



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ (ΜΔΔ)**

**Γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις γλοιοβλαστώματος.**

**Βλαχοδημητροπούλου Λαμπρινή**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

Γαλάνη Βασιλική, Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

**Ιωάννινα**

**2024**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ (ΜΔΔ)**

**Γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις γλοιοβλαστώματος.**

**Βλαχοδημητροπούλου Λαμπρινή**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

Γαλάνη Βασιλική, Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

**Ιωάννινα**

**2024**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ (ΜΔΔ)

**Genetic and epigenetic alterations in glioblastoma.**

*Ιωάννινα*

2024

# **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις γλοιοβλαστώματος.**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γαλάνη Βασιλική, Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	7
Περίληψη .....	8
Abstract .....	9
1.Εισαγωγή .....	10
1.1 Γλοιοβλάστωμα .....	11
1.2 Εντόπιση -Συμπτωματολογία.....	12
2. Μοριακοί υποτύποι γλοιοβλαστώματος .....	21
2.1 Γλοιοβλάστωμα και μοριακοί υπότυποι .....	21
3. Κύρια μονοπάτια παθογένεσης στο γλοιοβλάστωμα.....	22
3.1 Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι .....	23
3.2 RAS/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι.....	24
4. Γενετική .....	27
4.1 Γενετικές αλλοιώσεις στο γλοιοβλάστωμα.....	27
4.2 Γενετικά σύνδρομα και νευρικό σύστημα .....	28
5.Επιγενετική .....	33
5.1 Επιγενετική και γλοιοβλάστωμα.....	33
6. Επιγενετικοί Μηχανισμοί .....	35
6.1 Μεθυλίωση DNA .....	35
6.2 Αποτύπωση (imprinting).....	40
6.3 RNA παρέμβαση (interference).....	45
6.4 Τροποποιήσεις Ιστονών.....	48
6.5 Φωσφορυλίωση.....	51
6.6 Αδρανοποίηση του X Χρωμοσώματος.....	52
7. Αποτελέσματα.....	58
8. Βιβλιογραφία .....	59

## **Ευχαριστίες**

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας κ.Γαλάνη Βασιλική,Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για την αμέριστη στήριξη της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας καθώς και για τη καθοδήγηση της.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Το γλοιοβλάστωμα (GBM), είναι ο πιο συχνός και πιο επιθετικός όγκος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) στους ενήλικες, αντιπροσωπεύοντας το 14.9% όλων των όγκων του ΚΝΣ και το 45,6% των πρωτοπαθών κακοηθών όγκων του εγκεφάλου. Οι γενετικές αλλοιώσεις αφορούν ανωμαλίες ή αλλαγές στον γενετικό κώδικα ενός οργανισμού. Στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος μπορεί να συμβούν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την κανονική λειτουργία των κυττάρων και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων.

**Σκοπός-Μέθοδος:** Έγινε βιβλιογραφικά ανασκόπηση των γενετικών και επιγενετικών μεταβολών στο γλοιοβλάστωμα.

**Αποτελέσματα:** Λόγω της προόδου της μοριακής βιολογίας οι τρέχουσες έρευνες έχουν συνδέσει την δημιουργία του γλοιώματος με γενετικές μεταβολές και επιγενετικά φαινόμενα, όπως τροποποιήσεις ιστόνης, μεθυλίωση DNA, αναδιαμόρφωση χρωματίνης και μεταβολές των microRNA. Επιπλέον, τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που ελέγχουν αυτές τις αλλοιώσεις έχουν γίνει νέοι στόχοι για τη θεραπεία του γλοιώματος λόγω της αναστρεψιμότητας των επιγενετικών τροποποιήσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, γονιδιακές μεταλλάξεις συμπεριλαμβανομένων των *P16*, *TP53* και *EGFR* και πολλών άλλων έχουν παρατηρηθεί στο GBM.

**Λέξεις κλειδιά:** Γλοιοβλάστωμα, γλοιόωμα, γενετικές αλλοιώσεις, επιγενετικές αλλοιώσεις.



## **Abstract**

**Introduction:** Glioblastoma (GBM), is the most common and most aggressive primary tumor of the Central Nervous System (CNS) in adults, representing 14.9% of all CNS tumors and 45.6% of all primary malignant brain tumors. Genetic alterations refer to abnormalities or changes in an organism's genetic code. In the case of glioblastoma, mutations can occur in specific genes.

