μηχανισμών.³⁴

Αναστολείς Ακετυλοτρανσφερασών Ιστονών (Histone Acetyltransferase inhibitors, HATis)

Φυσικά συστατικά όπως το αναρκαδικό οξύ, γαρσινόλη, κουρκουμίνη και γαλλική επιγαλλοκατεχίνη-3 έχουν δείξει ότι αναστέλλουν p300 και PCAF in vitro.³⁴

Αναστολείς Μεθυλοτρανσφερασών Ιστονών (Histone Methyltransferase inhibitor, HMTis)

Ένας από τους πρώτους αναστολείς που αναπτύχθηκε, η chaetocin έδειξε κάποια ειδικότητα για την τάξη SUV 39 των μεθυλοτρανσφερασών. Πρόσφατα ανακαλυφθέντες παράγοντες περιλαμβάνουν αναστολείς των EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2), SMYD2 και SET7/9. Αναστολείς που έχουν αναγνωριστεί κατατάσσονται σε αυτούς που στοχεύουν : την οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν το τμήμα SET (π.χ. SHH, sinefungin και chaetocin), τους αναστολείς DOT1L που δεν περιέχουν το τμήμα SET (π.χ. EPZ004777) και τους αναστολείς μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης που είναι προϊόντα της πυραζολαμίδης ή ανάλογα του 1,5 διφαι-νυλ-1.4 πενταδι- εν-3-ονη που έχουν διαφορετικές δραστηριότητες στις in vitro δοκιμασίες.³⁴

Αναστολείς Απομεθυλασών Ιστονών (Histone DeMethylase inhibitors, HDMTis)

Ανάλογα διγουανιδίων, πολυαμίνης και μονοαμινοξειδάσης έχουν αναπτυχθεί σαν αναστολείς LSD1 (Lysine-Specific Demethylase-1) και επίσης ανάλογα α-κετογλουταρικού και αναστολείς HIF (Hypoxia Inducible factor) έχει φανεί ότι έχουν ανασταλτική δράση στην οικογένεια JMJC των αναστολέων αυτών.³⁴

2.2.2.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Απαντώνται λιγότερο συχνά σε σχέση με άλλες περισσότερο μελετημένες και είναι ίσως διαφορετικός ο ρόλος τους. Κάποιες βρέθηκαν ότι εμφανίζουν διασταυρούμενη αλληλεπίδραση με άλλες τροποποιήσεις. Στην περίπτωση της βουτυρυλίωσης και προπιονυλίωσης λυσίνης που χρησιμοποιούν ξεχωριστούς συμπαραγόντες συνενζύμου A, (βουτυρυλ-CoA και προπιονυλ-CoA), μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να καταλύονται αλλά

και να απομακρύνονται από ακετυλτρανσφεράσες και απακετυλάσες. Είναι σημαντικό να καθοριστεί που υπάρχουν στο γονιδίωμα, πώς εμφανίζουν διασταυρούμενη επίδραση με άλλες και ποιες καθοδικές λειτουργίες διαμεσολαβούνται από αυτές τις τροποποιήσεις³²

Φωσφορυλίωση ιστονών

Είναι η προσθήκη φωσφορυλομάδας σε κατάλοιπα σερίνης στα N-τελικά άκρα των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4. Η φωσφορυλίωση σε H1 ή H3 θεωρείται κλειδί στη μεταγραφική ρύθμιση και μίτωση και συνδέεται με το σχηματισμό μεταφασικών χρωμοσωμάτων.^{34,36}

Ουμπικουϊτίνωση ιστονών.

Είναι η προσθήκη της μικρής πρωτεΐνης ουμπικιτίνης σε κατάλοιπα λυσίνης στα C-τελικά άκρα των ιστονών H2A και H2B.

Ουμπικουϊτίνωση της H2B επιδρά στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Η ιστόνη H2B υφίσταται μονο-ουμπικιτίνωση της K123 κατά τη διάρκεια μεταγραφής που οδηγεί στην μεθυλίωση των H3K4 και H3K79.³⁴

Σομοϋλίωση ιστονών.

Προσθήκη της πρωτεΐνης SUMO. Παρόμοια δράση με την ουμπικουϊτίνωση. Παίξει ανασταλτικό ρόλο στη μεταγραφή καθώς ανταγωνίζεται την ακετυλίωση.³⁷

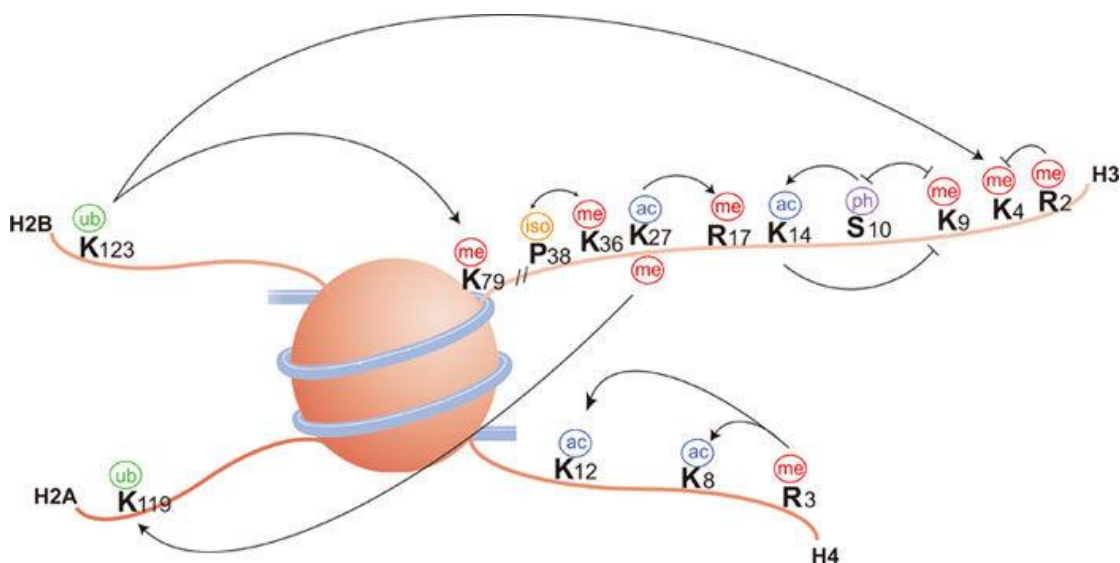
Άλλες τροποποιήσεις ιστονών.

Ένα πλήθος άλλων τροποποιήσεων ιστονών έχει περιγραφεί, όπως ADP- Ριβοζυλίωση (ADP-ribosylation), απαμίνωση (deamination), ισομερίωση προλίνης (Proline isomerization), κροτονυλίωση λυσίνης (Crotonylation), προπιονυλίωση λυσίνης (Propionylation), βουτυρυλίωση λυσίνης (Butyrylation), N-φορμυλίωση λυσίνης (Formylation), μαλονυλίωση λυσίνης (malonylation), 5-υδροξυλίωση λυσίνης (lysine 5-hydroxylation), σουκινυλίωση λυσίνης (lysine succinylation), υδροξυλίωση τυροσίνης (tyrosine hydroxylation), ακετυλίωση σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης (serine/threonine/tyrosine acetylation) και O-GlcNAκυλίωση σερίνης/θρεονίνης (serine/threonine O-GlcNAcylation).³²

ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα χρωμοσώματα όπως η μεταγραφή επηρεάζονται από μια ποικιλία μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στις ιστόνες όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, μεθυλίωση και ουμπικουϊτίνωση. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να δράσουν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό έτσι ώστε να διευκολύνουν ή να καταστείλουν διαδικασίες μεσολαβούμενες από την χρωματίνη. Μερικές τροποποιήσεις ιστονών θεωρείται ότι επηρεάζουν τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων, αλλά είναι

συναρπαστικό ότι οι τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να επηρεάζουν η μία την άλλη έτσι ώστε μια τροποποίηση στρατολογεί ή ενεργοποιεί τροποποιητικά της χρωματίνης συμπλέγματα για τη δημιουργία διαφορετικής ιστονικής τροποποίησης (Εικόνα 22) ³⁸.



Εικόνα 22 : Διασταυρούμενες επιδράσεις τροποποιήσεων ιστονών. Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά άλλες τροποποιήσεις. Η θετική επίδραση απεικονίζεται με τόξο ενώ η αρνητική με επίπεδο. Απο Review: Andrew J Bannister & Tony Kouzarides: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* volume 21, pages381–395 (2011) doi:10.1038/cr.2011.22 (picture updated from : Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128:693–705).

2.2.2.4. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Μοριακοί δείκτες ιστονών (histone marks) βρέθηκαν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα διακετυλίωση της ιστόνης H4 στις K4 και K12 σχετίζεται με την S φάση με εναπόθεση ιστόνης ενώ η φωσφορυλίωση της H2A (σε S1 και T119) και H3 (σε T3, S10 και S28) λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μίτωσης.³⁴

2.2.2.5. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ DNA.

ΙΣΤΟΝΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ.

Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν επίσης να αλληλεπιδρούν με τροποποιήσεις του DNA για να αλλάξουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Για παράδειγμα δείκτες κατασταλτικής DNA μεθυλίωσης βρέθηκαν στην ίδια περιοχή όπως και ακετυλίωση ιστονών. Μελέτες έχουν επίσης ερευνήσει την επίδραση της μεθυλίωσης DNA στην στρατολόγηση αρκετών συμπλεγμάτων συνκαταστολής που περιέχουν ένζυμα HDACs και τροποποιήσεις

ιστονών όπως H3K9 μεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή του p16 πριν τη μεθυλίωση CpG.³⁴

Απακετυλάσες ιστονών (HDACs) προσελκύονται από πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA και πραγματοποιούν αποακετυλίωση H3K9, ενώ πρωτεΐνες που αλλάζουν τη στερεοδομή του DNA προσελκύονται από άλλες οι οποίες προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA και προκαλούν συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής²⁷⁻²⁹.

Οι συνδυασμοί των τροποποιήσεων των ιστονών στο σύνολο τους συγκροτούν τον «ιστονικό κώδικα» που αντιστοιχεί στη δυναμικά μεταβαλλόμενη μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή χρωματινική κατάσταση, που μεταβιβάζεται από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά του.³⁷

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο νεφροκυτταρικός καρκίνος (ΝΚΚ), ο οποίος προέρχεται από τα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων αποτελεί το 80-85% όλων των πρωτοπαθών νεφρικών νεοπλασμάτων. Τα καρκινώματα της νεφρικής πυέλου από μεταβατικό επιθήλιο είναι τα επόμενα σε σειρά συχνότητας (περίπου 8%) ενώ άλλοι παρεγχυματικοί επιθηλιακοί όγκοι (ογκοκυτώματα) και νεφρικά σαρκώματα, εμφανίζονται σπάνια. Το νεφροβλάστωμα ή όγκος του Wilms είναι συχνό στα παιδιά και αποτελεί το 5-6% όλων των πρωτοπαθών όγκων στην παιδική ηλικία, ενώ το μυελοειδές νεφροκυτταρικό καρκίνωμα είναι μια σπάνια μορφή ΝΚΚ που απαντάται στην ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία και (λιγότερο συχνά) στην δρεπανοκυτταρική νόσο.³⁹

3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Διεθνώς, η επίπτωση του ΝΚΚ ποικίλει από περιοχή σε περιοχή και είναι υψηλότερη στην Τσεχία και στην Βόρεια Αμερική. Στις ΗΠΑ εμφανίζονται περίπου 64000 νέες περιπτώσεις και 14000 θάνατοι από ΝΚΚ, ενώ στην ΕΕ 84000 και 35000 περίπου αντίστοιχα, κάθε χρόνο.

Το ΝΚΚ είναι συχνότερο στους άνδρες (αναλογία ανδρών/ γυναικών περίπου 3/2) και εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της 6^{ης} ως 8^{ης} δεκαετίας της ζωής με μια μέση ηλικία διάγνωσης τα 64 έτη, ενώ είναι ασύνηθες πριν την ηλικία των 40 και σπάνιο στα παιδιά. Όσον αφορά στην έκταση της νόσου, η πλειοψηφία των ασθενών (65%) εμφανίζεται με τοπική νόσο (περιορισμένη στο νεφρό), το 16% με περιοχική νόσο (ως τους λεμφαδένες) και 16% εμφανίζεται με μεταστατική νόσο.

Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με καρκίνο νεφρού έχει διπλασιαστεί τα τελευταία 50 χρόνια από 34% το 1954 σε 62% το 1996 και σε 73% από το 2005 ως το 2011. Αυτή η βελτίωση στην επιβίωση οφείλεται κυρίως στην πρόωμη ανίχνευση αυτών των όγκων σε μικρότερα μεγέθη (π.χ.<4cm) και στη θεραπευτική χειρουργική αντιμετώπιση.³⁹

3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Παράγοντες που έχει διαπιστωθεί ότι συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΝΚΚ είναι το κάπνισμα, η υπέρταση, η παχυσαρκία, η επίκτητη κυστική νόσος του νεφρού, η επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες (κάδμιο, αμίαντος και παράγωγα πετρελαίου), η παρατεταμένη χρήση αναλγητικών, γενετικοί παράγοντες, προηγηθείσες χημειοθεραπευτικές αγωγές, η χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), η δρεπανοκυτταρική νόσος (για μυελοειδές καρκίνωμα) και οι λίθοι του νεφρού.³⁹

3.4. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ

Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο σακχαρώδης διαβήτης, η πολυκυστική νόσος των νεφρών, διαιτητικοί παράγοντες όπως η πρόσληψη νιτρικών, αναπαραγωγικοί παράγοντες όπως οι πολλές εγκυμοσύνες, οι προηγηθείσες ακτινοθεραπείες και ο καρκίνος κατά την παιδική ηλικία. Η χρήση αντισυλληπτικών μπορεί να μειώνει τον κίνδυνο ενώ και η συστηματική λήψη αλκοόλ δρά προστατευτικά.³⁹

3.5 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ

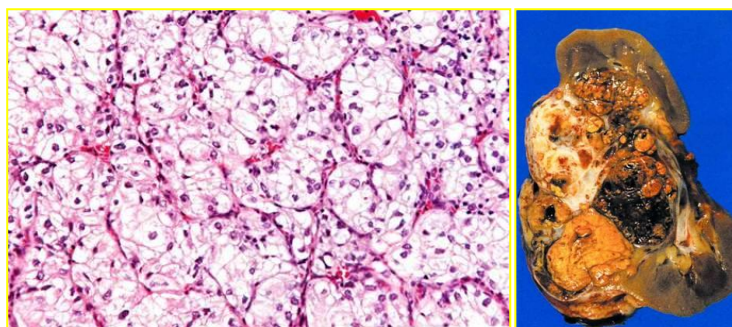
Η ταξινόμηση των καρκινωμάτων του νεφρού αντανakλά τη μορφολογία, το πρότυπο ανάπτυξης, την προέλευση του κυττάρου και την ιστοχημική και μοριακή βάση.

Οι ιστολογικοί τύποι του νεφροκυτταρικού καρκίνου περιλαμβάνουν:

3.5.1. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα (δκΝΚΚ).

Απαντώνται συχνότερα από όλους τους υπόλοιπους υπότυπους (75-85%) και προέρχονται από το εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο (Εικόνα 23). Μακροσκοπικά (Εικόνα 24) είναι συμπαγή ή (λιγότερο συχνά) κυστικά. Επιπρόσθετα εκτός από την σποραδική νόσο σχετίζονται με τη νόσο Von Hippel-Lindau. Ο υψηλός πυρηνικός βαθμός κακοήθειας και το σαρκωματοειδές πρότυπο ανάπτυξης σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση (ειδικά στην πρώιμη νόσο).

Συνήθεις γενετικές ανωμαλίες στο σποραδικό VHL-null ΝΚΚ περιλαμβάνουν απώλεια στο 3p (94%) και αφορά στα γονίδια VHL, BAP-1 και PBRM-1, απώλεια του 5q (69%), μονοσωμία ή μερική απώλεια του 14q (42%), απώλεια του 7q (20%), απαλοιφή του 8p (32%) και απώλεια του 9p (29%).³⁹



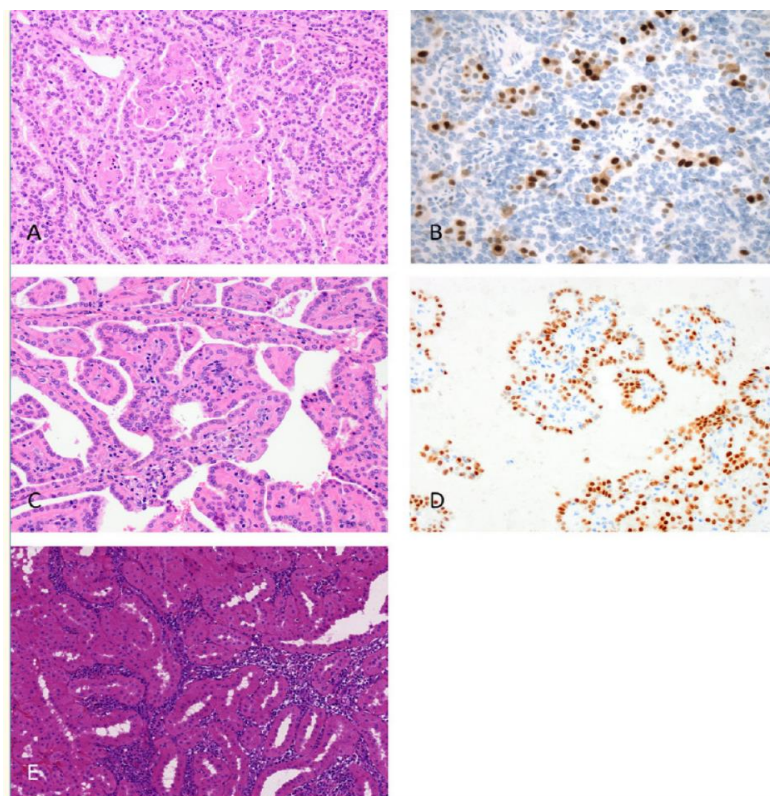
Εικόνα 23 (αριστερά): Μικροσκοπική εικόνα διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

Εικόνα 24 (δεξιά): Μακροσκοπική εικόνα διαυγοκυτταρικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

Από : Κορκολοπούλου Π. Νεοπλάσματα νεφρού. Μαθήματα ΠΜΣ: «Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: Κλινικοπαθολογοανατομική θεώρηση και Έρευνα».

3.5.2. Τα θηλώδη καρκινώματα (ΘΝΚΚ).

Αποτελούν το 10-15% των ΝΚΚ και η παλαιότερη διαίρεσή τους ήταν βάσει ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών σε τύπο 1 και τύπο 2. Στην 5^η έκδοση της ταξινόμησης του WHO (2022) οι υπότυποι 1 και 2 δεν προτείνονται. Νεφροκυτταρικά καρκινώματα τα οποία προηγουμένως ταξινομούνταν σαν τύπου 2 ΘΝΚΚ, εμφανίζουν σημαντική μορφολογική ετερογένεια και διαφορετική κλινική συμπεριφορά. Έτσι αναγνωρίζονται σαν διακριτές και ξεχωριστές οντότητες όπως σποραδικό ΝΚΚ με έλλειψη FH, ΝΚΚ με διαμετάθεση, ΝΚΚ με ALK αναδιάταξη, ΝΚΚ σχετιζόμενο με επίκτητη κυστική νόσο και ηωσινοφιλικό συμπαγές και κυστικό ΝΚΚ. Το μορφολογικό φάσμα των ΘΝΚΚ έχει επεκταθεί για να συμπεριλάβει αρκετά διακριτά ΘΝΚΚ μοτίβα που έχουν πρόσφατα περιγραφεί συμπεριλαμβανομένων του διφασικού (κυψελιδικού/πλακοειδούς) ΘΝΚΚ που μπορεί να έχει συμπαγή ανάπτυξη, του θηλώδους νεφρικού νεοπλάσματος με αντίστροφη πολικότητα που προηγουμένως περιγραφόταν σαν «ογκοκυτταρικό low grade ΘΝΚΚ» και τον Warthin-like ΘΝΚΚ που μιμείται τον όγκο των σιελογόνων αδένων^{39, 278}.



Εικόνα 25 : Θηλώδες ΝΚΚ.(Α) Διφασικό (κυψελιδικό/πλακοειδές) θΝΚΚ.(Β) Θετικότητα σε Cyclin D1.(C) Θηλώδες νεφρικό νεόπλασμα με αντίστροφη πυρηνική πολικότητα.με θετικότητα σε GATA3 (D). (E). Warthin-like θΝΚΚ. Reza Alaghehbandan, Farshid Siadat, and Kiril Trpkov.What's new in the WHO 2022 classification of kidney tumours? *Pathologica*. 2023 Feb; 115(1):8- 22. Published online 2023 Jan 16. <https://doi.org/10.32074%2F1591-951X-818>

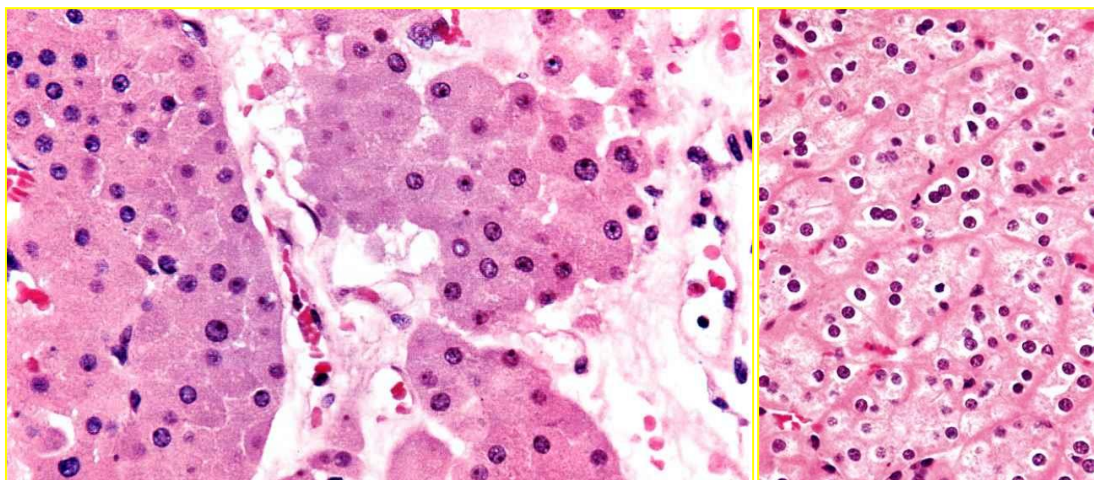
3.5.3 Τα χρωμόφοβα καρκινώματα (χρΝΚΚ).

Αποτελούν το 5-10% των ΝΚΚ. Ιστολογικά, απαρτίζονται από στιβάδες κυττάρων που στερούνται τα λιπίδια και το γλυκογόνο, χαρακτηριστικά των περισσότερων ΝΚΚ, ενώ εξορμώνται από τα εμβόλιμα (intercalated) κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων (Εικόνα 27).

Τα κύτταρα των χρωμόφοβων καρκινωμάτων έχουν υποδιπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων αλλά δεν έχουν απαλοιφή του 3p γενετικού χρωμοσωμικού τόπου.³⁹ Μια μελέτη⁵¹ με χρήση συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού βρήκε ότι 17 από τους 19 όγκους επιδεικνύουν μια ευρεία ποικιλία ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων συνδυασμών απώλειας χρωμοσωμάτων (1,2,6,10,13,17,21). Σε μια μελέτη προφίλ γονιδιακής έκφρασης το K1T ογκογονίδιο ήταν ένα από τα γονίδια τα οποία βρέθηκαν ότι

υπερεκφράζονται ειδικά στο χρNKK, ενώ το προϊόν του εντοπίστηκε με ανοσοϊστοχημική ανάλυση στις κυτταρικές μεμβράνες του χρωμόφοβου καρκινώματος.

Τα χρωμόφοβα καρκινώματα μπορεί να έχουν χαμηλότερο κίνδυνο προόδου νόσου και θανάτου συγκριτικά με τα διαυγοκυτταρικά, παρότι αυτό είναι πιθανά εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ασθενείς παρουσιάζονται σε πρωιμότερο στάδιο. Επίσης, η λειτουργία των μιτοχονδρίων έχει καταδειχθεί σαν σημαντικό στοιχείο της βιολογίας της νόσου. Γονιδιακές μελέτες έδειξαν περιοδικά επαναλαμβανόμενες δομικές ασυνέχειες στην περιοχή του υποκινητή της Αντίστροφης Τρανσκριπτάσης της Τελομεράσης (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) που σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης.³⁹



Εικόνα 26: (δεξιά) Χρωμόφοβο ΝΚΚ.

Εικόνα 27 (Αριστερά) : Ογκοκύτωμα.

Από : Κορκολοπούλου Π. Νεοπλάσματα νεφρού. Μαθήματα ΠΜΣ: «Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: Κινηκοπαθολογοανατομική θεώρηση και Έρευνα».

3.5.4. Τα ογκοκυτώματα.

Είναι ασυνήθιστα νεοπλάσματα (3-7% των νεφροκυτταρικών νεοπλασμάτων) και αποτελούνται από αμιγή πληθυσμό ογκοκυττάρων, που είναι μεγάλα, καλά διαφοροποιημένα νεοπλασματικά κύτταρα με έντονα ηωσινόφιλο κοκκιδές κυτταρόπλασμα λόγω μεγάλου αριθμού μιτοχονδρίων (Εικόνα 28). Φαίνεται ότι προέρχονται από τα εμβόλιμα (intercalated) κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων. Ενώ τα σποραδικά ογκοκυτώματα συνήθως είναι ετερόπλευρα και μονήρη, έχουν περιγραφεί αμφοτερόπλευρα

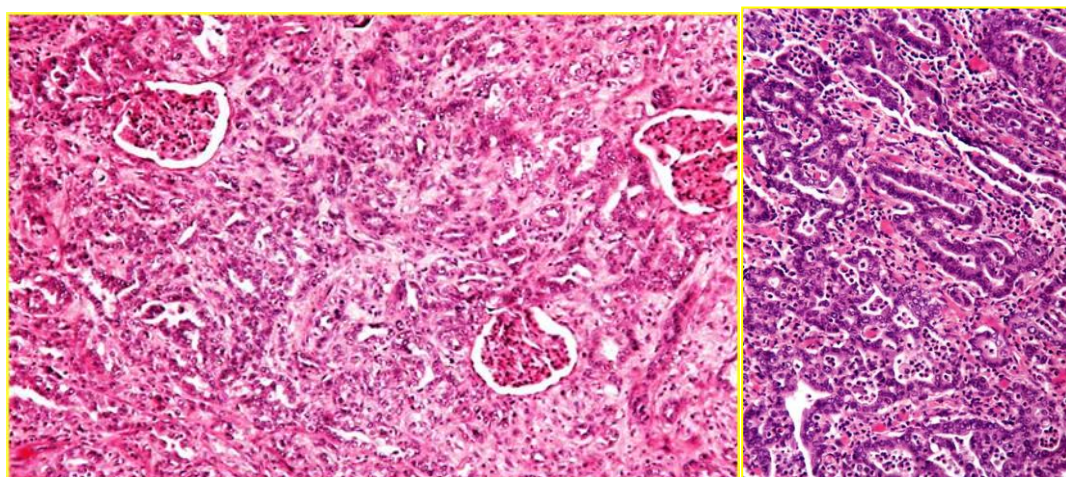
και πολλαπλά σε ασθενείς με σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης και σύνδρομο Birt-Hogg-Dube.

Η ετερογένειά τους καταδείχθηκε σε χρωμοσωμικές αναλύσεις που συμπεριελάμβαναν συνδυασμένες απώλειες χρωμοσωμάτων Y και 1, αναδιατάξεις που εμπλέκουν τον τόπο της κυκλίνης D1 (CCND1 locus) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q13, συμμετοχή του 12q12-13 και απώλεια του 14q.

Τα νεφρικά ογκοκυτώματα συμπεριφέρονται καλοήθως, παρότι έχει αναγνωριστεί ότι ο ρυθμός αύξησης μπορεί να είναι παρόμοιος με του ΝΚΚ. Ακόμα και όταν είναι πολύ μεγάλα, περιβάλλονται από κάψα και σπάνια είναι διηθητικά ή σχετίζονται με μεταστάσεις. Συνυπάρχοντα ΝΚΚ μπορεί να διαγνωστούν σε 10 ως 32% των ασθενών με ογκοκύτωμα, ειδικά σε αυτούς που παρουσιάζονται με διάχυτα ογκοκυτταρικά οζίδια που περιλαμβάνουν το νεφρικό παρέγχυμα (γνωστή και σαν νεφρική ογκοκύτωση) και γι'αυτό πρέπει να παρακολουθούνται στενά και να αντιμετωπίζονται όταν υπάρχει ταχεία ανάπτυξη του όγκου. Όμως, παρά την υψηλή συχνότητα συνυπαρχόντων ΝΚΚ, ο κίνδυνος ανάπτυξης μετάχρονων νεφρικών όγκων μετά από εκτομή ογκοκυτώματος είναι χαμηλός.³⁹

3.5.5. Όγκοι των αθροιστικών σωληναρίων (Όγκοι του Bellini)

Είναι σπάνιοι αλλά εμφανίζονται σε νεότερους ασθενείς, συχνότερα σε μαύρους και είναι συχνά επιθετικοί, καθώς παρουσιάζονται με προχωρημένη νόσο σταδίου III ή IV. Συχνά παρουσιάζονται με αιματουρία, ενώ έχουν βρεθεί και σαρκωματοειδείς ποικιλίες.(εικόνα29)



Εικόνα 28 (Αριστερά) : Όγκος του Bellini.

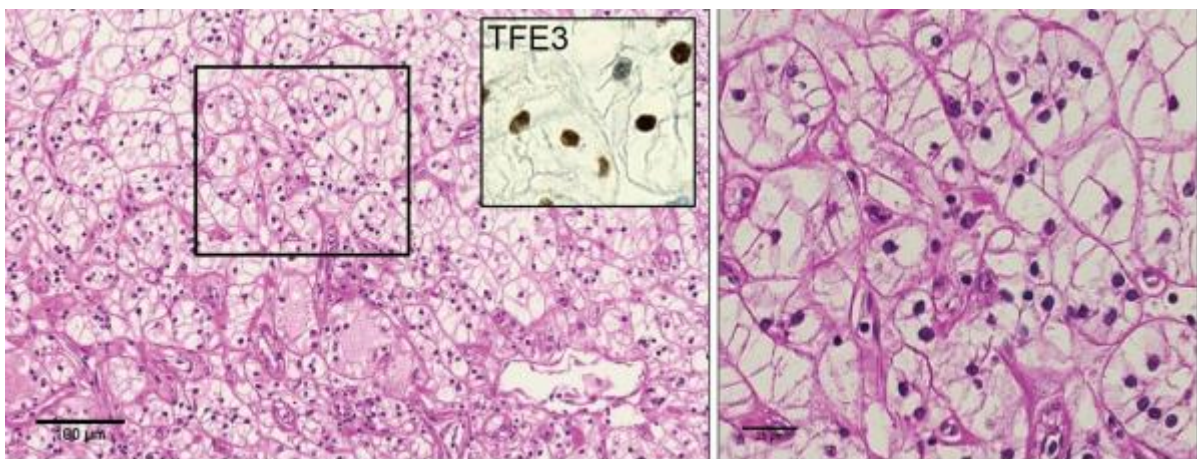
Εικόνα 29 (Δεξιά) : Μυελοειδές καρκίνωμα.

Από : Κορκολοπούλου Π. Νεοπλασμάτα νεφρού. Μαθήματα ΠΜΣ: «Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: Κλινικοπαθολογοανατομική θεώρηση και Έρευνα».

Δεν έχουν συσχετιστεί με ένα σταθερό πρότυπο γενετικών ανωμαλιών, ενώ βιολογικά μιμούνται περισσότερο όγκους μεταβατικού επιθηλίου παρά ΝΚΚ.

3.5.6 Μυελοειδές νεφρικό καρκίνωμα με έλλειψη SMARCB1 (INI-1) (Medullary carcinoma)

Συνιστά αλλαγή στο όνομα του μυελοειδούς νεφρικού καρκινώματος στην κατάταξη του WHO (2022). Αυτοί οι τύποι καρκινωμάτων δείχνουν ομοιόμορφη απώλεια της πυρηνικής έκφρασης της πρωτεΐνης SMARCB1(INI1 SNF5 BAF47) από όπου προκύπτει και η ονομασία τους. Σπάνια και επιθετικά καρκινώματα που εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε νεαρούς Αφρικανικής καταγωγής με δρεπανοκυτταρική νόσο ή σπάνια άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες. Απώλεια της SMARCB1 πρωτεΐνης έχει επίσης βρεθεί σε σπάνια νεφρικά καρκινώματα που δεν μπορούν να διαχωριστούν μορφολογικά από το νεφρικό μυελοειδές καρκίνωμα και παρατηρούνται σε ασθενείς χωρίς αιμοσφαιρινοπάθειες. Η 5^η έκδοση του WHO προτείνει να θεωρούνται σαν υπότυποι του μυελοειδούς καρκινώματος με έλλειψη SMARCB1. Ωστόσο, η απώλεια SMARCB1 μπορεί σπανίως να βρεθεί σε άλλους αναγνωρίσιμους υπότυπους ΝΚΚ που τυπικά δείχνουν είτε αποδιαφοροποίηση ή ραβδοειδή μορφολογία και αντιπροσωπεύουν δευτερεύον γεγονός. Συστήνεται να ταξινομούνται σύμφωνα με τον πρωτογενή τύπο (π.χ. δκΝΚΚ με ραβδοειδή / αποδιαφοροποιημένη μορφολογία) (Εικόνα 29) ²⁷⁸



Εικόνα 30: Καρκινώματα σχετιζόμενα με διαμετάθεση. Xingming Zhang, Hella A. Bolck, Niels J. Rupp, Holger Moch. Genomic alterations and diagnosis of renal cancer Virchows Archiv (2024) 484:323–337

3.5.7. Καρκινώματα σχετιζόμενα με διαμετάθεση.

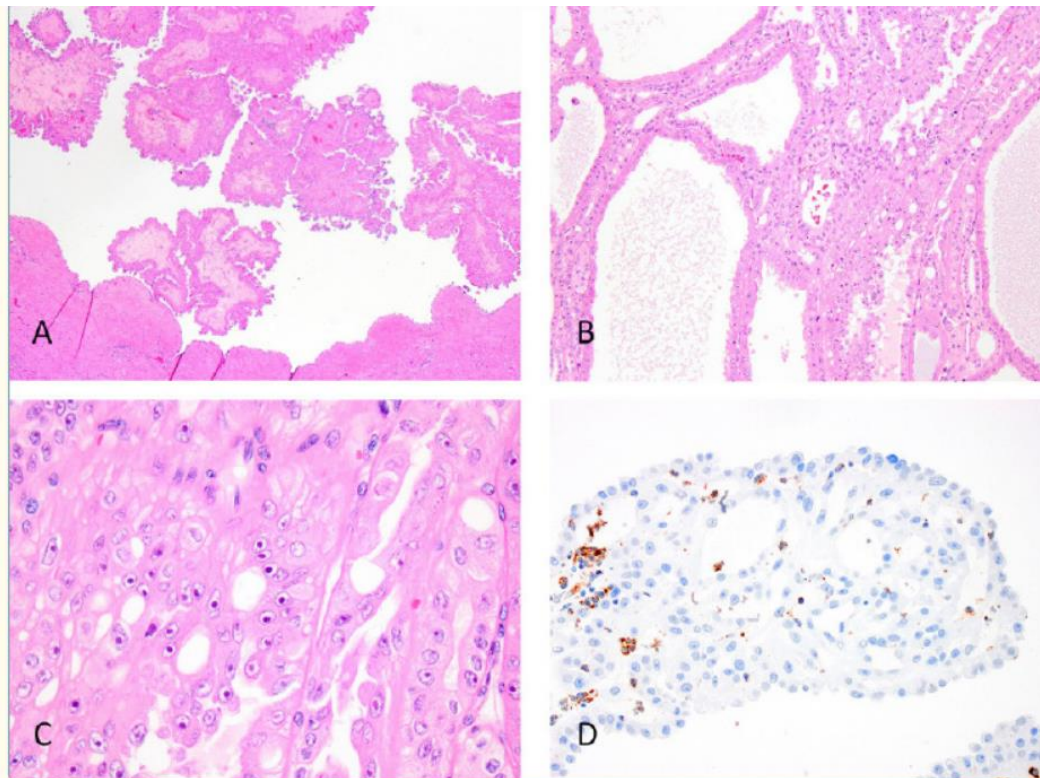
Στην προηγούμενη ταξινόμηση του WHO (2016) τα ΝΚΚ με αναδιάταξη σε TFE3 (επίσης γνωστά σαν ΝΚΚ με διαμετάθεση Χρ11) χαρακτηρίζονται από σύντηξη του TFE3 (Χρ11) με άλλα γονίδια στα χρωμοσώματα 1,17 και Χ συνήθως RBM10, GRIPAP1, RBMX και NONO. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία στα ΝΚΚ με TFE3 αναδιατάξεις, έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση περισσότερων φαινότυπων (Εικόνα 30). Επιπλέον, ΡΕCόματα με TFE3 αναδιατάξεις έχουν επίσης αναγνωριστεί, όπου λείπει τυπικά έκφραση PAX8 με αποτέλεσμα την χρησιμότητα στη διαφοροδιάγνωση τους από τα ΝΚΚ με TFE3 αναδιατάξεις.

Τα ΝΚΚ με αναδιατάξεις TFEB χαρακτηρίζονται από διαμετάθεση t(6;11)(p21;q12) που οδηγεί σε σύντηξη γονιδίων TFEB-MALAT1. Είναι κυρίως μη επιθετικοί, χαμηλού σταδίου όγκοι. Χαρακτηρίζονται από διφασικό μοτίβο, αποτελούμενο από μεγάλα και μικρά επιθηλιοειδή κύτταρα. Ωστόσο, πρόσφατα περιγράφονται ογκοκυτταρικές και θηλώδεις μορφολογίες και χαρακτήρες που επικαλύπτονται με άλλα ΝΚΚ.

Το ΝΚΚ με TFEB ενίσχυση εμφανίζει ενίσχυση του 6p21 καταλήγοντας σε TFEB υπερέκφραση με υπερέκφραση των γειτονικών γονιδίων για παράδειγμα VEGFA. ΝΚΚ με TFEB αναδιατάξεις παρατηρούνται σε μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς και έχουν περισσότερο επιθετική συμπεριφορά, συνήθως εμφανιζόμενοι σαν όγκοι υψηλού σταδίου²⁷⁸.

3.5.8. ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης.

Είναι όγκοι που εμφανίζουν μορφολογία συμβατή με αυτούς που υπάρχουν στο σύνδρομο (HLRCC). Εμφανίζουν πολλαπλά μοτίβα (θηλώδη, σωληνώδη/σωληνοκυστικά, συμπαγή, σαρκωματοειδή και κυστικά στοιχεία²⁷⁸).



Εικόνα 31: ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης. Μορφολογικά μοτίβα. Reza Alaghebandan, Farshid Siadat, and Kiril Trpkov. What's new in the WHO 2022 classification of kidney tumours? *Pathologica*. 2023 Feb; 115(1):8- 22. Published online 2023 Jan 16. <https://doi.org/10.32074%2F1591-951X-818>

3.5.9. Αταξινόμητα κακοήγη νεοπλάσματα.

Άλλες σπάνιες πρωτοπαθείς κακοήθειες έχουν αναφερθεί ότι προέρχονται από το νεφρό όπως λεμφώματα, σαρκώματα μαλακών μορίων (π.χ. λειομυοσάρκωμα, λιποσάρκωμα) και καρκινοειδή, οι οποίες αντιπροσωπεύουν λιγότερο από 5% των κακοήθων όγκων του νεφρού.³⁹

3.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ – ΕΚΤΙΜΗΣΗ – ΔΙΑΓΝΩΣΗ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Ασθενείς με ΝΚΚ μπορούν να παρουσιαστούν με ποικιλία συμπτωμάτων εξαιτίας του ίδιου του όγκου (π.χ. μάζα, άλγος), διήθησης της ουροφόρου οδού (π.χ. αιματουρία), παρανεοπλασματικών συνδρόμων ή με εκδηλώσεις από την ύπαρξη μεταστάσεων. Επιπρόσθετα, το ΝΚΚ διαγιγνώσκεται τυχαία σαν συνέπεια αυξημένης χρήσης απεικονιστικών τεχνικών για άλλους λόγους.

Ασθενείς με συμπτώματα, σημεία ή άλλα ευρήματα συμβατά με ΝΚΚ θα έπρεπε να υποβάλλονται σε εκτίμηση για τυχόν παρουσία νεφρικής μάζας. Υπολογιστική τομογραφία ή υπερηχογράφημα κοιλιακής χώρας μπορούν να επιβεβαιώσουν την παρουσία μίας μάζας, να διαχωρίσουν μια καλοήγη κύστη από ΝΚΚ και να υπολογίσουν την έκταση της νόσου.

Σε επίπεδο μικρής συμπαγούς νεφρικής μάζας, οι απεικονιστικές μελέτες δεν μπορούν να διαχωρίσουν αξιόπιστα ένα καλοήγη όγκο από ΝΚΚ. Επομένως γενικά συνιστάται ότι αλλοιώσεις άλλες εκτός απλών κύστεων πρέπει να αφαιρούνται.

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM (Tumor, Nodes, Metastasis), που βασίζεται στην έκταση του πρωτοπαθούς όγκου και στην παρουσία ή απουσία συμμετοχής περιοχικών λεμφαδένων ή απομακρυσμένων μεταστάσεων, χρησιμοποιείται για τη σταδιοποίηση όλων των ιστολογικών υποτύπων του ΝΚΚ. Αυτό το σύστημα σταδιοποίησης σχετίζεται με την πρόγνωση και παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αντιμετώπιση του ασθενή.³⁹

3.7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.

Σε περιοχική νόσο η αντιμετώπιση περιλαμβάνει ριζική ή μερική νεφρεκτομή (αναλόγως της θέσης και της έκτασης της βλάβης), ανοικτή ή λαπαροσκοπική και ακολούθως παρακολούθηση.