**Aim-Method:** A bibliographic review of genetic and epigenetic alterations in glioblastoma was performed.

**Results:** Due to advances in molecular biology, current research has linked glioma to certain genetic and epigenetic alterations, such as histone modifications, DNA methylation, chromatin remodeling, and microRNA alterations. Furthermore, the genes and proteins that control these alterations have become novel targets for glioma therapy due to the reversibility of epigenetic modifications. In some cases, gene mutations including *P16*, *TP53* and *EGFR* and several others have been observed in GBM.

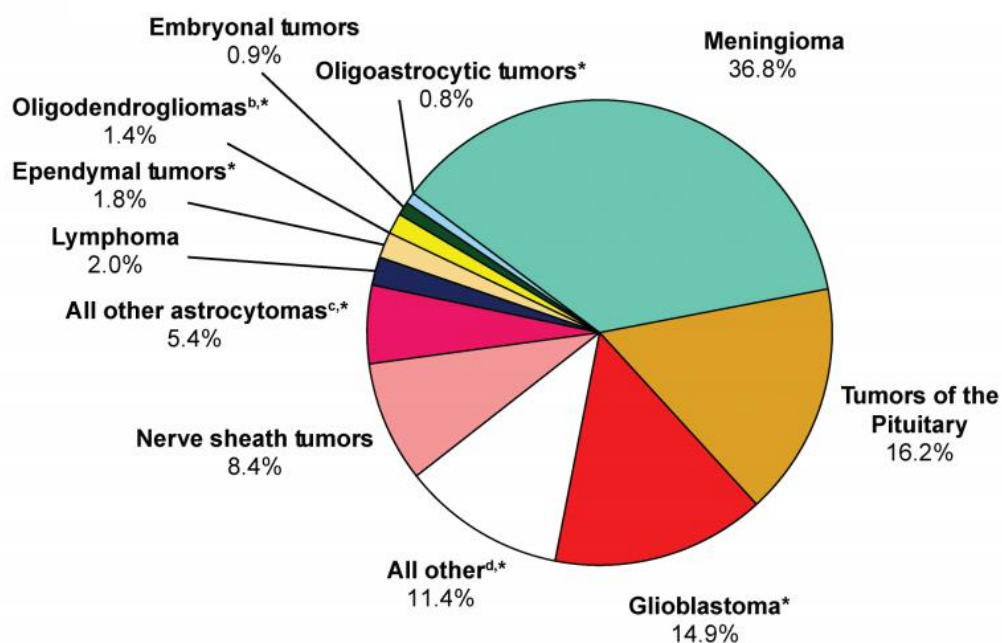
**Key words:** Glioblastoma (GBM), glioma, genetic alterations, epigenetic alterations.

## **1.Εισαγωγή**

## 1.1 Γλοιοβλάστωμα

Το γλοιοβλάστωμα (GBM), είναι ο πιο συχνός και πιο επιθετικός όγκος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) στους ενήλικες, αντιπροσωπεύοντας το 14.9% όλων των όγκων του ΚΝΣ και το 45,6% των πρωτοπαθών κακοηθών όγκων του εγκεφάλου [1]. Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης γλοιοβλαστώματος, αυτό φαίνεται να αφορά περίπου 3,19-4,17 περιπτώσεις/100.000 ενήλικα άτομα ετησίως. Στον παιδιατρικό πληθυσμό, το ποσοστό είναι αρκετά χαμηλότερο, της τάξεως του 0,85/100.000 παιδιά.

Εικόνα 1. Πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ σε ενήλικες. CBTRUS 2021 [1].



Σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας που αναθεωρήθηκε το 2021 (World health organization, WHO, 2021) πολλές νέες οντότητες προστέθηκαν. Αναφορικά με τα γλοιώματα διακρίνονται πλέον στα

διάχυτα γλοιώματα ενηλίκων, παιδιατρικά διάχυτα γλοιώματα χαμηλής κακοήθειας, παιδιατρικά διάχυτα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας και περιγεγραμμένα αστροκυτταρικά γλοιώματα. Στα διάχυτα αστροκυτώματα των ενηλίκων υπάρχουν πλέον 3 μόνο κατηγορίες νεοπλασμάτων, το γλοιοβλάστωμα *IDH-wildtype*, το αστροκύτωμα *IDH-mutant* (βαθμού κακοήθειας 2 έως 4) και το ολιγοδενδρογλοίωμα *IDH-mutant* και *1p/19- codeleted*. Επιπλέον για την καλύτερη ταξινόμηση αυτών των νεοπλασμάτων αξιολογείται η παρουσία νέκρωσης, μικροαγγειακού πολλαπλασιασμού, μετάλλαξη του *TERTp*, *ATRX* και *TP53* [2].