Σε προχωρημένο διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ έχει θέση η κυτταρομειωτική νεφρεκτομή πριν την έναρξη συστηματικής θεραπείας και μετά από εκτίμηση κινδύνου η ανοσοθεραπεία ή και η στοχευμένη θεραπεία με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες.

Σε προχωρημένο μη διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ, προτείνεται μετά από επέμβαση κυτταρομείωσης αγωγή με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες αρχικά, ενώ σε ΝΚΚ που προέρχονται από αθροιστικά σωληνάρια ή σε μυελοειδές έχει θέση η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία.

Ο ρόλος της ακτινοθεραπείας περιορίζεται σε επώδυνες οστικές μεταστάσεις, σε εγκεφαλικές μεταστάσεις καθώς και σε επώδυνες υποτροπές στην περιοχή του αφαιρεθέντος νεφρού.³⁹

4. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΚΚ

4.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΚΚ.

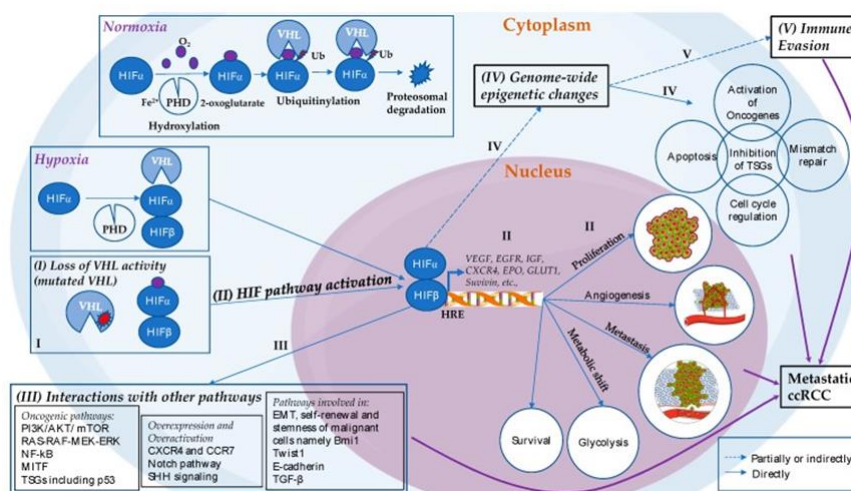
4.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΝΚΚ.

Το γονίδιο VHL (Von Hippel-Lindau).

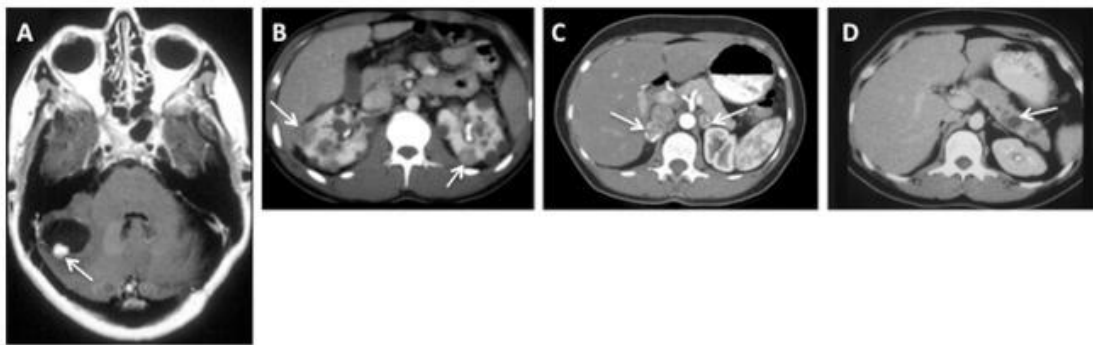
Ανάλυση γενετικής σύνδεσης πραγματοποιήθηκε σε οικογένειες με νόσο Von Hippel-Lindau (VHL) με σκοπό την αναγνώριση του τόπου (locus) VHL στο χρωμόσωμα 3p25. Ανιχνεύτηκαν γαμετικές μεταλλάξεις (germline) στο VHL σε σχεδόν 100% των οικογενειών, με περισσότερες από 420 μοναδικές μεταλλάξεις όλων των τύπων να έχουν αναφερθεί παγκοσμίως και έχουν προκύψει συσχετισμοί γονοτύπου-φαινοτύπου. Η πλειοψηφία των οικογενειών που αναπτύσσουν ΝΚΚ και αιμαγγειοβλαστώματα ΚΝΣ χωρίς φαιοχρωμοκυτώματα και ταξινομούνται στον τύπο 1, έχουν μεταλλάξεις οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του μεγέθους της πρωτεΐνης (truncating mutations) ή ενδογονιδιακές (intragenic) απαλοιφές. Οι τύπου 2 VHL οικογένειες έχουν κυρίως παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις και εμφανίζονται με φαιοχρωμοκυτώματα ή χωρίς (τύπος 2A) ή με (τύπος 2B) ΝΚΚ και με αιμαγγειοβλαστώματα (τύποι 2A και 2B). Το VHL είναι ένα κλασσικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, στο οποίο και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου πρέπει να είναι αδρανοποιημένα για την ανάπτυξη όγκου. (Εικόνα 32)

Η νόσος Von Hippel-Lindau είναι μια αυτοσωματική επικρατής κληρονομούμενη πολυσυστηματική διαταραχή στην οποία τα άτομα που προσβάλλονται, είναι σε κίνδυνο για την ανάπτυξη διαυγοκυτταρικού τύπου καρκίνου του νεφρού και κύστεων, όγκων των επινεφριδίων (φαιοχρωμοκυτωμάτων), παγκρεατικών κύστεων και όγκων των νησιδίων, αιμαγγειοβλαστωμάτων του ΚΝΣ (και του αμφιβληστροειδούς), όγκου ενδολεμφικού ασκού του έσω ωτός και κυσταδενωμάτων επιδιδυμίδας. (Εικόνα 33)

Μεταλλάξεις του VHL με επακόλουθη αδρανοποίηση του φυσικού στελέχους VHL αλληλίου επίσης βρέθηκαν σε υψηλό ποσοστό όγκων από ασθενείς με σποραδικό διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ. Σε μελέτη των Nickerson και συν. ανιχνεύτηκαν VHL μετάλλαξη ή υπερμεθυλίωση σε 92% των σποραδικών διαυγοκυτταρικών ΝΚΚ. ^{41,42}



Εικόνα 32 : Η φυσιολογία του μονοπατιού VHL-HIF μαζί με την προτεινόμενη αιτιοπαθογένεια που οδηγεί στο μεταστατικό δcNKK. Σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου (normoxia), η υδροξυλίωση του HIFα καταλύεται από τις PHDs και απαιτεί σίδηρο, ασκορβικό και 2-οξυγλουταρικό οξύ. Οι πρωτεΐνες PHD χρησιμοποιούν οξυγόνο για να προσθέτουν ομάδες υδροξυλίου σε ένα από τα δύο συντηρημένα υπολείμματα προλίνης του τμήματος αποδόμησης οξυγόνου της υπομονάδας α του μορίου HIFα με σκοπό τη σήμανσή του για αναγνώριση από την pVHL, η οποία στην συνέχεια αναγνωρίζει τον υδροξυλιωμένο HIFα, τον ουβικουιτινώνει και τον καθιστά στόχο για αποδόμηση στο πρωτεάσωμα. Ωστόσο στην υποξία το βήμα της υδροξυλίωσης από τις PHDs δεν λαμβάνει χώρα, καταλήγοντας σε σταθεροποίηση του HIFα, ο οποίος συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζει σύμπλεγμα με το σταθερά εκφραζόμενο HIFβ και τελικά μεταβαίνει στον πυρήνα όπου συνδέεται με HREs ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο εκατοντάδες γονίδια που σχετίζονται με την προσαρμογή σε περιβάλλον με χαμηλό οξυγόνο. (1) Απώλεια δραστηριότητας VHL.(2) Σταθερά ενεργό μονοπάτι HIF : όταν το VHL είναι μεταλλαγμένο, η πρωτεΐνη VHL είναι μη λειτουργική με αποτέλεσμα σταθεροποίηση του HIFα και καθοδική υπερέκφραση σημαντικού αριθμού γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση (π.χ.VEGA), στον πολλαπλασιασμό (π.χ EGFR), στη μετανάστευση και διήθηση (π.χ. CXCR4), στην αλλαγή του μεταβολισμού προς την κατεύθυνση της γλυκόλυσης (π.χ. GLUT1), στην επιβίωση (π.χ. survivin), στην ερυθροποίηση (π.χ. EPO) τα οποία τελικά συμβάλλουν στην ογκογένεση του δcNKK. (3) Αλληλεπίδραση της οδού HIF με άλλες οδούς : ενώ η οδός HIF αλληλεπιδρά με και ενισχύει την δράση άλλων ογκογόνων οδών, μπορεί επίσης να συμβάλλει στις ευρείες επιγενετικές αλλαγές στο γένωμα.(4) Ευρείες επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμα : επιγενετικά μοτίβα τα οποία εγκαθίστανται εξαιτίας μεταλλάξεων πολλαπλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις, αλλάζουν πολλά μονοπάτια ογκογένεσης, απόπτωσης, ρύθμισης κυτταρικού κύκλου και επισκευών αναντιστοιχίας του DNA. (5) Ανοσοδιαφυγή συμβαίνει στο NKK, η οποία φαίνεται ότι ενισχύεται σταδιακά από επιγενετικές αλλαγές σε μεγάλο εύρος του γενώματος.Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί αλληλεπιδρούν για την παθογένεση και την μεταστατική εξάπλωση του δcNKK. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ : VHL, von Hippel Lindau; HIF, hypoxia inducible factor; PHD, prolyl hydroxylase;Ub, ubiquitin; HRE, hypoxia response elements; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF- κ B, nuclear factor kappa B; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; CXCR4, CXC chemokine receptor 4; CCR7, C-C chemokine receptor type 7; SHH, sonic hedgehog; TSGs, tumor suppressor genes, EMT, epithelial to mesenchymal transition; TGF- β , transforming growth factor beta; and ccRCC, clear cell renal cell carcinoma. Από : Mehdi A, Riazlhosseim Y. Epigenome Aberrations : Emerging Driving Factors of the clear cell renal cell carcinoma. *Int.J.Mol.Sci.* 2017, 18 ;1774 doi:10.3390/jms18081774.



Εικόνα 33 : Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου von Hippel-Lindau (A) MRI με σκιαγραφική ενίσχυση : παρεγκεφαλιδικό αιμαγγειοβλάστωμα (βέλος) με μια σχετιζόμενη κύστη (γειτονική σκοτεινή περιοχή) σε ένα 40χρονο VHL ασθενή. (B) Αμφοτερόπλευροι πολυεστιακοί νεφρικοί όγκοι (βέλη) και πολλαπλές κύστεις σε 22χρονο VHL ασθενή. (C) Αμφοτερόπλευρα φαιοχρωμοκυτώματα (βέλη) στα επινεφρίδια 29χρονου VHL ασθενή. (D) Παγκρεατικός νευροενδοκρινής όγκος (βέλος) στο πάγκρεας VHL ασθενή. Από⁴² προσαρμοσμένο και ανατυπωμένο με άδεια από : Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet*. 2003;361:2059–67.

Η μπελζουτιφάνη είναι ένα φάρμακο που στοχεύει τον HIF-2a. Στη μελέτη LITESPARK 004, 49% των ασθενών με ΝΚΚ που σχετίζεται με τη νόσο VHL και έλαβαν μπελζουτιφάνη είχαν επιβεβαιωμένη αντικειμενική ανταπόκριση, οι περισσότεροι ελάττωση στο μέγεθος του όγκου. Δύο ασθενείς (3%) είχαν πρόοδο της νόσου. Το 30% των ασθενών με αιμαγγειοβλαστώματα του ΚΝΣ είχαν ανταπόκριση μετά τη λήψη μπελζουτιφάνης, όπως και το 91% των ασθενών με παγκρεατικούς νευροενδοκρινείς όγκους, ένδειξη αποτελεσματικότητας σε αυτούς τους όγκους που σχετίζονται με τη VHL νόσο. Στοιχεία της μελέτης έδειξαν ότι η μπελζουτιφάνη θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν εναλλακτική θεραπεία ή σαν συμπλήρωμα της χειρουργικής αγωγής για αυτούς τους ασθενείς. Μετά την έναρξη της μελέτης μόνο 3% των ασθενών υποβλήθηκαν σε παρέμβαση που στόχευε νεόπλασμα σχετιζόμενο με τη VHL νόσο.⁴³

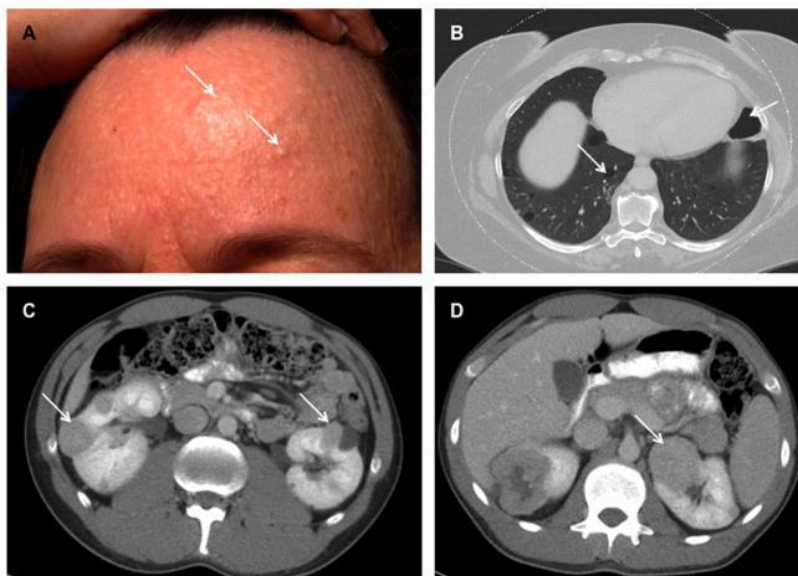
Το γονίδιο MET.

Η ανάλυση σύνδεσης σε οικογένειες με κληρονομικό θηλώδες νεφροκυτταρικό καρκίνο, εντόπισε τον τόπο (locus) της νόσου στο χρωμόσωμα 7q31 και γαμετικές μεταλλάξεις στο πρωτοογκογονίδιο MET αναγνωρίστηκαν σε μέλη προσβληθέντων οικογενειών. Οι μεταλλάξεις του MET που σχετίζονται με κληρονομικό θηλώδη καρκίνο νεφρού είναι παρανοηματικές (missense) (αντικατάσταση αμινοξέος), επιδρούν στο ενδοκυττάριο τμήμα της τυροσινικής κινάσης και ενεργοποιούν τη MET κινάση.

Παρότι μεταλλάξεις του MET αναγνωρίστηκαν σε λιγότερο από 15% των σποραδικών θηλωδών νεφροκυτταρικών καρκινωμάτων, η ενίσχυση του MET μπορεί να παρέχει ένα μηχανισμό με τον οποίο αναπτύσσεται το νεόπλασμα.⁴²

Το γονίδιο FLCN (Folliculin).

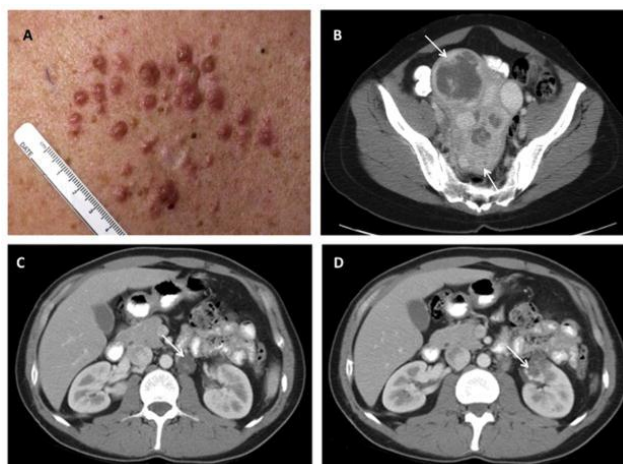
Ο γενετικός τόπος για τη νόσο Birt-Hogg-Dube χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 17p με ανάλυση γενετικής σύνδεσης σε πάσχουσες οικογένειες και αναγνωρίστηκαν γαμετικές μεταλλάξεις σε ένα νέο γονίδιο (FLCN, Folliculin) σε άτομα προσβληθέντα από τη νόσο. Η πλειοψηφία από τις 149 μοναδικές (unique) μεταλλάξεις FLCN έχει σαν αποτέλεσμα ελάττωση του μεγέθους της πρωτεΐνης (protein truncating) και είναι αδρανοποιητικές, παρότι έχουν αναφερθεί παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις. Το συνολικό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων πλησιάζει το 85%. Απώλεια ή μετάλλαξη του φυσικού στελέχους αλληλίου FLCN σε 70% των σχετιζόμενων με Birt-Hogg-Dube νεφρικών όγκων και ανάπτυξη όγκων σε ποντίκια στα οποία ενέθηκαν κύτταρα νεφρού με έλλειψη FLCN, υποστηρίζουν ογκοκατασταλτικό ρόλο για το FLCN. (Εικόνα 34)⁴²



Εικόνα 34: Κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου Birt-Hogg-Dubé (BHD): Πολλαπλά ινοθυλακιώματα στο μέτωπο ασθενούς με BHD (βέλη). (B) CT θώρακα ασθενούς με BHD που δείχνει αμφοτερόπλευρες πολλαπλές πνευμονικές κύστεις (βέλη) που μπορεί να οδηγήσουν σε αυτόματο πνευμοθώρακα. (C,D) CT κοιλίας που δείχνει αμφοτερόπλευρους πολυεστιακούς νεφρικούς όγκους σε ασθενείς με BHD (βέλη). Από: προσαρμοσμένο και ανατυπωμένο από : Schmidt LS, Linehan WM. Molecular genetics and clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome. Nat Rev Urol. 2015;12:558–69.

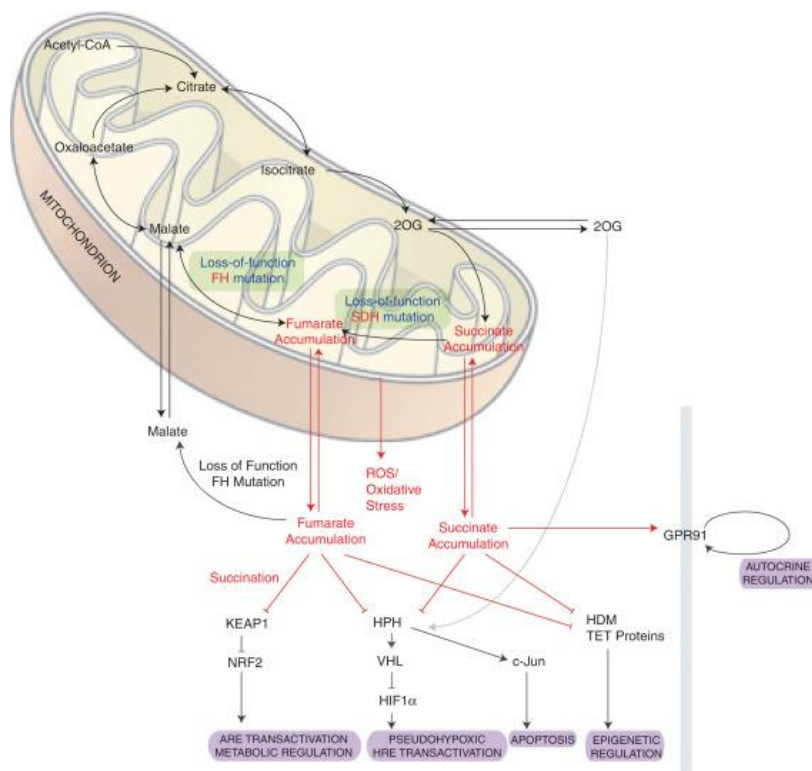
Το γονίδιο FH (Fumarate Hydratase)

Οι Launonen και συν. (2001)⁴⁴ περιέγραψαν τη συσχέτιση των λειομυμάτων της μήτρας και του δέρματος με νεφρικούς όγκους και χαρτογράφησαν τον τόπο (locus) της Κληρονομικής Λειομυμάτωσης με Νεφροκυτταρικό Καρκίνο (HLRCC, Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma) (Εικόνα 35) στο χρωμόσωμα 1q42-44, ενώ ακολούθως, γαμετικές μεταλλάξεις αναγνωρίστηκαν στο γονίδιο της φουμαρικής υδρατάσης (Fumarate Hydratase, FH). Περισσότερες από 130 μοναδικές μεταλλάξεις FH όλων των τύπων έχουν αναφερθεί, με ένα ποσοστό ανίχνευσης που αγγίζει το 90%. Η φουμαρική υδρατάση μετατρέπει το φουμαρικό σε μηλικό και εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μητρική ουσία. (Εικόνα 36) Η ενζυμική της δράση είναι ελαττωμένη σε κυτταρικές σειρές λεμφοβλαστών και ινοβλαστών που ελήφθησαν από ασθενείς με HLRCC και ήταν χαμηλότερη σε σειρές με παρανοηματική (missense) μετάλλαξη από ότι σε κύτταρα με μετάλλαξη που οδηγεί σε ελάττωση του μεγέθους του μορίου της πρωτεΐνης (truncating mutation). Επειδή η FH είναι μια ομοτετραμερής πρωτεΐνη, προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες που είναι προϊόντα παρανοηματικών (missense) μεταλλάξεων, θα καταργούσαν το σχηματισμό σχεδόν όλων των ομοτετραμερών, έχοντας με αυτό τον τρόπο μια σοβαρότερη επίδραση στην δραστικότητα της FH από ότι οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε ελάττωση του μεγέθους του μορίου της πρωτεΐνης (truncating mutations). Σύμφωνα με την πρόσφατη ταξινόμηση του WHO (2022) η νοσολογική αυτή οντότητα αναφέρεται ως ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης σε αντικατάσταση του ΝΚΚ σχετιζόμενου με κληρονομική λειομυμάτωση, της προηγούμενης ταξινόμησης του 2016.²⁷⁸



Εικόνα 35: Κλινικές εκδηλώσεις κληρονομικής λειομυμάτωσης και νεφροκυτταρικού καρκίνου. (Α) Πολλαπλά δερματικά λειομύματα σε ασθενή με HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and renal cell carcinoma, Κληρονομική Λειομυμάτωση και νεφροκυτταρικό καρκίνωμα) (Β) CT όπου απεικονίζονται πολλαπλά μεγάλα λειομύματα μήτρας (βέλη) που απαντώνται σε HLRCC.(C) Νόσος σε παραορτικούς λεμφαδένες (βέλος) και (D) Νεφρικός όγκος σε ασθενή με HLRCC. Από : ανατυπωμένο και προσαρμοσμένο με άδεια από : Grubb RL, 3rd, Franks ME, Toro J, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *J Urol*. 2007;177:2074–80.

Το γονίδιο FH δρα σαν ογκοκατασταλτικό, με βάση την αναγνώριση απώλειας ετεροζυγωτίας ή σωματικών μεταλλάξεων ως «δεύτερο χτύπημα» (“second hit”) σε ένα FH φυσιολογικό αλληλίο στα πλαίσια συνδρόμου λειομυμάτων μήτρας και δέρματος, και σε σχετιζόμενους με HLRCC νεφρικούς όγκους.⁴²



Εικόνα 36: Ογκογόνα μονοπάτια των μεταλλάξεων σε FH και SDH. Η μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας στην FH προκαλεί τη συσσώρευση φουμαρικού σε μιτοχόνδρια και κυτταρόπλασμα. Η αφθονία του φουμαρικού στο κυτταρόπλασμα αναστέλλει ανταγωνιστικά την PHD οδηγώντας σε σταθεροποίηση του HIF1α, μετατόπιση στον πυρήνα και ψευδοϋποξική ενεργοποίηση του HRE. Το συσσωρευμένο κυτταροπλασματικό φουμαρικό, επίσης μη αναστρέψιμα προσθέτει ηλεκτρικό οξύ στην KEAP1 προκαλώντας σταθεροποίηση του NRF2, μετατόπιση στον πυρήνα, ενεργοποίηση του ARE και μεταβολική ρύθμιση. Ανάλογα με την φουμαρική, η μετάλλαξη της απώλειας λειτουργίας της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) προκαλεί συσσώρευση ηλεκτρικού σε μιτοχόνδρια και κυτταρόπλασμα. Η συσσώρευση ηλεκτρικού στο κυτταρόπλασμα ανταγωνιστικά αναστέλλει την PHD και άλλες εξαρτώμενες από 2-οξυγλουταρικό και σίδηρο διοξυγενάσες συμπεριλαμβανομένων HDM και TET πρωτεϊνών. Αυτό μπορεί να επηρεάσει αντίστροφα την επιγενετική μεταγραφική ρύθμιση. Η συσσώρευση του ηλεκτρικού έχει αυτοκρινή ρύθμιση μέσω του ενεργοποιού συνδέσμου με τη μεμβράνη-υποδοχέα GPR91 οδηγώντας σε μεσολάβηση από cAMP και φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη διαμεταγωγή σήματος. Οι αδρανοποιητικές μεταλλάξεις της SDH μπορούν να οδηγήσουν σε μιτοχονδριακό οξειδωτικό stress μέσω παθολογικής δημιουργίας ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τον ελαττωματικό κύκλο του TCA, οδηγώντας σε ριζική βλάβη πυρηνικών και κυτταροπλασματικών δομών. Συνοτομογραφίες: ARE, antioxidant response element; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; FH, fumarate hydratase; GPR91, G-protein receptor 91; HDM, histone demethylase; HIF1α, hypoxia-inducible factor-1α; HRE, hypoxia response element; KEAP1, Kelch-like ECH-associated protein 1; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; 2OG, 2-oxoglutarate; PHD, prolyl hydroxylase domain enzyme; ROS, reactive oxygen species; SDH, succinate dehydrogenase; TCA, tricarboxylic acid; TET proteins, ten-eleven translocation proteins; VHL, von Hippel-Lindau. Από : Oscar C.Y. Yang, Patrick H. Maxwell and Patrick J. Pollard. Renal cell carcinoma: translational aspects of metabolism and therapeutic consequences. *Kidney International* (2013) 84, 667–681; doi:10.1038/ki.2013.245.

Το γονίδιο SDH (Succinate Dehydrogenase).

Ο νεφροκυτταρικός καρκίνος με έλλειψη ηλεκτρικής αφυδρογονάσης, χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρους, πολυεστιακούς, πρώιμης έναρξης (σε ηλικία <40 ετών) νεφρικούς όγκους, με αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο κληρονομικότητας και μπορεί να απαντώνται μαζί με κληρονομούμενα παραγαγγλιώματα κεφαλής τραχήλου (Paragangliomas, PGLs) και επινεφριδιακά ή εξωεπινεφριδιακά φαιοχρωμοκυτώματα (Pheochromocytomas, PCCs).

Οι Vanharanta και συν. (2004) ανέφεραν παραγαγγλιώματα / φαιοχρωμοκυτώματα (PGL/PCC) και ΝΚΚ σε δυο οικογένειες με πρώιμη έναρξη νεφρικού όγκου (σε ηλικία <30 ετών) και ποικίλους ιστολογικούς τύπους που είχαν γαμετικές μεταλλάξεις SDHB, που κωδικοποιεί την υπομονάδα Β του ενζύμου του κύκλου του Krebs ηλεκτρική δεϋδρογονάση (Εικόνα 36)⁴⁵. Αναφέρθηκαν τρεις οικογένειες με γαμετικές μεταλλάξεις SDHB και ΝΚΚ σαν μόνη εκδήλωση⁴⁶. Οι Ricketts και συν. (2008, 2012)^{46, 47} (έχουν περιγράψει 11 οικογένειες με γαμετικές μεταλλάξεις SDHB στη διαφόρων τύπων και κλινικές εκδηλώσεις που περιελάμβαναν μόνο νεφρικούς όγκους (45.5%) ή νεφρικούς όγκους και PGL/PCC (54.5%). Οι νεφρικοί όγκοι ήταν συμπαγείς ή μικτές κυστικές / συμπαγείς αλλοιώσεις, αλλά κυρίως εμφάνιζαν παρόμοια κυτταρική μορφολογία, μοιράζονταν κοινά «ογκοκυτταρικά νεοπλασματικά» χαρακτηριστικά και χαρακτηρίζονταν από μικρή ηλικία έναρξης (μέση ηλικία 33 έτη) και την παρουσία μεταστάσεων σε 43% των περιπτώσεων. Δυο οικογένειες με ΝΚΚ και γαμετική μετάλλαξη στην υπομονάδα C του SDHB αναφέρθηκαν, όπως επίσης μια οικογένεια με ΝΚΚ με γαμετική μετάλλαξη στην υπομονάδα D της SDH.⁴²

Τα γονίδια της οζώδους σκλήρυνσης (Tuberous Sclerosis, TSC1, TSC2)

Είναι μια αυτοσωματική επικρατούσα διαταραχή, η οποία παρουσιάζεται με μια ποικιλία εκδηλώσεων σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων σοβαρών νευρολογικών διαταραχών εξαιτίας της παρουσίας όζων στον εγκεφαλικό φλοιό, αγγειοσωμάτων προσώπου, λεμφαγγειομυωμάτωσης των πνευμόνων και νεφρικών αγγειομυολιπωμάτων. Οι ασθενείς αναπτύσσουν νεφροκυτταρικό καρκίνο σε συχνότητα παρόμοια με αυτή του γενικού πληθυσμού (2-3%) αλλά με μικρότερη ηλικία έναρξης. Γαμετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο TSC1 στο χρωμόσωμα 9q34 που κωδικοποιεί την αμαρτίνη ή στο γονίδιο TSC2 στο χρωμόσωμα 16p13 που κωδικοποιεί την τουμπερίνη είναι υπεύθυνες για αυτή τη συστηματική διαταραχή. Τα προϊόντα των παραπάνω γονιδίων σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ρυθμίζει αρνητικά τον άξονα mTOR και μεταλλάξεις σε κάποια από τα γονίδια μπορούν να καταργήσουν τη λειτουργία του συμπλέγματος οδηγώντας σε ενεργοποίηση του mTOR.⁴²

Το γονίδιο BAP-1 (BRCA Associated Protein-1).

Η σχετιζόμενη με το BRCA-1 πρωτεΐνη-1, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί μια πυρηνική αποουμπικουΐνιάση, μέλος του συμπλέγματος κατασταλτικής αποουμπικουΐνιάσης της ομάδας Polycomb που συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην τροποποίηση της χρωματίνης, έχει βρεθεί ότι είναι απενεργοποιημένη τόσο στα σωματικά όσο και στα γεννητικά κύτταρα στο οφθαλμικό μελάνωμα και στο κακόηθες μεσοθηλίωμα.

Η BAP-1 βρέθηκε μεταλλαγμένη στο 14% των σποραδικών δκNKK και σχετίστηκε με επιθετικότερους όγκους και πτωχή πρόγνωση. Δύο αναφορές έχουν περιγράψει γαμετικές μεταλλάξεις του BAP-1 σε άτομα με πρώιμη έναρξη, και αμφοτερόπλευρους και πολυεστιακούς όγκους δκNKK. Όγκοι σχετιζόμενοι με BAP-1 έδειξαν απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 3p όπου εντοπίζεται το BAP-1 και απώλεια της πρωτεΐνης BAP-1 στην ανοσοιστοχημική χρώση. Επιπρόσθετες αναφορές οικογενειών με οφθαλμικά μελανώματα, δερματικά μελανώματα και κακόηθες μεσοθηλίωμα με γαμετικές μεταλλάξεις BAP-1 και οικογενειακό ιστορικό NKK συνοψίστηκαν από Rai και συν. ^{42,48}

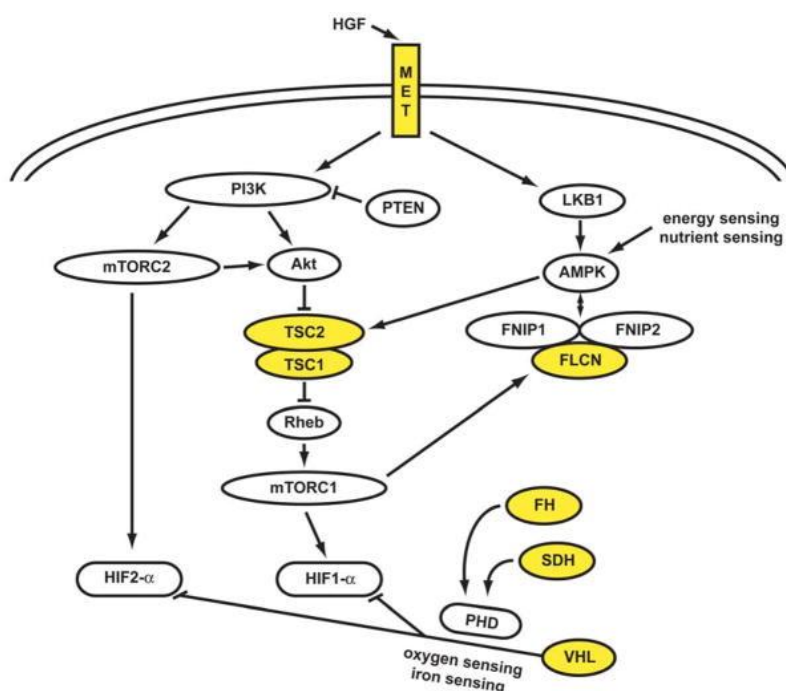
Το γονίδιο MiTF (Microphthalmia associated Transcription Factor).

Ο MiTF, μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων σχετιζόμενων με μικροφθαλμία (Microphthalmia associated Transcription Factor), παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των μελανοκυττάρων και απορρύθμισή του σχετίζεται με μελάνωμα, και συνεπώς το γονίδιο χαρακτηρίζεται ως ογκογονίδιο του μελανώματος. Αναγνωρίστηκε μια παραλλαγή του γονιδίου MiTF (c.952.G->A;p.E318K) από παρανοηματική (missense) γαμετική μετάλλαξη σε υψηλότερη συχνότητα σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό δερματικού κακοήθους μελανώματος ή πρωτοπαθών πολλαπλών μελανωμάτων σε σχέση με ομάδες ελέγχου υγιών ατόμων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια φαινοτυπική συσχέτιση του μελανώματος με NKK και αλληλούχηση του MiTF αποκάλυψε μια υψηλότερη συχνότητα της παραλλαγής MiTF p.E318K σε ασθενείς πάσχοντες από είτε NKK, είτε από NKK και μελάνωμα. Άτομα που κληρονόμησαν την παραλλαγή αυτή, είχαν περισσότερο από 5 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, NKK ή και των δυο συγκριτικά με μη φορείς αυτής. ⁴²

Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ. ΜΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Τα γονίδια που είναι γνωστό ότι προκαλούν καρκίνο του νεφρού VHL, MET, FLCN, FH, SDH, TSC1 και TSC2, μοιράζονται το κοινό χαρακτηριστικό: συμμετοχή σε σηματοδοτικές οδούς ανίχνευσης οξυγόνου, σιδήρου, ενέργειας ή και θρέψης (Εικόνα 37).

Ο καρκίνος του νεφρού είναι θεμελιακά μια μεταβολική νόσος. Το VHL στοχεύει τους HIF1α και HIF2α για αποδόμηση διαμεσολαβούμενη από ουμπικουιλίνη μέσω ενός μηχανισμού ανίχνευσης οξυγόνου και σιδήρου. Το σύμπλεγμα FLCN/FNIP1/FNIP2 συνδέει AMPK, τον πρωταρχικό ανιχνευτή ενέργειας στο κύτταρο και η FLCN (Folliculin), φωσφορυλιώνεται από μια κινάση ευαίσθητη στη ραπαμυκίνη (π.χ. mTORC1). Τα TSC1/TSC2 φωσφορυλιώνονται από LKB1/AMPK «καταρράκτη» και διαμεσολαβούν την ανταπόκριση του κυττάρου στην ανίχνευση ενέργειας/θρέψης. Η φουμαρική υδρατάση και η ηλεκτρική αφυδρογονάση είναι ένζυμα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Έλλειψη αυτών επηρεάζει την λειτουργία του κύκλου αυτού, και το κύτταρο εξαρτάται από τη γλυκόζη για παραγωγή ενέργειας. Αδρανοποίησή τους επηρεάζει τη λειτουργία της prolyl υδροξυλάσης του HIF και αντιπροσωπεύει έναν ανεξάρτητο του VHL μηχανισμό για απορρύθμιση της αποδόμησης του HIF. Αυξημένα επίπεδα HIF οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα GLUT1 που επιτρέπουν μεταφορά της γλυκόζης για παραγωγή ATP. ⁴⁹



Εικόνα 37 : Η Γενετική βάση του καρκίνου του νεφρού. Μια μεταβολική νόσος. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ : folliculin interacting protein 1 (FNIP1) and folliculin interacting protein 2 (FNIP2), HIF prolyl hydroxylase (PHD). Από : W. Marston Linehan, Ramaprasad Srinivasan, and Laura S. Schmidt. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol.* 2010 May ; 7(5): 277–285. doi:10.1038/nrurol.2010.47

4.1.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΝΚΚ.

Συνήθεις γενετικές ανωμαλίες στο σποραδικό VHL-null διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ περιλαμβάνουν απώλεια στο 3p (94%) που αφορά στα γονίδια VHL, BAP-1 και PBRM-1, απώλεια του 5q (69%), μονοσωμία ή μερική απώλεια του 14q (42%), απώλεια του 7q (20%), απαλοιφή του 8p (32%) και απώλεια του 9p (29%).³⁹ Μεταλλάξεις του VHL με επακόλουθη αδρανοποίηση του φυσικού στελέχους VHL επίσης βρέθηκαν σε υψηλό ποσοστό όγκων από ασθενείς με σποραδικό διαυγοκυτταρικό ΝΚΚ. Σε μελέτη των Nickerson και συν.(2008) ανιχνεύτηκαν VHL μετάλλαξη ή υπερμεθυλίωση σε 92% των σποραδικών διαυγοκυτταρικών ΝΚΚ.^{41,42} Επίσης οι Bihl και συν. έδειξαν ότι η συνδυασμένη λειτουργική απενεργοποίηση των γονιδίων PBRM1, BAP1, SETD2 και pVHL είναι καθοριστική για την εξέλιξη του δκΝΚΚ.⁵⁰

Τα κύτταρα των χρωμόφοβων καρκινωμάτων έχουν υποδιπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων αλλά δεν έχουν απαλοιφή του 3p γενετικού χρωμοσωμικού τόπου.³⁹ Μια μελέτη⁵¹ με χρήση συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού βρήκε ότι 17 από τους 19 όγκους επιδεικνύουν μια ευρεία ποικιλία ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων συνδυασμών απώλειας χρωμοσωμάτων (1,2,6,10,13,17,21).

Η ετερογένεια των ογκοκυττωμάτων καταδείχθηκε σε χρωμοσωμικές αναλύσεις που συμπεριελάμβαναν συνδυασμένες απώλειες χρωμοσωμάτων Y και 1, αναδιατάξεις που εμπλέκουν τον τόπο της κυκλίνης D1 (CCND1 locus) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q13, συμμετοχή του 12q12-13 και απώλεια του 14q³⁹.

Τα καρκινώματα διαμετάθεσης σχετίζονται με σύντηξη του γονιδίου TFE3 (Transcription Factor E3) με άλλα γονίδια όπως ASP1 (L-Asparaginase -1) και PRCC (Papillary Renal Cell Cell Carcinoma) στο χρωμόσωμα Χp11.2.³⁹

4.1.3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Το γονίδιο PBRM1 (Polybromo-1).

Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p21 και είναι το δεύτερο συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο στο δκΝΚΚ, ευρισκόμενο στο 41% των ασθενών. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BAF180, η οποία είναι η υποομάδα του PBAF (PRG1-associated factor) που στοχεύει τη χρωματίνη και είναι μέλος του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF

(Switching defective/sucrose nonfermenting). Το πολυμερές αυτό σύμπλεγμα χρησιμοποιεί ATP για κινητοποίηση του χρωμοσώματος και την τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, και διαδραματίζει βασικούς ρόλους στην αντιγραφή, μεταγραφή και επιδιόρθωση του DNA, στον κυτταρικό θάνατο, μεταβολισμό και έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Επιπλέον είναι ρυθμιστής – κλειδί της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της συσχέτισής του με μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων.

Το PBRM1 λειτουργεί σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο «δυσχτυπημάτων» και η πλειοψηφία των μεταλλάξεων έχει σαν αποτέλεσμα απώλεια τμήματος της πρωτεΐνης (truncating mutation). Η αδρανοποίησή του σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση, ενώ η επανέκφραση στα ΝΚΚ κύτταρα με έλλειψη PBRM1 έχει αντίστροφες δράσεις, επάγοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση μέσω αύξησης των επιπέδων του p21 αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Επιπρόσθετα, το PBRM1 μπορεί να μεταβάλλει τον κυτταροσκελετό και την κυτταρική κινητικότητα, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση (π.χ. E-cadherin). Επίσης, η πρωτεΐνη BAF180, φαίνεται να προάγει τη συνοχή του κεντρομεριδίου σε κύτταρα ανθρώπων και ποντικών και να αποτρέπει την γενωμική αστάθεια και ανευπλοειδία.

Νέα ζωικά μοντέλα συνεχίζουν να προάγουν τις γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους η έλλειψη PBRM1 συμβάλλει στην ανάπτυξη δκΝΚΚ. Έτσι, βρέθηκαν οι μηχανισμοί, με τους οποίους η συνδυασμένη απώλεια VHL και PBRM1 οδηγεί στην ανάπτυξη δκΝΚΚ. Επιπρόσθετες μελέτες αποκάλυψαν ότι όγκοι με διπλή έλλειψη VHL και PBRM1 επέδειξαν ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR αναδεικνύοντάς το σαν το τρίτο οδηγό γεγονός στο δκΝΚΚ μετά την απώλεια VHL και PBRM1.^{52,53}

Οι Narguud και συν. ανακάλυψαν ότι η απαλοιφή VHL και PBRM1 αλλά όχι μόνο σε καθένα από αυτά, έχει σαν αποτέλεσμα αμφοτερόπλευρους, πολυεστιακούς διαυγοκυτταρικούς νεφροκυτταρικούς καρκίνους.⁵³

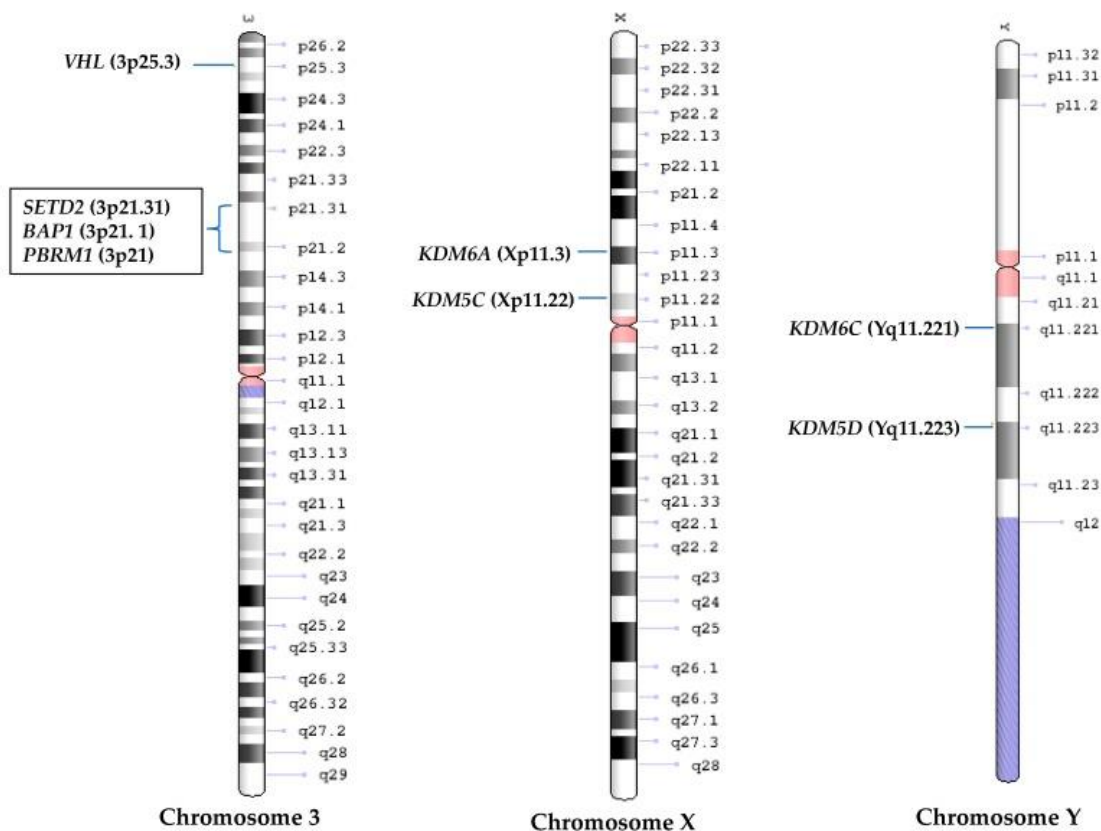
Το γονίδιο BAP-1 (BRCA Associated Protein-1).

Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p ανάμεσα στα γονίδια VHL και PBRM1. Η ακριβής λειτουργία του όσον αφορά την παθογένεια του ΝΚΚ παραμένει άγνωστη, αλλά πολλές μελέτες συγκλίνουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.⁵² Η BAP-1 βρέθηκε

μεταλλαγμένη σε ως 14% των σποραδικών δκNKK και σχετίστηκε με επιθετικότερους όγκους και πτωχή πρόγνωση.⁴²

Το γονίδιο SETD2 (SET Domain containing-2).

Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p (Εικόνα 38) κοντά στα γονίδια VHL, PBRM1 και BAP-1 και είναι αδρανοποιημένο σε 3-12% των NKK. Κωδικοποιεί μια μεθυλτρανσφεράση ιστόνης (H3K36) και η αδρανοποίησή της έχει σαν αποτέλεσμα μείωση της τριμεθυλίωσης της ιστόνης H3 στη λυσίνη 36. Η SETD2 είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση της αναντιστοιχίας βάσεων του DNA, την επιδιόρθωση θραυσμάτων της διπλής έλικας του DNA και για τη σταθερότητα του γενώματος. Αυτές οι λειτουργίες διαμεσολαβούνται εμφανώς από τη δράση μεθυλτρανσφεράσης του SETD2, αφού η τριμεθυλίωση στη λυσίνη 36 της H3, είναι βασική για την μέσω TP53 και ATM ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της επιδιόρθωσης του DNA και τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης MSH2. Επιπλέον, η απώλεια του SETD2 μαζί με μετάλλαξη του PBRM1, οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια και αποτρέπει τον ορθό έλεγχο των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του SETD2 σχετίζονται με ελαττωμένη μεθυλίωση H3K36me3 σε πρώιμου σταδίου NKK, η οποία (H3K36me3) απορρυθμίστηκε σταδιακά στη μετάσταση, ενώ η απώλεια του ενός αλληλίου του SETD2 δεν τροποποιεί τα επίπεδα H3K36me3.⁵²



Εικόνα 38: Εντόπιση συχνά μεταλλαγμένων ή αρνητικά ρυθμισμένων γονιδίων τροποποιητών του επιγενώματος, συμπεριλαμβανομένων των PBRM1, BAP1, SETD2, KDM5C και KDM6A στο δκΝΚΚ. Το 3p χρωμόσωμα περιέχει μια περιοχή 50Mbs όπου τέσσερα από αυτά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια εντοπίζονται το ένα δίπλα στο άλλο. Επιπλέον, τα KDM5C και KDM6A εντοπίζονται στο Χχρωμόσωμα αλλά διαφεύγουν από την αδρανοποίησή του (EXITS). Τα KDM5C και KDM6C που εντοπίζονται στο Υ χρωμόσωμα είναι ομόλογα των KDM5C και KDM6A αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα ομόλογα στο Υ των συνδεδεμένων με το Χ γονιδίων συχνά απαλείφονται σε άνδρες ασθενείς που προσβάλλονται από δκΝΚΚ. Η εικόνα δεν είναι σχεδιασμένη βασει κλίμακας. Ροζ:κεντρομερίδιο, Μαύρο: G-θετική ζώνη. Λευκό:G-αρνητική ζώνη. Γκρι: G-θετική ζώνη (με αυξανόμενη πυκνότητα του γκρι να δείχνει αυξανόμενη θετική ζώνη 25-75%) Μωβ: μεταβαλλόμενη περιοχή. Από Ali Mehdi and Yasser Riazalhosseini. Epigenome Aberrations: Emerging Driving Factors of the Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1774.

4.1.4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΦΥΛΕΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Το γονίδιο KDM6A (Lysine Demethylase 6A).

Το γονίδιο KDM6A ή UTX που εντοπίζεται στο Χp11.2 (Εικόνα 38) ήταν ο πρώτος επιγενετικός τροποποιητής που αναγνωρίστηκε σαν μεταλλαγμένο και αδρανοποιημένο

γονίδιο στο δκNKK. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που απομεθυλιώνει την H3K27 και είναι μεταλλαγμένο στο 1% των δκNKK. Προκειμένου να ερευνηθούν οι λειτουργικές συνέπειες των μεταλλάξεων του γονιδίου KDM6A, έγιναν μελέτες σε κυτταρικές σειρές. Είναι σημαντικό ότι τα κύτταρα με έλλειψη KDM6A έδειξαν εξάρτηση από EZH2, ένα μέλος του PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) που μεθυλιώνει H3K27 για πολλαπλασιασμό, δείχνοντας ότι η αναστολή του EZH2 μπορεί να είναι μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση έναντι των KDM6A μεταλλαγμένων όγκων.⁵²

Το γονίδιο KDM5C (Lysine Demethylase 5C)

Το γονίδιο KDM5C ή JARID1C είναι ένα άλλο γονίδιο που κωδικοποιεί απομεθυλάση συνδεδεμένο με το X χρωμόσωμα (X-linked) (Εικόνα 38) το οποίο είναι μεταλλαγμένο σε 7-9% των δκNKK όγκων. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί απομακρύνει μεθυλομάδες από την H3K4me3, μια μοριακή σήμανση ιστονών που σχετίζεται με ενεργή μεταγραφή γονιδίων και αυτή η απομεθυλίωση καταλήγει σε μεταγραφική απενεργοποίηση γονιδίων.

Έχει δειχθεί ότι ο HIF διεγείρει την έκφραση του KDM5C ο οποίος με τη σειρά του λειτουργεί για την καταστολή της έκφρασης αρκετών γονιδίων-στόχων όπως IGFBP3, DNAJC12 και COL6A1 απομεθυλιώνοντας H3K4me3 στους υποκινητές. Αυτό δείχνει ότι το γονίδιο KDM5C λειτουργεί σαν ρυθμιστικό για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που ενεργοποιούνται από την υποξία, ακολουθώντας τη βασική έκφραση του HIF. Με δεδομένο ότι η βασική ενεργοποίηση του HIF (εξαιτίας της VHL αδρανοποίησης) είναι το κυρίως οδηγό μονοπάτι του δκNKK, το KDM5C φαίνεται να δρά σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο δκNKK. Η έκταση αυτή της ογκοκατασταλτικής δράσης έχει επιβεβαιωθεί από μια πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι η έλλειψη έχει σαν αποτέλεσμα δομικές αναδιατάξεις και αστάθεια, οδηγώντας σε επιθετικές μορφές δκNKK. Τα NKK με μετάλλαξη στο KDM5C δείχνουν απορρυθμισμένη έκφραση μη κωδικών RNAs και γονιδιακές ανωμαλίες σε σύγκριση με τα NKK χωρίς τέτοια μετάλλαξη.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια KDM5C και KDM6A διαφεύγουν από την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος και έχουν πρόσφατα αναγνωριστεί μεταξύ των γονιδίων που καλούνται : «διαφεύγοντα από την αδρανοποίηση του X ογκοκατασταλτικά (Escape from X Inactivation Tumor Suppressor, EXITS).⁵²

4.1.5. ΠΙΘΑΝΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΙΣΤΟΝΩΝ/ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει πολυπλοκότητα του γονιδιώματος του δκΝΚΚ με μεταλλάξεις που είναι ευρέως διαδεδομένες (ubiquitous), κοινές (shared), ή /και ιδιωτικές (private). Οι ευρέως διαδεδομένες μεταλλάξεις αποκτώνται σε πρώιμο στάδιο της ογκογένεσης ενώ οι ιδιωτικές είναι εκείνες που αποκτώνται αργότερα στη διαδικασία και οι κοινές ενδιάμεσα. Οι μεταλλάξεις των VHL και PBRM1 φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένες, ενώ οι μεταλλάξεις των BAP1 και SETD2 φαίνεται ότι είναι ιδιωτικές και αποκτώνται αργότερα στην εξέλιξη του δκΝΚΚ. Έχει ενδιαφέρον ότι στο δκΝΚΚ, οι μεταλλάξεις των BAP1 και PBRM1 είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (mutually exclusive). Επιπλέον, οι περισσότερες μεταλλάξεις των SETD2 και KDM5C είναι αμοιβαία αποκλειόμενες. Γενικά, αν οι μεταλλάξεις στα γονίδια είναι αποκλειόμενες (exclusive), φαίνεται ότι τα γονίδια λειτουργούν στο ίδιο μονοπάτι. Ωστόσο αρκετές μελέτες⁵⁴⁻⁵⁷ πρότειναν, ότι BAP και PBRM1 λειτουργούν σε δύο διαφορετικά μονοπάτια, όπως και τα SETD2 και KDM5C. Στην πραγματικότητα, οι μεταλλάξεις BAP1 σχετίζονται με παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά επιθετικής νόσου, συμπεριλαμβανομένων υψηλού βαθμού κακοήθειας, μεταστατικής νόσου κατά τη διάγνωση, χειρότερης ειδικής του καρκίνου επιβίωσης, άμεσης ενεργοποίησης της σηματοδότησης mTOR και ενεργοποίηση των μονοπατιών που εμπλέκονται σε αυξητικούς παράγοντες. Κατά τον ίδιο τρόπο, ασθενείς με δκΝΚΚ και μεταλλάξεις του KDM5C, εμφανίζουν επιθετική μορφή της νόσου. Αντίθετα, σε όγκους με μετάλλαξη στο PBRM1, η ενεργοποίηση του mTOR συμβαίνει μόνο μετά από μια μακρά λανθάνουσα (latency) περίοδο. Επιπλέον, αποτελέσματα που αφορούν στην κλινική σημασία των μεταλλάξεων στα PBRM1 και SETD2 είναι αντικρουόμενα.⁵²

Οι μεταλλάξεις του BAP1 και PBRM1 σχετίζονται με χαρακτηριστικές και μη επικαλυπτόμενες υπογραφές γονιδιακής έκφρασης και η έκβαση για ασθενείς με δκΝΚΚ με μεταλλάξεις των BAP1 και PBRM1 είναι διαφορετική. Σαν τέτοιες, οι μεταλλάξεις των BAP1 και PBRM1 υποδηλώνουν δυο διαφορετικούς μοριακούς υπότυπους του δκΝΚΚ με διαφορετική βιολογία και έκβαση. Από την άλλη, είναι ενδιαφέρον ότι εμφανίζεται μια θετική γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ PBRM1 και SETD2. Μια μεταάνάλυση⁵⁸ δείχνει ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων του SETD2 στο δκΝΚΚ, είναι δύο φορές υψηλότερη σε όγκους με PBRM1 μετάλλαξη. Αυτό δείχνει ότι μπορεί να υπάρχει μια επιλεκτική πίεση για μεταλλάξεις του SETD2 σε PBRM1 μεταλλαγμένους όγκους, μολονότι η μοριακή βάση παραμένει άγνωστη. Περιέργως, ωστόσο, και η BAF180 (που κωδικοποιείται από το PBRM1) και η SETD2 εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση, η μια σαν αναγνώστης (reader) και η άλλη σαν εγγραφέας (writer) αντίστοιχα.⁵²

Άλλη μελέτη⁵⁹ επισήμανε ότι η απώλεια των BAP1 και PBRM1 πιθανώς είναι γεγονότα που είναι απαραίτητα τόσο στην ανάπτυξη του δκΝΚΚ, όσο και στην εξέλιξη προς μετάσταση. Επιπλέον έδειξαν ότι το status της έκφρασης πρωτεΐνης των BAP1 και PBRM1 είναι παρόμοιο στην πρωτοπαθή και στη μεταστατική εστία στον ίδιο ασθενή. Επιπλέον, η ενδοογκική ετερογένεια σε μεταστατικούς όγκους ήταν ελάχιστη στην έκφραση των πρωτεϊνών PBRM1 και BAP1. Αυτό δείχνει ότι αποτελέσματα από εξέταση της έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών σε πρωτοπαθείς όγκους ίσως να ισχύουν και σε δείγματα από μεταστάσεις. Ωστόσο, επιπρόσθετες μελέτες που να περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα.⁵²

Οι Park και συν. μελέτησαν ασθενείς που διεγνώσθησαν με επιθετικούς όγκους δκΝΚΚ κλινικού σταδίου T1 που τους καθόρισαν ως αυτούς που εμφάνισαν σύγχρονες μεταστάσεις, υποτροπή ή θάνατο σχετιζόμενο με τη νόσο. Αυτοί οι ασθενείς έδειξαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των FOX2, PBRM1 και BAP1.⁶⁰

4.1.6. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΙΣΤΟΝΕΣ ΣΤΟ ΝΚΚ.

Δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ιστόνες στο ΝΚΚ.

4.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.

4.2.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στον νεφροκυτταρικό καρκίνο (ΝΚΚ) υπήρξε αντικείμενο έντονης έρευνας κατά την τελευταία δεκαετία και τα διάφορα γονίδια που υφίστανται επιγενετικές αλλαγές με μεθυλίωση του DNA θα αναφερθούν εδώ για να μας δώσουν μια εικόνα των πολλών ενδοκυττάρων μονοπατιών, που μπορεί να επηρεαστούν από μεθυλιωτικούς παράγοντες.⁶¹

4.2.1.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΣ ΝΚΚ.

Το γονίδιο VHL (Von Hippel-Lindau).

Ο πιο συχνός τύπος οικογενούς ΝΚΚ συμβαίνει σε άτομα με κληρονομικό σύνδρομο Von Hippel-Lindau. Η αναγνώριση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p οδήγησε στο εύρημα ότι εκτός της αδρανοποίησης λόγω σημειακής μετάλλαξης ή απαλοιφής, το γονίδιο VHL ήταν αδρανοποιημένο λόγω ανώμαλης υπερμεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή, που σχετίστηκε με μεταγραφική αποσιώπηση στο 15% του οικογενούς και σποραδικού ΝΚΚ⁶². Ήταν το πρώτο γονίδιο που βρέθηκε υπερμεθυλιωμένο στο ΝΚΚ. Η αδρανοποίηση του VHL συμβαίνει μόνο σε δκΝΚΚ και παρόμοια μεθυλίωση του VHL έχει βρεθεί μόνο σε δκΝΚΚ^{62,63} και, αφού είναι το αρχικό γεγονός σε οικογενείς δκΝΚΚ όγκους, είναι πιθανά ένα πρώιμο ή ακόμα και αρχικό γεγονός στην ογκογένεση του δκΝΚΚ.⁶⁴

Το γονίδιο MET

Σημειακές μεταλλάξεις του ογκογονιδίου MET είναι αίτιο ενός κληρονομικού τύπου θηλώδους ΝΚΚ⁶⁵. Δεν έχει αναφερθεί ένδειξη υπομεθυλίωσης του MET.⁶⁴

Το γονίδιο FH και το γονίδιο Birt-Hogg-Dube.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο FH (Fumarate Hydratase) αναγνωρίστηκε σαν ένα γονίδιο που προδιαθέτει σε έναν άλλο τύπο κληρονομικού θηλώδους ΝΚΚ⁶⁶ και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Birt-Hogg-Dube για χρωμόφοβο ΝΚΚ⁶⁷. Μολονότι αυτά τα γονίδια έχουν τυπικά CpG νησίδια στην περιοχή του υποκινητή, δεν έχει βρεθεί ένδειξη υπερμεθυλίωσης στο οικογενές και σποραδικό ΝΚΚ ή και σε καρκίνους που προέρχονται από άλλα όργανα^{63,64,68,69}.

Το γονίδιο SDHB.

Η κληρονομούμενη μετάλλαξη του SDHB (Succinate Dehydrogenase complex subunit B, Iron sulfur, Ip) γονιδίου προδιαθέτει σε πρώιμη έναρξη ΝΚΚ⁴⁶ και μεθυλίωση του αναφέρθηκε σε 1 από 25 σποραδικά ΝΚΚ^{70,64}

Το γονίδιο PTEN.

Το σύνδρομο Cowden είναι ένα αυτοσωματικό επικρατούν σύνδρομο που προδιαθέτει σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του ΝΚΚ^{71,72}. Το γονίδιο PTEN, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 10q, αναγνωρίστηκε ως το γονίδιο στο οποίο οφείλεται το

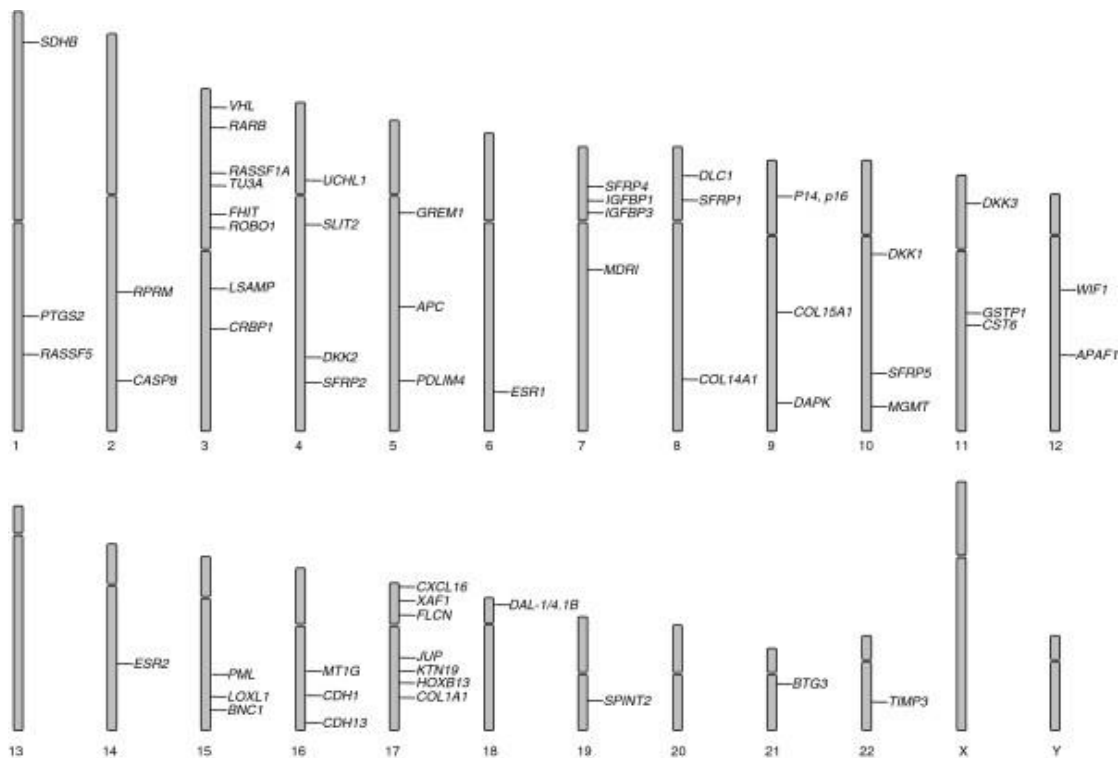
σύνδρομο⁷³. Αδρανοποίηση του PTEN με απαλοιφή και σημειακή μετάλλαξη συμβαίνει σε μειοψηφία νεφρικών όγκων αλλά μελέτες δεν έχουν δείξει μεθυλίωση του υποκινητή. Ένα ψευδογονίδιο PTEN, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 9, μπορεί να μεθυλιωθεί. Εξαιτίας σημαντικής επικάλυψης αλληλουχίας στην περιοχή του υποκινητή με το PTEN, είναι πιθανό κάποιες αναφορές για μεθυλίωση του PTEN να αντιπροσωπεύουν υπερμεθυλίωση του ψευδογονιδίου^{64,74}.

Τα γονίδια TSC.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν άτομα με οζώδη σκλήρυνση έχουν μεγαλύτερη επίπτωση ΝΚΚ. Μεθυλίωση του TSC1 δεν έχει μελετηθεί αρκετά και μια αναφορά δεν έδειξε μεθυλίωση του TSC2 στα αμαρτώματα σε ασθενείς με οζώδη σκλήρυνση⁷⁵. Το γονίδιο TSC2 περιέχει ένα τυπικό νησίδιο CpG στην περιοχή του υποκινητή αλλά σε μία προκαταρκτική μελέτη δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση σε 10 πρωτοπαθή ΝΚΚ και 5 κυτταρικές σειρές ΝΚΚ.⁶⁴

4.2.1.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΝΚΚ.

Τα περισσότερα από τα γονίδια τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι υφίστανται υπερμεθυλίωση (Εικόνα 39) στο ΝΚΚ έχουν ογκοκατασταλτικό ρόλο. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ρυθμιστές γονιδιακής έκφρασης, όπως μεταγραφικούς παράγοντες, miRNAs και μεταγωγείς σήματος στα πλαίσια σηματοδοτικών οδών. Επίσης έχουν ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης, της αυτοφαγίας, και της διαφοροποίησης κυττάρων και κωδικοποιούν δομικά συστατικά διακυττάρων δομών και σχηματισμών υπεύθυνων για την κυτταρική προσκόλληση καθώς και αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών και των VEGFR, με ρόλους στη διήθηση και μετάσταση. Διακριτή και σημαντική είναι επίσης η συμμετοχή τους στην επιδιόρθωση του DNA.



Εικόνα 39 : Μεθυλιωμένα γονίδια στο Νεφροκυτταρικό καρκίνο και η κατανομή τους στο γένωμα. Ωστόσο υπάρχει συγκέντρωση αποσιωπημένων γονιδίων στο 3p. Μεθυλιωμένα γονίδια είναι συγκεντρωμένα επίσης στο χρωμόσωμα 17 και απώλεια και ανάκτηση του χρωμοσώματος 17 έχει αναφερθεί στο ΝΚΚ. Από : Mark R Morris and Eamonn R Maher Epigenetics of renal cell carcinoma: the path towards new diagnostics and therapeutics. *Genome Med.* 2010; 2(9): 59.

Το γονίδιο SFRP1 (Secreted Frizzled-Related Protein -1).

Είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SFRP1, έναν Wnt ανταγωνιστή που ελέγχει την κυτταρική αύξηση και νεοαγγείωση. Η επιγενετική αποσιώπηση του επισυμβαίνει σε προκαρκινικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή ή στον καρκίνο⁷⁶. Οι ανταγωνιστές Wnt διαιρούνται σε δύο τάξεις : την τάξη SFRP (Secreted Frizzled Related Protein) και την τάξη DKK (Dickkopf). Η SFRP περιλαμβάνει τις SFRP-1, SFRP-2, SFRP-3, SFRP-4, SFRP-5, WIF-1 και Cerberus. Αυτές συνδέονται απευθείας με το Wnt και αναστέλλουν τη σηματοδότηση του Wnt μονοπατιού. Οι DKK πρωτεΐνες συνδέονται με ένα μέλος του συμπλέγματος του Wnt υποδοχέα για να αναστείλουν το μονοπάτι Wnt.

Ο ογκογόνος ρόλος του SFRP1 στο νεφροκυτταρικό καρκίνο έχει καταδειχτεί με ανάλυση⁷⁷ μεθυλίωσής του σε δείγματα από 10 ασθενείς. Με τη χρήση MSP (Methylation specific PCR) αναδείχθηκε υπερμεθυλίωση σε 8 από 10 δείγματα όγκου και σε 1 από 10 δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού. Σε τέσσερις κυτταρικές σειρές (A498, 786-O, UMRC3 και ACHN) αναδείχθηκε CGI μεθυλίωση παρέχοντας επιπλέον απόδειξη του ρόλου

της στην απώλεια έκφρασης του γονιδίου SFRP1 στο NKK⁷⁸. Σε άλλη μελέτη, υπερμεθυλίωση του SFRP1 διαπιστώθηκε στο 68% των 38 NKK και σχετίστηκε με απώλεια έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημική ανάλυση.⁶⁴ Οι Saini S. και συν. (2009) ανακάλυψαν ότι το γονίδιο SFRP1 υπερεκφράζεται, γεγονός που ίσως συνδέεται με διηθητικότητα και μεταστατική συμπεριφορά στο NKK και ότι ο υποκινητής του είναι μη μεθυλιωμένος/υπομεθυλιωμένος στο μεταστατικό NKK. Ερεύνησαν τη μοριακή βάση του ρόλου του SFRP1 στη διήθηση και μετάσταση και διαπίστωσαν ότι η μεταλλοπρωτεΐνάση θεμέλιας ουσίας 10 (Matrix Metalloproteinase 10, MMP10) ρυθμίζεται από το SFRP1 ⁷⁹.

Οι Atschekzei και συν. (2012) παρατήρησαν ότι η μεθυλίωση του SFRP1 συσσωρεύεται με την ηλικία σε νεφρικούς ιστούς που φαίνονται φυσιολογικοί και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του νεφρού.⁸⁰

Το γονίδιο SFRP2.

Είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που δρα σαν Wnt ανταγωνιστής και εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q31.3. Οι Kawamoto και συν.⁸¹ εξέτασαν 20 δείγματα από ασθενείς με NKK που είχαν υποβληθεί σε ριζική νεφρεκτομή, κυτταρική σειρά ανθρώπινου νεφρού HK-2 και κυτταρικές σειρές NKK Caki-1, Caki-2, A-498 και ACHN. Με ανοσοχρώση παρατήρησαν ότι η έκφραση SFRP2 ήταν έντονα θετική στο 70% των δειγμάτων φυσιολογικού νεφρικού ιστού, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων NKK ήταν αρνητική. Χρησιμοποιώντας ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου παρατήρησαν ότι το SFRP2 εκφραζόταν σε σημαντικά υψηλότερο επίπεδο στις HK-2 σε σύγκριση με τις NKK κυτταρικές σειρές (οι A498 και ACHN δεν εξέφραζαν καθόλου ενώ οι Caki-1 και Caki-2 εμφάνιζαν χαμηλή έκφραση). Με τη χρήση αλληλούχισης μετά από επίδραση θειωδών ανιόντων (bisulfite genomic sequencing) παρατηρήθηκε ότι οι σειρές HK-2 δεν είχαν μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή SFRP2 ενώ οι κυτταρικές σειρές Caki-2, A498 και ACHN είχαν έντονη μεθυλίωση και η Caki-1 μικρότερου βαθμού σε σχέση με τις άλλες σειρές. Αγωγή με αζακυτιδίνη αποκατέστησε την έκφραση mRNA και πρωτεΐνης SFRP2 σε όλες τις σειρές NKK.

Το γονίδιο SFRP5.

Κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη SFRP5 που είναι μέλος της οικογένειας SFRP, αρνητικών ρυθμιστών της σηματοδοτικής οδού Wnt^{78,82,83}. Μια μελέτη για το ρόλο του και της επιγενετικής του ρύθμισης σε NKK κυτταρικές σειρές Caki-1, Caki-2, ACHN και A498 και μια μικροσυστοιχία ιστών από 12 δκNKK και αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς αποκάλυψε έντονη μεθυλίωση του υποκινητή SFRP5 σε όλες τις NKK κυτταρικές σειρές και δείγματα ιστών, ενώ οι ίδιες περιοχές στο φυσιολογικό νεφρικό ιστό ήταν κυρίως

μη μεθυλιωμένες. Η έκφραση SFRP5 mRNA βρέθηκε να είναι σημαντικά ελαττωμένη σε NKK σειρές σε σύγκριση με σειρές από φυσιολογικό ιστό ($p < 0.01$). Η αγωγή με αζακυτιδίνη αποκατέστησε την έκφραση mRNA SFRP5 δείχνοντας ελάττωση της μεθυλίωσης. Διαμόλυνση (transfection) κυττάρων A498 με SFRP5 κατέληξε σε ελαττωμένη ικανότητα σχηματισμού αποικιών, ελαττωμένη ικανότητα διήθησης και επίσης αυξημένο κλάσμα αποπτωτικών κυττάρων.^{84,61}

Το γονίδιο WIF-1 (Wingless type Inhibitor Factor-1).

Το προϊόν του γονιδίου είναι μια γλυκοπρωτεΐνη-ανταγωνιστής που συνδέεται με την πρωτεΐνη Wnt η οποία ως γνωστό έχει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση⁸⁵

Το γονίδιο WIF-1 έχει αναφερθεί ότι έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο σε διάφορους καρκίνους. Ο ρόλος αυτός, όπως και η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του στο NKK μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές σειρές Caki-2, ACHN και A498 και μικροσυστοιχίες ιστών από 24 δκNKK και αντίστοιχους φυσιολογικούς παρακείμενους νεφρικούς ιστούς. Ανοσοχρώση για WIF-1 σε δείγματα φυσιολογικού ιστού ήταν σημαντικά ($p < 0,0001$) υψηλότερη συγκρινόμενη με δείγματα δκNKK. Η περιοχή του υποκινητή βρέθηκε να είναι έντονα μεθυλιωμένη στις 3 κυτταρικές σειρές NKK και μη μεθυλιωμένη σε δείγματα φυσιολογικού ιστού. Αγωγή των κυτταρικών σειρών με απομεθυλιωτικό παράγοντα αποκατέστησε σημαντικά την έκφραση του γονιδίου. Διαμόλυνση (transfection) με WIF-1 των κυτταρικών σειρών μείωσε σημαντικά την βιωσιμότητα του κυττάρου NKK, αύξησε το κλάσμα των αποπτωτικών κυττάρων και ελάττωσε το σχηματισμό αποικιών^{86,61}.

Το γονίδιο DKK-1.

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Dickkopf related protein-1 που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Dickkopf. Είναι απευθείας αναστολέας του Wnt με κατασταλτικό ρόλο στους ανθρώπινους καρκίνους.

Μελέτη μεθυλίωσης και έκφρασής του στις σειρές NKK A498 και 769-P, φυσιολογικές σειρές HK-2 και δείγματα ασθενών με NKK ανέδειξε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του DKK-1 στις σειρές NKK και απουσία μεθυλίωσης στην κυτταρική σειρά από φυσιολογικό νεφρικό ιστό. Η έκφραση DKK-1 mRNA ήταν χαμηλότερη στην A498 και 769-P συγκρινόμενη με αυτή στην HK-2. Αγωγή των κυτταρικών σειρών NKK με αζακυτιδίνη είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στην έκφραση DKK-1 και αυξημένο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων. Ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 50 δείγματα δκNKK και 50 αντίστοιχα δείγματα παρακείμενου φυσιολογικού ιστού ανέδειξε σημαντικά χαμηλότερη έκφραση DKK-

1 σε ιστούς ΝΚΚ. Η διαμόλυνση (transfection) DKK-1 σε κύτταρα ΝΚΚ είχε σαν αποτέλεσμα αναστολή ανάπτυξης, αυξημένη απόπτωση και ελαττωμένη ικανότητα διήθησης^{87,61}.

Το γονίδιο Rap1GAP.

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rap1GAP η οποία απενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rap που εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρκίνου, τη διήθηση και τη μετάσταση⁸⁸. Η Rap1GAP είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Rap GTPase που έχει τεκμηριωθεί ότι ρυθμίζουν μονοπάτια κυτταρικής προσκόλλησης (Cell adhesion pathways) με τη μεσολάβηση ιντεγκρίνης⁸⁹.

Ο υποκινητής του Rap1GAP βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος σε κυτταρικές σειρές ΝΚΚ (SN12C και Caki-1) και η θεραπεία με αζακυτιδίνη των κυττάρων SN12C αύξησε σημαντικά τη σχετική έκφραση της Rap1GAP που οδήγησε σε σημαντική μείωση στην διηθητικότητα των SN12C και Caki-1 καταδεικνύοντας ένα ρόλο στη διήθηση. Ωστόσο, η Rap1GAP φαίνεται να μην έχει ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε καμιά από τις δύο αυτές κυτταρικές σειρές.^{90,61}

Το γονίδιο KILLIN.

Συμμετέχει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζεται από το p53. Κωδικοποιεί μια μικρή πρωτεΐνη που συνδέεται με το DNA, η οποία αναστέλλει τη σύνθεση του DNA in vitro και προκαλεί διακοπή της S φάσης⁹¹.

Σε μια μελέτη που έγινε για να καθορίσει το ποσοστό μεθυλίωσης και την έκφραση του γονιδίου KILLIN σε σειρές γεννητικών, σωματικών και ΝΚΚ κυττάρων, 23 από 41 ασθενείς με διαυγοκυτταρικό (δκ)ΝΚΚ (56%) έδειξαν γαμετική (germline) μεθυλίωση του υποκινητή του KILLIN ενώ κανείς από τους 50 της ομάδας ελέγχου δεν εμφάνισε μεθυλίωση ($p < 0,0001$). Η εξέταση για σωματική υπερμεθυλίωση 19 δειγμάτων δκΝΚΚ από τον πρωτοπαθή όγκο και ενός από μετάσταση έδειξε ότι 19 δείγματα (95%) είχαν μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή. Σε 8 κυτταρικές σειρές ΝΚΚ (RC-6, RC-9, RC13, RC-45, 786-O, ACHN, Caki-1 και Caki-2) και 1 κυτταρική σειρά φυσιολογικού νεφρικού ιστού (HEK293T) που εξετάστηκαν για μεθυλίωση του KILLIN υποκινητή, 100% των κυτταρικών σειρών ΝΚΚ έδειξαν μεθυλίωση σε τουλάχιστον 1 από τις 4 CpG περιοχές που αναγνωρίστηκαν ενώ η HEK293T ήταν πλήρως απομεθυλιωμένη. Όλες οι κυτταρικές σειρές ΝΚΚ είχαν σημαντική ελάττωση της έκφρασης του KILLIN. Η χρήση αζακυτιδίνης σε 7 από τις 8 σειρές είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση του KILLIN σε 6 από τις 7 σειρές ΝΚΚ⁹².

Τα γονίδια miR-9-1 και miR-9-3.

Τα micro-RNAs είναι μικρά μη κωδικά RNAs που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων με στοχευμένη καταστολή της μεταγραφής και μετάφρασης⁹¹. Τα γονίδια των micro RNAs έχει δειχθεί ότι έχουν ρόλο στον καρκίνο^{93,94} και μπορούν να τροποποιηθούν επιγενετικά⁹⁵. Τα γονίδια miR-9-1, miR-9-2 και miR-9-3 εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 1, 5 και 15 αντίστοιχα και κωδικοποιούν hsa-miR-9.

Μια μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των miR-9-1 και miR-9-3 σε 32 ζεύγη δειγμάτων δκNKK και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, ανέδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης και για τα δύο ($p=0.00021$ για το miR-9-1 και $p=0.000074$ για το miR-9-3) στα δείγματα όγκου συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς νεφρικούς ιστούς. Το επίπεδο μεθυλίωσης βρέθηκε να είναι σχεδόν διπλάσιο για το miR-9-1 και περισσότερο από τετραπλάσιο για το miR-9-3. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική τάση αυξημένης μεθυλίωσης σε δείγματα όγκων υψηλότερων κλινικών σταδίων και για τα δύο miR-9-1 ($p=0.024$) και miR-9-3 ($p=0.040$). Ο ρόλος της κατάστασης μεθυλίωσης των miR-9 γονιδίων στη μετάσταση αναλύθηκε με βάση πληροφορίες από την παρακολούθηση 59 ασθενών με δκNKK από τους οποίους 21 ανέπτυξαν μεταστατική υποτροπή. Αυτοί οι 21 ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς υποτροπή. Υπήρχε σημαντική μείωση στο χρόνο επιβίωσης ελεύθερο υποτροπής (Recurrence Free Survival) για ασθενείς με υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης miR-9-1 και miR-9-3 ($p=0.034$ και $p=0.007$ αντίστοιχα)^{96,61}.

Το γονίδιο GREM1 (GREMLIN-1).

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Gremlin-1, έναν αναστολέα στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGF β . Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που είναι ανταγωνιστής των μορφογενετικών των οστών πρωτεϊνών (Bone Morphogenetic Protein, BMP) 2, 4 και 7. Αυτή η ανταγωνιστική δράση αποτρέπει τους συνδέτες από την πρόσδεση στους υποδοχείς αναστέλλοντας έτσι την καθοδική σηματοδότηση TGF β ⁹⁷.

Μελέτη ερεύνησε την κατάσταση μεθυλίωσης των νησιδίων CpG του υποκινητή του GREM1 σε 4 σειρές κυττάρων NKK (SKRC1, SKRC10, SKRC52, SKRC59). Εκατόν πενήντα δείγματα όγκων από ασθενείς με σποραδικό δκNKK ανέδειξαν έντονη μεθυλίωση. Διαπιστώθηκε μικρού βαθμού ή καθόλου έκφραση GREM1 mRNA στις κυτταρικές σειρές και αγωγή με αζακυτιδίνη προκάλεσε έκφραση mRNA και στις 4 κυτταρικές σειρές^{98,61}.

Το γονίδιο BTG3.

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 21q21.1 και κωδικοποιεί πρωτεΐνη της οικογένειας BTG/Tob πρωτεϊνών που σχετίζονται δομικά και εμφανίζονται να έχουν δραστηριότητα με αποτέλεσμα ελάττωση του πολλαπλασιασμού. Εμφανίζεται ως πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο μέσω της ανασταλτικής δράσης στον μεταγραφικό παράγοντα E2F1 προκαλώντας αρνητική ρύθμιση στον κυτταρικό κύκλο⁹⁹.

Η κατάσταση μεθυλίωσης του BTG3 στο NKK εξετάστηκε χρησιμοποιώντας ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NKK (A498, ACHN, HEK293), σειρά φυσιολογικού νεφρού HK-2 και 20 δείγματα όγκων ασθενών με τα αντίστοιχα δείγματα παρακείμενου του όγκου φυσιολογικού νεφρικού ιστού. Η περιοχή του υποκινητή στις NKK σειρές ήταν πλήρως μεθυλιωμένη σε σύγκριση με την απουσία μεθυλίωσης στην HK-2 σειρά. Τα δείγματα όγκου ήταν υπερμεθυλιωμένα συγκρινόμενα με αυτά του υγιούς ιστού. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε σχετικά χαμηλά επίπεδα BTG3 έκφρασης στα δείγματα όγκου και σε NKK σειρές A498, ACHN και HEK-293 συγκριτικά με δείγματα φυσιολογικού ιστού και κύτταρα HK-2. Η έκφραση BTG3 ήταν σημαντικά αυξημένη σε κυτταρικές σειρές NKK μετά από αγωγή με αζακυτιδίνη ¹⁰⁰.

Το γονίδιο XAF-1 (XIAPP-associated Factor-1).

Είναι ένα γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία είναι ένας ανταγωνιστής της οικογένειας πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (Inhibition of Apoptosis Protein, IAP). Οι πρωτεΐνες αυτές αναστέλλουν κασπάσες οι οποίες είναι συνήθως ενεργές κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και αναστέλλοντας αυτές τις IAPs, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το XAF-1 γονίδιο βοηθά στο να αποφευχθεί η μη ελεγχόμενη ανάπτυξη σε καρκίνους. Είναι ένα γονίδιο που ενισχύεται από την ιντερφερόνη (IFN), που επάγει υψηλά επίπεδα XAF-1 πρωτεΐνης σε κύτταρα που είναι ευαίσθητα στην προαποπτωτική επίδραση της IFNβ ¹⁰¹.

Αγωγή με αζακυτιδίνη κατεδείχθη ότι αυξάνει την επαγωγή απόπτωσης με ιντερφερόνη σε κυτταρικές σειρές NKK ACHN και SK-RC-45 ¹⁰². Από τις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν η ACHN είχε την υψηλότερη αύξηση στην έκφραση XAF-1 σε θεραπεία με αζακυτιδίνη. Η διαμόλυνση με siRNA εναντίον του XAF-1 έδειξε να ελαττώνει την επαγόμενη από IFN απόπτωση σε κύτταρα προθεραπευμένα με αζακυτιδίνη επιβεβαιώνοντας το ρόλο του XAF-1 γονιδίου στην απόπτωση. Ωστόσο ανάλυση με ποσοτική ειδική μεθυλίωσης PCR (quantitative Methylation Specific PCR, qPCR) πρωτοπαθών NKK έδειξε μεθυλίωση σε 10% 91 περιπτώσεων, υποδηλώνοντας έτσι άλλους μηχανισμούς για μεταγραφική αρνητική ρύθμιση του XAF-1.⁶⁴

Το γονίδιο APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1).

Το γονίδιο APAF-1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 12q23, είναι στόχος του p53 και συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9 η οποία διεγείρει τον καταρράκτη των κασπασών οδηγώντας στην απόπτωση. Αδρανοποίηση του APAF-1 μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα αποτυχία στην έναρξη της απόπτωσης με αποτέλεσμα ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη.⁶¹

Δύο μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνότητα μεθυλίωσης του APAF-1 σε καρκινικά δείγματα είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τα δείγματα αντίστοιχου φυσιολογικού νεφρικού παρεγχύματος και η έκφραση του APAF-1 είναι σημαντικά χαμηλότερη στα καρκινικά δείγματα^{103,104}. Σε άλλη μελέτη¹⁰⁴, 2 κυτταρικές σειρές NKK (A498, Clear-Ca-5) υποβλήθηκαν σε αγωγή με αζακυτιδίνη και παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της ανάπτυξης από την πέμπτη μέρα μετά την αρχική θεραπεία. Επίσης, το επίπεδο του APAF-1 mRNA στις ίδιες αυτές σειρές κυτάρων αυξήθηκε σημαντικά μετά τη θεραπεία με το φάρμακο αζακυτιδίνη σε σύγκριση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της θεραπείας, υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου.⁶¹

Το γονίδιο DAPK-1 (Death Associated Protein Kinase-1).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 9q34.1. Κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης εξαρτώμενη από καλμοδουλίνη που συμμετέχει στις κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς της επιβίωσης, απόπτωσης και αυτοφαγίας. Είναι ένα πιθανά ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο ενεργεί σαν μεσολαβητής της επαγόμενης από ιντερφερόνη γ (IFNγ) απόπτωσης και η απώλεια της έκφρασής του έχει συνδεθεί με αρκετούς τύπους καρκίνου. Αναφέρθηκε ότι αντενεργεί σε μετασχηματισμό επαγόμενο από ογκογονίδιο με ενεργοποίηση ενός εξαρτώμενου από p19^{ARF}/p53 αποπτωτικού σημείου ελέγχου (checkpoint), το οποίο σχεδιάστηκε για να εξουδετερώσει προκαρκινικά κύτταρα¹⁰⁵. Οι κυτταρικές δράσεις της πρωτεΐνης είναι σημαντικές για τον ανταγωνισμό της εξαρτώμενης από κασπάσες απόπτωσης, με στόχο την προαγωγή της επιβίωσης του κυττάρου κάτω από συνθήκες φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης⁶⁴.

Οι Christof και συν. στη μελέτη τους¹⁰⁴ για τη μεθυλίωση του DAPK-1 και APAF-1 και τις επιδράσεις των απομεθυλιωτικών παραγόντων στον καρκίνο του νεφρού εξέτασαν 80 δείγματα ασθενών με δκNKK και 20 δείγματα φυσιολογικού νεφρού από άλλους ασθενείς. Παρατήρησαν ότι η συχνότητα μεθυλίωσης του DAPK-1 ήταν 33% στα δείγματα NKK και 5% στα δείγματα με φυσιολογικό νεφρικό ιστό.

Οι Kissil και συν. (1997) βρήκαν ότι κυτταρικές σειρές NKK είχαν έλλειψη DAPK1 mRNA και πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε αποκατάσταση της έκφρασης DAPK1 μετά την αγωγή με

αζακυτιδίνη¹⁰⁶. Τα στοιχεία σχετικά με τα ποσοστά μεθυλίωσης του DAPK1 σε διαφορετικές μελέτες είναι αντικρουόμενα (από 29 ως 100%).

Το γονίδιο Nbk/Bik (Natural Born Killer/Bcl-2 interacting killer).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 22q13.31 και κωδικοποιεί μια ιστοειδική BH3-only πρωτεΐνη με προαποπτωτικά χαρακτηριστικά. Η προαποπτωτική δράση αναφέρθηκε ότι είναι εξαρτώμενη από το Bax, ένα μέλος της οικογένειας Bcl-2 ¹⁰⁷.

Σε μια μελέτη που διερευνά τη σχέση ανάμεσα στην αδρανοποίηση του γονιδίου Nbk και το NKK, μη καρκινικός ιστός νεφρού παρατηρήθηκε ότι είχε σημαντικά υψηλότερη έκφραση Nbk γονιδίου σε πρωτεϊνικό επίπεδο συγκριτικά με την ασθενή ή απύουσα έκφραση του Nbk σε 57 NKK δείγματα που μελετήθηκαν. Ανάλυση με Western Blot έδειξε παρόμοια αποτελέσματα για έκφραση Nbk πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές NKK. Η RT-PCR ανέδειξε απουσία mRNA Nbk σε 9 από τις 10 κυτταρικές σειρές NKK που μελετήθηκαν. Αγωγή των σειρών με αζακυτιδίνη είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση στην έκφραση του Nbk mRNA και πρωτεΐνης, εκτός μιας σειράς ¹⁰⁸. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν το ρόλο του Nbk ως ογκοκατασταλτικού γονιδίου, το οποίο αδρανοποιείται με μεθυλίωση υποκινητή στο NKK.

Το γονίδιο HOXA5 (Homeobox A5).

Αποτελεί μέρος των γονιδίων Homeobox που ανευρίσκονται σε συστοιχίες με ονόματα A, B, C και D σε 4 διαφορετικά χρωμοσώματα. Το συγκεκριμένο είναι μέρος της συστοιχίας γονιδίων A (A cluster) στο χρωμόσωμα 7 και κωδικοποιεί έναν συνδεδεμένο με DNA μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει γονιδιακή έκφραση, μορφογένεση και διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη ρυθμίζει θετικά το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η επιγενετική αποσιώπηση λόγω μεθυλίωσης δυνατόν ως εκ τούτου να παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση. ⁶¹ Μια μελέτη 6 περιπτώσεων δκNKK με ζεύγη δειγμάτων όγκου και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού απέδειξε ότι η κατάσταση μεθυλίωσης του HOXA5 είχε μια σημαντική συσχέτιση με τον πυρηνικό βαθμό κακοήθειας (P=0.041). Το γονίδιο HOXA5 εμφάνισε ποσοστό μεθυλίωσης 51.6% στον καρκινικό ιστό και 21% στο φυσιολογικό ιστό. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό μεθυλίωσης του HOXA5 και την επιβίωση των ασθενών. ¹⁰⁹

Το γονίδιο HOXB13 (Homeobox 13).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21.2 και κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια homeobox. Είναι μια ακολουθία DNA εντός γονιδίων, τα οποία

κωδικοποιούν ομοιοπεριοχές (homeodomain), οι οποίες, όταν εκφράζονται σαν πρωτεΐνες, μπορούν να συνδεθούν με το DNA και να πυροδοτήσουν την έκφραση άλλων γονιδίων ⁶¹.

Το HOXB13 έχει δείχτει ότι είναι μεθυλιωμένο σε υψηλότερο βαθμό σε πρωτοπαθείς όγκους του νεφρού ¹¹⁰. Εξετάστηκαν 56 δείγματα από πρωτοπαθή ΝΚΚ, 17 από τα οποία (30%) έδειξαν ογκοειδική μεθυλίωση του HOXB13 που δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα αντίστοιχα δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού. Επίσης, μελετήθηκαν 15 κυτταρικές σειρές ΝΚΚ και από αυτές 11 (73%) έδειξαν ανώμαλη μεθυλίωση του HOXB13. Σχεδόν πλήρης μεθυλίωση του HOXB13 βρέθηκε σε 4 κυτταρικές σειρές, ενώ μερική μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 7 άλλες. Η έκφραση του HOXB13 mRNA στις κυτταρικές σειρές μελετήθηκε χρησιμοποιώντας RT-PCR και οι 4 κυτταρικές σειρές που έδειξαν πλήρη μεθυλίωση αποκάλυψαν απουσία έκφρασης HOXB13. Από τις 4 σειρές, 3 έλαβαν αγωγή με αζακυτιδίνη και TSA ξεχωριστά και η αζακυτιδίνη μόνη της αναφέρθηκε ότι επάγει ανάκτηση της έκφρασης HOXB13. Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς KC-12 με FLAG-σημασμένο HOXB13 και η επανέκφραση του HOXB13 αναφέρθηκε να σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα σχηματισμού αποικιών, ένδειξη του ογκοκασταλτικού του ρόλου. Κύτταρα ΝΚΚ UMRC-6 διαμολυσμένα με FLAG-HOXB13 έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα κασπάσης-3, αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα με πυρηνική συμπύκνωση και κυτταρικό θάνατο. Μεθυλίωση του HOXB13, επίσης, σημειώθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση με το βαθμό κακοήθειας του όγκου, το στάδιο, το μέγεθος και τη μικροαγγειακή διήθηση. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεθυλίωση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση του HOXB13.¹¹⁰

Το γονίδιο MSH2.

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MSH2 για την επιδιόρθωση κακοζευγαρωμένων βάσεων (mismatch repair) του DNA. Η πρωτεΐνη συμμετέχει σε πολλούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA συμπεριλαμβανομένων : επιδιόρθωση συνδεόμενη με τη μεταγραφή (transcription coupled repair), ομόλογος ανασυνδυασμός και επιδιόρθωση με αποκοπή βάσεων.

Οι Yoo και συν.¹⁰⁹ αναγνώρισαν το MSH2 μαζί με το HOXA5 ως υπερμεθυλιωμένο γονίδιο. Στο MSH2 το ποσοστό μεθυλίωσης ήταν 54.8% στον καρκινικό ιστό και 26.1% στο φυσιολογικό ιστό. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στο ποσοστό μεθυλίωσης του MSH2 και την επιβίωση των ασθενών παρομοίως με το HOXA5. Περαιτέρω μελέτες με απομεθυλιωτικούς παράγοντες σε δείγματα ΝΚΚ και κυτταρικές σειρές θα έπρεπε να γίνουν για να αναγνωριστεί ο ρόλος της επιγενετικής αποσιώπησης του MSH2.

To γονίδιο DAL.1/4.1B (Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung-1).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 18p11.32 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συνδέεται με ακτίνη και με την πρωτεΐνη TSLCL (Tumor Suppressor in Lung Cancer-1) μέσω του μοτίβου πρόσδεσης (binding motif) 4.1. ¹¹¹.

Από τις 19 κυτταρικές σειρές NKK που εξετάστηκαν σε μελέτη, 10 (53%) δεν είχαν έκφραση DAL-1 mRNA ¹¹². Αναλύθηκαν 19 χειρουργικά δείγματα NKK με μη καρκινικούς νεφρικούς ιστούς από τους ίδιους ασθενείς και 12 από 19 (63%) δείγματα από πρωτοπαθείς εστίες NKK έδειξαν απουσία ή ελαττωμένη έκφραση του DAL-1, ενώ τα δείγματα του φυσιολογικού νεφρικού ιστού έδειξαν σημαντική έκφραση. Η κατάσταση μεθυλίωσης του DAL-1 εκτιμήθηκε στις 19 NKK κυτταρικές σειρές, από τις οποίες 9 έδειξαν έντονη υπερμεθυλίωση του υποκινητή. Αυτά τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με μελέτες έκφρασης όπου υπερμεθυλίωση σχετίστηκε με κατεσταλμένη έκφραση γονιδίων. Οι κυτταρικές σειρές Caki-1, Caki-2 και KMRC-3 έλαβαν αγωγή με αζακυτιδίνη. Οι σειρές Caki-2 και KMRC-3 που είχαν υπερμεθυλωμένο DAL-1 υποκινητή έδειξαν επανέκφραση του DAL-1, ενώ η Caki-1 η οποία είχε έλλειψη μεθυλίωσης δεν έδειξε επανέκφραση. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν έναν αιτιολογικό ρόλο της μεθυλίωσης του υποκινητή στην επιγενετική αποσιώπηση του DAL-1. Επίσης, η μεθυλίωση του υποκινητή βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μεταστατική υποτροπή σε ασθενείς με δκNKK. ¹¹²

To γονίδιο SPINT2/HAI2 (Serine Peptidase Inhibitor Kunitz type 2) Bikunin

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει διάφορες πρωτεάσες σερίνης (αναστολείς της πρωτεάσης τύπου Kunitz, που λειτουργεί σαν ρυθμιστής της δράσης του HIF). Η πρωτεΐνη SPINT2 αναστέλλει τον ενεργοποιητή του HGF (Hepatocyte Growth Factor Activator) αποτρέποντας το σχηματισμό ενεργού HGF, ο οποίος έχει το σημαντικό ρόλο της ενεργοποίησης του MET που με τη σειρά του ενεργοποιεί τα Ras/MAPK και PI3K/AKT μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν την ανάπτυξη NKK και τη μετάσταση. ¹¹³

Οι Morris και συν. ¹¹⁴ ερεύνησαν το ρόλο της επιγενετικής αποσιώπησης του SPINT2 στο NKK. Υπεβλήθησαν σε θεραπεία με αζακυτιδίνη 11 κυτταρικές σειρές NKK για 5 μέρες και 5 από 11 (SKRC-39, UMRC-2, 786O, Caki-1 και KTCL26) είχαν θετική ρύθμιση της έκφρασης SPINT2. Έντονη μεθυλίωση του υποκινητή του SPINT2 βρέθηκε στις κυτταρικές σειρές UMRC2 και SKRC39, οι οποίες είχαν δείξει πλήρη αποσιώπηση του SPINT2 με RT-PCR. Από 102 δείγματα NKK που μελετήθηκαν, 34 έδειξαν μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή ενώ μόνο 2 από 38 δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού. Διαμόλυνση του

γονιδίου SPINT2 στις UMRC2 και SKRC39 κυτταρικές σειρές είχε σαν αποτέλεσμα ελαττωμένο σχηματισμό αποικιών στις in vitro αναλύσεις. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ένα σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης στην αποσιώπηση του γονιδίου SPINT2 στο NKK. Η ογκοκατασταλτική δράση όπως και η αδρανοποίηση με υπερμεθυλίωση έχει αναγνωρισθεί τόσο σε διαυγοκυτταρικό (30%) όσο και σε θηλώδες (40%) NKK.^{64,114}

Το γονίδιο γ-catenin/JUP (Junction Plakoglobin).

Η γ-κατενίνη ή πλακοσφαιρίνη σύνδεσης είναι μια πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης και μέλος της οικογένειας των κατενινών. Κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21. Είναι κοινό συστατικό των δεσμοσωμάτων και των διάμεσων συνδέσεων (junctions), οι οποίες είναι κυτταρικές δομές που ειδικεύονται στην προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους. Απώλεια της λειτουργίας πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης όπως η γ-κατενίνη έχει αναφερθεί ότι διασπά την διακυττάρια αλληλεπίδραση στους όγκους, σχετιζόμενη με χειρότερη πρόγνωση¹¹⁵.

Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA σαν μηχανισμός αποσιώπησης του γονιδίου της γ-κατενίνης στο NKK ερευνήθηκε σε μια μελέτη από τους Breault και συν. (2005) με 54 δείγματα πρωτοπαθούς NKK και αντίστοιχων φυσιολογικών δειγμάτων και 3 κυτταρικών σειρών A498, Caki-1 και Caki-2. Η μελέτη ανέδειξε έντονη έκφραση σε δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού και ασθενή έκφραση στην πλειοψηφία των NKK. Τα επίπεδα μεταγράφων mRNA ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερα στα δείγματα NKK σε σύγκριση με αυτά φυσιολογικού νεφρικού ιστού ($p < 0,05$). Αγωγή με αζακυτιδίνη των 3 κυτταρικών σειρών NKK (A498, Caki-1 και Caki-2) έδειξε αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA γ-κατενίνης μετά από θεραπεία σε σύγκριση με ομάδες ελέγχου χωρίς λήψη αγωγής^{116,61}.

Το γονίδιο TCF21 (Transcription Factor 21).

Αναγνωρίστηκε σαν πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο 6q23-q24 και είναι επιγενετικά αδρανοποιημένο σε πολλούς καρκίνους¹¹⁷. Το ποσοστό μεθυλίωσης του TCF21 βρέθηκε να είναι πολύ υψηλό σε δείγματα δκNKK συγκρινόμενο με δείγματα παρακείμενων φυσιολογικών νεφρικών ιστών. Αγωγή με αζακυτιδίνη (απομεθυλιωτικό παράγοντα του DNA) αποκατέστησε μέρος της έκφρασης του TCF21 στην κυτταρική σειρά 786-O¹¹⁸. Σε άλλη μελέτη σημαντική αντίστροφη συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της μεθυλίωσης του TCF21 και επιπέδων έκφρασης αυτού σε κυτταρικές σειρές NKK χωρίς θεραπεία. Θεραπεία με 1μM ή 5μM αζακυτιδίνης είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση του γονιδίου

Το γονίδιο PCDH17 (Protocadherin 17).

Κωδικοποιεί μια πρωτοκαντχερίνη που πιστεύεται ότι έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες εξαιτίας των λειτουργιών κυτταρικής προσκόλλησης, μεταγωγής σήματος και ελέγχου ανάπτυξης, μολονότι ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Η περιοχή του υποκινητή PCDH17 βρέθηκε να είναι υπερμεθυλιωμένη στο 61% των ΝΚΚ ¹¹⁹.

Το γονίδιο HIC1 (Hypermethylated In Cancer-1).

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HIC1, η οποία λειτουργεί σαν μεταγραφικός καταστολέας. Το γονίδιο έχει φανεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής του p53 και του E2 και σε απαντήσεις σε βλάβη του DNA μέσω του παράγοντα E2F1^{120,121,122}. Απώλεια της λειτουργίας του HIC1 έχει συσχετιστεί με εμφάνιση διαφόρων όγκων. Μια μελέτη του ρόλου της μεθυλίωσης των CpG νησιδίων του HIC1 στο ΝΚΚ με τη χρήση τροποποίησης παρουσίας όξινου θειώδους νατρίου (bisulfite conversion) και πυροαλληλούχισης (pyrosequencing) σε 98 καρκινικά δείγματα και 70 δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού αναγνώρισε υπερμεθυλίωση του HIC1 στους όγκους, ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ελαττωμένου διαστήματος επιβίωσης ελεύθερου υποτροπής (RFS recurrence free survival) ¹²³.

Το γονίδιο LRRC3B (Leukine Rich Repeat Containing 3B).

Κωδικοποιεί μια εξελικτικά υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη, αλλά η βιολογική της σημασία είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περισσότερες από 2000 πρωτεΐνες που περιέχουν LRR μοτίβο και συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές διαδικασίες, όπως ανοσία φυτών και ζώων, αλληλεπιδράσεις ορμόνης-υποδοχέα, κυτταρική προσκόλληση, μεταγωγή σήματος, ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης και απόπτωση.

Ένας αριθμός μελετών με τεχνολογία μικροσυστοιχιών έκφρασης (microarray expression profiling) έδειξαν ότι το LRRC3B ρυθμίζεται θετικά σε διάφορους καρκίνους, ένδειξη ότι συμμετέχει στην καρκινογένεση ¹²⁴. Σε μια μελέτη για το ρόλο του στο ΝΚΚ, 57% των δειγμάτων έδειξαν υπερμεθυλίωση ή και απαλοιφή (deletion). Ανάλυση έκφρασης του LRRC3B με τη χρήση RT-qPCR έδειξε μειωμένη έκφραση στο στάδιο III του ΝΚΚ. Το γονίδιο, επίσης, καταδείχτηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης σε πειράματα μετασχηματισμένων αποικιών in vitro, επιπλέον ένδειξη του ρόλου του σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο ¹²⁵.

Το γονίδιο GATA5.

Ανήκει σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με δομή «δακτύλου» ψευδαργύρου που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την αντίστοιχη DNA αλληλουχία (A/T)GATA(A/G)¹²⁶. Είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ρυθμίζεται αρνητικά σε διάφορους καρκίνους.

Μια μελέτη για το επίπεδο μεθυλίωσης του γονιδίου GATA5 στις κυτταρικές σειρές NKK: RCC-GS, 786-O, A498, ACHN και RCC-45 όπως επίσης και στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (RPTEC) με τη χρήση COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) ανέδειξε ότι το επίπεδο μεθυλίωσης ήταν 77% στην 786-O, 53% στην RCC-65, 89% στην RCC-HS, 99% στην RCC-MF, 99% στην A498, 12% στην ACHN και 2% στην RPTEC. Αυξημένη μεθυλίωση του GATA5 στην ομάδα δκNKK συσχετίστηκε με μετάσταση ($p=0.005$) και ελαττωμένο PFS ($p=0.005$)¹²⁷.

Το γονίδιο RASSF1 (Ras ASSociation domain containing protein-1).

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RASSF1 και είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p21. Έχει αρκετές κύριες ισομορφές εξαιτίας εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) αλλά η επιγενετική αποσιώπηση της μακρότερης ισομορφής RASSF1 σχετίζεται ειδικά με καρκίνο¹²⁸. Το RASSF1A λειτουργικά εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων ρυθμίζοντας την πρόοδο και λειτουργία της μίτωσης σαν αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου⁶⁴, στην κυτταρική προσκόλληση, κινητικότητα όπως επίσης στην απόπτωση¹²⁹.

Σε μια μελέτη, ο μέσος κανονικοποιημένος δείκτης μεθυλίωσης (methylation index, MI) του RASSF1A υποκινητή ήταν σημαντικά υψηλότερος σε δείγματα θηλώδους NKK συγκριτικά με δείγματα παρακείμενων φυσιολογικών ιστών (2.11 vs 0.61 $p=0.001$)¹³⁰. Άλλη μελέτη προσδιόρισε τη σχέση μεταξύ επιπέδων μεθυλίωσης του RASSF1A και πρόγνωσης σε 179 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική ή μερική νεφρεκτομή για δκNKK. Το επίπεδο της μεθυλίωσης του RASSF1A υποκινητή βρέθηκε να είναι υψηλότερο σε ασθενείς με στάδιο III ή IV NKK συγκριτικά με ασθενείς σταδίου I ή II ($p=0.043$). Υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σχετίζονται ανεξάρτητα με πτωχή πρόγνωση στην πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) ($p=0.0053$)¹³¹. Σε άλλη μελέτη, το RASSF1A παρατηρήθηκε ότι έχει σημαντικά υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης στο θηλώδες NKK συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους.¹³²

Το γονίδιο ανευρίσκεται μεθυλιωμένο σε 28-91% των πρωτοπαθών νεφρικών όγκων. Οι διαφορές στα ποσοστά μεθυλίωσης οφείλονται στη χρήση αλληλουχιών εκκινητή από διαφορετικές περιοχές των νησιδίων CpG του υποκινητή, διαφορές στην αναλογία του

ιστολογικού τύπου, βαθμού κακοήθειας και σταδίου όπως και στην μεθοδολογία ανάλυσης της μεθυλίωσης που χρησιμοποιείται στην μελέτη.

Επίσης βρέθηκε μεθυλίωση και στο χρωμόφοβο ΝΚΚ ¹³² ενώ είναι το πιο συχνά μεθυλιωμένο γονίδιο σε ΝΚΚ πρώιμου σταδίου (περιορισμένα στο όργανο).⁶⁴

Το γονίδιο UNC5C.

Το προϊόν αυτού του γονιδίου ανήκει στην οικογένεια UNC5H υποδοχέων, δρα όπως ένας από τους υποδοχείς Netrin-1 και έχει την ικανότητα να επάγει απόπτωση σε απουσία συνδέτη Netrin-1 ^{133,134}. Εκφράζεται στο εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο από όπου προέρχονται τα περισσότερα ΝΚΚ. ¹³⁵

Η μελέτη με RT-PCR 5 κυτταρικών σειρών ΝΚΚ : 786-O, Os-RC-2, A498, ACHN και Caki-1 αποκάλυψε ασθενή έκφραση του UNC5C στη σειρά Caki-1 και εξαιρετικά χαμηλή (μη ανιχνεύσιμη) έκφραση στις άλλες 4 σειρές. Από τις 5 ΝΚΚ κυτταρικές σειρές, οι 2 (786-O και OS-RC-2) βρέθηκαν να έχουν υπερμεθυλιωμένο UNC5C. Μελετήθηκαν 44 δείγματα πρωτοπαθούς ΝΚΚ με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς νεφρικούς ιστούς. Όλα τα δείγματα ΝΚΚ βρέθηκαν να έχουν ελαττωμένη έκφραση συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Από τα 44 δείγματα, 12 έδειξαν υπερμεθυλίωση του υποκινητή UNC5C (27.3%) συγκριτικά με απουσία μεθυλίωσης των αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών ^{135,61}.

Το γονίδιο KRT19 (Keratin type -1 cytoskeletal 19).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21.2 και κωδικοποιεί την κυτταροκερατίνη (CK)19 ¹³⁶. Είναι πιθανά ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση Akt ¹³⁷. Σε φυσιολογικό νεφρικό ιστό, η KRT19 εκφράζεται στα κύτταρα των άπω εσπειραμένων και αθροιστικών σωληναρίων.

Μια μελέτη διεξήχθη στις κυτταρικές σειρές ΝΚΚ : 769-P, 786-O, Caki-1, Caki-2, A498 και ACHN και 112 δείγματα ασθενών για τον προσδιορισμό μεθυλίωσης και έκφρασης επιπέδων KRT19. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή και συγκριτικά επίπεδα έκφρασης mRNA έδειξαν μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$) αντίστροφη συσχέτιση στην 769-P, Caki-1, Caki-2, A498 και ACHN. Η κυτταρική σειρά 786-O έδειξε χαμηλά επίπεδα τόσο μεθυλίωσης όσο και έκφρασης. Έγινε χορήγηση 5Μμ αζακυτιδίνης σε 4 ΝΚΚ σειρές : 769-P, Caki-1, Caki-2 και A498 (786-O και ACHN είχαν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης και ως εκ τούτου εξαιρέθηκαν) και εκτός από την Caki-2, η απομεθυλίωση του υποκινητή του KRT19 σε 3 κυτταρικές σειρές είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση mRNA. Η σειρά Caki-2 είχε τα χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των 4 κυτταρικών σειρών. Στα δείγματα ιστών,

23 από 112 (9/52 διαυγοκυτταρικού ΝΚΚ , 6/22 θηλώδους ΝΚΚ , 2/22χρωμόφοβου ΝΚΚ , 6/16 ογκοκυτώματος) έδειξαν υπερμεθυλίωση του υποκινητή της KRT19 ¹³⁸.

Το γονίδιο GATA3.

Κωδικοποιεί τον κυτταροειδικό μεταγραφικό παράγοντα GATA3, μια πρωτεΐνη που έχει ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και λειτουργίας των Th-2 κυττάρων και εκφράζεται εκλεκτικά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης των ανθρωπίνων νεφρών ¹³⁹. Ρυθμίζει την έκφραση του TβRIII (ενός υποδοχέα του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού, που συμβάλλει στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού), δρώντας στην εγγύς περιοχή του υποκινητή του γονιδίου TβR3.

Η έκφραση του GATA3 έχει βρεθεί μειωμένη σε όλα τα στάδια του ΝΚΚ σε 2 μελέτες ¹⁴⁰⁻¹⁴¹ και ελαττωμένη έκφραση του GATA3 καταλήγει σε συνακόλουθη ελάττωση της πρωτεΐνης TβRIII. Ο υποκινητής του γονιδίου GATA3 έχει βρεθεί σε καρκινικά δείγματα έντονα μεθυλιωμένος και αγωγή της κυτταρικής σειράς ΝΚΚ UMRC2 με αζακυτιδίνη είχε σαν αποτέλεσμα δραματική αύξηση της έκφρασης mRNA GATA3¹⁴⁰.

Το γονίδιο TIMP3 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 3).

Το προϊόν του είναι μέλος των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών της ενδογενούς Εξωκυττάριας Θεμέλιας Ουσίας ¹⁴² και είναι φυσιολογικός ανταγωνιστής του VEGFR-2. Η σηματοδότηση VEGF ενισχύεται έντονα στους περισσότερους δκΝΚΚ.

Μια μελέτη σε 105 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική ή μερική νεφρεκτομή για δκΝΚΚ, αποκάλυψε ότι συγκριτικά με το φυσιολογικό νεφρικό ιστό 100 από τους 105 είχαν ελαττωμένη έκφραση TIMP3 ¹⁴³. Άλλη μελέτη ανέφερε ότι 4 από 12 (33%) κυτταρικές σειρές ΝΚΚ, 28 από 36 δείγματα όγκων και 0 από 27 φυσιολογικά δείγματα ιστών που μελετήθηκαν είχαν υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου TIMP3. Η μεθυλίωση βρέθηκε να είναι παρόμοια στα νεφροκυτταρικά καρκινώματα όλων των βαθμών κακοήθειας, υποδηλώνοντας ότι αυτή η επιγενετική αλλαγή ίσως επισυμβαίνει σε πρώιμα στάδια του καρκίνου ¹⁴⁴.

Το γονίδιο TU3A (ή FAM107A, Family with sequence similarity 107, member A).

Είναι πιθανά ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p21.1. Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην αποσιώπηση της έκφρασής του σε διάφορα ανθρώπινα καρκινώματα όπως : νεφρού, ουροδόχου κύστης, τραχήλου μήτρας, μαστού, ήπατος, ωοθηκών και όρχεως μελετήθηκε από τους Awakura και συν. (2008). Οι ερευνητές εξέτασαν τις κυτταρικές σειρές ΝΚΚ Caki-1, ACHN και NC65 και βρήκαν ότι η σειρά ACHN είχε χαμηλή

έκφραση του TU3A ενώ οι άλλες δύο δεν έδειξαν καμία έκφραση. Η θεραπεία με αζακυτιδίνη αποκατέστησε την έκφραση του TU3A mRNA και στις 3 κυτταρικές σειρές, ενώ η έκφραση ήταν ακόμη περισσότερο σημαντική όταν συνδυάστηκαν αζακυτιδίνη και Trichostatin-A (αναστολέας απακετυλασών ιστονών, HDACis). Επίσης βρέθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του TU3A σχετίζεται σημαντικά με προχωρημένο στάδιο νόσου και πτωχή ειδική της νόσου επιβίωση (Disease Specific Survival, DSS).¹⁴⁵.

Το γονίδιο FHIT (Fragile Histidine Triad).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p14, είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων της τριάδας της ιστοιδίνης και κωδικοποιεί την FHIT πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μεταβολισμό των πουρινών. Δρα σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο με αναστολή της ανάπτυξης και επαγωγή της απόπτωσης σε διάφορους καρκίνους. Το γονίδιο περικλείει την κοινή εύθραυστη χρωμοσωματική θέση (common fragile site) FRA3B στο χρωμόσωμα 3p, όπου βλάβη επαγόμενη από καρκινογόνα μπορεί να οδηγήσει σε μεταθέσεις και ανώμαλα μετάγραφα του γονιδίου αυτού.⁶⁴

Ο ρόλος της μεθυλίωσης του υποκινητή του DNA στην έκφραση FHIT στο δκNKK μελετήθηκε από Kvasha και συν.¹⁴⁶. Πραγματοποιήθηκε PCR-ειδική μεθυλίωσης για 22 ζεύγη ιστών δκNKK και μη κακοήθων νεφρικών ιστών και παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση σε 12 από 22 (54.5%) των δκNKK δειγμάτων και σε κανένα από αυτά των μη κακοήθων ιστών. Επίσης παρατήρησαν ότι η συχνότητα υπερμεθυλίωσης ήταν σημαντικότερα υψηλότερη σε ασθενείς άνω των 50 ετών από ότι σε νεότερους σε ηλικία ασθενείς ($p=0.027$). Παρατήρησαν επίσης σημαντικά ελαττωμένα έκφραση FHIT σε δείγματα όγκων με μεθυλιωμένο FHIT γονίδιο χρησιμοποιώντας ημιποσοτική RT-PCR, ενώ τα μη μεθυλιωμένα δείγματα έδειξαν έκφραση FHIT σε υψηλά επίπεδα.¹⁴⁶

Το γονίδιο DLK1 (Delta like-1).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα 14q32 και είναι πατρικής προέλευσης εκφρασμένο αποτυπωμένο γονίδιο (paternally expressed imprinted gene) που κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην διαφοροποίηση αρκετών τύπων κυττάρων, περιλαμβανομένων των λιποκυττάρων.

Ο Kawakami και συν.¹⁴⁷ προσδιόρισαν μια απαλοιφή στο 14q32 στα NKK και υπέθεσαν συμμετοχή του DLK1 στην ογκογένεση NKK. Χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη 15 κυτταρικές σειρές NKK και μια σειρά 50 περιπτώσεων χειρουργικά αφαιρεθέντων πρωτοπαθών NKK (δκNKK, μη θηλώδη NKK) και παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί. Διαπιστώθηκε απώλεια έκφρασης του DLK1 σε 39 από 50 (78%) ιστούς με πρωτοπαθές

NKK, ενώ έκφραση του DLK1 διατηρήθηκε σε κάθε φυσιολογικό νεφρικό ιστό. Μόνο μία από 15 κυτταρικές σειρές NKK βρέθηκε να έχει έκφραση. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημική μέθοδο η DLK1 πρωτεΐνη εμφάνιζε υψηλότερη έκφραση στα σωληναριακά κύτταρα του νεφρού, όπου είναι η θέση προέλευσης των NKK. Διαμόλυνση με DLK1 κατέληξε σε αυξημένη απόπτωση και στις 4 κυτταρικές σειρές NKK σε σχέση με τις σειρές ελέγχου. Σημαντική μείωση στην ανάπτυξη υποδόριων όγκων σε γυμνούς (nude) ποντικούς παρατηρήθηκε μετά από αποκατάσταση του DLK1 σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές ελέγχου, δείχνοντας ογκοκατασταλτική δραστικότητα του DLK1 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα DLK1 και GTL2 (Gene Trap Locus 2) είχαν προηγουμένως αναφερθεί ότι είναι αμοιβαία αποτυπωμένα (reciprocally imprinted) γονίδια και επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε αυτή τη μελέτη¹⁴⁸. Η μεθυλίωση του CpG2 νησιδίου του GTL2 βρέθηκε να συμφωνεί με την έκφραση του DLK1 γονιδίου. Αγωγή με αζακυτιδίνη είχε σαν αποτέλεσμα την ανάκτηση της έκφρασης του DLK1 σχετιζόμενη με απομεθυλίωση της περιοχής CpG2 του GTL2 στις κυτταρικές σειρές.

Το γονίδιο CX32 (Connexin 32).

Εδράζεται στο χρωμόσωμα Xq13.1 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία σχηματίζει ένα μέρος του καναλιού της χασματικής σύναψης (gap junction), που διευκολύνει τη μεταφορά ιόντων και μικρών μορίων μεταξύ των κυτάρων. Ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια αιμοκάθαρση έχουν τον κίνδυνο ανάπτυξης επίκτητης κυστικής νόσου των νεφρών (Acquired Cystic Kidney Disease, ACKD) και αυτές οι κύστεις αναπτύσσονται από το προγονικό (progenitor) κύτταρο του NKK, το επιθηλιακό κύτταρο του εγγύς εσπειραμένου νεφρικού σωληναρίου. Το καρκίνωμα έχει την τάση να εξορμάται από θηλώδη αδενώματα που προέρχονται από τις κύστεις της ACKD. Το γονίδιο CX 32 έχει αναφερθεί ότι έχει ένα ογκοκατασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του νεφροκυτταρικού καρκίνου στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς^{149,150}.

Σε μια μελέτη που ερεύνησε την κατάσταση μεθυλίωσης του CX32 υποκινητή και το ρόλο του σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο NKK που αναπτύσσεται σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, μελετήθηκαν 19 καρκινικοί ιστοί και 19 αντιπαρατεθέντες (matched) μη κακοήθεις ιστοί από νεφρούς αιμοκαθαιρόμενων ασθενών μαζί με 10 ζεύγη NKK και φυσιολογικών ιστών ασθενών που δεν υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση. Παρατηρήθηκε ότι 15 από 19 μη καρκινικούς ιστούς από τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς ήταν μεθυλιωμένοι ενώ όλοι οι (10) φυσιολογικοί νεφρικοί ιστοί από τους μη αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς ήταν μη μεθυλιωμένοι ($p=0.0001$). Το status μεθυλίωσης σχετιζόταν με την έκφραση του γονιδίου. Η μέση διάρκεια της αιμοκάθαρσης σε ασθενείς με θετικό status μεθυλίωσης ήταν 51.2 μήνες

ενώ ήταν 33.6 μήνες σε ασθενείς με αρνητικό status μεθυλίωσης στο CX32, ένδειξη ότι μεγαλύτερη διάρκεια αιμοκάθαρσης επάγει μεθυλίωση του CX32. ^{61,149,150}

Το γονίδιο ECAD (E-Cadherin).

Εδράζεται στο 16q22.1 και ανήκει στην υπεροικογένεια της καντχερίνης. Κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη προσκόλλησης μεταξύ κυττάρων εξαρτώμενη από ασβέστιο. Απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου ή ελάττωση έκφρασης μελετήθηκε σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του νεφρού, και θεωρήθηκε ότι συμβάλλει στην πρόοδο του καρκίνου σε υψηλότερα στάδια, με αυξημένο πολλαπλασιασμό, διήθηση και/ή μετάσταση.

Θετική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στη μεθυλίωση του υποκινητή του ECAD και του βαθμού κακοήθειας, με βαθμού 3 ΝΚΚ όγκους να έχουν 100% μεθυλίωση, βαθμού 2 57% και βαθμού 1 57% ¹⁵¹. Στην ίδια μελέτη, 4 ΝΚΚ κυτταρικές σειρές (769-P, 786-O, Caki-1 και Caki-2) αναφέρθηκε ότι έχουν υψηλότερο βαθμό μεθυλίωσης στις περισσότερες θέσεις CpG στην περιοχή του υποκινητή ECAD, συγκρινόμενα με φυσιολογικά κύτταρα νεφρού που δεν είχαν καθόλου μεθυλίωση. Αγωγή με αζακυτιδίνη για 3 ημέρες είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση ECAD mRNA και στις 4 κυτταρικές σειρές. ¹⁵¹

Στα πρωτοπαθή ΝΚΚ οι Dulaimi και συν. ανέφεραν συχνότητα μεθυλίωσης 11% ⁶³. Σε κυτταρικές σειρές ΝΚΚ υπερμεθυλίωση αναφέρθηκε σε 9 από 14 (64%). Στην ίδια μελέτη υπερμεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή της ECAD και άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ήταν έντονα σχετιζόμενη, αλλά όχι πάντα, με απώλεια έκφρασης ^{152,64}.

Το γονίδιο VHL (Von Hippel Lindau).

Η αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL με μεθυλίωση του υποκινητή αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1998. Η περιοχή του υποκινητή βρέθηκε μεθυλιωμένη σε 11% (11/99) των πρωτοπαθών ΝΚΚ και 10% από αυτούς τους όγκους δεν είχαν ένδειξη συνακόλουθης μετάλλαξης του γονιδίου VHL, δείχνοντας ότι τα δύο γεγονότα ήταν αμοιβαία αποκλειόμενα (mutually exclusive) ¹⁵³. Παρομοίως, επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου VHL αναφέρθηκε στο 7% των δκΝΚΚ όγκων. (Cancer Genome Atlas Research Network Group)¹⁵⁴.

Το γονίδιο UQCRH (Ubiquinol Cytochrome C Reductase Hinge protein).

Είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή συνδετική πρωτεΐνη (hinge protein), υπομονάδα του συμπλέγματος UQCR που αποτελείται από ένα προϊόν που κωδικοποιείται από μιτοχονδριακό γονίδιο και 10 προϊόντα που

κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα και είναι τμήμα της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Βρέθηκε υπερμεθυλιωμένο και κατεσταλμένο σε 36% των δκΝΚΚ όγκων από το Cancer Atlas Research Network Group¹⁵⁴.

Το γονίδιο DACH1 (Dachhund homologue 1).

Είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που αναστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1 και είναι γνωστό ότι είναι κατεσταλμένο στο ΝΚΚ με υπερμεθυλίωση. Αγωγή με αζακυτιδίνη έδειξε να αποκαθιστά την έκφραση DACH1¹⁵⁵.

Τα γονίδια p16^{ink4a} - p14^{ARF}

Απώλεια αλληλομόρφου στην περιοχή του χρωμοσώματος 9p21 είναι συχνή στους περισσότερους τύπους συμπαγών όγκων. Οι στόχοι της απαλοιφής είναι τα p16^{ink4a} και το παρακείμενο p14^{arf} ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η ομόζυγη απαλοιφή είναι ο πιο κοινός μηχανισμός αδρανοποίησης σε αυτά τα γονίδια. Η μεθυλίωση του υποδοχέα ανευρίσκεται σχετικά ασυνήθως και η σημειακή μετάλλαξη είναι εξαιρετικά σπάνια ¹⁵⁶. Η συχνότητα μεθυλίωσης του p16^{ink4a} στις κυτταρικές σειρές ΝΚΚ¹⁵⁷ είναι υψηλότερη από ότι στο πρωτοπαθές ΝΚΚ⁶³. Αυτή η παρατήρηση αληθεύει για πολλά γονίδια που υπερμεθυλιώνονται στον καρκίνο. Επειδή οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από προχωρημένους όγκους και μπορεί να υποστούν κλωνική επιλογή μέσα από έναν αριθμό διελεύσεων (passages), η συχνότητα της μεθυλίωσης γονιδίων μπορεί να είναι αντιπροσωπευτική του πρωτοπαθούς όγκου ¹⁵⁸.

Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του p16^{ink4a} παρατηρείται στο 5-10% των πρωτοπαθών ΝΚΚ ⁶³. Μεταλλάξεις του p16^{ink4a} ανευρίσκονται σε πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους από τον ίδιο ασθενή ¹⁵⁷ και σε άλλη μελέτη σε όλα τα στάδια και βαθμούς κακοήθειας των νεφρικών όγκων ⁶³. Το γονίδιο p14^{ARF} που μοιράζεται μια κωδική περιοχή με το p16 έχει μια ξεχωριστή περιοχή εξονίου 1 και υποκινητή που περιέχει ένα τυπικό CpG νησίδιο ¹⁵⁹ το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι μεθυλιωμένο σε 5-10% των πρωτοπαθών ΝΚΚ ^{160,64}.

Το γονίδιο APC. (Adenomatous Polyposis Coli).

Σχετίζεται με Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση (FAP) και σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο και είναι μέρος της σηματοδοτικής οδού Wnt. Παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση σε 8% σε σχετικά μικρό δείγμα νεφρικών όγκων. Σε άλλη μελέτη, με μεγαλύτερο αριθμό όγκων, η συχνότητα μεθυλίωσης βρέθηκε να είναι 14%.¹⁶¹

To GSTP1 γονίδιο (Glutathione S transferase pi 1)

Κωδικοποιεί ένα ένζυμο αποτοξίνωσης από καρκινογόνα. Βρέθηκε μεθυλιωμένο σε λιγότερο από 10% των νεφροκυτταρικών καρκίνων ανεξαρτήτως ιστολογικού τύπου, βαθμού κακοήθειας και σταδίου κατά την διάγνωση^{63,64,162}.

To γονίδιο MGMT (O6 methylguanine DNA methyltransferase).

Είναι γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA και έχει ανώμαλη μεθύλιωση του υποκινητή που σχετίζεται με απώλεια έκφρασης σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Η υπερμεθύλιωση του MGMT υποκινητή είναι σχετικά ασυνήθης στο νεφρικό καρκίνο (6-8%)^{63,163}.

To γονίδιο RARβ2 (Retinoic Acid Receptor β2).

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί τον β υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος, μέλος της υπεροικογένειας πυρηνικών μεταγραφικών ρυθμιστών του Thyroid-steroid hormone receptor. Αυτός ο υποδοχέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (μιτοχόνδρια) και στα υποπυρηνικά διαμερίσματα. Συνδέει ρετινοϊκό οξύ, τη βιολογικά ενεργή μορφή βιταμίνης A που διαμεσολαβεί στην κυτταρική σηματοδότηση, στην εμβρυική μορφογένεση, κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη RARβ2 πιστεύεται ότι περιορίζει την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων. Μεθύλιωση του RARβ2 στους νεφρικούς όγκους παρατηρείται με συχνότητα 12%.^{63,64}

To γονίδιο BLU/ZMYND10 (Zinc finger MYND type containing 10).

Εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 3 κοντά στο RASSF1A. Βρέθηκε να έχει συχνότητα μεθύλιωσης 50% σε κυτταρικές σειρές από καρκινώματα νεφρού. Παρότι RASSF1A και BLU εδράζονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην μεθύλιωση του υποκινητή στα δύο αυτά γονίδια^{164,64}.

To γονίδιο ABCG2 (ATP Binding Cassete subfamily G member2).

Κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη συνδεόμενη με ATP, εμπλεκόμενη στην αντοχή φαρμάκων. Η περιοχή του υποκινητή βρέθηκε μεθυλιωμένη σε υψηλά επίπεδα σε ΝΚΚ κυτταρικές σειρές, ενώ παρατηρήθηκε επανενεργοποίηση της έκφρασης μετά από αγωγή με αζακυτιδίνη^{165,64}.

4.2.1.3. ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Υπάρχουν αρκετές πιθανές εξηγήσεις για τις διαφορές στην αναφερόμενη συχνότητα μεθυλίωσης ενός γονιδίου μεταξύ διαφορετικών μελετών. Αυτές περιλαμβάνουν διαφορές στα χαρακτηριστικά του υλικού που μελετήθηκε : π.χ. αριθμός δειγμάτων που μελετήθηκαν, ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας, στάδιο και ποσοστό καρκινικών κυττάρων που περιέχονται στη βιοψία ¹⁶⁶. Η συχνότητα της μεθυλίωσης ενός γονιδίου σε σειρές καρκινικών κυττάρων δεν συμβαδίζει πάντα με τη συχνότητα (μεθυλίωσης) σε μια αντιπροσωπευτική ομάδα από πρωτοπαθείς όγκους. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι σειρές καρκινικών κυττάρων δείχνουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα υπερμεθυλίωσης νησιδίων CpG από ότι οι πρωτοπαθείς κακοήθειες που αντιπροσωπεύουν. ¹⁵⁸.

Η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας διθειώδους άλατος (bisulfite modification) και της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για ανάλυση είναι σχετική, αφού περιπτώσεις όπου μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του όγκου (5-10%) περιέχουν μεθυλιωμένα αλλήλια, θα μπορούσαν να χαθούν με άμεση αλληλούχιση μετά από επίδραση θειωδών ανιόντων (direct bisulfite sequencing) ή πυροαλληλούχιση (pyrosequencing) για παράδειγμα. Η συμβατική βασιζόμενη σε gel MSP δε μπορεί εύκολα να διαχωρίσει μεταξύ ενός όγκου με κλωνική (σε 100% των κυττάρων) μεθυλίωση και ενός όγκου με μεθυλίωση μόνο σε 1% των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η βιολογική σημασία των χαμηλών επιπέδων μεθυλίωσης δεν είναι ξεκάθαρη. Ο σχεδιασμός και η θέση των εκκινητών μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε μελέτες και η ετερογένεια στη μεθυλίωση μεμονωμένων CpG θέσεων ανάμεσα σε διαφορετικούς όγκους μπορεί να οδηγήσει στο MSP, το οποίο εξετάζει μόνο λίγες CpG θέσεις, λογαριάζοντας το δείγμα όγκου σαν μεθυλιωμένο ή μη μεθυλιωμένο, ανάλογα με το σε ποιές συγκεκριμένες θέσεις CpG κατευθύνονται οι εκκινητές (primers). Η ακρίβεια της MSP αντίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) την PCR και την θερμοκρασία, συνθήκες που μπορούν να διαφέρουν μεταξύ εργαστηρίων ¹⁶⁷. Τα παραπάνω θέτουν την ερώτηση πως θα πρέπει να μετράται. Η αυξανόμενη χρήση ποσοτικής RT-PCR για ανάλυση μεθυλίωσης παρέχει περισσότερες πληροφορίες από την συμβατική MSP αλλά πάραυτα δεν υπάρχει τυποποίηση (standardization) για αξιολόγηση αποτελεσμάτων.

Μια ποσοτική ανάγνωση αλληλουχίας παραμένει το gold standard ¹⁶⁷. Ούτε η άμεση αλληλούχιση μετά από επίδραση θειωδών ανιόντων που είναι ημιποσοτική παρέχει ανάγνωση μακράς αλληλουχίας, ούτε η άμεση πυροαλληλούχιση, η οποία είναι περισσότερο ποσοτική, αλλά δίνει βραχεία ανάγνωση είναι προς το παρόν κοντά στο στόχο.

Οι υπάρχουσες συστοιχίες μεθυλίωσης επίσης έχουν προβλήματα, ένα από τα οποία είναι ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό θέσεων CpG του υποκινητή ενός γονιδίου αντιπροσωπεύονται. Πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι μερικές μελέτες βασιζόμενες σε συστοιχίες δεν επικυρώνουν ανεξάρτητα τη μεθυλίωση με μια διαφορετική τεχνολογία. Ορισμένες δημοσιεύσεις που αφορούν μεθυλίωση γονιδίων δεν παρουσιάζουν επαρκείς πληροφορίες. Υπάρχει επίσης το ερώτημα : μόνο η μεθυλίωση με λειτουργική σημασία π.χ. στο όριο ή πάνω από αυτό (με επέκταση η /και θέση σε δεδομένο υποκινητή γονιδίου) για απώλεια έκφρασης θα βαθμολογηθεί; Αυτό ποικίλλει από το ένα γονίδιο στο άλλο. Επανέκφραση ενός μεθυλιωμένου γονιδίου μετά από χορήγηση απομεθυλιωτικού φαρμάκου στα καλλιεργούμενα κύτταρα είναι μόνο μια ένδειξη ότι η μεθυλίωση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι λειτουργικής σημασίας και είναι πιθανό ότι απομεθυλίωση ενός μεταγραφικού παράγοντα ή ενός ανοδικού (upstream) ρυθμιστικού γονιδίου έχει αποκαταστήσει την έκφραση. Ακόμα κι αν η μεθυλίωση ενός γονιδίου μπορεί να φανεί ότι έχει λειτουργική σημασία, αυτό δεν υπονοεί έναν αιτιολογικό ρόλο στην έναρξη ή πρόοδο του καρκίνου. Αν ένας φαινότυπος μεθυλίωσης CpG νησιδίων¹⁶⁸ καταδειχτεί ξεκάθαρα στο ΝΚΚ θα περιπλέξει την αναγνώριση ανάμεσα σε υπερμεθυλίωση οδηγών και συνοδών (ή ακολούθων) γονιδίων (driver και passenger gene) με τον ίδιο τρόπο που συνέβη με μικρές προσθήκες και απαισιόφες που αδρανοποιούν γονίδια σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια¹⁶⁹.

4.2.1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

Η ανώμαλη μεθυλίωση γονιδίων στον ουρογεννητικό καρκίνο έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς ανεξαρτήτως φύλου, ηλικίας, εθνότητας, ιστολογικού τύπου, βαθμού κακοήθειας και σταδίου της νόσου ¹⁶⁶. Παραδοσιακά ογκοκατασταλτικά γονίδια και μερικά πιθανά ογκοκατασταλτικά γονίδια βρέθηκαν να είναι μη μεθυλιωμένα σε φυσιολογικά νεφρικά κύτταρα, μολονότι η μεθυλίωση γονιδίων που σχετίζεται με την ηλικία είναι ένα θέμα προς διερεύνηση. ¹⁶⁶.

Η μεθυλίωση γονιδίων μπορεί να απορρυθμίσει κρίσιμα ενδοκυττάρια μονοπάτια και έτσι ενδεχόμενα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη νεφρική ογκογένεση.

Μεθυλίωση του DNA και ογκογένεση στο ΝΚΚ.

Η φυσική ιστορία του σποραδικού ΝΚΚ δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Το εύρημα της μεθυλίωσης σε όγκους νεφρού χαμηλότερου παθολογοανατομικού σταδίου (T1a) και

βαθμού κακοήθειας 1 υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση μπορεί να είναι ένα σχετικά πρώιμο γεγονός στην νεφρική ογκογένεση⁶³.

Είναι γνωστό ότι οι οικογενείς και σχεδόν 70% των σποραδικών περιπτώσεων δκNKK χαρακτηρίζονται από αλλαγές του γονιδίου VHL, σαν αποτέλεσμα σωματικών μεταλλάξεων, απώλειας ετεροζυγωτίας και υπερμεθυλίωσης του υποκινητή¹⁷⁰. Η απενεργοποίηση ενός γονιδίου με μεθυλίωση στον υποκινητή του επισυμβαίνει σε ~15% των περιπτώσεων σποραδικού δκNKK, ενώ ενδογενείς μεταλλάξεις είναι σπάνιες.

Συγκρίνοντας τα προφίλ μεθυλίωσης DNA (αναλύθηκαν 1505 CpGs) μεταξύ περιπτώσεων οικογενούς και σποραδικού φυσιολογικού τύπου (wildtype) VHL, αρκετοί τόποι στους οποίους συμπεριλαμβάνονται RASSF1, PITX2, CDH13, HS3ST2, TWIST1, TAL1, TUSC3 και DCC βρέθηκαν να είναι πιο συχνά μεθυλιωμένοι στο σποραδικό από ότι στο οικογενές δκNKK^{171,172}. Αυτό το εύρημα ίσως δείχνει ότι η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται στα μονοπάτια ογκογένεσης του σποραδικού δκNKK και δίνει μία πιθανή εξήγηση για τη χαμηλή αποτελεσματικότητα στη θεραπεία του καρκίνου, αν μπλοκάρονται μόνο τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια της αδρανοποίησης του VHL. Αρκετά γονίδια βρέθηκαν να είναι συχνά μεθυλιωμένα στο δκNKK (50% των περιπτώσεων) συμπεριλαμβανομένων : CDH1, APAF1, COL1A1, DKK2, DKK3, SFRP1, SFRP4, SFRP5, WIF, PCDH17 και TCF21 ενώ είναι σπάνια μεθυλιωμένα σε αντίστοιχους φυσιολογικούς νεφρικούς ιστούς (<10%)^{120,171,173}. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε διαφορετικά βήματα της ογκογένεσης όπως η μεταγωγή σήματος, απόπτωση, αγγειογένεση, κυτταρική προσκόλληση και διήθηση του όγκου..

Οι IGFBP1-3 είναι τα κύρια μέλη της οικογένειας των IGFBP (Insulin Growth Factor Binding Protein), που μπορούν να αναστείλουν την αυξητική δραστηριότητα των IGF1 και 2. Ο IGFBP3 είναι γνωστό ότι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη απομονώνοντας τον IGF1, ωστόσο ο μηχανισμός με τον οποίο ο IGFBP1 ασκεί τη δράση του είναι λιγότερο κατανοητός. Σε σχέση με τον πιθανό ρόλο αυτών των γονιδίων στον καρκίνο, οι IGFBP1 και IGFBP3 εμφάνισαν μεθυλίωση του υποκινητή τους στα κύτταρα του όγκου, αλλά όχι στα φυσιολογικά κύτταρα. Ξεκάθαρα βασιζόμενη στη μεθυλίωση, αποσιώπηση του IGFBP1 και IGFBP3 θα μπορούσε να παρέχει πλεονέκτημα ανάπτυξης στο νεοπλασματικό κύτταρο.⁶⁴

Το γονίδιο HOXA5 (Homeobox A5) αποτελεί μέρος των γονιδίων Homeobox και κωδικοποιεί έναν συνδεδεμένο με DNA μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει γονιδιακή έκφραση, μορφογένεση και διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη αυξάνει την έκφραση (upregulates) του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και η επιγενετική αποσιώπηση από μεθυλίωση μπορεί ως εκ τούτου, να παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση.⁶¹ μεθυλίωση του γονιδίου TIMP3 βρέθηκε να είναι παρόμοια στα νεφροκυτταρικά καρκινώματα όλων των βαθμών

κακοήθειας, υποδηλώνοντας ότι αυτή η επιγενετική αλλαγή ίσως επισυμβαίνει σε πρώιμα στάδια του καρκίνου. ¹⁴⁴

Οι Atshekzei και συν. ανακάλυψαν ότι η μεθυλίωση του SFRP1 συσσωρεύεται με την ηλικία σε νεφρικούς ιστούς που φαίνονται φυσιολογικοί και μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση. ⁸⁰.

Οι Xu B. και συν. βρήκαν ότι το γονίδιο ADAMTS18 είναι συχνά υπορρυθμισμένο μέσω υπερμεθυλίωσης σε κυτταρικές σειρές δκNKK και πρωτοπαθείς όγκους, δείχνοντας το σημαντικό ρόλο του σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο δκNKK. Η αγωγή με αζακυτιδίνη, ανέστρεψε την υπερμεθυλίωση του γονιδίου και αποκατέστησε την έκφρασή του. Υπερμεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 44 από 101 (43,6%) πρωτοπαθείς όγκους και σε 3 από 20 (15%) γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς. Συμπέραναν ότι το υπερμεθυλιωμένο αυτό γονίδιο μπορεί να εμπλέκεται στην ογκογένεση του δκNKK και μπορεί να είναι ένας βιοδείκτης για τη νόσο. ¹⁷⁴

Οι Du Z. και συν. βρήκαν ότι ο επιγενετικός τροποποιητής CHD5 (Chromodomain Helicase DNA binding) εκφράζεται στους περισσότερους ουρογεννητικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού αλλά συχνά υφίσταται αποσιώπηση ή αρνητική ρύθμιση με μεθυλίωση των CpG του υποκινητή σε 78% των κυτταρικών σειρών NKK και 44% (24/55) των πρωτοπαθών όγκων. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις του CHD5 φαίνονται να είναι σπάνιες σε NKK όγκους. Σε μεθυλιωμένες κυτταρικές σειρές NKK, η έκφραση CHD5 μπορούσε να αποκατασταθεί με θεραπεία απομεθυλίωσης με αζακυτιδίνη. Επιπλέον βρέθηκε ότι το CHD5 ως παράγοντας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ανέστειλε την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων ογκογονιδίων (MYC, MDM2, STAT3, CCND1, YAP1), γονιδίων ελέγχου επιγενετικής τροποποίησης, (Bmi-1, EZH2, JMJD2C) , όπως επίσης δεικτών Επιθηλιομεσεγχυματικής Μετατροπής και αρχέγονων κυττάρων (SNAT1, FN1, OCT4) συνιστώντας ογκοκατασταλτικό γονίδιο και συμμετέχοντας σε μοριακούς μηχανισμούς κατά την παθογένεση του NKK¹⁷⁵.

Οι Mahalingaiah και συν. ανακάλυψαν ανώμαλη έκφραση επιγενετικών ρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στην μεθυλίωση του DNA (DNMT1, DNMT3a, MBD4) στα HK-2 κύτταρα με κακοήγη μετατροπή από χρόνιο οξειδωτικό stress. Επιπρόσθετα, το μειωμένο ογκογενετικό δυναμικό των κυττάρων αυτών μετά από αγωγή με αζακυτιδίνη επιβεβαίωσε τον κρίσιμο ρόλο της υπερμεθυλίωσης του DNA στον επαγόμενο από οξειδωτικό stress κακοήγη μετασχηματισμό τους. ¹⁷⁶

Οι Li L. και συν. (2016) περιέγραψαν την επιγενετική αδρανοποίηση της DNA μεθυλτρανσφεράσης (DNMT) TET1 σαν αυτορρυθμιζόμενο βρόχο ανατροφοδότησης της μεθυλίωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα και του νεφροκυτταρικού καρκίνου. Αυτή η

απώλεια έκφρασης της TET1, μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή της, συμβαίνει συχνά σε καρκινικά κύτταρα και προάγει την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων κατά την παθογένεση του ΝΚΚ.¹⁷⁷

Οι Schelleckes K. και συν. συμπέραναν ότι η μεθυλίωση του υποκινητή είναι ένας κύριος μηχανισμός στη ρύθμιση της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου KIBRA στα πλαίσια του μονοπατιού HIPPO. Τα επίπεδα έκφρασης του KIBRA ελαττώνονται στο δκΝΚΚ και αλλαγές στην ισορροπία σύνδεσης μορίων του μονοπατιού HIPPO (π.χ. KIBRA/SP1) από μεθυλίωση του υποκινητή μπορεί να συμμετέχουν στην έναρξη ή και στην εξέλιξη του δκΝΚΚ¹⁷⁸.

Οι Avissar-Whiting και συν. έδειξαν ότι τα γονίδια PcG (Polycomb Group) ήταν σε σημαντικό βαθμό μεθυλιωμένα στο ΝΚΚ σε σχέση με το φυσιολογικό νεφρικό ιστό ενώ τόνισαν τον κεντρικό ρόλο του EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) σαν σύνδεσμο ανάμεσα στους δυο μηχανισμούς επιγενετικής καταστολής γονιδίων : τη μεθυλίωση του DNA και την αναδιαμόρφωση των ιστονών. Τα παραπάνω μοτίβα μεθυλίωσης , ίσως αντανakλούν σημαντικές και πρώιμες ειδικές μεταβολές των γονιδίων που σχηματοποιούν το επιγονιδίωμα του όγκου¹⁷⁹

Οι Ibragimova I. και συν. βρήκαν ότι ανώμαλη υπερμεθυλίωση του υποκινητή των PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A και άλλων γονιδίων τροποποίησης της χρωματίνης απουσιάζει ή είναι σπάνια στο δκΝΚΚ.¹⁸⁰

Οι Mitsui Y. και συν. βρήκαν ότι το BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) είναι ένας σημαντικός ογκοκαταστολέας που ρυθμίζεται αρνητικά από υπερμεθυλίωση υποκινητή στο ΝΚΚ. Επίσης ρυθμίζει θετικά την έκφραση p21^{WAF1/CIP1} και p27^{KIP1} και διαμεσολαβεί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω απόπτωσης στο ΝΚΚ. Ως εκ τούτου πιθανολογήθηκε ότι σχετίζεται με την παθογένεση της νόσου.^{181,182}

Μεθυλίωση του DNA και μετάσταση του ΝΚΚ.

Το COL1A1 (Collagen type 1 Alpha 1) είναι το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα α1 του κολλαγόνου τύπου 1 που είναι το κύριο συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του δέρματος και των οστών. Αλλαγές στη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου 1, σχετίζονται με φυσιολογική ανάπτυξη και διαδικασίες ιστικής αναδιαμόρφωσης. Αλλαγές στη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας εμπλέκονται στην ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου. Το COL1A1 έδειξε μεθυλίωση του υποκινητή στα καρκινικά κύτταρα αλλά ήταν μη μεθυλιωμένο στα φυσιολογικά κύτταρα.^{64,181}

Οι Saini και συν. ανακάλυψαν ότι το γονίδιο SFRP1 υπερεκφράζεται, και ότι ο υποκινητής του είναι μη μεθυλιωμένος/υπομεθυλιωμένος στο μεταστατικό ΝΚΚ, γεγονός

που ίσως συνδέονται με διηθητικότητα και μεταστατική συμπεριφορά. Το συμπέρασμα, σύμφωνα με τα στοιχεία τους, είναι ότι το SFRP1 έχει ένα ρόλο στο μεταστατικό δυναμικό του ΝΚΚ.^{79,80}

Οι Carter J. και συν. έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την τενσίνη 3 (TNS3, μια κυτταροσκελετική ρυθμιστική πρωτεΐνη, η οποία αναστέλλει την κυτταρική κινητικότητα) μπορεί να συμβάλει στη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων στο ΝΚΚ. Τα αποτελέσματά τους προτείνουν ένα επιγενετικό μηχανισμό για την ανώμαλη αρνητική ρύθμιση της TNS3, αναδεικνύοντας ένα διαφορετικό μοντέλο μεθυλίωσης στον υποκινητή της στο ΝΚΚ.¹⁸³

Οι Pan Y.J. και συν. ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-106-a5p ήταν μειωμένα σε σημαντικό βαθμό σε ιστούς ΝΚΚ σε σύγκριση με φυσιολογικούς γειτονικούς ιστούς, και τα επίπεδα του υπερμεθυλιωμένου γονιδίου miR-106-a5p σχετίζονταν με αυξημένη κυτταρική μετανάστευση, διήθηση και μετάσταση.¹⁸⁴

Οι Ibragimova και συν. ανέδειξαν γονίδια ανώμαλα υπερμεθυλιωμένα, τα οποία εμπλέκονται σε ενδοκυττάρια μονοπάτια, τα οποία συμμετέχουν στην επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή.¹⁸⁵

Ο ρόλος της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων miR-9 σε περιπτώσεις με μεταστατική νόσο αναλύθηκε με βάση πληροφορίες από την παρακολούθηση 59 ασθενών με δκΝΚΚ, από τους οποίους 21 ανέπτυξαν μεταστατική νόσο. Αυτοί οι 21 ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς υποτροπή.^{61,96}

4.2.1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Μεθυλίωση του DNA και μελλοντικός κίνδυνος-πρόληψη ΝΚΚ.

Οι Atschekzei και συν. (2012) αναφέρουν ότι η μεθυλίωση του γονιδίου SFRP1 συσσωρεύεται με την ηλικία σε νεφρικούς ιστούς που φαίνονται φυσιολογικοί και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του νεφρού⁸⁰.

Οι Karami S. και συν. βρήκαν ότι υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου LINE1 (Long Interspersed Nuclear Elements) στο DNA του αίματος που μετρήθηκαν *πρίν* από την διάγνωση ΝΚΚ σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο ΝΚΚ και μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη μελλοντικού κινδύνου για τη νόσο μεταξύ ανδρών καπνιστών¹⁸⁶.

Μεθυλίωση του DNA και λήψη δειγμάτων.

Οι Van Neste και συν. (2017) αναφέρουν ότι η ισχαιμία κατά τη διάρκεια της χειρουργικής αφαίρεσης του νεφροκυτταρικού όγκου, μπορεί να προκαλέσει επιγενετικές αλλαγές, οπότε η επίδραση των διαδικασιών λήψης δειγμάτων στις κλινικές μελέτες θα έπρεπε να λαμβάνεται υπόψη. Βρέθηκαν 6 γονίδια διαφορεικά μεθυλιωμένα στα δείγματα από τα οποία 4 συνδέονταν με ισχαιμία ή υποξία (REXO1L1, TLR4, hsa-miR-1299, ANKRD2) ¹⁸⁷.

Μεθυλίωση του DNA και μοριακή διάγνωση του ΝΚΚ.

Η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών και άλλων γονιδίων είναι μια αλλαγή πρώιμη και ειδική του καρκίνου. Η ευαίσθητη τεχνική MSP (Methylation Specific PCR) είναι ικανή να ανιχνεύσει ένα μεθυλιωμένο αλληλίο από ένα νεοπλασματικό κύτταρο σε ένα έδαφος αρκετών χιλιάδων αλληλίων μη μεθυλιωμένων σε φυσιολογικά κύτταρα.

Έχει πραγματοποιηθεί ένας αριθμός μελετών για τον προσδιορισμό διαγνωστικών βιοδεικτών σε υγρή βιοψία βάσει μεθυλίωσης ¹⁶⁶. Με τη χρήση συμβατικής MSP ένα πανομοιότυπο μοτίβο υπερμεθυλίωσης γονιδίων με αυτό στο ΝΚΚ, ανιχνεύτηκε σε 44 από 50 (88%) δείγματα DNA ούρων. Μεθυλίωση γονιδίων ανιχνεύτηκε σε προεγχειρητικό δείγμα ούρων από ασθενείς με ΝΚΚ περιορισμένο στο νεφρό (στάδιο I η II) συμπεριλαμβανομένων μικρών όγκων 2,2cm σε μέγεθος. Αντίθετα, η μεθυλίωση ήταν απύσχα από φυσιολογικό νεφρικό ιστό και ούρα που ελήφθησαν από φυσιολογικά και μη νεοπλασματικά δείγματα ελέγχου. Άλλοι ερευνητές επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα σε μεταγενέστερες μελέτες με ποσοτική RT-MSP σε DNA ούρων ασθενούς με ΝΚΚ¹⁶³.

Ένα εμπόδιο στην μεταφραστική εφαρμογή μεθυλίωσης γονιδίων για πρώιμη ανίχνευση είναι ότι η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων που αναγνωρίστηκαν μπορεί να είναι μεθυλιωμένα σε όλους τους τύπους ουρογεννητικού καρκίνου, όπως επίσης και σε καρκίνους άλλων οργάνων. Σχετικά λίγα γονίδια αναγνωρίστηκαν ότι έχουν μεθυλίωση ειδική του οργάνου ή του κυτταρικού τύπου που θα διευκόλυνε την διαφορική διαγνωστική. Η μεθυλίωση του VHL περιορίζεται στο δκΝΚΚ. Μεθυλίωση του TIMP3 είναι περισσότερο συνήθης στο ΝΚΚ από ότι σε άλλους τύπους όγκων, αν και δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ¹⁴⁴.

Μεθυλίωση του υποκινητή γονιδίων έχει βρεθεί στον ορό, περιφερικό αίμα και ούρα δείχνοντας την πιθανή αξία του μεθυλιωμένου DNA αίματος και υγρών του σώματος ως δείκτη στην πρώιμη μη επεμβατική ανίχνευση του δκΝΚΚ ¹⁸⁸. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της μεθυλίωσης του υποκινητή του RASSF1A (Ras Association domain family member-1) και VHL που ανιχνεύτηκαν στον ορό ασθενών με δκΝΚΚ ¹⁹⁹, όπως και αυτά του KILLIN (ένα νέο p53-ρυθμιζόμενο ογκοκατασταλτικό γονίδιο κοντά στο PTEN) και LINE-1 (Long

Interspersed Nuclear Elements) που ανιχνεύτηκαν στο περιφερικό αίμα^{92,190}, ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των ασθενών με καλοήθεις όγκους και ασθενών ομάδων ελέγχου, αντίστοιχα. Σίγουρα, η πρακτική σημασία των υποψήφιων δεικτών μεθυλίωσης, αξίζει επικύρωσης σε μεγάλες ανεξάρτητες μελέτες.

Οι Dimitriev A. και συν. έδειξαν ότι η μεθυλίωση γονιδίων στο χρωμόσωμα 3 (ειδικά στο βραχύ σκέλος 3p) είναι ένα συνηθισμένο γεγονός στο δκNKK, αναδεικνύοντας συχνή (20-92%) αρνητική ρύθμιση 6 γονιδίων με υψηλή συχνότητα μεθυλίωσης/απαλοιφής. Στοιχεία που αποκομίστηκαν επέτρεψαν τη σύσταση μιάς δοκιμής ανάλυσης 6 δεικτών για αναγνώριση δκNKK σε βιοψίες νεφρού με ακρίβεια 87%.¹⁹¹

Οι Xu B. και συν. ανακάλυψαν ότι το καθεστώς υπερμεθυλίωσης του γονιδίου ADAMTS18 μπορεί να θεωρηθεί ένας νέος βιοδείκτης για τη νόσο, όταν ανιχνεύεται σε δείγματα ορού και ούρων ασθενών με δκNKK.¹⁷⁴

Οι Pires-Luis A. και συν. βρήκαν ότι ένα panel γονιδίων που περιλαμβάνει μεθυλίωση του υποκινητή των OXR1 και MST1R επιτρέπει την ανίχνευση με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα των NKK και ειδικά του διαυγοκυτταρικού. Εκτός αυτού, υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή OXR1 σχετίζονται με τον πυρηνικό βαθμό κακοήθειας του δκNKK, που είναι στοιχείο επιθετικότητας του όγκου.¹⁹²

Οι Mitsui Y. και συν. έδειξαν ότι η ανώμαλη μεθυλίωση του BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) και η επακόλουθη απώλεια της έκφρασης BMP-2 μπορεί να είναι ένας χρήσιμος μοριακός δείκτης για το σχεδιασμό βελτιωμένων διαγνωστικών διαδικασιών για το NKK¹⁸¹.

Μεθυλίωση του DNA και ιστολογικοί υπότυποι NKK.

Τα γονίδια RASSF1 και SPINT2 ανευρίσκονται συχνότερα μεθυλιωμένα στο θηλώδες παρά στο δκNKK^{63,128,114,172,132} ενώ τα IGFBP1 και COL1A1 συχνότερα στο δκNKK¹⁹³. Η μεθυλίωση του CDH1 αναφέρθηκε σημαντικά υψηλότερη στο δκNKK σε σύγκριση με το χρωμόφοβο ή το ογκοκύτωμα.¹³²

Οι Ibragimova και συν. (2013) αναγνώρισαν «υπογραφές» υπερμεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων, που διακρίνουν το διαυγοκυτταρικό και το θηλώδη ιστολογικό τύπο μεταξύ τους καθώς και καθέναν από αυτούς από το χρωμόφοβο καρκίνωμα και το (καλόηθες) ογκοκύτωμα. Επίσης, αναδείχθηκαν γονίδια ανώμαλα υπερμεθυλιωμένα σε ένα ιστολογικό τύπο και συχνά μη μεθυλιωμένα σε άλλους τύπους και σε φυσιολογικό ιστό¹⁸⁵.

Οι Dimitriev A. και συν. σε μελέτη τους, αποκόμισαν στοιχεία τα οποία επέτρεψαν τη σύσταση μιάς ομάδας από 6 δείκτες μεθυλίωσης για ανίχνευση δκNKK σε βιοψίες νεφρού με ακρίβεια 87%.¹⁹¹

Οι Chopra και συν. βρήκαν ότι διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης DNA υπάρχουν, όχι μόνο μεταξύ καλοήθων και κακοήθων ιστών, αλλά επίσης ανάμεσα σε ιστολογικούς υπότυπους και υπέθεσαν ότι ειδική του καρκίνου μεθυλίωση DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης ειδικός του υπότυπου. Αυτό το μοντέλο ταξινόμησης της DNA μεθυλίωσης μπορεί να επιτρέψει βελτιωμένη κλινική αντιμετώπιση των ασθενών με ΝΚΚ, κατά την οποία μη απαραίτητες χειρουργικές διαδικασίες θα μπορούσαν να ελαχιστοποιηθούν για ασθενείς με καλοήθεις αλλοιώσεις, ελαττώνοντας την θνησιμότητα/ θνητότητα που σχετίζεται με τον ασθενή ¹⁹⁴.

Μεθυλίωση του DNA και πρόγνωση του ΝΚΚ.

Η ανάλυση μεθυλίωσης σε επίπεδο γονιδιώματος είναι ένα ισχυρό εργαλείο για αναγνώριση πολυγονιδιακών προφίλ, που αντανακλούν τη συμπεριφορά του όγκου.

Αυτή η μελέτη αποκάλυψε δκΝΚΚ με φαινότυπο μεθυλίωσης CpGI στα γονίδια FAM150A, GRM6, ZNF540, ZFP42, ZNF154, RIM54, PCDHAC1, KHDRB52, ASCL2, KCNQ1, PRAC, WNT3A, TRH, FAM78A, ZNF671, SLC13A5, NKX6-2, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από πιο επιθετικούς όγκους και φτωχότερα θεραπευτικά αποτελέσματα ¹⁹⁵ (χειρότερη έκβαση). Υψηλή ανάλυση μεθυλιώματος του ΝΚΚ έδειξε ότι μόνο μεθυλίωση των υποκινητών ήταν ισχυρά προγνωστική, ακόμα και σε πολυπαραγοντική ανάλυση ^{30,182}.

Η συσχέτιση του status μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων με τη βιολογία του όγκου, μπορεί να διευκολύνει ταξινόμηση αναφορικά με την ανταπόκριση στην στοχευμένη θεραπεία και την έκβαση της νόσου. Για παράδειγμα το γονίδιο της γ-κατενίνης έχει συσχετιστεί με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με ΝΚΚ ^{64,116}.

Ο ρόλος της κατάστασης μεθυλίωσης των miR-9 γονιδίων σε ασθενείς με μεταστάσεις αναλύθηκε με βάση πληροφορίες από την παρακολούθηση 59 ασθενών με δκΝΚΚ από τους οποίους 21 ανέπτυξαν μεταστατική νόσο. Υπήρχε σημαντική μείωση στο χρόνο επιβίωσης ελεύθερο υποτροπής για ασθενείς με υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης miR-9-1 και miR-9-3 ($p=0.034$ και $p=0.007$ αντίστοιχα). ^{61,96}

Μια άλλη μελέτη προσδιόρισε τη σχέση μεταξύ επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου RASSF1A και πρόγνωσης σε 179 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική ή μερική νεφρεκτομή για δκΝΚΚ. Το επίπεδο της μεθυλίωσης του RASSF1A υποκινητή βρέθηκε να είναι υψηλότερο σε ασθενείς με στάδιο III ή IV ΝΚΚ συγκριτικά με ασθενείς σταδίου I ή II ($p=0.043$). Υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σχετίζονται ανεξάρτητα με πτωχή πρόγνωση κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) ($p=0.0053$) ¹³¹.

Μια μελέτη του ρόλου της μεθυλίωσης των CpG νησιδίων του HIC1 στο ΝΚΚ με τη χρήση μετατροπής διθειώδους (bisulfite conversion) και πυροαλληλούχισης

(pyrosequencing) σε 98 δείγματα όγκου και 70 δείγματα φυσιολογικού νεφρικού ιστού, αναγνώρισε υπερμεθυλίωση του HIC1 σε όγκους ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ελαττωμένου διαστήματος επιβίωσης ελεύθερου υποτροπής (RFS recurrence free survival) ¹²³.

Οι Awakura και συν. επίσης βρήκαν ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου TU3A σχετίζεται σημαντικά με προχωρημένο στάδιο νόσου και πτωχή ειδική της νόσου επιβίωση (Disease Specific Survival, DSS). ¹⁴⁵

Οι Atshkekzei και συν. βρήκαν ότι τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του SFRP1 σε NKK, μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για παρατεταμένη επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (Recurrence Free Survival). ⁸⁰

Οι Fisel P. και συν. ανέδειξαν τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου SLC16A3 σαν επιγενετικό μηχανισμό για τη ρύθμιση του MCT4 (Monocarboxylate Transporter 4) στο δκNKK και την συσχέτισή της με μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης. ¹⁹⁶

Οι Deckers I. και συν. έδειξαν ότι οι ασθενείς με δκNKK που έχουν μεθυλίωση του υποκινητή του CDO1 έχουν σημαντικά πτωχότερη επιβίωση σε σχέση με τους υπόλοιπους. Οι διαφορές στην επιβίωση ήταν ανεξάρτητες από άλλους προγνωστικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων ηλικίας, φύλου, σταδίου TNM, μεγέθους όγκου και βαθμού κακοηθείας¹⁹⁷.

Ο Macrophage Stimulating 1 Receptor (MST1R) είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης της οικογένειας των C-MET πρωτο-ογκογονιδίων (επίσης γνωστός και ως RON). Οι Pires-Luis A.S. και συν. βρήκαν ότι σε μια σειρά 120 νεφροκυτταρικών όγκων συμπεριλαμβανομένων των 4 κύριων υποτύπων, (διαυγοκυτταρικό, θηλώδες, χρωμόφοβο και ογκοκύτωμα), τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής και σχετίζονταν με τα επίπεδα του ολικού MST1R (MST1R_{total}) σε πρωτοπαθείς όγκους και κυτταρικές σειρές NKK. Μετά από αγωγή απομεθυλίωσης, ο λόγος MST1R_{long}/MST1R_{total} αυξήθηκε, όπως αναμενόταν σε κυτταρικές σειρές NKK που εξετάστηκαν. Ωστόσο, σε πρωτοπαθείς όγκους με υπερμεθυλίωση πέρα από τη θέση έναρξης της μεταγραφής, μείωση του λόγου MST1R_{long}/MST1R_{total} δεν ανιχνεύτηκε, μολονότι NKK με υπερμεθυλίωση MST1R_{up} έδειξε σημαντικά υψηλότερη έκφραση NFκB, δείχνοντας ότι η μεθυλίωση του υποδοχέα δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός ρύθμισης έκφρασης του MST1R. Επιπρόσθετα, η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι ο λόγος MST1R_{long}/MST1R_{total} σχετιζόταν ανεξάρτητα με βραχύτερη ειδική της νόσου επιβίωση (Disease Specific Survival) και ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease Free Survival), ενώ η έκφραση MST1R_{total} σχετιζόταν με βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease Free Survival) ¹⁹⁸.

Οι Van Vloderp και συν. αναγνώρισαν 4 δείκτες μεθυλίωσης συνδυασμένους σε ένα panel, που αποτελείται από τα GREM1, NEUR1, LAD1 και NEFH, οι οποίοι σχετίστηκαν με φτωχότερη επιβίωση σε δύο ανεξάρτητες σειρές ασθενών, ευρήματα που επιβεβαιώθηκαν σε μια τρίτη σειρά δκNKK περιπτώσεων από το Cancer Genome Atlas ¹⁹⁹.

Οι Zhang J. και συν. συμπέραναν ότι η επιγενετική αποσιώπηση με μεθυλίωση CpG νησιδίων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση (όπως FLT4, FLT1, KDR) είναι βασικό χαρακτηριστικό επιθετικού δκNKK ²⁰⁰.

Οι Joosten S. και συν. αναγνώρισαν την μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων BNC1, SCUBE3, GATA5, SFRP1, GREM1, RASSF1A, PCDH8, LAD1 και NEFH ως υποσχόμενους προγνωστικούς βιοδείκτες, που όμως απαιτούν περαιτέρω αξιολόγηση και εκτίμηση πριν από την χρήση τους στην κλινική πράξη ²⁰¹.

Οι Yamada και συν. βρήκαν ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου DAL.1 / 4.1B είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μεταστατική νόσο σε ασθενείς με δκNKK. ¹¹²

Οι Yi Miao και συν. σε μελέτη τους βρήκαν ότι υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης DNA στο Hugi-2 ελάττωσαν την έκφραση Hugi-2 mRNA, προήγαγαν την διήθηση και μετάσταση και αποτελούσαν δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών με δκNKK. ²⁰²

Οι Ricketts και συν. αναγνώρισαν μια υποομάδα χρNKK με μεταβολική απόκλιση που εμφάνισε ένα ιδιαίτερο μοτίβο μεταβολικής έκφρασης και σχετίζεται με εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση. ²⁰³

Οι Peng και συν. αναγνώρισαν μια σειρά διαφορετικά εκφρασμένων και μεθυλιωμένων γονιδίων (FGCR1A, F2, NOD2). Σύμφωνα με ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meyer, το σύστημα βαθμολόγησης κινδύνου, που βασίστηκε στην προγνωστική αυτή υπογραφή μπορούσε να διαστρωματώσει τους ασθενείς σε ομάδες υψηλού και χαμηλού κινδύνου, με σημαντικά διαφορετική συνολική επιβίωση. Επιπλέον, η υπογραφή μεθυλίωσης των τριών αυτών γονιδίων φάνηκε ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στο δκNKK. Σχεδιάστηκε ένα νομόγραμμα που συνδυάζει την προγνωστική υπογραφή και μερικές ανεξάρτητες μεταβλητές και αποδείχθηκε ότι προβλέπει ικανοποιητικά την επιβίωση στο δκNKK. ²⁰⁴

Μεθυλίωση του DNA και θεραπεία του NKK.

Σημαντικός αριθμός γονιδίων και ενδοκυττάρων μονοπατιών που σχετίζονται με το δκNKK απορρυθμίζονται εξαιτίας της υπερμεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων. Απομεθυλιωτικοί παράγοντες ή αναστολείς DNMT (π.χ. decitabine ή αζακυτιδίνη) έδειξαν

να μειώνουν τη μεθυλίωση συμπεριλαμβανομένων των υποκινητών⁵⁴, προτείνοντας ότι η αναστροφή της ανώμαλης μεθυλίωσης υποκινητών, μπορεί να είναι μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική. Αγωγές με αναστολείς μεθυλίωσης DNA έχουν δείξει αποτελέσματα σε αιματολογικές νεοπλασίες όπως οξεία μυελογενής λευχαιμία και χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία²⁰⁵. Παρομοίως, αγωγή με αζακυτιδίνη έχει καταστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις 15 κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν σε άλλη μελέτη²⁰⁶. Η αζακυτιδίνη, ένα άλλο φάρμακο σε κλινικές μελέτες συνχορηγείται με interferon- α 2b ή bevacizumab ενώ το MG-98 εκτιμάται σε κλινική μελέτη φάσης II σαν μονοθεραπεία για το ΝΚΚ.^{33,207} Επιπλέον η decitabine έδειξε να αναστέλλει την ανάπτυξη μιας ανθρώπινης μεταστατικής ΝΚΚ κυτταρικής σειράς σε ένα μοντέλο ξενομοσχεύματος αποκαθιστώντας τη γονιδιακή έκφραση της Cx 32 (connexin 32)^{33,208}. Παρά τις πιθανά ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις, δεν υπάρχει μεγάλης κλίμακας μελέτη για αγωγή του ΝΚΚ με αναστολείς μεθυλίωσης DNA.²⁰⁸

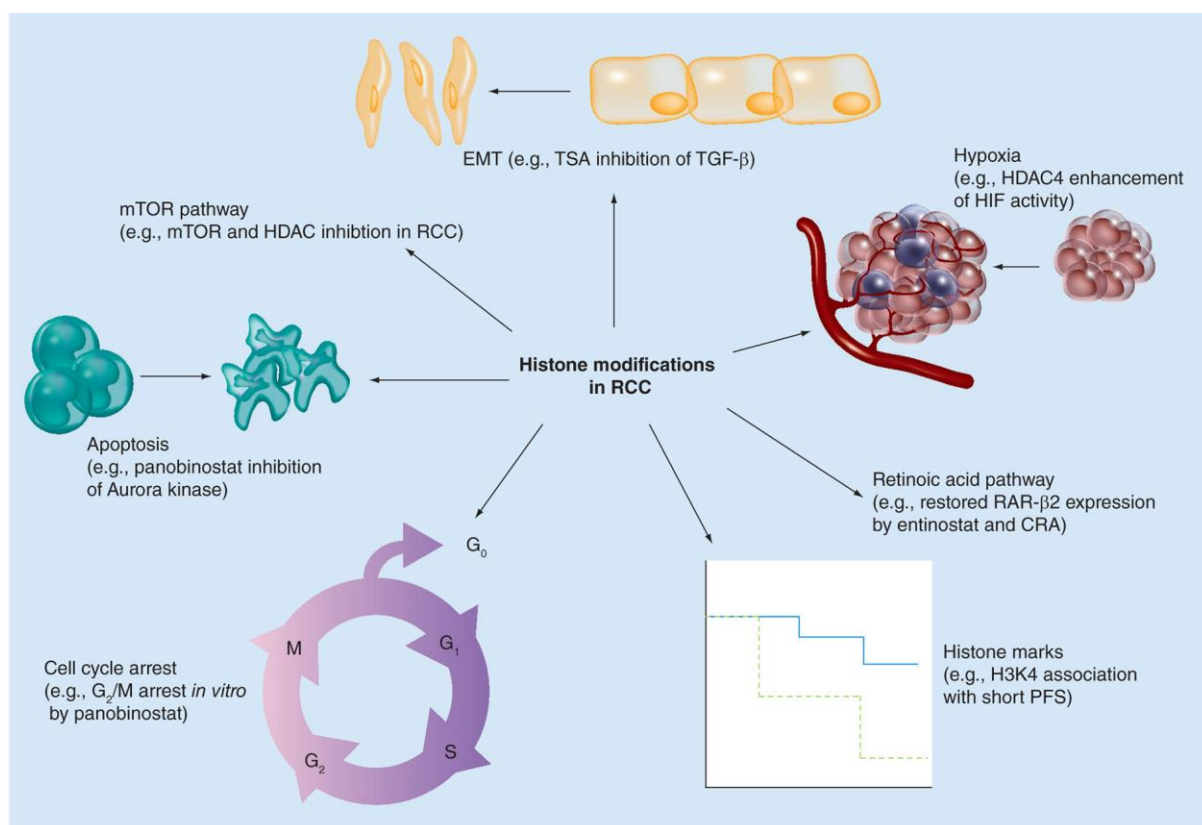
Το δινουκλεοτίδιο του decitabine, guanecitabine, επιδεικνύει βελτιωμένη ικανότητα απορρόφησης (absorption capacity) για το DNA των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα. Και τα δύο φάρμακα είναι σε κλινική μελέτη για την δράση τους εναντίον του ΝΚΚ.^{33,209}

Ως σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για δείκτες μεθυλίωσης DNA και πρόβλεψη χημειοθεραπευτικής ανταπόκρισης σε ασθενείς με ΝΚΚ, παρότι αρκετά, σε διαφορετικό βαθμό μεθυλιωμένα, γονίδια προτάθηκαν σαν πιθανοί δείκτες ανταπόκρισης σε φάρμακα στον ανθρώπινο καρκίνο²¹⁰. «Επιγενετική θεραπεία» με αναστολείς DNA μεθυλοτρανσφερασών και αποκατάσταση δραστηριότητας αποσιωπηθέντων γονιδίων με αποτέλεσμα ενίσχυση της απόπτωσης και ελαττωμένη ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, έχει γίνει μια υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για δκΝΚΚ. Αυτή η νέα στρατηγική μπορεί να επαναπρογραμματίσει τα προφίλ έκφρασης γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, κάνοντας με αυτό τον τρόπο το δκΝΚΚ ευαίσθητο στην καθιερωμένη θεραπεία^{30,211}.

Οι Zhu και συνεργάτες βρήκαν ότι ο συνδυασμός decitabine (αναστολέα DNA μεθυλίωσης) και vorinostat (αναστολέα απακετυλάσης ιστονών) αύξησε σημαντικά την έκφραση OCT2 (Organic Cation Transporter 2) σε κυτταρικές σειρές ΝΚΚ, με ευαισθητοποίηση αυτών των κυττάρων στην οξαλιπλάτινα. Πρότειναν δε ότι ο συνδυασμός αντικαρκινικών παραγόντων και επιγενετικών φαρμάκων μπορεί να παρέχει νέα χημειοθεραπευτικά σχήματα.²¹²

4.2.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών ανευρίσκονται απορρυθμισμένα στο ΝΚΚ με αποτέλεσμα μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο μέσω των διαφόρων σημείων ελέγχου ή και μονοπατιών που συμμετέχουν στην απόπτωση, διεργασίες που είναι πιθανό ότι συμμετέχουν στην ογκογένεση, αλλά και στην εξέλιξη και μετάσταση της νόσου, σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες, όπως το χρόνιο οξειδωτικό stress των κυττάρων. (Εικόνα 40)



Εικόνα 40 : Μονοπάτια στο νεφροκυτταρικό καρκίνο τα οποία επηρεάζονται από αλλαγές σε μοριακές σημάνσεις ιστονών, τροποποιήσεις ιστονών ή τους αναστολείς τους συμπεριλαμβανομένων του μονοπατιού mTOR, του ρετινοϊκού οξέος, της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής, του κυτταρικού κύκλου και της υποξίας. Οι επιδράσεις και η σημασία τους επεξηγούνται λεπτομερώς στο κείμενο. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ: CRA: *Cis*-retinoic acid; EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition; PFS: Progression-free survival; RCC: Renal cell carcinoma; TSA: Trichostatin A. Από : Swathi Ramakrishnan, Leigh Ellis and Roberto Pili¹. Histone modifications: implications in renal cell carcinoma. *Epigenomics*. 2013 August ; 5(4).

4.2.2.1. ENZYMA ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΤΟΥ ΝΚΚ.

Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στο ΝΚΚ.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης/ακετυλίωσης ιστονών και τα ένζυμα-τροποποιητές παίζουν αρκετούς σημαντικούς ρόλους στην μεταγραφή και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) είναι βασικές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, μέσω των δράσεων στις μη ιστονικές πρωτεΐνες όπως pRb και p53^{213,214}. Αγωγή των κυτταρικών σειρών 786-O (in vitro και in vivo) με τον τάξης 1 και 2 αναστολέα (HDACi) panobinostat είχε σαν αποτέλεσμα διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο G2/M και απόπτωση, έμμεσα, μέσω κατανάλωσης των κινασών Aurora A και B²¹⁵. Επιπρόσθετα η προσθήκη αυτή ενίσχυσε την αποπτωτική δραστηριότητα του Ad5-TRAIL στα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων νεφρικών σωληναρίων²¹⁶. Οι αναστολείς απακετυλασών ιστονών (HDACis) σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της rapamycin (αναστολέα mTORC1), έχουν δείξει επίσης να ενισχύουν την ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη όγκων σε ξενομοσχεύματα (xenografts) ΝΚΚ²¹⁷. Ωστόσο, ενώ εμφανίζουν έντονη αντικαρκινική δράση έναντι συγκεκριμένων νεφρικών κυτταρικών σειρών in vitro και μοντέλων ξενομοσχεύματος όγκου (xenografts tumor models) in vivo, οι αναστολείς δεν επιδεικνύουν παρόμοια επίπεδα τοξικότητας ή δραστηριότητας σε διάφορες κυτταρικές σειρές νεφρού²¹⁸. Για παράδειγμα, η θεραπεία με romidepsin επήγαγε διαφορετικά επίπεδα ακετυλίωσης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές νεφρού, δείχνοντας ότι η δραστηριότητα των αναστολέων αποακετυλασών ιστονών (HDACs) διαφέρει ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον²¹⁹.

Αρκετές μεμονωμένες μελέτες έχουν πρόσφατα αναφέρει το SETD2 που κωδικοποιεί μια μεθυλτρανσφεράση (HMT), σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο ΝΚΚ^{220,221}. Μια αρχική μελέτη που αποτελείτο από μιας μεγάλης κλίμακας Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (NGS) γονιδιωμάτων πρωτοπαθών ΝΚΚ αναγνώρισε σωματικές μεταλλάξεις που έχουν σαν αποτέλεσμα ελάττωση του μήκους της παραγόμενης πρωτεΐνης (truncating mutations) στο SETD2 (~3%). Οι μεταλλάξεις SETD2 σχετίζονταν με μια μείωση στη μεθυλίωση H3K36, VHL μεταλλάξεις και/η υποξικό φαινότυπο²²⁰ όπως επίσης μείωση στην πρωτεΐνη του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (Chromatin Remodeling Complex protein) PBRM1 σε κλινικές μελέτες²³⁰. Είναι επίσης σημαντικό να σημειώσουμε ότι το SETD2 εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του ανθρώπινου χρωμοσώματος 3(3p21.31) κοντά στο

γονίδιο VHL και η 3p περιοχή συχνά υφίσταται αλλαγές στα δκNKK²²². Μεταλλάξεις σε ένζυμα που ελέγχουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης συχνά ανευρίσκονται στην προχωρημένου σταδίου νόσο, ωστόσο αυτές οι μεταλλάξεις δεν σχετίζονται με την επιβίωση²²³. Η H3K27 μεθυλτρανσφεράση Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) (η οποία σχετίστηκε με επιθετικότητα στον καρκίνο του μαστού και υπερεκφράζεται στο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη), υπερεκφράζεται σε δείγματα νεφρικού καρκίνου ασθενών, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους γειτονικούς μη νεοπλασματικούς ιστούς^{224,225}. Αποσιώπηση του EZH2 επηρεάζει την βιωσιμότητα των νεφρικών κυττάρων *in vitro* καθώς και τη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και το διάστημα επιβίωσης ελεύθερο υποτροπής (Recurrence Free Survival, RFS)²²⁶. Αντίθετα, οι απομεθυλάσες (HDMTs) που ελέγχουν το status μεθυλίωσης των H3K27, UTX και JMJD3 υπερεκφράζονται στο δκNKK σε σύγκριση με το γειτονικό μη καρκινικό ιστό²²⁷.

Οι Porter EG και συν. βρήκαν ότι 4 από τους βρωμοτομείς (bromodomains, BD) των τροποποιητών της χρωματίνης δρουν μαζί με στόχο το PBRM1 στις θέσεις – στόχους της. Όταν ένας μόνο βρωμοτομέας μεταλλάσσεται, το PBRM1 δεν ελέγχει πια κανονικά την έκφραση του γονιδίου, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ακετυλίωση στη λυσίνη 14 της ιστόνης 3 (H3K14Ac) για τη σύνδεση της PBRM1 μέσω της BD2 (Bromodomain-2)²²⁸.

Ωστόσο η φωσφορυλίωση της H3 σχετίζεται με συμπύκνωση και διαχωρισμό χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης²²⁹. Επιπρόσθετα, πρώιμη συμπύκνωση της χρωματίνης προλαμβάνεται με μια ελάττωση στην H3 φωσφορυλίωση και όχι στην H1 φωσφορυλίωση²³⁰. Στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου νεφρικού σωληναρίου η 2,3,5, tris(glutathione-S-yl)hydro-quinone επάγει φωσφορυλίωση του H3 με σηματοδότηση μέσω Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species), τα οποία προκαλούν πρώιμη συμπύκνωση χρωματίνης και τελικά κυτταρικό θάνατο^{34,231}.

Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και ρύθμιση της υποξίας στο NKK.

Ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων του αυξανόμενου όγκου είναι η ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ή σε υποξία. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στις ισομορφές HIF και τα ένζυμα τροποποίησης ιστονών.

Ο Qian και συν. (2006) έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ HDAC4 και HIF1α προστατεύει τον HIF1α από την αποδόμηση, αυξάνει την ακετυλίωση του HIF1α και ελαττώνει με αυτό τον τρόπο τη σταθερότητά του στις κυτταρικές σειρές NKK²³². Ενώ ο HIF1α έχει δείξει ότι αλληλεπιδρά με αποακετυλάσες ιστονών (HDACs), άλλες

μεθυλτρανσφεράσες (HMTs), όπως το JMJD1A, επάγονται επιγενετικά από τον HIF2α κάτω από συνθήκες υποξίας σε διάφορες NKK κυτταρικές σειρές²³³⁻²³⁵. Η JARID1C είναι μία ακόμη απομεθυλάση (HDMT) με στόχευση HIF και πιστεύεται ότι είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο σε VHL null όγκους²³⁶. Αυτό μαζί με τη σταθερή υπερέκφραση του JMJD1A στο NKK όπως συγκρίνεται με φυσιολογικό ιστό²³⁴⁻²³⁵, υποδεικνύει ότι τα τροποποιητικά ένζυμα των ιστονών είναι σημαντικά, ειδικά στα NKK με VHL μεταλλάξεις ή απαλοιφές. Επίσης, σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι αρκετές απομεθυλάσες ιστονών (KDM3A, KDM5C, KDM6B, KDM4B, KDM3B) επάγονται σε συνθήκες υποξίας και μέσω οδών αγγειογένεσης μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη NKK.²³⁷

Τροποποίηση ιστονών και παθογένεση NKK.

Η ακετυλτρανσφεράση ιστονών hMOF ανήκει στην οικογένεια MYST (Moz-Ybf2/Sas3-Sas2-Tip60) και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την ακετυλίωση της ιστόνης H4 στη λυσίνη 16 στα ανθρώπινα κύτταρα. Οι Wang και συν. (2013) έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MYST1 (γνωστό και σαν hMOF) είναι ελαττωμένα στο 90.5% των ασθενών με NKK. Η ελάττωση της πρωτεΐνης hMOF τόσο στους καρκινικούς ιστούς όσο και στις κυτταρικές σειρές NKK σχετίζεται στενά με την ακετυλίωση της ιστόνης H4K16. Επιπρόσθετα, υπερέκφραση της καρβονικής ανυδράσης 9 (CA9) ανιχνεύθηκε σε 100% των ασθενών με δκNKK. Άρα η hMOF και οι τροποποιήσεις της ίσως συνιστούν ένα νέο και ανεξάρτητο της CA9 βιοδείκτη διάγνωσης του NKK, που ίσως εμπλέκεται και στην παθογένεσή του²³⁸.

Οι Ferreira και συν. (2017) ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα έκφρασης SETD2 και RIOX2 (μεθυλτρανσφεράση και απομεθυλάση ιστονών αντίστοιχα) ήταν σημαντικά διαφορετικά σε νεφροκυτταρικούς όγκους, γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου²³⁹.

Οι Mahalingaiah και συν. (2017) ανακάλυψαν ανώμαλη έκφραση επιγενετικών ρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στις τροποποιήσεις των ιστονών (HDAC1, HMT1, HAT1) στα HK2 κύτταρα με κακοήγη μετατροπή από χρόνιο οξειδωτικό stress¹⁷⁶.

Ένζυμα τροποποιητικά ιστονών και επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή στο NKK.

Η Επιθηλιομεσεγχυματική Μετατροπή (EMT) πιστεύεται ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη νεφρική ίνωση²⁴⁰. Η θεραπεία με TGFβ (τον πρωταρχικό επαγωγέα EMT στο νεφρό και άλλα όργανα) και ενός αναστολέα αποακετυλασών (HDACi) όπως η trichostatin A, αύξησε τη ακετυλίωση αποτρέποντας την EMT στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς

εσπειραμένου νεφρικού σωληναρίου ²⁴⁰. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστολή των απακετυλασών ιστονών καταστέλλει την επαγόμενη από TGF-β EMT δείχνοντας έτσι έναν πιθανό ρόλο των αναστολέων (HDACis) στην αναστροφή της EMT.

Τροποποιήσεις ιστονών και εξέλιξη-μετάσταση στο ΝΚΚ.

Οι Arseneault και συν. (2017) βρήκαν ότι μεταξύ των γονιδίων που είναι συνδεδεμένα με το Υ χρωμόσωμα, τα οποία ήταν αρνητικά ρυθμισμένα εξαιτίας απώλειας του Υ, οι επιγενετικοί τροποποιητές (HDMs) KDM5D και KDM6C έχουν λειτουργικά παρόμοια ομόλογα συνδεδεμένα με το Χ των οποίων η έλλειψη συνδέεται με την πρόοδο του δκΝΚΚ ²⁴¹.

Οι Ferreira και συν. σε μελέτη τους (2017) συμπέραναν ότι SETDB2 και RIOX2 (HMT και HDM αντίστοιχα) ίσως εμπλέκονται στη νεφρική ογκογένεση και στην εξέλιξη της νόσου, ειδικά στην μεταστατική διασπορά. Υψηλότερα επίπεδα μεταγράφων RIOX2 μπορούν να αναγνωρίσουν περιπτώσεις δκΝΚΚ με μικρότερο μεταστατικό δυναμικό ²³⁹.

Οι Cao L. και συν. συσχέτισαν την έκφραση της ακετυλτρανσφεράσης (HAT) hMOF με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ΝΚΚ και επιβεβαίωσαν προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες βρέθηκε αρνητική ρύθμιση του hMOF σε ασθενείς με ΝΚΚ, με αποτέλεσμα ελαττωμένη hMOF πρωτεΐνη, εύρημα που σχετίστηκε στενά με ακετυλίωση H4K16. Σημειώνεται ότι σημαντική ελάττωση της hMOF βρέθηκε μόνο σε άνδρες. Επιπρόσθετα, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ χαμηλής έκφρασης hMOF και δκΝΚΚ ($p < 0,05$) ή σε όγκους σταδίου T1 ($P < 0,05$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με το βαθμό κακοήθειας. Ο μοριακός μηχανισμός που συνδέεται με την απώλεια έκφρασης της hMOF, ίσως εμπλέκεται στην εξέλιξη του νεφροκυτταρικού καρκίνου. ²⁴².

4.2.2.2. ENZYMA ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΝΚΚ.

Τροποποιήσεις ιστονών και κίνδυνος ανάπτυξης – πρόληψη ΝΚΚ.

Οι Yu Q. και συν. ανακάλυψαν μια σημαντική μείωση του SLC47A2 (Solute Carrier Family 47 member 2) σε δείγματα ΝΚΚ, συγκριτικά με τους αντίστοιχους παρακείμενους μη καρκινικούς ιστούς σε ασθενείς με χαμηλό TNM στάδιο. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από τον συνδυασμό τροποποιήσεων ιστονών H3K4me3, H3K27me3 και H3K27Ac. Η συνδυασμένη δράση των δύο πρώτων κατέστειλε την έκφραση του SLC47A2 προτείνοντας μοτίβο ρύθμισης διδύναμου γονιδίου (bivalent gene). Η αποακετυλάση HDAC10 μπορεί να αποτρέψει τον εμπλουτισμό H3K4me3 στον υποκινητή SLC47A2 παρέχοντας μια σύνδεση

μεταξύ αποακετυλίωσης και μεθυλίωσης. Φαίνεται ότι ασθενείς με μεταγραφική καταστολή του SLC47A2 εμφανίζουν προδιάθεση για ΝΚΚ. ²⁴³.

Τροποποίηση ιστονών και διάγνωση - ιστολογικοί υπότυποι ΝΚΚ.

Οι Pires-Luis A.S. και συν. βρήκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των HMTs (μεθυλοτρανσφερασών) SMYD2, SETD3 και της HDM (απομεθυλάσης) NO66 σε νεφροκυτταρικούς όγκους σε σύγκριση με φυσιολογικούς νεφρικούς ιστούς και σε χρωμόφοβα νεφροκυτταρικά καρκινώματα συγκριτικά με ογκοκυτώματα ²⁴⁴.

Η ακετυλτρανσφεράση ιστονών hMOF και οι τροποποιήσεις της ίσως συνιστούν ένα νέο βιοδείκτη διάγνωσης του ΝΚΚ, που εμπλέκεται πιθανώς και στην παθογένεσή του, σύμφωνα με τη μελέτη των Wang και συν., όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. ²³⁸.

Τροποποιήσεις ιστονών και πρόγνωση στο ΝΚΚ.

Οι τροποποιήσεις ιστονών έχει καταδειχτεί ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Επιπρόσθετα, αρκετές τροποποιήσεις ιστονών (θα αναφερθούν παρακάτω) είναι ενδεικτικές του βαθμού κακοήθειας, ανάπτυξης του όγκου ή κλινικής έκβασης.

Οι Ellinger και συν. ανέφεραν συσχέτιση των χαμηλότερων επιπέδων ολικής H3K4 μεθυλίωσης σε 193 ΝΚΚ δείγματα με πτωχή πρόγνωση και βραχύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (Progression Free Survival). Το επιθετικό θηλώδες τύπου 2 ΝΚΚ είχε ένα χαμηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης H3K4 σε σύγκριση με θηλώδες τύπου 1 ²⁴⁵. Σύμφωνα με τα ίδια στοιχεία βρέθηκε ότι χαμηλό ολικό H3K9 και H4K20 ποσοστό μεθυλίωσης σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο και βαθμό κακοήθειας όγκου. Επιπρόσθετα, χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης H3K9Me1 σχετίστηκαν με βραχύτερο διάστημα επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (PFS, Progression Free Survival), όπως επίσης και χειρότερη ειδική του καρκίνου επιβίωση (Cancer Specific Survival). ²⁴⁶

Σε μία διαφορετική ομάδα δειγμάτων, η ακετυλίωση H3K18Ac και η μεθυλίωση H3K4Me βρέθηκαν να είναι σημαντικοί δείκτες υποτροπής σε ασθενείς με εντοπισμένη νόσο και ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για την πρόοδο του ΝΚΚ για όλους τους ασθενείς αντίστοιχα ²⁴⁷. Ολικά επίπεδα ακετυλιωμένης ιστόνης H3, είναι ελαττωμένα στο ΝΚΚ σε σύγκριση με μη καρκινικά δείγματα, με την ελαττωμένη ακετυλίωση να σχετίζεται με αυξημένο πυρηνικό βαθμό κακοήθειας και παθολογοανατομικό στάδιο ^{218,248}. Παρότι δεν υπήρχε συσχέτιση με την επιβίωση, οι Seligson και συν. βρήκαν ότι ασθενείς με εντοπισμένο

NKK (βαθμού κακοήθειας I και II) που είχαν ασθενέστερη χρώση των H3K4Me2 και H3K18Ac, είχαν πτωχότερη κλινική έκβαση.^{34,249}

Χαμηλά επίπεδα έκφρασης των Μεθυλοτρανσφερασών (HMTs) SMYD2, SETD3 και της απομεθυλάσης (HDM) NO66 σχετίστηκαν σημαντικά από τους Pires-Luis A.S. και συν. με βραχύτερη ειδική της νόσου (Disease Specific Survival) και ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease Free Survival), ειδικά σε ασθενείς με όγκους μη περιορισμένους στο νεφρό²⁴⁴.

Το επίπεδο της ακετυλίωσης της ιστόνης H4 (H4Ac) συσχετίστηκε αντίστροφα με το παθολογοανατομικό στάδιο και το πυρηνικό βαθμό κακοήθειας του δκNKK, ενώ χαμηλότερα επίπεδα H3Ac συσχετίστηκαν με συστηματική μεταστατική διασπορά και αύξηση του όγκου. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα ακετυλίωσης H3K18Ac σχετίστηκαν σημαντικά με την εξέλιξη του NKK σε μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Η H3K18Ac θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της προόδου νόσου και πτωχής επιβίωσης μετά από χειρουργική επέμβαση στο εντοπισμένο NKK²⁴⁹.

Μια σειρά από αναφορές έχουν δείξει ότι τα χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης της ιστόνης 3 σε διαφορετικούς επίτοπους λυσίνης ήταν χειρότερης προγνωστικής αξίας στο NKK. Τα χαμηλότερα επίπεδα ολικής H3K4 μεθυλίωσης (μονο-,δι- και τρι-μεθυλίωσης) ειδικά H3K4Me2, αναφέρθηκε ότι σχετίζονται αντίστροφα με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους όπως προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο και υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, όπως επίσης χειρότερο διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης (Progression Free Survival) ή ειδικής του καρκίνου επιβίωσης (Cancer Specific Survival) σε μονοπαραγοντική ανάλυση, δείχνοντας ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες πτωχής πρόγνωσης στο NKK.^{245,247}

Τα επίπεδα μεθυλίωσης H3K9 βρέθηκε επίσης να είναι προγνωστικής σημασίας στους ασθενείς με NKK. Το χαμηλότερο επίπεδο H3K9Me2 βρέθηκε να είναι σημαντικός προγνωστικός δείκτης χειρότερης έκβασης σε NKK ακόμα και σε πολυπαραγοντική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού βαθμού κακοήθειας, μεγέθους όγκου και των βιοδεικτών ki67 και p53²⁵⁸. Το χαμηλότερο επίπεδο ολικής μεθυλίωσης της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27Me1, H3K27Me2, H3K27Me3) δείχτηκε ότι σχετίζεται με προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο, υψηλότερο βαθμό κακοήθειας και αγγειακή διήθηση. Επιπρόσθετα, χαμηλά επίπεδα H3K27Me3 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Επιπλέον το Διάστημα Ελεύθερο Προόδου Νόσου (PFS) ήταν βραχύτερο σε ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης H3K27Me1 και H3K27Me3, όμως μόνο σε μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση.

Αρκετές αναφορές έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) ήταν ένας αρνητικός προγνωστικός βιοδείκτης σε διαφορετικούς τύπους

καρκινωμάτων. Ως τώρα, περιορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλότερη ενδοογκική έκφραση του EZH2 σχετίστηκε με προχωρημένα στάδια και πτωχή επιβίωση ασθενών με δκNKK, τόσο με τοπική όσο και με προχωρημένη νόσο ^{250,251}. Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. ³⁰

Οι Ferreira και συν. ανακάλυψαν ότι τα μετάγραφα SETD2 και RIOX2 ήταν υπερεκφρασμένα σε νεφροκυτταρικούς όγκους, συγκριτικά με φυσιολογικούς νεφρικούς ιστούς και στα ογκοκυττώματα σε σχέση με NKK, με το δκNKK και το θNKK να εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα. Χαμηλά επίπεδα SETDB2 και υψηλότερο στάδιο προέβλεψαν ανεξάρτητα βραχύτερο ελεύθερο νόσου διάστημα επιβίωσης (DFS), ενώ υψηλότερα επίπεδα μεταγράφων RIOX2 μπορούν να αναγνωρίσουν περιπτώσεις δκNKK με μικρότερο μεταστατικό δυναμικό. ²³⁹

Οι Ho T. και συν. βρήκαν ότι, ενώ οι αλλαγές στο SETD2 DNA και mRNA δεν σχετίζονται με τη συνολική επιβίωση, η απορρύθμιση του άξονα H3K36me3 σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο θανάτου από NKK. ²⁵²

Οι Zhang J. και συν. ανακάλυψαν την αποσιώπηση της μεθυλτρανσφεράσης (HMT) H3K36, NSD1 με μεθυλίωση DNA στο δκNKK. Όγκοι με NSD1 μεθυλίωση εμφάνιζαν υψηλότερο στάδιο και βαθμό κακοήθειας. ²⁰⁰

Τροποποίηση ιστονών και θεραπεία NKK.

Γενικά πολλοί κακοήθεις όγκοι συμπεριλαμβανομένων των νεφροκυτταρικών δείχνουν υπερέκφραση απακετυλασών ιστονών (HDACs) καθώς και μια ελάττωση της ακετυλίωσης ιστονών στο γονιδίωμα, η οποία σχετίζεται με ελαττωμένη έκφραση γονιδίων μεταξύ των οποίων ογκοκατασταλτικά γονίδια-κλειδιά ^{253,254}. Στην πραγματικότητα οι HDACs 1 και 2 υπερεκφράζονται σε 50% των περιπτώσεων NKK και πιθανολογείται ότι αποσιωπούν βασικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έτσι, αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να επιβεβαιώσουν την αποτελεσματικότητα μερικών αναστολέων απακετυλασών (HDACis) π.χ. του βαλπροϊκού οξέος, όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση στο NKK. ^{255,256}

Οι Touma και συν. έδειξαν ότι ο συνδυασμός HDAC αναστολέων (της τάξης των υδροξαμικών οξέων), ρετινοϊκού οξέος και trichostatin A (TSA), ελάττωσε τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών NKK in vitro και ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου, ενόσω αύξανε την απόπτωση σε μοντέλο ξενομοσχεύματος in vivo²⁵⁷. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα επί της ανάπτυξης του όγκου επιτεύχθηκε μέσω της ενίσχυσης της οδού του ρετινοϊκού οξέος και ήταν εντονότερο όταν συγκρινόταν με μονοθεραπεία είτε με HDACi, είτε με 13-cis-ρετινοϊκό οξύ (CRA) μόνο. Αγωγή με MS-275, έναν HDACi παράγωγο βενζαμίνης, σε συνδυασμό με 13-cis-ρετινοϊκό οξύ (CRA), έδειξε εντονότερη

μείωση της ανάπτυξης του όγκου, σε σύγκριση με την απλή μονοθεραπεία, με καθένα από τα φάρμακα αυτά²⁵⁸. Επιπρόσθετα, δύο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις έγιναν κατά τη διάρκεια της μελέτης : πρώτον, η διακοπή της θεραπείας προκάλεσε υποτροπή του όγκου σε σύγκριση με συνεχώς θεραπευόμενα ποντίκια επιβεβαιώνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα, και δεύτερον, παρατηρήθηκε επαγωγή του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RARβ2) που έδειξε ότι ίσως οι HDACis αναστρέφουν την αντίσταση στα ρετινοειδή.

Η Επιθηλιομεσεγχυματική Μετατροπή (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) είναι ένα από τα χαρακτηριστικά-κλειδιά κατά την ογκογένεση του ΝΚΚ και άλλων καρκίνων. Μια μελέτη έδειξε ότι η αγωγή με TSA αποτρέπει την επαγόμενη από TGFβ1 EMT σε καλλιέργειες ανθρώπινων νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς σωληναρίου ²⁴⁰. Αγωγή TGFβ1 μαζί με TSA απέτρεψε σημαντικά την επαγόμενη από τον TGFβ1 αρνητική ρύθμιση της E-Cadherin και τη θετική ρύθμιση του κολλαγόνου τύπου Ι ²⁴⁰, δείχνοντας ότι οι HDACis, ίσως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά της EMT στο ΝΚΚ.

Οι απακετυλάσες (HDACs) κατά ένα μέρος ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, μέσω των επιδράσεών τους στις p53 και pRb ²¹⁷. Συνεπώς, όταν χρησιμοποιούνται οι HDACis (π.χ. ο LBH589), σε συνδυασμό με rapamycin (mTORC1 αναστολέα), δείχνουν σημαντική καταστολή της ανάπτυξης του όγκου και της αγγειογένεσης in vitro και in vivo σε ΝΚΚ κυτταρικές σειρές και ξеноμοσχεύματα ²¹⁷. Άλλη μελέτη έδειξε θετική ρύθμιση της έκφρασης του p53 και του VHL και αρνητική ρύθμιση του HIF1a και του VEGF με τη χρήση TSA ²⁵⁹. Η TSA έδειξε επίσης αντιαγγειογενετική δράση in vitro και in vivo. Επιπλέον, οι δυο προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι HDACis αποσταθεροποιούν και ελαττώνουν τα επίπεδα HIF1a μέσω αποδόμησης του πρωτεασώματος, όπως προτάθηκε από Jeong και συν. ²⁶⁰. Αρχικά αυτό το αποτέλεσμα θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με υπερακετυλίωση και αυξημένη έκφραση των VHL και p53 ²⁵⁹, ωστόσο το ίδιο παρατηρήθηκε σε VHL-/- και p53-/- κυτταρικές σειρές, δείχνοντας ότι η παρατηρούμενη αποδόμηση του HIF1a μέσω πρωτεασώματος είναι ανεξάρτητη των VHL και p53 και δεν απαιτεί το σύστημα ουμπικουιλίνης.²⁶¹

Ένας άλλος αναστολέας HDAC, η panobinostat (από την τάξη των υδροξαμικών οξέων), έχει αναφερθεί ότι μειώνει την επαγόμενη από την υποξία αντίσταση στη cisplatin στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα, προάγοντας την αποσταθεροποίηση του HIF1a ²⁶². Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η χορήγηση των HDACis στο δκΝΚΚ με έλλειψη VHL, πιθανώς θα καθιστούσε τους όγκους χημειοευαίσθητους, μέσω της αποσταθεροποίησης του HIFa, αντιμετωπίζοντας την αντίσταση που υπάρχει στο δκΝΚΚ. Είναι ενδιαφέρον ότι η ριτοναβίρη, ένας αναστολέας πρωτεάσης HIV, αναφέρθηκε ότι δρα συνεργιστικά με την

Panobinostat, αυξάνοντας την ακετυλίωση ιστονών και αναστέλλοντας την ανάπτυξη ΝΚΚ σε ξενομοσχεύματα. ²⁶³.

Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα από προκλινικές μελέτες, τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμασιών των HDACis δεν ήταν ενδιαφέροντα εξαιτίας των πολύ χαμηλών ποσοστών ανταπόκρισης και των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών ^{264, 265, 255, 256}, δείχνοντας ότι η μονοθεραπεία με αυτά τα φάρμακα δεν βελτίωσε την έκβαση. Όσον αφορά τη συνδυασμένη θεραπεία, η vorinostat (HDACi της τάξης των υδροξαμικών οξέων) δρούσε συνεργικά με τον temsirolimus (αναστολέα του mTOR μονοπατιού) σε ένα panel κυτταρικών σειρών *in vitro* και δυο μοντέλα ξενομοσχευμάτων *in vivo* ²⁶⁶. Ως εκ τούτου, η βιωσιμότητα των κυττάρων και η επιβίωση των κλώνων ελαττώθηκαν, ενώ η απόπτωση αυξήθηκε στα *in vitro* μοντέλα. Επιπλέον, το φορτίο του όγκου και η αγγειογένεση περιορίστηκαν σημαντικά εξαιτίας της ελάττωσης στην έκφραση του HIF2α και της πυκνότητας των αγγείων *in vivo*. Επιπρόσθετα, η συνδυασμένη θεραπεία είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων της survivin, επακόλουθο της επαγωγής της απόπτωσης και του ελαττωμένου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. ²⁶⁶

Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός του αναστολέα HDAC romidepsin και του αναστολέα μεθυλτρανσφεράσης decitabine για την δοκιμή της αντικαρκινικής τους δράσης σε κυτταρικές σειρές σταδίου IV δκΝΚΚ και τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού ²⁶⁷, μεταστατικών συμπαγών όγκων που είναι επιθετικοί και ανθεκτικοί στην φαρμακευτική αγωγή. Ο συνδυασμός τους έδειξε συνεργιστικά αποτελέσματα στην αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και στην επαγωγή της απόπτωσης σε υψηλότερα επίπεδα από την μονοθεραπεία με το κάθε φάρμακο. Αυτό το συνεργιστικό αποτέλεσμα οφείλεται στην επανέκφραση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του SFRP1. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η συνδυαστική θεραπεία με romidepsin και decitabine σε ανθεκτικούς σε φάρμακα όγκους, είναι μια υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για προχωρημένο δκΝΚΚ και τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού. ²⁶⁷

Επιβλαβείς μεταλλάξεις (deleterious mutations) του BAP1 σχετίζονται με έλλειμμα στην διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων στο οφθαλμικό μελάνωμα και στη μετάσταση του καρκίνου. Οι Landreville και συν. ²⁶⁸ βρήκαν ότι η θεραπεία καλλιεργούμενων κυττάρων οφθαλμικού μελανώματος με τον HDACi VPA επάγει διαφοροποίηση, διακοπή του κυτταρικού κύκλου και μεταβολή προς ένα διαφοροποιημένο προφίλ έκφρασης γονιδίων χαρακτηριστικών των μελανοκυττάρων. Επιπλέον, η αγωγή με VPA έδειξε αποτέλεσμα στην αναστολή ανάπτυξης του όγκου στα οφθαλμικά μελάνωμα *in vivo*. Επιπρόσθετα, το μεσολαβούμενο από απενεργοποίηση έκφρασης (knockdown) μέσω παρεμβολής RNA (RNA interference) του γονιδίου BAP1 στα κύτταρα οφθαλμικού μελανώματος, επήγαγε μια

σημαντική αύξηση στην ουμπικουϊτίνωση της H2A και η αγωγή με VPA είχε σαν αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση των επιπέδων ουμπικουϊτίνωσης της ιστόνης H2A σε κύτταρα με έλλειψη BAP1. Έτσι, οι HDACis ίσως είναι αποτελεσματικοί για τη θεραπεία του NKK σε ασθενείς με μεταλλάξεις του BAP1, αφού μπορεί να έχουν την ικανότητα να αναστρέφουν την H2A ουμπικουϊτίνωση που παρατηρείται στο δκNKK με μετάλλαξη στο γονίδιο BAP1²⁶⁸. Αυτά τα αποτελέσματα μαζί δείχνουν ότι οι συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν HDACis και σύγχρονες στοχευμένες θεραπείες ίσως είναι υποσχόμενες και πρέπει να ληφθούν υπόψη για τις μελλοντικές κλινικές μελέτες.

Η EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) είναι η καταλυτική υπομονάδα του PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), που δρα σαν HMT στην τριμεθυλίωση H3K27me3 και η οποία εμπλέκεται στην αποσιώπηση αρκετών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η αποσιώπησή της EZH2 από τον αναστολέα της DZnep (S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-deazaneplanocin A) ανέστειλε σημαντικά την μετανάστευση και διήθηση των κυτταρικών σειρών NKK, ενώ ρύθμιζε θετικά την e-cadherin in vitro. Επίσης η DZnep ανέστρεψε την ανάπτυξη του όγκου και επιμήκυνε την επιβίωση σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων NKK.²⁶⁹⁻²⁷¹.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η SETD2 (μια HMT) απαιτείται για την τριμεθυλίωση H3K36 και αυτή χάνεται συχνά στο δκNKK με SETD2 μετάλλαξη. Το σημαντικότερο, η H3K36me3 διευκολύνει την έκφραση της RRM2, μιας υπομονάδας ριβονουκλεϊνικής ρεδοκτάσης βασικής για την παραγωγή δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Ιδιαίτερα, η RRM2 ρυθμίζεται από ένα δεύτερο μονοπάτι στο οποίο οι CDK προάγουν την αποδόμηση της RRM2. Η δραστηριότητα των CDK, ελέγχεται από το WEE1 (μια πυρηνική κινάση σερίνης/θρεονίνης) και με την αναστολή της WEE1 η υπερενεργή CDK προάγει την αποδόμηση της RRM2. Έτσι, η συνακόλουθη έλλειψη της H3K36me3 και αναστολή των δράσεων της WEE1 σε χαμηλότερες ποσότητες της RRM2, πυροδοτεί μη προσχεδιασμένη είσοδο στη μίτωση οδηγώντας στην απώλεια ακεραιότητας του γονιδιώματος, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε stress αντιγραφής και ανώμαλη έναρξή της, καταλήγοντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση.²⁷²

Τα παραπάνω επικυρώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν από τους Pfister και συν. (2015) για το σχεδιασμό μιας αγωγής για όγκους με έλλειψη H3K36me. Έδειξαν ότι το AZD1775 (ένας αναστολέας WEE1), ελάττωσε το μέγεθος των όγκων με έλλειμμα SETD2 (ή H3K36me3) σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων ποντικών τονίζοντας το πολλά υποσχόμενο αποτέλεσμα της στόχευσης των SETD2 μεταλλαγμένων (ή με έλλειψη HEK36me3) καρκινικών κυττάρων από αναστολείς WEE1.²⁷²

Οι Zhu και συν. βρήκαν ότι ο συνδυασμός decitabine (αναστολέα DNA μεθυλίωσης) και vorinostat (αναστολέα απακετυλάσης ιστονών) αύξησε σημαντικά την έκφραση OCT2

(Organic Cation Transporter 2) σε κυτταρικές σειρές ΝΚΚ, με ευαισθητοποίηση αυτών των κυττάρων στην οξαλιπλάτινα. Πρότειναν δε ότι ο συνδυασμός αντικαρκινικών παραγόντων και επιγενετικών φαρμάκων μπορεί να παρέχει ένα νέο χημειοθεραπευτικό σχήμα. ²¹²

Τροποποίηση ιστονών και αντίσταση στα φάρμακα στο ΝΚΚ.

Οι Adelaiye και συν. διερεύνησαν την υπόθεση ότι η αντίσταση στην αρχική δόση του sunitinib ίσως είναι παροδική και μπορεί να υπερνικηθεί με αύξηση δόσης. Ο ανθεκτικός φαινότυπος σχετίστηκε με παροδική αύξηση της αγγείωσης του όγκου, παρά τη συσσώρευση της sunitinib ενδοογκικά σε μεγαλύτερη δόση, ενώ επιπρόσθετα παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση της μεθυλτρανσφεράσης EZH2 και τροποποίηση ιστονών κατά το χρόνο της αντίστασης. ²⁷³

4.2.2.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA ΣΤΟ ΝΚΚ.

Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε πρόσληψη συμπλεγμάτων πρωτεΐνης που περιέχουν απακετυλάσες (HDACs), γεγονός που μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής της χρωματίνης ²⁷⁴. Αυτό απεικονίζεται σε μια μελέτη με τη χρήση του απομεθυλιωτικού παράγοντα του DNA αζακυτιδίνη και/ή genistein που επανενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο BTG3, αυξάνοντας την ακετυλίωση των H3 και H4 και τη μεθυλίωση H3K4Me2 και H3K4Me3 στη θέση έναρξης μεταγραφής του BTG ¹⁰⁰. Ο συνδυασμός, επίσης, ελάττωσε τα κατασταλτικά σήματα μεθυλίωσης H3K9Me2 και H3K9Me3 ¹⁰⁰. Ενισχυμένη αντικαρκινική δράση έχει βρεθεί σε ΝΚΚ μοντέλα μετά από αγωγή με trichostatin A και entinostat σε συνδυασμό με *all-trans* ρετινοϊκό και *cis*- ρετινοϊκό οξύ αντίστοιχα, μέσω επανενεργοποίησης του RARβ2 (Retinoic Acid Receptor β2) ^{257,258}.

Οι Minardi και συν. παρατήρησαν ότι καρκινικοί ιστοί είχαν αυξημένη σφαιρική DNA μεθυλίωση σε σύγκριση με τους μη καρκινικούς ιστούς. Όγκοι grade 3 και 4 επίσης παρουσιάστηκαν με ένα υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης DNA ²⁴⁸. Ωστόσο η τροποποίηση αυτή δεν βρέθηκε να είναι προγνωστικός δείκτης ²³¹. Διαφορετικά μονοπάτια στο κυτταρικό περιβάλλον επηρεάζονται από τις προαναφερθείσες τροποποιήσεις και συνοψίζονται στην Εικόνα.20 ³⁴

Οι Avissar-Whiting και συν. τόνισαν τον κεντρικό ρόλο του EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) σαν σύνδεσμο ανάμεσα στους δυο μηχανισμούς επιγενετικής καταστολής γονιδίων: τη μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση των ιστονών ¹⁷⁹.

Οι Ibragimova I. και συν. βρήκαν ότι ανώμαλη υπερμεθυλίωση του υποκινητή των PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A και άλλων γονιδίων τροποποίησης της χρωματίνης απουσιάζει ή είναι σπάνια στο δκNKK. ¹⁸⁰

Οι Li L. και συν. (2016) περιέγραψαν την επιγενετική αδρανοποίηση της DNA μεθυλτρανσφεράσης (DNMT) TET1 σαν μηχανισμό ανατροφοδότησης της μεθυλίωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα και του νεφροκυτταρικού καρκίνου. Αυτή η απώλεια έκφρασης της TET1, μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή της, συμβαίνει συχνά σε καρκινικά κύτταρα και προάγει την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων κατά την παθογένεση του NKK. ¹⁷⁷

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταβολισμού και των επιγενετικών μηχανισμών.

Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αρκετές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που επιτρέπουν τη μεταβολική προσαρμογή και συντηρούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Ο καρκινικός μεταβολικός διακόπτης οδηγεί σε συσσώρευση μεταβολιτών που πιστεύεται ότι μεταβάλλουν επιγενετικούς παράγοντες και την επακόλουθη γονιδιακή έκφραση. Πράγματι, ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στις τροποποιήσεις των ιστονών και του DNA απαιτούν ενδιάμεσα προϊόντα των κυτταρικών μεταβολικών οδών, όπως το ακετυλο-συνένζυμο Α το α-κετογλουταρικό, S-αδενοσυλμεθειονίνη και NAD⁺ σαν συμπαραγόντες ή υποστρώματα. Επιπρόσθετα, η αποδιοργάνωση και αποσύνθεση των μεταβολικών οδών μπορεί επίσης να οδηγήσει σε συσσώρευση μεταβολιτών όπως το συνένζυμο Α, η αδενοσυλ-ομοκυστεΐνη (SAH), το β-υδροξυβουτυρικό, το 2-υδροξυγλουταρικό (2HG), το φουμαρικό, το ηλεκτρικό και γαλακτικό τα οποία αναστέλλουν συγκεκριμένους επιγενετικούς ρυθμιστές. ²⁷⁵

Ο Μεταβολισμός και η τροποποίηση της ακετυλίωσης των ιστονών στο NKK.

Το NKK εμφανίζει υψηλό γλυκολυτικό μεταβολισμό, με αυξημένη μετατροπή πυροσταφυλικού σε γαλακτικό. Μολονότι η επίδραση αυτών των δύο μεταβολιτών στο επιγενετικό τοπίο δεν έχει ακόμα περιγραφεί για το NKK, αυτοί οι δύο μεταβολίτες φάνηκε ότι ενεργούν σαν αναστολείς απακετυλασών ιστονών σε άλλους όγκους. Επομένως, η αυξημένη απόπτωση καρκινικών κυττάρων, σχετίστηκε με αναστολή απακετυλασών ιστονών από το πυροσταφυλικό προτείνοντας ένα αρνητικό ρόλο του τελευταίου στο σχηματισμό όγκου. Επιπρόσθετα, το περισσότερο πυροσταφυλικό, μετατρέπεται

απ'ευθείας σε γαλακτικό για διατήρηση του λόγου $NAD^+/NADH$, συντηρώντας τη γλυκόλυση που απαιτείται από τα καρκινικά κύτταρα. Αντίστροφα, η αναστολή του γαλακτικού από τους αναστολείς απακετυλασών ιστονών τάξης I και II αναφέρθηκε για τους καρκίνους του κόλου και του τραχήλου της μήτρας. Το γαλακτικό προάγει την ακετυλίωση ιστονών και την γονιδιακή έκφραση μέσω μηχανισμού αναστολής απακετυλασών ιστονών συμβάλλοντας στην επιδιόρθωση του DNA και στην αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης ιστονών, έχουν βρεθεί μετά την έκθεση καρκινικών κυττάρων μαστού στο γαλακτικό, όπως επίσης επακόλουθη αυξημένη έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με αρχέγονα κύτταρα (stemness) και συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση γονιδίων επαγόμενων από το γαλακτικό και την έκβαση ασθενών. Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη, η σχετιζόμενη με το γαλακτικό ακετυλίωση δικαιολογήθηκε όχι από την αναστολή των αποακετυλασών ιστονών, αλλά μέσω ενεργοποίησης ακετυλτρανσφερασών ιστονών από την αύξηση της δεξαμενής του ακετυλο-συνένζυμου A. Επιπρόσθετα, άλλοι μεταβολίτες όπως το βουτυρικό και το β-υδροξυβουτυρικό είναι επίσης γνωστοί αναστολείς απακετυλασών ιστονών. Είναι ενδιαφέρον ότι το βουτυρικό οξύ παίζει ένα διπλό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση των κυττάρων. Στα καρκινικά κύτταρα το φαινόμενο Warburg οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα βουτυρικού επειδή δε μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο A. Σε αυτές τις συνθήκες η συσσώρευση του βουτυρικού αναστέλλει την δραστηριότητα των τάξης I, II και IV απακετυλασών ιστονών και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω μεταγραφής προαποπτωτικών γονιδίων. Αντ'αυτού, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούν βουτυρικό σαν καύσιμο μέσω παραγωγής ακετυλο-συνένζυμου A, ο πολλαπλασιασμός διεγείρεται και διευκολύνεται η ανάπτυξη καρκίνου. Περιέργως, το β-υδροξυβουτυρικό φαίνεται να έχει επίδραση παρόμοια με του βουτυρικού. Σε απουσία γλυκολυτικού μεταβολισμού, το β-υδροξυβουτυρικό χρησιμοποιείται σαν οξειδωτική ενεργειακή πηγή αντί για επιγενετικός ρυθμιστής, επάγοντας την ανάπτυξη του όγκου. Επί παρουσίας γλυκολυτικού μεταβολισμού ωστόσο, το β-υδροξυβουτυρικό δεν μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο A αλλά συσσωρεύεται, οδηγώντας σε αναστολή των απακετυλασών ιστονών τάξης I και II. Επιπρόσθετα, μια in vivo μελέτη, έδειξε ειδική αναστολή των τάξης I απακετυλασών από το β-υδροξυβουτυρικό με επακόλουθη αύξηση της γενικής (global) ακετυλίωσης των ιστονών, η οποία σχετίστηκε με αντίσταση στο οξειδωτικό stress, επάγοντας την μεταγραφική δραστηριότητα. Παράλληλα, η γλυκόλυση στον καρκίνο, ελαττώνει το λόγο $NAD^+/NADH$ βασικό για τη δράση των σιρτουινών, αφού αυτά τα ένζυμα εξαρτώνται από το NAD^+ σαν συμπράγοντα. Έτσι, η αναστολή των σιρτουινών φαίνεται να συμβάλλει στην υπερακετυλίωση και στην ανώμαλη μεταγραφή γονιδίων οδηγώντας στην πρόοδο του καρκίνου. Παρ'όλα αυτά, χρειάζονται επιπλέον μελέτες για την καλύτερη κατανόηση των

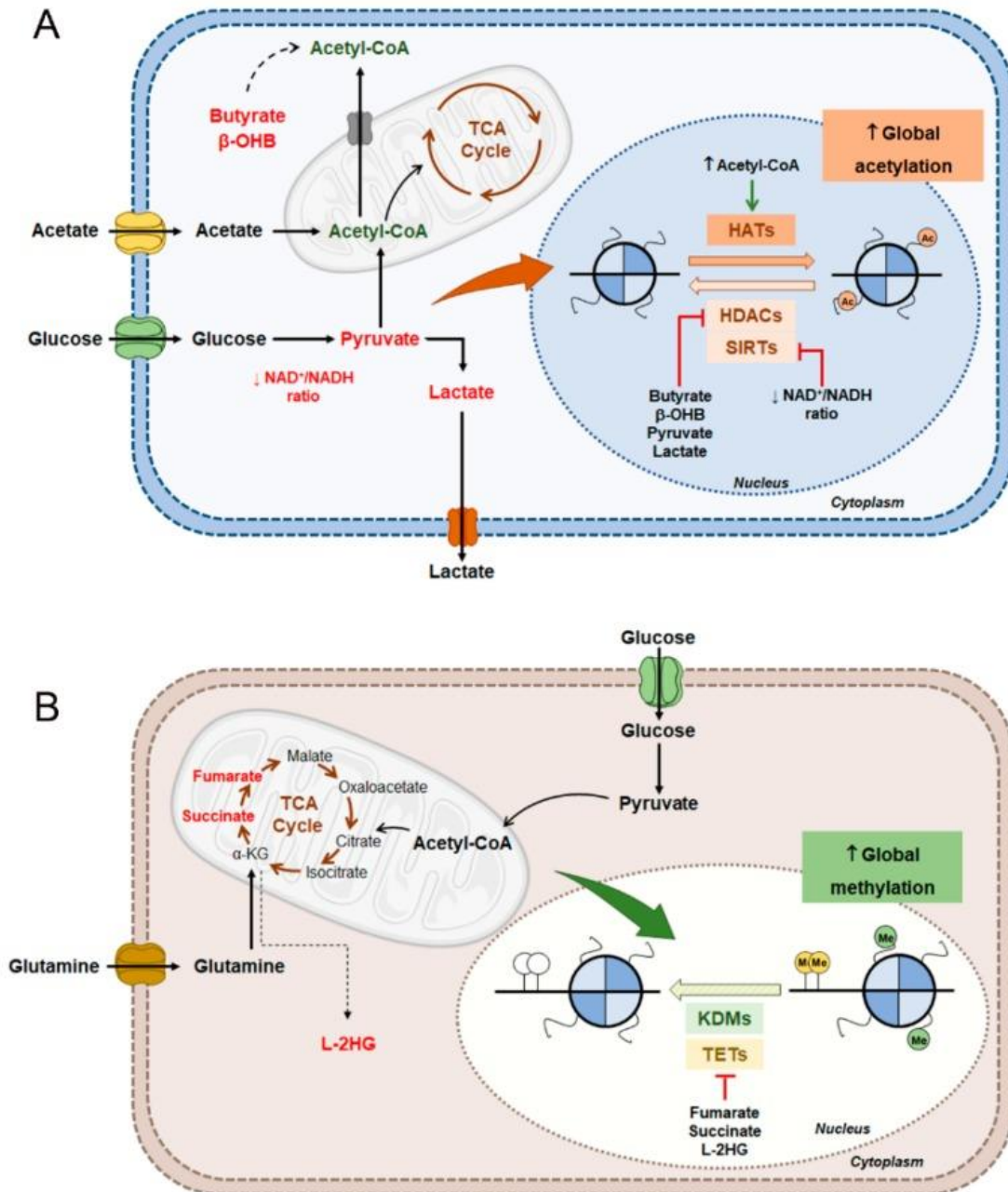
αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο μεταβολικό status και την δράση των σιρτουινών στον καρκίνο. Στο ΝΚΚ, ο γλυκολυτικός μεταβολισμός που επάγεται μέσω της ενεργοποίησης της οδού HIF-1a, οδηγεί στην καταστολή του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος εμποδίζοντας την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-συνένζυμο Α. Σ' αυτήν την κατάσταση, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν άλλες πηγές για να αποκτήσουν ακετυλο-συνένζυμο Α βασικό για τη σύνθεση λιπιδίων όπως επίσης για τη λειτουργία των ακετυλτρανσφερασών ιστονών. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματίσουν το μεταβολισμό τους για να παράγουν κιτρικό στα μιτοχόνδρια, το οποίο μεταφέρεται στο κυτοσόλιο και μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α με τη δράση της ATP κιτρικής λυάσης. Σε αυτές τις συνθήκες, το ακετυλο-συνένζυμο Α παίζει ένα ρόλο στην ακετυλίωση των ιστονών σε απάντηση στη διέγερση των αυξητικών παραγόντων και της γλυκόζης. Το ακετύλιο του κυτταροπλάσματος είναι μια άλλη πηγή ακετυλ-συνενζύμου Α. Υπό περιορισμό γλυκόζης ή σε υποξικό stress το ακετύλιο (οξικό άλας) χρησιμοποιείται σαν άμεσο μεταβολικό πρόδρομο μόριο για σύνθεση λιπαρών οξέων και επίσης επάγει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη de novo λιπιδιακή σύνθεση και την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου, προάγοντας την ακετυλίωση των ιστονών σε συγκεκριμένες περιοχές υποκινητών. Επιπρόσθετα, το ακετυλ-συνένζυμο Α, που γεννάται (generated) από την γλουταμίνη, φαίνεται να εμπλέκεται στην ακετυλίωση των ιστονών επάγοντας την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψιν τον υψηλό γλυκολυτικό μεταβολισμό στο ΝΚΚ, παρατηρείται γενική (global) υπερακετυλίωση ιστονών και επακόλουθη ανώμαλη μεταγραφή γονιδίων, πιθανά λόγω αυξημένης δράσης των ακετυλτρανσφερασών, που επάγονται από το ακετυλοσυνένζυμο Α, και επίσης εξαιτίας της αναστολής από αρκετους μεταβολίτες που συμβάλλουν στην πρόοδο και επιθετικότητα του καρκίνου (εικόνα 41). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διευκρίνιση αυτής της υπόθεσης σε αυτό το συγκεκριμένο μοντέλο. ²⁷⁵

Ο Μεταβολισμός στη διαμόρφωση της μεθυλίωσης του DNA και των ιστονών στο ΝΚΚ.

Συσσώρευση του φουμαρικού και ηλεκτρικού ανευρίσκεται τυπικά σε ΝΚΚ με έλλειψη φουμαρικής υδρατάσης και ηλεκτρικής αφυδρογονάσης. Και οι δύο μεταβολίτες έχουν συσχετιστεί με εξαρτώμενη από α-κετογλουταρικό αναστολή απομεθυλάσων ιστονών και DNA, δηλαδή των TETs και KDMs. Σε όγκους με μεταλλάξεις SDH η συσσώρευση ηλεκτρικού σχετίζεται με φαινότυπο υπερμεθυλίωσης DNA. Η αναστολή απομεθυλασών των ιστονών και του DNA σχετίστηκε με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου και δυναμικό διήθησης, λόγω της επιγενετικής αποσιώπησης γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική

διαφοροποίηση και την επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή. Επιπρόσθετα, το φουμαρικό επίσης σχετίστηκε με επιθετικότητα του όγκου. Οι Sciacovelli και συν. ²⁷⁶ έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια συσσώρευση φουμαρικού οδηγεί σε αλλαγές σε γονίδια της Επιθηλιομεσεγγυματικής μετατροπής όπως τα ZEB (Zinc finger E-box binding Homeobox), SNA1 (Snail family transcriptional repressor-1) και VIM (Vimentin) μέσω αναστολής των TETs και της επακόλουθης μεωμένης έκφρασης αντιμεταστατικών αθροισμάτων (clusters) micro-RNA σε κύτταρα NKK ποντικού.

Πιο πρόσφατα, το L-εναντιομερές του 2-υδροξυγλουταρικού βρέθηκε να είναι συσσωρευμένο στο NKK. Αυτός ο μεταβολίτης παράγεται από α-κετογλουταρικό μέσω LDHA σε συνθήκες υποξίας και φάνηκε ότι είναι πιθανά αναστολέας των TETs και KDMs . Στο NKK, αυξημένα επίπεδα L-2HG διαμεσολαβούνται από την ελαττωμένη έκφραση αφυδρογονάσης της L-2HG εξαιτίας απώλειας αριθμού αντιγράφων. Επιπρόσθετα, οι Shim και συν. ανέφεραν μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα υψηλά επίπεδα L-2HG και στα ελαττωμένα επίπεδα DNA 5hmC εξαιτίας αναστολής δραστηριότητας της TET ²⁷⁷. Αντίστροφα, η αποκατάσταση της L2HGDH στα NKK κύτταρα σχετίστηκε με ελάττωση L2HG και επακόλουθη απομεθυλίωση DNA και ιστονών από επαναδραστηριοποίηση των TETs και KDMs. Επιπλέον, η επανέκφραση L2HGDH μπόρεσε να μετριάσει τον κακοήθη φαινότυπο αναστέλλοντας τον ογκογενετικό ρόλο του L2HG στις κυτταρικές σειρές NKK. Συνεπώς, λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια FH, SDH και L2HGDH οι οποίες οδηγούν σε αναστολή των TET και KDMs, ανώμαλη συσσώρευση ογκομεταβολιτών συμβαίνει στο NKK, διεγείροντας την ανάπτυξη και επιθετικότητα αυτών των όγκων.(εικόνα 41)²⁷⁶



Εικόνα 41: Θεωρούμενος μεταβολικός επαναπρογραμματισμός των επιγενετικών ενζύμων στο ΝΚΚ. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί τροποποιούνται από τους διαθέσιμους μεταβολίτες στο κύτταρο συμβάλλοντας στην ανώμαλη γονιδιακή έκφραση. (Α) Όσον αφορά την ακετυλίωση ιστονών, η δρατικότητα των HATs διεγείρεται από τα υψηλά επίπεδα ακετυλοσυνένζυμου Α. Αντίθετα, η δρατικότητα των HDACs, μπορεί να ανασταλεί από το βουτυρικό, β-υδροξυβουτυρικό, γαλακτικό και πυροσταφυλικό, ενώ η δράση των σιρτουϊνών ρυθμίζεται από το λόγο NAD⁺/NADH. (Β) Η απομεθυλίωση του DNA και των ιστονών μπορεί να ελαττωθεί με αναστολή των KDMs και TETs εξαιτίας της παρουσίας φουμαρικού, ηλεκτρικού και L-2HG, μεταβολίτες με παρόμοια δράση με το α-KG. Abbreviations: L-2HG, L enantiomer of 2-hydroxyglutarate; β-OHB, Beta-hydroxybutyrate. Από : Ana Lameirinhas, Vera Miranda-Concalves, Rui Henrique and Carmen Jeronimo. The Complex Interplay between Metabolic Reprogramming and Epigenetic Alterations in Renal Cell Carcinoma. *Cell* 2019, 10, 264 doi:10.3390/genes 10040264

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η χρωματίνη αποτελεί μεγαλομοριακό σύμπλεγμα γενετικού υλικού (DNA) και πρωτεϊνών (ιστονών και μη ιστονών) με σύνθετο ρόλο δομικό, αλλά κυρίως λειτουργικό που σχετίζεται με τη ροή των γενετικών πληροφοριών, τόσο κατά τη διάρκεια της ζωής των κυττάρων (σωματικών και γενετικών) όσο και προς τις επόμενες γενεές τους. Για την επιτέλεση του σύνθετου αυτού ρόλου, υφίσταται συνεχώς μεταβολές στη δομή της κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταβολές όταν αφορούν άμεσα στον ίδιο τον γενετικό κώδικα (γενετικές), επέρχονται είτε περιορισμένα με την μορφή γονιδιακών αλλαγών, είτε και πιο εκτεταμένα με την μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Όταν δεν αφορούν άμεσα τον γενετικό κώδικα (επιγενετικές), είναι αλλαγές στη χημική σύνθεση του DNA (μεθυλίωση), των ιστονών (κυρίως μεθυλίωση ή ακετυλίωση) και ανώμαλη ρύθμιση των μη κωδικών RNAs.

Όλες οι παραπάνω αλλαγές, είτε συμβαίνουν ξεχωριστά και μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό, έχουν σαν αποτέλεσμα μεταβολές στην ποιότητα και ποσότητα των πρωτεϊνικών προϊόντων κάποιων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά και τα προϊόντα τους, μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και επομένως του πολλαπλασιασμού του κυττάρου (πιθανά ογκοκατασταλτικά γονίδια), και επομένως αλλαγές τους μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα απώλεια ελέγχου και ανεξέλεγκτη διαίρεση, επομένως ογκογένεση. Περαιτέρω μεταβολές σε γονίδια και προϊόντα τους τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση, διαφοροποίηση, επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή και μετανάστευση, είναι πιθανό να προσδώσουν στο ήδη νεοπλασματικό κύτταρο περισσότερο επιθετική βιολογική συμπεριφορά.

Ο καρκίνος του νεφρού είναι κακόηθες νεόπλασμα του ουροποιητικού συστήματος, που αποτελεί την συντριπτική πλειοψηφία των κακοήθων όγκων του νεφρού και εμφανίζει αυξανόμενη επίπτωση τις τελευταίες δεκαετίες. Παρουσιάζεται σε κληρονομικές και σποραδικές μορφές με ποικίλουσα ιστοπαθολογία και διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο.

Γαμετικές μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια, οδηγούν σε νεοπλασματικά σύνδρομα με συμμετοχή διαφόρων οργάνων και συστημάτων τα οποία περιλαμβάνουν το νεφροκυτταρικό καρκίνο και κληρονομούνται το καθένα με διαφορετικό τρόπο. Γενετικές μεταβολές στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων που οδηγούνται σε νεοπλασματική εκτροπή στα πλαίσια σποραδικού νεφροκυτταρικού καρκίνου, έχουν σαν αποτέλεσμα συγκεκριμένες γονιδιακές αλλαγές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένους ιστολογικούς υπότυπους. Επιγενετικές μεταβολές με τη μορφή μεθυλίωσης του DNA ή της μεθυλίωσης και της ακετυλίωσης ιστονών σε θέσεις συγκεκριμένων γονιδίων

(πιθανά ογκοκατασταλικών), ανευρίσκονται σε υψηλό ποσοστό σε καρκινικό νεφρικό ιστό σε σχέση με τον αντίστοιχο μη νεοπλασματικό νεφρικό ιστό. Τροποποιήσεις όπως οι παραπάνω σε γονίδια και προϊόντα τους συνιστούν χαρακτηριστικό μοριακό προφίλ, όχι μόνο για τα νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και για συγκεκριμένους ιστολογικούς υπότυπους, με πιθανή χρήση στη μοριακή διάγνωση της νόσου, από ιστολογικό παρασκεύασμα, αίμα, ορό ή και σωματικά υγρά. Επίσης, χαρακτηριστική επιγενετική υπογραφή μπορεί να συνδέεται με μεταστατική νόσο, υψηλό στάδιο και ελαττωμένη συνολική ή και ειδική της νόσου επιβίωση αποκτώντας έτσι πιθανά προγνωστική αξία. Τέλος, συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών και προφίλ μεθυλίωσης γονιδίων, βρέθηκε ότι συμμετέχουν στην ρύθμιση της υποξίας, στην επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή αλλά και στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στο ΝΚΚ.

Απο την άλλη, χρωματινικές μεταβολές όπως η μεθυλίωση DNA απαντώνται σε μη νεοπλασματικούς νεφρικούς ιστούς και μάλιστα φαίνεται ότι συσσωρεύονται με την ηλικία, ενώ έχουν βρεθεί σε υψηλότερα επίπεδα ακόμη και στο περιφερικό αίμα πριν από την διάγνωση ΝΚΚ, σχετιζόμενα με αυξημένο μελλοντικό κίνδυνο ή σε μη νεοπλασματικό ιστό σαν αποτέλεσμα ισχαιμίας ή υποξίας κατά την χειρουργική εξαίρεση της αλλοίωσης. Επίσης, αντίσταση σε φάρμακα στο ΝΚΚ έχει σχετιστεί με τροποποίηση ιστονών και μεταβολές στην έκφραση ενζύμων που τις καταλύουν.

Πρέπει να θυμόμαστε, ότι η ανεύρεση χαρακτηριστικών επιγενετικών μεταβολών, πρέπει να υπόκειται σε ιδιαίτερα προσεκτική αξιολόγηση και οι οποιεσδήποτε ερμηνείες να λαμβάνουν υπόψη τους, είδος, συνθήκες δειγματοληψίας, προηγηθείσα επεξεργασία και το είδος της τεχνικής που χρησιμοποιείται καθώς και τις τεκμηριωμένες δυνατότητές της.

Πρέπει να τονιστεί ότι τα παραπάνω παραμένουν στο πεδίο της έρευνας και, προκειμένου οι μεταβολές της δομής της χρωματίνης στο νεφροκυτταρικό καρκίνο να αποκτήσουν εγκεκριμένες και καθιερωμένες διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές, απαιτείται περαιτέρω κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, που τις διέπουν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Remodelling της χρωματίνης και καρκίνος. Davis PK, Brachmann RK. *Cancer biology and therapy*. 2003 2:(1)24-31. Απόδοση στα Ελληνικά. Φ.Βλαστός. Πνευμονολόγος Επιμελητής Α ΚΑΑ ΝΝΘΑ.
2. Luger K, Mader A, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389:251-60.
<https://doi.org/10.1038/38444>
3. Belmont AS, Dietzel S, Nye AC, Strukov YG, Tunbar T. Large scale chromatin structure & function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999 11:307-11
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80041-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80041-6)
4. Woodcock CL, Dimitrov S. Higher order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. opin. Genet. Dev.* 2001 11:130-5
[https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00169-6](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00169-6)
5. Hayes JJ, Hansen JC. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001 11:124-9 [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00168-4](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00168-4)
6. Wolffe AP, Guschin D. Review: chromatin structural features & targets that regulate transcription. *J. Struct. Biol.* 2000 129:102-22 <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4217>
7. Knezetic JA, Luse DS. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase 2 in vitro. *Cell* 1986 45:95-104
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90541-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90541-6)
8. Schreiber SL, Bernstein BE. Signalling network model of chromatin. *Cell* 2002 111:771-8 [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01196-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01196-0)
9. Μπακολίτσας Κώστας. Το νουκλεόσωμα και η ουβικιτίνη (ubiquitin).
10. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Βιοχημεία τόμος 2. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο 2005, σελ.984.
11. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Εισαγωγή στην Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης σελ.291-292.
12. Berg J., Tymoczko J., Stryer I. Βιοχημεία τόμος 2. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο 2005. σελ. 986.
13. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης σελ.293-294

14. Κατσώρης Π. Μοριακή Βιολογία. «Εκπαιδευτικό υλικό του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών : Μεταπτυχιακή Ειδίκευση Καθηγητών Φυσικών Επιστημών». Εναλλακτικό διδακτικό υλικό για τη θεματική ενότητα: Οργάνωση της ύλης σε έμβια συστήματα» ΕΑΠ 2005 σελ.10.
15. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης σελ.311-312.
16. William K.M.Lai & B.Franklin Pugh. Understanding nucleosome dynamics and Their links to gene expression and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Sep; 18(9): 548–562. doi: 10.1038/nrm.2017.47. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
17. Καθηγητής Κων. Ε. Βοργιάς. Δομή και ιδιότητες του DNA. Μη ιστόνες πρωτεΐνες. *Μοριακή Βιολογία* κεφ.1 (2014).
https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/DNA_Chromatin.pdf
18. L Triesmann, Y V Postnikov, A Rickers, and M Bustin. Modular structure of Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol Cell Biol.* 1995 Dec;15(12) 6663-6669. PMID:PMC230919
<https://doi.org/10.1128%2Fmcb.15.12.6663>
19. Twyman R.M. Advanced Molecular Biology. bios scientific publishes.σελ.37.
20. Gonzalez FJ, Bustin Landsman D, Soares N (1986). “Chromosomal protein HMG-17. Complete human cDNA sequence and evidence for a multigene family” *J.Biol.Chem.* 261 (16) : 7479-7484. PMID 3754870
21. Raymond Reeves, Lois Beckerbauer. HMG1/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Structure and Expression.* Volume 1519, Issues 1–2, 28 May 2001, Pages 13-29 [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00215-9)
22. M Friedmann, L T Holth, H Y Zoghbi, and R Reeves. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* 1993 Sep 11; 21(18): 4259–4267. PMID: PMC310059
<https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F21.18.4259>
23. Καραμάνος Θ. Ο ρόλος του νουκλεοσώματος στη γονιδιακή έκφραση. Διάλεξη 4/7/2006. http://multimedia.biol.uoa.gr/media2005_06/karamanos_files/lobby0.htm
24. Mutations. *Wikipedia.*
25. Muller’s Morphs. *Wikipedia.*
26. Mutant types in : Introduction to genetic analysis. 2000 W.H. Freeman & Co.

27. Fischle W et al. Histone and chromatin crosstalk. *Current Opinion in Cell Biology* 15:172-183.2003 [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00013-9)
28. Peterson CL and Laniel MA. Histones and histone modifications. *Current Biology* 14:R546-R551.2004 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
29. Αναδιάπλαση της χρωματίνης. Chromatin remodeling. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Τμήμα Βιολογίας. *Μαθήματα Βιολογίας*.
<http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL412/documents/Lecture5.pdf>
30. Tiaming Xing, Huiying He : Epigenomics of clear cell red cell carcinoma: mechanisms and potential use in molecular pathology. *Chinese Journal of Cancer Res.* 2016;28 (1) 80-91 <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.09>
31. Νικολάου Χριστόφορος, Χουβαρδάς Παναγιώτης. *Υπολογιστική βιολογία : ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ*. Κεφ.11 : Βιολογία Μεγάλων Δεδομένων. Εκδόσεις Κάλλιπος
32. Scott B. Rothbart and Brian D. Strahl. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 August ; 1839(8): 627–643.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>
33. Seong Hwi Hong, Jiyoung Lee, Eun Bi Jang, Sung Yul Park, Hong-Sang Moon, Young Eun Yoon. Epigenetic Approaches to the Treatment of Renal Cell Cancer. *Korean J Urol Oncol* 2020;18(2):78-90.
<https://doi.org/10.22465/kjuo.2020.18.2.78>
34. Swanthi Ramakrishnan, Leigh Ellis, Roberto Pili : Histone modifications: Implications in renal cell carcinoma. *Epigenomics* 2013 August ; 5(4).
<https://doi.org/10.2217/epi.13.40>
35. Marmorstein R (August 2001). "Structure of histone acetyltransferases". *J. Mol.Biol.* 311 (3): 433–44.PMID 11492997. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4859>
36. Rossetto D , Avvakumov N and Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*. 2012 Oct 1; 7(10): 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
37. Πιπέρη Χ. Επιγενετικά φαινόμενα στον καρκίνο με έμφαση στην τροποποίηση των ιστονών. *ΠΜΣ Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο* 2016.
38. Tamaki Suganuma, Jerry L. Workman. Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* Volume 135, Issue 4, p604–607, 14 November 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.036>

39. Atkins M.B, Choueiri T.K, Richie J.P, Ross M.E : Epidemiology,pathology and pathogenesis of renal cell carcinoma. Clinical manifestations, evaluation and staging of renal cell cancer. *Uptodate* 2017
40. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of Papillary Renal cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2016; 374:135-45 <https://doi.org/10.1056/nejmoa1505917>
41. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, et al. Improved identification of Von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal cell tumors. *Clin.Cancer Res.* 2008;14: 4726-34. [PubMed: 18676741] 323. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4921>
42. Laura S. Schmidt and W. Marston Linehan. Genetic predisposition to kidney cancer. *Semin Oncol.* 2016 October ; 43(5): 566–574. doi:10.1053/j.seminoncol.2016.09.001 421. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.09.001>
43. Eric Jonasch, Frede Donskov, Othon Iliopoulos, W. Kimryn Rathmell, Vivek K.Narayan, Benjamin L. Maughan, Stephane Oudard, Tobias Else, Jodi K. Maranchie, Sarah J. Welsh, Sanjay Thamake, Eric K. Park, et al. Belzutifan for Renal Cell Carcinoma in von Hippel–Lindau Disease. *N Engl J Med* 2021; 385:2036-2046.DOI: 10.1056/NEJMoa2103425. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2103425>
44. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2001 ; 98: 3387- 92 [PubMed: 11248088] <https://doi.org/10.1073/pnas.051633798>
45. Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, et al. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB –associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet.* 2004; 74: 153-9 <https://doi.org/10.1086/381054>
46. Ricketts C, Woodward ER, Killick P, et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:1260–1262. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn254>
47. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, et al. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of Warburg effect in cancer. *J Urol.* 2012; 188. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.030>
48. Rai K, Pilarski R, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet.* 2016 Mar;89(3):285-94. Epub 2015 Jul 14.71. <https://doi.org/10.1111/cge.12630>
49. W. Marston Linehan, Ramaprasad Srinivasan, and Laura S. Schmidt. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol.* 2010 May ;7(5): 277–285. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.47>

50. Svenja Bihl, Riuko Ohashi, Ariane L Moore, Jan H Rüschoff, Christian Beisel, Thomas Hermanns, Axel Mischo, Claudia Corrà, Jörg Beyer, Niko Beerenwinkel, Holger Moch, Peter Schraml. Expression and Mutation Patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 Mirror Specific Evolutionary Subtypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia*. 2019 Feb;21(2):247-256. doi:. 10.1016/j.neo.2018.12.006 Epub 20 <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.12.006>
51. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schröck E, Ried T, Cremer T, Störkel S, Kovacs A, Kovacs G. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*. 1994;145(2):356. 19 Jan 16. PMID: 7519827
52. Mehdi A, Riazhosseim Y. Epigenome Aberrations : Emerging Driving Factors of the clear cell renal cell carcinoma. *Int.J.Mol.Sci*. 2017, 18 ;1774 doi:10.3390/ijms18081774. <https://doi.org/10.3390/ijms18081774>
53. Amrita M. Nargund, Can G. Pham, Yiyu Dong, Patricia I. Wang, Hatice U. Osmangeyoglu, Yuchen Xie, Omer Aras, Song Han, Toshinao Oyama, Shugaku Takeda, Chelsea E. Ray, Zhenghong Dong, Mathieu Berge, A Ari Hakimi, Sebastien Monette, Carl L. Lekaye, Jason A. Koutcher, Christina S. Leslie, Chad J. Creighton, Nils Weinhold, William Lee, Satish K. Tickoo, Zhong Wang, Emily H. Cheng, and James J. Hsieh. The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep*. 2017 Mar 21;18(12): 2893–2906. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.074>
54. Morris, M.R.; Latif, F. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat. Rev.Nephrol*. 2016, 13, 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.168>
55. Brugarolas, J. PBRM1 and BAP1 as Novel Targets for Renal Cell Carcinoma. *Cancer J*. 2013, 19, 324–332. <https://doi.org/10.1097%2FPP0.0b013e3182a102d1>
56. Brugarolas, J. Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin.Oncol*. 2014, 32, 1968–1976. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.45.2003>
57. Vieira-Coimbra, M.; Henrique, R.; Jerónimo, C. New insights on chromatin modifiers and histone post-translational modifications in renal cell tumours. *Eur. J. Clin. Investig*. 2017, 45, 16–24. <https://doi.org/10.1111/eci.12360>
58. Peña-Llopis, S.; Christie, A.; Xie, X.J.; Brugarolas, J. Cooperation and antagonism among cancer genes: The renal cancer paradigm. *Cancer Res*. 2013, 73, 4173–4179. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-0360>

59. Eckel-Passow JE, Serie DJ, Chevillet JC, Ho TH, Kapur P, Brugarolas J, Thompson RH, Leibovich BC, Kwon ED, Joseph RW, Parker AS. BAP1 and PBRM1 in metastatic clear cell renal cell carcinoma: tumor heterogeneity and concordance with paired primary tumor. *BMC Urol.* 2017 Mar 21;17(1):19. doi: 10.1186/s12894-017-0209-3. <https://doi.org/10.1186/s12894-017-0209-3>
60. Jee SooPark, Hyo Jung Lee, Nam Hoon Cho, Jongchan Kim, Won Sik Jang, Ji Eun Heo, Won Sik Ham. Risk Prediction Tool for Aggressive Tumors in Clinical T1 Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma Using Molecular Biomarkers. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* Volume 17, 2019, Pages 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.03.005>
61. Niraj Shenoy, Nishanth Vallumseta, Yiyu Zou, Jose Nahim Galias, Makardhwaj Shrivastava, Caroline Hu, Kataliu Susztak and Amit Verma. Role of DNA methylation in renal cell carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology* (2015) <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-015-0180-y>
62. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:9700–9704. [PubMed:7937876] <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9700>
63. Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:3972–3979. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0175>
64. Amanda M. Hoffman Bsc and Paul Cairns PhD. The Epigenetics of kidney cancer and bladder cancer. *Epigenomics* 2011 February 3(1) : 19-34 <https://doi.org/10.2217/epi.10.64>
65. Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet.* 1997; 16:68–73. [PubMed:9140397] <https://doi.org/10.1038/ng0597-68>
66. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30:406–410. [PubMed: 11865300] <https://doi.org/10.1038/ng849>
67. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell.* 2002; 2:157–164. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00104-6)

68. da Silva NF, Gentle D, Hesson LB, Morton DG, Latif F, Maher ER. Analysis of the Birt-Hogg-Dube (BHD) tumour suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma and colorectal cancer. *J Med Genet.* 2003; 40:820–824.
<https://doi.org/10.1136/jmg.40.11.820>
69. Gad S, Lefevre SH, Khoo SK, et al. Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2007; 96:336–340. [PubMed: 17133269]
<https://doi.org/10.1038%2Fsj.bjc.6603492>
70. Morris MR, Hesson LB, Wagner KJ, et al. Multigene methylation analysis of Wilms'tumour and adult renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2003; 22:6794–6801.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206914>
71. Haibach H, Burns TW, Carlson HE, Burman KD, Deftos LJ. Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease) associated with renal cell carcinoma and primary neuroendocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). *Am J Clin Pathol.* 1992; 97:705–712. [PubMed: 1575215]
<https://doi.org/10.1093/ajcp/97.5.705>
72. Pilarski R, Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up (again)? Expanding mutational and clinical spectra of the PTEN hamartoma tumour syndrome. *J Med Genet.* 2004; 41:323–326. [PubMed: 15121767]
<https://doi.org/10.1136/jmg.2004.018036>
73. Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* 1997; 16:64–67. [PubMed: 9140396] <https://doi.org/10.1038/ng0597-64>
74. Zysman MA, Chapman WB, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol.* 2002; 160:795-800. [PubMed:11891178] [https://doi.org/10.1016%2FS0002-9440\(10\)64902-4](https://doi.org/10.1016%2FS0002-9440(10)64902-4)
75. iida Y, Stemmer-Rachamimov AO, Logrip M, et al. Survey of somatic mutations in tuberous sclerosis complex (TSC) hamartomas suggests different genetic mechanisms for pathogenesis of TSC lesions. *Am J Hum Genet.* 2001; 69:493–503. [PubMed:11468687] <https://doi.org/10.1086/321972>
76. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007;13(14):4042–5 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-2316>
77. Morris MR et al. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(14):2104–17.
<https://doi.org/10.1038/onc.2009.493>

78. Gumz ML et al. Secreted frizzled-related protein 1 loss contributes to tumor phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13 (16): 4740–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0143>
79. Saini S, Liu J, Yamamura S, Majid S, Kawakami K, Hirata h, Dahiya R. Functional Significance of Secreted Frizzled-Related Protein-1 in Metastatic Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res* 2009 ;69 : (17)
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1254>
80. Atschekzei F, Hennenlotter j, Janisch S, Grobhennig A, Trankenschuh W, Waalkes S, Peters I, Dork T, Merseburger A.S, Stenzi A, Kuczyk M.A and Serth J. SFRP1 CpG island methylation locus is associated with renal cell cancer susceptibility and disease recurrence. *Epigenetics* 7: 5,447-457. 2012 <https://doi.org/10.4161/epi.19614>
81. Kawamoto K et al. DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2008; 123(3):535–42. <https://doi.org/10.1002/ijc.23514>
82. Awakura Y et al. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2008; 20(5): 1257–63. PMID: 18949430
http://dx.doi.org/10.3892/or_00000138
83. Dahl E et al. Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2007; 26(38): 5680–91. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210345>
84. Kawakami K et al. Secreted frizzled-related protein-5 is epigenetically downregulated and functions as a tumor suppressor in kidney cancer. *Int J Cancer*. 2011; 128(3): 541–50. <https://doi.org/10.1002/ijc.25357>
85. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000; 14(15): 1837–51. PMID: 10921899
86. Kawakami K et al. Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. *Cancer Res*. 2009; 69(22): 8603–10.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-2534>
87. Hirata H et al. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2011;128(8): 1793–803. <https://doi.org/10.1002/ijc.25507>
88. Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10) : 615–23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.001>

89. Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:355–75.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105714>
90. Kim WJ, Gersey Z, Daaka Y. Rap1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. *Cancer Lett*. 2012; 320(1): 65–71. <https://doi.org/10.1016%2Fj.canlet.2012.01.022>
91. Cho YJ, Liang P. Killin is a p53-regulated nuclear inhibitor of DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(14): 5396–401.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705410105>
92. Bennett KL et al. Germline and somatic DNA methylation and epigenetic regulation of KILLIN in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(8): 654–61. <https://doi.org/10.1002/gcc.20887>
93. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med*. 2009; 60: 167–79 <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.053006.104707>
94. Wang WT, Chen YQ. Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. *J Hematol Oncol*. 2014; 7(1): 86. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0086-0>
95. Lujambio A et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(36): 13556–61.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803055105>
96. Hildebrandt MAT et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29(42):5724–8. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.305>
97. Brazil DP et al. BMP signaling : agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(5): 249–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.004>
98. van Vlodrop IJ et al. Prognostic significance of Gremlin1 (GREM1) promoter CpG island hypermethylation in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2010; 176(2) :575–84. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090442>
99. Ou YH et al. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. *EMBO J*. 2007;26 (17): 3968–80.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601825>
100. Majid S, Dar AA, Ahmad AE, et al. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis*. 2009; 30(4):662–670. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp042>

101. Leaman DW et al. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002; 277(32): 28504–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.m204851200>
102. Reu FJ et al. Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation. *J Clin Oncol*. 2006; 24 (23): 3771–9. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.03.4074>
103. Ahmad ST et al. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population. *Tumor Biol*. 2012; 33(2): 395–402. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0235-9>
104. Christoph F et al. Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer. *Br J Cancer*. 2006; 95(12): 1701–7. 2009; 30(4): 662–70. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603482>
105. Raveh T et al. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol*. 2001;3(1):1–7. <https://doi.org/10.1038/35050500>
106. Kissil JL , Feinstein E , Cohen O, Jones PA , Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME and Kimchi A. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* (1997) 15, 403 - 407 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201172>
107. Gillissen B et al. Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J*. 2003;22(14):3580–90. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg343>
108. I Sturm, C Stephan, B Gillissen, R Siebert, M Janz, S Radetzki, K Jung, S Loening, B Dorken and PT Daniel. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death and Differentiation* (2006) 13, 619–627. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401782>
109. Yoo KH et al. Epigenetic inactivation of HOXA5 and MSH2 gene in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Int*. 2010 60(10): 661-6 <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02578.x>
110. Okuda H et al. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2006; 25(12): 1733–42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209200>

111. Tran YK et al. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59(1):35–43. PMID: 9892180
112. Yamada D et al. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2006;118(4):916–23. <https://doi.org/10.1002/ijc.21450>
113. Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(7):658–64. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.7.13247>
114. Morris MR et al. Tumor suppressor activity and epigenetic inactivation of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2/SPINT2 in papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65(11): 4598–4606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-3371>
115. Syrigos KN et al. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol.* 1998;160(5):1889–93. PMID: 9783980
116. J E. Breault, H Shiina, M Igawa, L A. Ribeiro-Filho, M Deguchi, H Enokida, S Urakami, M Terashima, M Nakagawa, CJ Kane, P R. Carroll and R Dahiya. Methylation of the g-Catenin Gene Is Associated With Poor Prognosis of Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 11, 557 – 564, January15,2005 [PubMed:15701841] <https://doi.org/10.1158/1078-0432.557.11.2>
117. Smith LT et al. Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(4):982–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510171102>
118. Ye YW et al. Down-regulation of TCF21 is associated with poor survival in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma.* 2012; 59(6): 599–605. https://doi.org/10.4149/neo_2012_076
119. Costa VL et al. TCF21 and PCDH17 methylation: an innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers. *Epigenetics.* 2011; 6(9): 1120–30. <https://doi.org/10.4161/epi.6.9.16376>
120. Chen WY et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell.* 2005; 123(3): 437–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.011>
121. Wang CG et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(9): 1025–U109. <https://doi.org/10.1038/ncb1468>

122. Jenal M et al. The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol Cancer Res.* 2009;7(6): 916–22. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-08-0359>
123. Eggers H et al. Prognostic and diagnostic relevance of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) CpG island methylation in renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012; 40(5): 1650–8. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1367>
124. Kim M et al. LRRC3B, encoding a leucine-rich repeat-containing protein, is a putative tumor suppressor gene in gastric cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(17): 7147–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0667>
125. Haraldson K et al. LRRC3B gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibits cell growth and replication. *Biochimie.* 2012; 94(5): 1151–7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.019>
126. Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(7): 3999–4010. <https://doi.org/10.1128%2Fmcb.13.7.3999>
127. Peters I et al. GATA5 CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression. *BJU Int.* 2012;110 (2 Pt 2):E144–52. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2011.10862.x>
128. Morrissey C et al. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61(19): 7277–81. PMID: 11585766
129. Peters I et al. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2007; 6:49. <https://doi.org/10.1186%2F1476-4598-6-49>
130. Ellinger J et al. DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2011;107(4):664–9. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2010.09468.x>
131. Kawai Y et al. Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2010; 21(8): 1612–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp577>
132. Costa VL et al. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer.* 2007;7:133. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-133>
133. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(12): 978–87. <https://doi.org/10.1038/nrc1504>
134. Cirulli V, Yebra M. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(4): 296–306. <https://doi.org/10.1038/nrm2142>

135. Lv D et al. Genetic and epigenetic control of UNC5C expression in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2011; 47(13): 2068–76.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.04.021>
136. Bader BL, Jahn L, Franke WW. Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur J Cell Biol*. 1988; 47(2): 300–19. PMID: 2468493
137. Ju JH et al. Regulation of cell proliferation and migration by keratin19- induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19 (16) : 4335–46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3295>
138. Cao Y et al. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Arch*. 2000; 436(2): 119–26. <https://doi.org/10.1007/pl00008210>
139. Labastie MC et al. The Gata-3 gene is expressed during human kidneyembryogenesis. *Kidney Int*. 1995; 47(6): 1597–603.
<https://doi.org/10.1038/ki.1995.223>
140. Cooper SJ et al. Loss of type III transforming growth factor-beta receptor expression is due to methylation silencing of the transcription factor GATA3 in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29(20):2905–15. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.64>
141. Tavares TS et al. Gene microarray analysis of human renal cell carcinoma: the effects of HDAC inhibition and retinoid treatment. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(10): 1607–18.
<https://doi.org/10.4161%2Fcbt.7.10.6584>
142. Qi JH et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med*. 2003;9(4):407–15. <https://doi.org/10.1038/nm846>
143. Masson D et al. Loss of expression of TIMP3 in clear cell renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1430–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.01.009>
144. Bachman KE et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res*. 1999; 59(4): 798–802. PMID: 10029065
145. Awakura Y et al. Methylation-associated silencing of TU3A in human cancers. *Int J Oncol*. 2008;33(4):893–9. PMID: 18813805
146. Kvasha S et al. Hypermethylation of the 5'CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas. *Cancer Lett*. 2008; 265(2): 250–7.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.036>

147. Kawakami T et al. Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2006;15(6):821–30. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl001>
148. Schmidt JV et al. The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev.* 2000;14(16): 1997–2002. PMID: 10950864
149. Yano T et al. Tumor-suppressive effect of connexin 32 in renal cell carcinoma from maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2003;63(1):381–1. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00745.x>
150. Yano T et al. Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. *Cancer Lett.* 2004;208(2):137–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.029>
151. Nojima D et al. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2001;32(1):19–27. <https://doi.org/10.1002/mc.1060>
152. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppression genes in human renal cancer cells. *Urology* 2003;61:226-230 [Pubmed:12559313] [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)02110-6](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)02110-6)
153. Clifford SC et al. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma:evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;22(3):200–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199807\)22:3%3C200::aid-gcc5%3E3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199807)22:3%3C200::aid-gcc5%3E3.0.co;2-#)
154. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013;499(7456):43–9. <https://doi.org/10.1038/nature12222>
155. Chu Q et al. DACH1 inhibits cyclin D1 expression, cellular proliferation and tumor growth of renal cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2014;7(1):73. <https://doi.org/10.1186%2Fs13045-014-0073-5>
156. Mark R Morris and Eamonn R Maher: Epigenetics of renal cell carcinoma:the path towards new diagnostics and therapeutics. *Genome Medicine* 2010 2: 59 <https://doi.org/10.1186%2Fgm180>

157. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995; 55:4525–4530. [PubMed: 7553621]
158. Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, et al. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *HumMol Genet.* 2001; 10:1413 -1419. This study illustrates the point that tumor cell lines need not be representative of the extent of aberrant methylation in a primary tumor. [PubMed: 11440994] <https://doi.org/10.1093/hmg/10.13.1413>
159. Robertson KD, Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:6457–6473. [PubMed: 9774662] <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6457>
160. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:3225–3229. [PubMed: 11309270]
161. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter Hyper methylation in human cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:4366-4371.
162. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58:4515–4518. [PubMed: 9788592]
163. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res.* 2004; 64:5511–5517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0799>
164. Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene.* 2003; 22:1580–1588. [PubMed:12629521] <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206243>
165. To KK, Zhan Z, Bates SE. Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma. *Mol Cell Biol.* 2006; 26:8572–8585. [PubMed: 16954373] <https://doi.org/10.1128/mcb.00650-06>
166. Cairns P. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:531–543. A discussion of the promise and challenges of aberrant methylation for early detection of cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc2170>

167. Kagan J, Srivastava S, Barker PE, Belinsky SA, Cairns P. Towards Clinical Application of Methylated DNA Sequences as Cancer Biomarkers: A Joint NCI's EDRN and NIST Workshop on Standards, Methods, Assays, Reagents and Tools. *Cancer Res.* 2007;67: 4545–4549. [PubMed:17510378]
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-2888>
168. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett.* 2008; 268:177–186.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.022>
169. Zhang L, Yu J, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Short mononucleotide repeat sequence variability in mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res.* 2001; 61:3801–3805. [PubMed: 11325855]
170. Bausch B, Jilg C, Gläsker S, et al. Renal cancer in von Hippel-Lindau disease and related syndromes. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:529-38.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.144>
171. Rydzanicz M, Wrzesiński T, Bluysen HA, et al. Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications. *Cancer Lett* 2013;341:111-26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.006>
172. McRonald FE, Morris MR, Gentle D, et al. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2009; 8:31. This is the first report of Illumina beadchip methylation technology in renal cancer.
<https://doi.org/10.1186%2F1476-4598-8-31>
173. Mark R Morris and Eamonn R Maher Epigenetics of renal cell carcinoma: the path towards new diagnostics and therapeutics. *Genome Med.* 2010; 2(9): 59.
<https://doi.org/10.1186%2Fgm180>
174. Xu B, Zhang L, Luo C, Qi Y, Cui Y, Ying J-M, Zhang Q, Jin J. Hypermethylation of the 16q23.1 Tumor Suppressor Gene ADAMTS18 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int.J.Mol.Sci.*2015,16,1051-1065; <https://doi.org/10.3390%2Fijms16011051>
175. Zhenfang Du, Lili Li, Xin Huang, Jie Jin, Suming Huang, Qian Zhang, Qian Tao. The epigenetic modifier CHD5 functions as a novel tumor suppressor for renal cell carcinoma and is predominantly inactivated by promoter CpG methylation. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 16 2016 <https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.7822>

176. Prathap Kumar S. Mahalingaiah, Logeswari Ponnusamy, Kamaleshwar P. Singh Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 7), pp: 11127-11143 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12091>
177. Lili Li, Chen Li, Haitao Mao, Zhenfang Du, Wai Yee Chan, Paul Murray, Bing Luo, Anthony TC Chan, Tony SK Mok, Francis KL Chan, Richard F Ambinder & Qian Tao. Epigenetic inactivation of the CpG demethylase TET1 as a DNA methylation feedback loop in human cancers. *Scientific Reports* 6, (2016) |6:26591 <https://doi.org/10.1038/srep26591>
178. Schelleckes K, Schmitz B, Ciarimboli G, Lenders M, Pavenstädt HJ, Herrmann E, Brand SM and Brand E. Promoter methylation inhibits expression of tumor suppressor KIBRA in human clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Epigenetics* (2017) 9:109 <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0415-6>
179. Avissar-Whiting M, Koestler DC, Houseman EA, Christensen BC, Kelsey KT and Marsit CJ. Polycomb group genes are targets of aberrant DNA methylation in renal cell carcinoma. *Epigenetics* 6:6, 703-709; June 2011 <https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16158>
180. Ilsiya Ibragimova, Marie E. Maradeo, Essel Dulaimi and Paul Cairns. Aberrant promoter hypermethylation of PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A and other chromatin-modifying genes is absent or rare in clear cell RCC. *Epigenetics* 8:5, 486–493; May 2013 <https://doi.org/10.4161/epi.24552>
181. Mitsui Y, Hirata H, Arichi N, Hiraki M, Yasumoto H, Chang I, Fukuhara S, Yamamura S, Shahryari V, Deng G, Saini S, Majid S, Dahiya R, Tanaka Y, Shiina H. Inactivation of bone morphogenetic protein 2 may predict clinical outcome and poor overall survival for renal cell carcinoma through epigenetic pathways. *Oncotarget* 2015 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3445>
182. Hu CY, Mohtat D, Yu Y, et al. Kidney cancer is characterized by aberrant methylation of tissue-specific enhancers that are prognostic for overall survival. *Clin Cancer Res* 2014;20:4349-60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0494>
183. Jessica A. Carter, Dariusz C. Górecki, Charles A. Mein, Börje Ljungberg and Sassan Hafizi, CpG dinucleotide-specific hypermethylation of the TNS3 gene promoter in human renal cell carcinoma. *Epigenetics* 8:7, 739–747; July 2013 <https://doi.org/10.4161/epi.25075>

184. Yao-Jie Pan, Lu-Lu Wei, Xiao-Jin Wu⁴, Fu-Chun Huo, Jie Mou and Dong-Sheng Pei. MiR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5. Citation: *Cell Death and Disease* (2017) 8, e3155; doi:10.1038/cddis.2017.561 Official journal of the Cell Death Differentiation Association. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.561>
185. Ibragimova I, Slifker M.J, Maradeo M.E, Banumathy G, Dulaimi E, Uzzo R.G, Cairns P. Genome-Wide Promoter Methylome of Small Renal Masses. 2013 *PLoS ONE* 8(10) : e77309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077309>
186. Sara Karami, Gabriella Andreotti, Linda M Liao, Ruth M Pfeiffer, Stephanie J Weinstein Mark P Purdue, Jonathan N Hofmann, Demetrius Albanes, Satu Mannisto, and Lee E Moore. LINE1 methylation levels in pre-diagnostic leukocyte DNA and future renal cell carcinoma risk. *Epigenetics* 10:4, 282--292; April 2015 <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1006505>
187. Van Neste C, Laird A, O'Mahony F, Van Criekinge W, Deforce D, Van Nieuwerburgh F, Powles T, Harrison DJ, Stewart GD, De Meyer T. Epigenetic sampling effects:nephrectomy modifies the clear cell renal cell cancer methylome. *Cell Oncol* (Dordr). 2017 Jun;40(3):293-297.Epub 2017 Jan 10 <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0313-5>
188. Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Schouten LJ, et al. Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1785:133-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.12.002>
189. de Martino M, Klatte T, Haitel A, et al. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker. *Cancer* 2012;118:82-90. <https://doi.org/10.1002/cncr.26254>
190. Liao LM, Brennan P, van Bemmelen DM, et al. LINE-1methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. *PLoS One* 2011;6:e27361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027361>
191. Dimitriev A.A, Rudenko E.E, Kudryavtseva A.V, Krasnov G.S, Gordiyuk V.V, Melnikova N.V, Stakhovsky E.O, Kononenko O.A, Pavlova L.S, Kondratieva T.T, Alekseev B.Y, Braga E.A, Senchenko V.N, and Kashuba V.I. Epigenetic Alterations of Chromosome 3 Revealed by Not1-Microarrays in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Biomed Research International* Volume 2014, Article ID 735292 , 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/735292>

192. Ana Sílvia Pires-Luís, Pedro Costa-Pinheiro, Maria João Ferreira, Luís Antunes, Francisco Lobo, Jorge Oliveira, Rui Henrique and Carmen Jerónimo. Identification of clear cell renal cell carcinoma and oncocytoma using a three-gene promoter methylation panel. *J. Transl Med.* (2017) 15
<https://doi.org/10.1186/s12967-017-1248-y>
193. Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66:5021–5028. [PubMed: 16707423]
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-3365>
194. Sameer Chopra, Jie Liu, Mehrdad Alemozaffar, Peter W. Nichols, Manju Aron, Daniel J. Weisenberger, Clayton K. Collings, Sumeet Syan, Brian Hu, Mihir Desai, Monish Aron, Vinay Duddalwar, Inderbir Gill, Gangning Liang and Kimberly D. Siegmund. Improving needle biopsy accuracy in small renal mass using tumor-specific DNA methylation markers. *Oncotarget*, 2017, Vol.8, (No. 3), pp: 5439-5448.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12276>
195. Arai E, Chiku S, Mori T, et al. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2012;33:1487-93. <https://doi.org/10.1093/carcin/bqs177>
196. Fisel P, Kruck S, Winter S, Bedke J, Hennenlotter J, Nies A.T, Scharp M, Fend F, Stenzl A, Schwab M, Schaeffeler E. DNA Methylation of the SLC16A3 Promoter Regulates Expression of the Human Lactate Transporter MCT4 in Renal Cancer with Consequences for Clinical Outcome. *Clin. Cancer Res* ;19 (18) 2013
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-1180>
197. Ivette A.G. Deckers, Leo J. Schouten, Leander Van Neste, Iris J.H. van Vlodrop, Patricia M.M.B. Soetekouw, Marcella M.L.L. Baldewijns, Jana Jeschke, Nita Ahuja, James G. Herman, Piet A. van den Brandt, and Manon van Engeland. Promoter Methylation of CDO1 Identifies Clear-Cell Renal Cell Cancer Patients with Poor Survival Outcome. *Clin Cancer Res.* 2015 August 1; 21(15): 3492–3500.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-2049>
198. Ana S Pires-Luís, Márcia Vieira-Coimbra, Maria João Ferreira, João Ramalho-Carvalho, Pedro Costa-Pinheiro, Luís Antunes, Paula C Dias, Francisco Lobo, Jorge Oliveira, Inês Graça, Rui Henrique, Carmen Jerónimo. Prognostic significance of MST1R dysregulation in renal cell tumors. *Am J Cancer Res* 2016; 6(8):1799-1811
www.ajcr.us /ISSN:2156-6976/ajcr0032587

199. Van Vlodrop IJH, Joosten SC, De Meyer T, Smits KM1, Van Neste L, Melotte V, Baldewijns MMLL, Schouten LJ, van den Brandt PA, Jeschke J, Yi JM, Schuebel KE, Ahuja N, Herman JG, Aarts MJ, Bosman FT, Van Criekinge W, van Engeland M. A Four-Gene Promoter Methylation Marker Panel Consisting of GREM, NEURL, LAD1, and NEFH Predicts Survival of Clear Cell Renal Cell Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2017 Apr 15;23(8):2006-2018. Epub 2016 Oct 18..
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-1236>
200. Su X, Zhang J, Mouawad R, Comperat ES, Roupert M, Allanic F, Parra J, Bitker MO, Thompson EJ, Gowrishankar B, Houldworth J, Weinstein JN, Tost J Broom BM, Khayat D, Spano JP, Tannir NM, Malouf GG. ND1 Inactivation and SETD2 Mutation Drive a Convergence toward Loss of Function of H3K36 Writers in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2017 Sep 15;77(18):
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-0143> . Epub 2017 Jul 28.
201. Sophie C Joosten, Ivette AG Deckers, Maureen J Aarts, Ann Hoeben, Joep G van Roermund, Kim M Smits, Veerle Melotte, Manon van Engeland & Vivianne CTjan-Heijnen. Prognostic DNA methylation markers for renal cell carcinoma: a systematic review. *Epigenomics* (2017) 9(9), 1243–1257. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0040>
202. Yi Miao, Fang Cao, Pingping Li, and Peijun Liu. DNA methylation of HUGL-2 is a prognostic biomarker in kidney renal clear cell carcinoma. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2020 Aug.5;48(1) : 44-53.doi: 10.1111/1440-1681.13390.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13390>
203. Christopher J. Ricketts, Aguirre A. De Cubas, Huihui Fan, Christof C. Smith, Martin Lang, Ed Reznik, Reanne Bowlby, Ewan A. Gibb, Rehan Akbani, Rameen Beroukhi, Donald P. Bottaro, Toni K. Choueiri, Henske, James J. Hsieh, Thai H. Ho, S. Kanchi, Bhavani Krishnan, David J. Kwiatkowski, Wembin Lui, Maria J. Merino, Gordon B. Mills, Jerome Myers, Michael L. Nickerson, Victor E. Reuter, Laura S. Schmidt, Richard A. Gibbs, Andrew K. Godwin, Scott Haake, A. Ari Hakimi, Elizabeth P., C. Simon Shelley, Hui Shen, Brian Shuch, Sabina Signoretti, Ramaprasad Srinivasan, Pheroze Tamboli, George Thomas, Benjamin G. Vincent, Cathy D. Vocke, David A. Wheeler, Lixing Yang, William Y. Kim, A. Gordon Robertson, The Cancer Genome Atlas Research Network, Paul T. Spellman, W. Kimryn Rathmell, and W. Marston Linehan. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports* 23, 313-326, April 3, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.075>

204. Qiliang Peng, Yibin Zhou, Lu Jin, Cheng Cao , Cheng Gao , Jianfang Zhou, Dongrong Yang , Jin Zhu. Development and validation of an integrative methylation signature and nomogram for predicting survival in clear cell renal cell carcinoma. *Translational Andrology and Urology*, Vol 9, No 3 June 2020. <https://doi.org/10.21037/tau-19-853>
205. Joeckel, T.E.; Lubbert, M. Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-20-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: An update. *Semin. Hematol.* 2012, 49, 330–341. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2012.08.001>
206. Ricketts, C.J.; Morris, M.R.; Gentle, D.; Shuib, S.; Brown, M.; Clarke, N.; Wei, W.; Nathan, P.; Latif, F.; Maher, E.R. Methylation profiling and evaluation of demethylating therapy in renal cell carcinoma. *Clin. Epigenet.* 2013, 5, 16. <https://doi.org/10.1186%2F1868-7083-5-16>
207. Faleiro I, Leao R, Binnie A, de Mello RA, Maia AT, Castelo-Branco P. Epigenetic therapy in urologic cancers: an update on clinical trials. *Oncotarget* 2017;8:12484-500. <https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.14226>
208. Hagiwara, H.; Sato, H.; Ohde, Y.; Takano, Y.; Seki, T.; Ariga, T.; Hokaiwado, N.; Asamoto, M.; Shirai, T.; Nagashima, Y.; et al. 5-Aza-20-deoxycytidine suppresses human renal carcinoma cell growth in a xenograft model via up-regulation of the connexin 32 gene. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 153, 1373–1381. <https://doi.org/10.1038%2Fbjp.2008.17>
209. Dunn J, Rao S. Epigenetics and immunotherapy: the current state of play. *Mol Immunol* 2017;87:227-39 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.04.012>
210. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13:679-92. <https://doi.org/10.1038/nrg3270>
211. Negrotto S, Hu Z, Alcazar O, et al. Noncytotoxic differentiation treatment of renal cell cancer. *Cancer Res* 2011;71:1431-41. <https://doi.org/10.1158%2F0008-5472.CAN-10-2422>
212. Qianying Zhu, Lushan Yu, Zhiyuan Qin, Lu Chen, Haihong Hu, Xiaoli Zheng and Su Zenga. Regulation of OCT2 transcriptional repression by histone acetylation in renal cell carcinoma. *Epigenetics*. 2019; 14(8): 791–803. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1615354>
213. Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3–9. *Nat Chem Biol.* 2005; 1(3):143–145. [PubMed:16408017] <https://doi.org/10.1038/nchembio721>

214. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)*. 2004; 82(3):175–181. [PubMed: 14752606]
<https://doi.org/10.1007/s00109-003-0517-9>
215. Cha TL, Chuang MJ, Wu ST, et al. Dual degradation of Aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(3):840–850.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-1918>
216. Vanoosten RL, Earel JK Jr, Griffith TS. Enhancement of Ad5-TRAIL cytotoxicity against renal cell carcinoma with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Gene Ther*. 2006;13 (6):628–632.[PubMed: 16456549] <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700939>
217. Verheul HMW, Salumbides B, Van Erp K, et al. Combination strategy targeting the hypoxia inducible factor-1 α with mammalian target of rapamycin and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(11):3589–3597.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4306>
218. Kanao K, Mikami S, Mizuno R, Shinojima T, Murai M, Oya M. Decreased acetylation of histone H3 in renal cell carcinoma: a potential target of histone deacetylase inhibitors. *J Urol*. 2008;180(3):1131–1136. [PubMed: 18639283]
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.04.136>
219. Duns G, Van Den Berg E, Van Duivenbode I, et al. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2010; 70(11):4287–4291. [PubMed: 20501857]
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-0120>
220. Dalglish GL, Furge K, Greenman C, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*. 2010; 463(7279):360–363. Demonstrates that histone demethylases are targets of HIF, an important pathway most frequently upregulated in renal cell carcinomas. [PubMed: 20054297] <https://doi.org/10.1038/nature08672>
221. Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011; 469(7331):539–542. PBRM1 mutations were found in 41% of clinical samples, suggesting that it plays an important role in renal cell carcinomas. [PubMed: 21248752] <https://doi.org/10.1038/nature09639>
222. Berry WL, Janknecht R. KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res*. 2013; 73(10):2936–2942. [PubMed: 23644528]
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-4300>

223. Hakimi AA, Chen Y-B, Wren J, et al. Clinical and pathologic impact of select chromatin modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2012; 63(5):848–854. [PubMed: 23036577]
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.09.005>
224. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(20):11606–11611. [PubMed: 14500907]
<https://doi.org/10.1073/pnas.1933744100>
225. Ozdag H, Teschendorff A, Ahmed A, et al. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics*. 2006; 7(1):90. [PubMed:16638127] <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-90>
226. Sakurai T, Bilim VN, Ugolkov AV, et al. The enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a potential therapeutic target, is regulated by miR-101 in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 422(4):607–614. [PubMed: 22609199]
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.035>
227. Shen Y, Guo X, Wang Y, et al. Expression and significance of histone H3K27 demethylases in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2012; 12(1):470. [PubMed: 23057811] <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-470>
228. Porter EG, Dykhuizen EC. Individual Bromodomains of Polybromo-1 Contribute to Chromatin Association and Tumor Suppression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Biol Chem*. 2017 Feb 17;292(7):2601-2610. doi: 10.1074 /jbc. M116.746875.
<https://doi.org/10.1074%2Fjbc.M116.746875>
229. Richon V, Zhou X, Rifkind R, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: development of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) for the treatment of cancers. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(1):260–264. [PubMed: 11358386]
<https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0376>
230. Ajiro K, Nishimoto T. Specific site of histone H3 phosphorylation related to the maintenance of premature chromosome condensation. Evidence for catalytically induced interchange of the subunits. *J Biol Chem*. 1985; 260 (29): 15379–15381. [PubMed: 4066674]
231. Tikoo K, Lau SS, Monks TJ. Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-Ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 2001; 60(2):394–402. [PubMed: 11455028]
<https://doi.org/10.1124/mol.60.2.394>

232. Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ, et al. Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res.* 2006; 66(17): 8814–8821. Demonstrates that class II HDACs not only associate with HIF, but also regulate HIF-1 α activity. [PubMed: 16951198]
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-4598>
233. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36542–36552. Demonstrates that histone demethylases are targets of HIF, an important pathway most frequently upregulated in renal cell carcinomas. [PubMed: 18984585]
<https://doi.org/10.1074/jbc.m804578200>
234. Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S, Giaccia AJ. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1{alpha}enhances hypoxic gene expression and tumor growth. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(1):344–353. [PubMed:19858293] <https://doi.org/10.1128/mcb.00444-09>
235. Guo X, Shi M, Sun L, et al. The expression of histone demethylase JMJD1A in renal cell carcinoma. *Neoplasma.* 2011; 58(2):153–157. [PubMed: 21275466]
https://doi.org/10.4149/neo_2011_02_153
236. Niu X, Zhang T, Liao L, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates gene expression and tumor growth through histone demethylase JARID1C. *Oncogene.* 2012; 31(6):776–786. [PubMed: 21725364]
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.266>
237. Xiaoqiang Guo, Qiaoxia Zhang. The emerging role of histone demethylases in renal cell carcinoma. Vol. 4 No. 2 (2017): *Journal of Kidney Cancer and VHL.*
<https://doi.org/10.15586/jkcvhl.2017.56>
238. Wang Y, Zhang R, Wu D, Lu Z, Sun W, Cai Y, Wang C, Jin J. Epigenetic change in kidney tumor: downregulation of histone acetyltransferase MYST1 in human renal cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2013;32(1):8
<https://doi.org/10.1186%2F1756-9966-32-8>
239. Maria João Ferreira, Ana Sílvia Pires-Luís, Márcia Vieira-Coimbra, Pedro CostaPinheiro, Luís Antunes, Paula C. Dias. SETDB2 and RIOX2 are differentially expressed among renal cell tumor subtypes, associating with prognosis and metastization. *Epigenetics.* Volume 12, 2017 - Issue 12 Download citation
<https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1385685>

240. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(1):58–65.
<https://doi.org/10.1681/asn.2005111187>
241. Madeleine Arseneault, Jean Monlong, Naveen S. Vasudev, Ruhina S. Laskar, Maryam Safisamghabadi, Patricia Harnden, Lars Egevad, Nazanin Nourbehesht, P. Panichnantakul, Ivana Holcatova, Antonin Brisuda, Vladimir Janout, Helena Kollarova, Lenka Foretova, Marie Navratilova, Dana Mates, Viorel Jinga, David Zaridze, Anush Mukeria, Pouria Jandaghi, Paul Brennan, Alvis Brazma, Jorg Tost, Ghislaine Scelo, Rosamonde E. Banks, Mark Lathrop, Guillaume Bourque & Yasser Riazalhosseini. Loss of chromosome Y leads to down regulation of KDM5D and KDM6C epigenetic modifiers in clear cell renal cell carcinoma. *Scientific Reports* 2017|7:44876 <https://doi.org/10.1038%2Fsrep44876>
242. L. Cao, L Zhu, J Yang, J Su, J Ni, Y Du, D Liu, Y Wang, F Wang, J Jin, Y Cai. Correlation of low expression of hMOF with clinicopathological features of colorectal carcinoma, gastric cancer and renal cell carcinoma. *Int.J.of Oncology* 44: 1207-1214, 2014 <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2266>
243. Qinqin Yu, Yanqing Liu, Xiaoli Zheng, Qianying Zhu, Zhuowei Shen, Hua Wang, Huadong He, Nengming Lin, Huidi Jiang, Lushan Yu, Su Zeng. Histone H3 Lysine 4 Trimethylation (H3K4me3), Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and Lysine 27 Acetylation (H3K27AC) Contribute to the Transcriptional Repression of Solute Carrier Family 47 Member 2 in Renal Cell Carcinoma. Published on November 7, 2016 as DOI:10.1124/dmd. 116. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.073734>
244. Pires-Luis A.S., Vieira-Coimbra M., Vieira F.Q., Costa Pinheiro P., Rui Silva- Santos, Paula C Dias, Luís Antunes, Francisco Lobo, Jorge Oliveira, Celine S Goncalves, Bruno M Costa, Rui Henrique, and Carmen Jeronimo. Expression of histone methyltransferases as novel biomarkers for renal cell tumor diagnosis and prognostication. *Epigenetics* 10:11, 1033--1043; November 2015
245. Ellinger J, Kahl P, Mertens C, et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010; 127 (10): 2360–2366. [PubMed: 20162570] <https://doi.org/10.1002/ijc.25250>
246. Rogenhofer S, Kahl P, Holzapfel S, Von Ruecker A, Mueller SC, Ellinger J. Decreased levels of histone H3K9me1 indicate poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*.2012; 32(3):879–886. [PubMed:22399607]

247. Mosashvilli D, Kahl P, Mertens C, et al. Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2010; 101(12):2664–2669. [PubMed: 20825416] <https://doi.org/10.1111%2Fj.1349-7006.2010.01717.x>
248. Minardi D, Lucarini G, Filosa A, et al. Do DNA-methylation and histone acetylation play a role in clear cell renal carcinoma? Analysis of radical nephrectomy specimens in a long-term follow-up. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011; 24(1):149–158. [PubMed: 21496397] <https://doi.org/10.1177/039463201102400117>
249. Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol.* 2009; 174(5):1619–1628. [PubMed:19349354] <https://doi.org/10.2353%2Fajpath.2009.080874>
250. Xu B, Abourbih S, Sircar K, et al. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1326-36. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0525-oa>
251. Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2010;10:524. <https://doi.org/10.1186%2F1471-2407-10-524>
252. Thai H. Ho, Payal Kapur, Richard W. Joseph, Daniel J. Serie, Jeanette E. Eckel-Passow, Pan Tong, Jing Wang, Erik P. Castle, Melissa L. Stanton, John C. Cheville, Eric Jonasch, James Brugarolas and Alexander S. Parke. Loss of histone H3 lysine 36 trimethylation is associated with an increased risk of renal cell carcinoma-specific death. *Mod Pathol.* 2016 January; 29(1): 34–42. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.123>
253. Fritzsche, F.R.; Weichert, W.; Röske, A.; Gekeler, V.; Beckers, T.; Stephan, C.; Jung, K.; Scholman, K.; Denkert, C.; Dietel, M.; et al. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer* 2008, 8, 381. <https://doi.org/10.1186%2F1471-2407-8-381>
254. Minardi, D.; Lucarini, G.; Filosa, A.; Zizzi, A.; et al. Prognostic role of global DNA-methylation and histone acetylation in pT1a clear cell renal carcinoma in partial nephrectomy specimens. *J. Cell. Mol. Med.* 2008, 13, 2115–2121. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1582-4934.2008.00482.x>
255. Jones, J.; Juengel, E.; Mickuckyte, A.; Hudak, L.; Wedel, S.; Jonas, D.; Blaheta, R.A. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 2009, 13, 2376-2385 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00436.x>

256. Siu, L.L.; Pili, R.; Duran, I.; Messersmith, W.A.; Chen, E.X.; Sullivan, R.; MacLean, M.; King, S.; Brown, S.; Reid, G.K.; et al. Phase I Study of MGCD0103 Given As a Three-Times-Per-Week Oral Dose in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 1940–1947. <https://doi.org/10.1200%2FJCO.2007.14.5730>
257. Touma, S.E.; Goldberg, J.S.; Moench, P.; Guo, X.; Tickoo, S.K.; Gudas, L.J.; Nanus, D.M. Retinoic acid and the histone deacetylase inhibitor trichostatin a inhibit the proliferation of human renal cell carcinoma in a xenograft tumor model. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 3558–3566. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-1155>
258. Wang, X.F.; Qian, D.Z.; Ren, M.; Kato, Y.; Wei, Y.; Zhang, L.; Fansler, Z.; Clark, D.; Nakanishi, O.; Pili, R. Epigenetic modulation of retinoic acid receptor beta2 by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 3535–3542. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-1092>
259. Kim, M.S.; Kwon, H.J.; Lee, Y.M.; Baek, J.H.; Jang, J.-E.; Lee, S.-W.; Moon, E.-J.; Kim, H.-S.; Lee, S.-K.; Chung, H.Y.; et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.* 2001, 7, 437–443. <https://doi.org/10.1038/86507>
260. Jeong, J.W.; Bae, M.K.; Ahn, M.Y.; Kim, S.H.; Sohn, T.K.; Bae, M.H.; Yoo, M.A.; Song, E.J.; Lee, K.J.; Kim, K.W. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002, 111, 709–720. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01085-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01085-1)
261. Kong, X.; Lin, Z.; Liang, D.; Fath, D.; Sang, N.; Caro, J. Histone Deacetylase Inhibitors Induce VHL and Ubiquitin-Independent Proteasomal Degradation of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 2019–2028. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2019-2028.2006>
262. Fischer, C.; Leithner, K.; Wohlkoenig, C.; Quehenberger, F.; Bertsch, A.; Olschewski, A.; Olschewski, H.; Hrzencjak, A. Panobinostat reduces hypoxia- induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1destabilization. *Mol. Cancer* 2015, 14, 4. <https://doi.org/10.1186%2F1476-4598-14-4>
263. Sato, A.; Asano, T.; Isono, M.; Ito, K. Ritonavir acts synergistically with panobinostat to enhance histone acetylation and inhibit renal cancer growth. *Mol. Clin. Oncol.* 2014, 2, 1016–1022. <https://doi.org/10.3892%2Fmco.2014.349>
264. Stadler, W.M.; Margolin, K.; Ferber, S.; McCulloch, W.; Thompson, J.A. A phase II study of depsipeptide in refractory metastatic renal cell cancer. *Clin. Genitourin. Cancer* 2006, 5, 57–60. <https://doi.org/10.3816/cgc.2006.n.018>

265. Hainsworth, J.D.; Infante, J.R.; Spigel, D.R.; Arrowsmith, E.R.; Boccia, R.V.; Burris, H.A. A phase II trial of panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of patients with refractory metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Investig.* 2011, 29, 451–455. <https://doi.org/10.3109/07357907.2011.590568>
266. Mahalingam, D.; Medina, E.C.; Esquivel, J.A., II; Espitia, C.M.; Smith, S; Oberheu, K.; Swords, R.; Kelly, K.R.; Mita, M.M.; Mita, A.C.; et al. Vorinostat enhances the activity of temsirolimus in renal cell carcinoma through suppression of survivin levels. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 141–153. <https://doi.org/10.1016%2Fj.taap.2012.11.002>
267. Cooper, S.J.; von Roemeling, C.A.; Kang, K.H.; Marlow, L.A.; Grebe, S.K.; Menefee, M.E.; Tun, H.W.; Colon-Otero, G.; Perez, E.A.; Copland, J.A. Re-expression of tumor suppressor, SFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol. Cancer Ther.* 2012, 11, 2105–2115. <https://doi.org/10.1158%2F1535-7163.MCT-11-0873>
268. Landreville, S.; Agapova, O.A.; Matatall, K.A.; Kneass, Z.T.; Onken, M.D.; Lee, R.S.; Bowcock, A.M.; Harbour, J.W. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2012, 18, 408–416. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-0946>
269. Liu, L.; Xu, Z.; Zhong, L.; Wang, H.; Jiang, S.; Long, Q.; Xu, J.; Guo, J. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2017, 117, 351–362. DOI: [10.1111/bju.12702](https://doi.org/10.1111/bju.12702)
270. Zhou, J.; Bi, C.; Cheong, L.L.; Mahara, S.; Liu, S.C.; Tay, K.G.; Koh, T.L.; Yu, Q.; Chng, W.J. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood* 2011, 118, 2830–2839. DOI: [10.1182/blood-2010-07-294827](https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294827)
271. Tan, J.; Yang, X.; Zhuang, L.; Jiang, X.; Chen, W.; Lee, P.L.; Karuturi, R.M.; Tan, P.B.O.; Liu, E.T.; Yu, Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007, 21, 1050–1063. DOI: [10.1101/gad.1524107](https://doi.org/10.1101/gad.1524107)
272. Pfister, S.; Markkanen, E.; Jiang, Y.; Sarkar, S.; Woodcock, M.; Orlando, G.; Mavrommati, I.; Pai, C.C.; Zalmas, L.P.; Drobnitzky, N.; et al. Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer Cell* 2015, 28, 557–568. [10.1016/j.ccell.2015.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.015)

273. Remi Adelaiye, Eric Ciamporcero, Kiersten Marie Miles, Paula Sotomayor, Jonathan Bard, Maria Tsompana, Dylan Conroy, Li Shen, Swathi Ramakrishnan, Sheng-Yu Ku, Ashley Orillion, Joshua Prey, Gerald Fetterly, Michael Buck, Sreenivasulu Chintala, Georg A. Bjarnason and Roberto Pili. Sunitinib dose-escalation overcomes transient resistance in clear cell renal cell carcinoma and is associated with epigenetic modifications. *Mol Cancer Ther.* 2015 February ; 14(2): 513–522. doi:10.1158/1535-7163. MCT-14-0208.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0208>
274. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998; 393(6683):386-389. [PubMed:9620804] <https://doi.org/10.1038/30764>
275. Ana Lameirinhas, Vera Miranda-Concalves, Rui Henrique and Carmen Jeronimo. The Complex Interplay between Metabolic Reprogramming and Epigenetic Alterations in Renal Cell Carcinoma. *Cell* 2019, 10, <https://doi.org/264doi:10.3390/genes10040264>
276. Marco Sciacovelli, Emanuel Gonçalves, Timothy Isaac Johnson, Vincent Roberto Zecchini, Ana Sofia Henriques da Costa, Edoardo Gaude, Alizee Vercauteren Drubbel, Sebastian Julian Theobald, Sandra Riekje Abbo, Maxine Gia Binh Tran, Vinothini Rajeeve, Simone Cardaci, Sarah Foster, Haiyang Yun, Pedro Cutillas, Anne Warren, Vincent Gnanapragasam, Eyal Gottlieb, Kristian Franze, Brian Huntly, Eamonn Richard Maher, Patrick Henry Maxwell, Julio Saez-Rodriguez & Christian Frezza. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* volume 537, pages 544–547 (2016) DOI: [10.1038/nature19353](https://doi.org/10.1038/nature19353)
277. Eun-Hee Shim, Carolina B Livi, Dinesh Rakheja, Jubilee Tan, Daniel Benson, Vishwas Parekh, Eun-Young Kho, Arindam P Ghosh, Richard Kirkman, Sadanan Velu, Shilpa Dutta, Balachandra Chenna, Shane L Rea, Robert J Mishur, Qihua Li, Teresa L Johnson-Pais, Lining Guo, Sejong Bae, Shi Wei, Karen Block, Sunil Sudarshan. L-2-Hydroxyglutarate: an epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer. *Cancer Discov.* 2014 Nov;4(11):1290-8. .CD-13-0696. Epub 2014 Sep .2 DOI: [10.1158/2159-8290.CD-13-0696](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0696)
278. Reza Alaghebandan, Farshid Siadat, and Kiril Trpkov. What's new in the WHO 2022 classification of kidney tumours? *Pathologica.* 2023 Feb; 115(1): 8–22. Published online 2023 Jan 16. <https://doi.org/10.32074%2F1591-951X-818>