Το GBM μπορεί να διακριθεί σε πρωτογενές και δευτερογενές. Το πρωτογενές GBM είναι συνήθως πιο επιθετικό και εμφανίζεται κατευθείαν ως βαθμού 4, χωρίς ένδειξη ύπαρξης κάποιας πρόδρομης ιστολογικής αλλοίωσης. Αντίθετα, το δευτερογενές GBM προκύπτει από αστροκυτώματα χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας που αποδιαφοροποιούνται σε πιο επιθετικές μορφές [3].

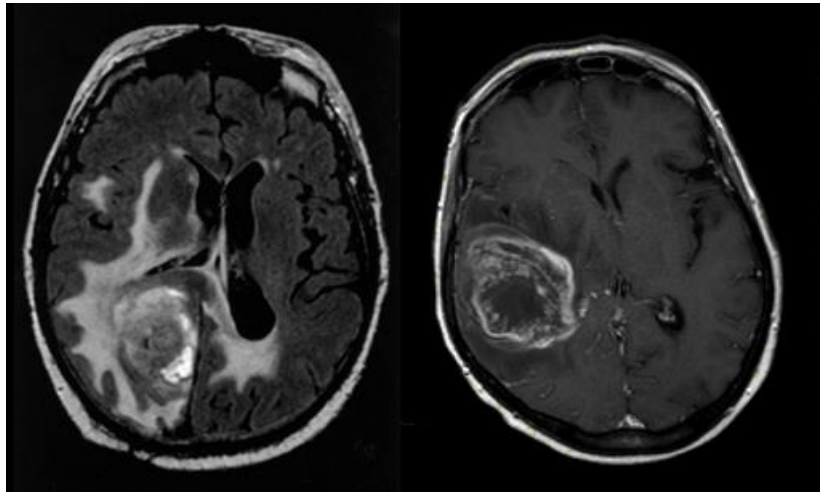
## **1.2 Εντόπιση -Συμπτωματολογία**

Στο 95 % των περιπτώσεων γλοιοβλαστώματος ο όγκος εμφανίζεται στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και σε μικρότερο ποσοστό στη παρεγκεφαλίδα, το εγκεφαλικό στέλεχος και το νωτιαίο μυελό. Συχνότερη ηλικία εμφάνισης είναι τα 65 έτη. Επίσης, εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες συγκριτικά με τις γυναίκες [4]. Στα παιδιά είναι εξαιρετικά σπάνιο νεόπλασμα και έχει λίγο καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με αυτή των ενηλίκων. Σε επιδημιολογική μελέτη 30 ετών στο νοσοκομείο Παίδων “Η Αγία Σοφία” σε υπήρξαν μόνο 4 περιπτώσεις γλοιοβλαστώματος [5]. Η συμπτωματολογία εξαρτάται από την εντόπιση του νεοπλάσματος με συχνότερα αυτά της ενδοκράνιας υπέρτασης (κεφαλαλγία, έμετοι) και εστιακή νευρολογική σημειολογία από καταστροφή νευρικού ιστού, από την πίεση της ίδιας της εξεργασίας, από το περιεστιάσιο οίδημα ή και από αιμορραγία της εξεργασίας. Επιληπτικές κρίσεις

μπορεί να υπάρχουν [6]. Όταν ο όγκος εντοπίζεται στον μετωπιαίο λοβό η συμπτωματολογία συνήθως αφορά διαταραχές προσωπικότητας (αβουλία, άνοια), σφιγκτηριακές διαταραχές (ακράτεια) και διαταραχές του λόγου (αφασία εκπομπής), στο βρεγματικό λοβό υπαισθησία-αναισθησία, αιμωδίες, αγνωσίες-απραξίες καθώς και κινητικά ελλείμματα από επέκταση οιδήματος ή διήθηση, στον ινιακό λοβό ημιανοψίες και οπτικές ψευδαισθήσεις και στον κροταφικό λοβό πιο συχνά επιληπτικές κρίσεις, διαταραχές μνήμης, οσφρητικές και ακουστικές ψευδαισθήσεις και διαταραχές του λόγου (αφασία πρόσληψης). Όταν ο όγκος εντοπίζεται στον οπίσθιο κρανιακό βόθρο συμπτώματα μπορεί να είναι συμπτώματα υδροκεφάλου, οίδημα οπτικών θηλών, αταξία άκρων (ημισφαίρια) / κορμού (σκώληκας), νυσταγμός, δυσμετρία, δυσδιαδοχοκινησία, πάρεση απαγωγού και διπλωπία, δυσκαταποσία, διαπυρηνική οφθαλμοπληγία, ναυτία, έμετος, ίλιγγος, διαταραχές του καρδιακού ρυθμού και της αναπνοής [6].

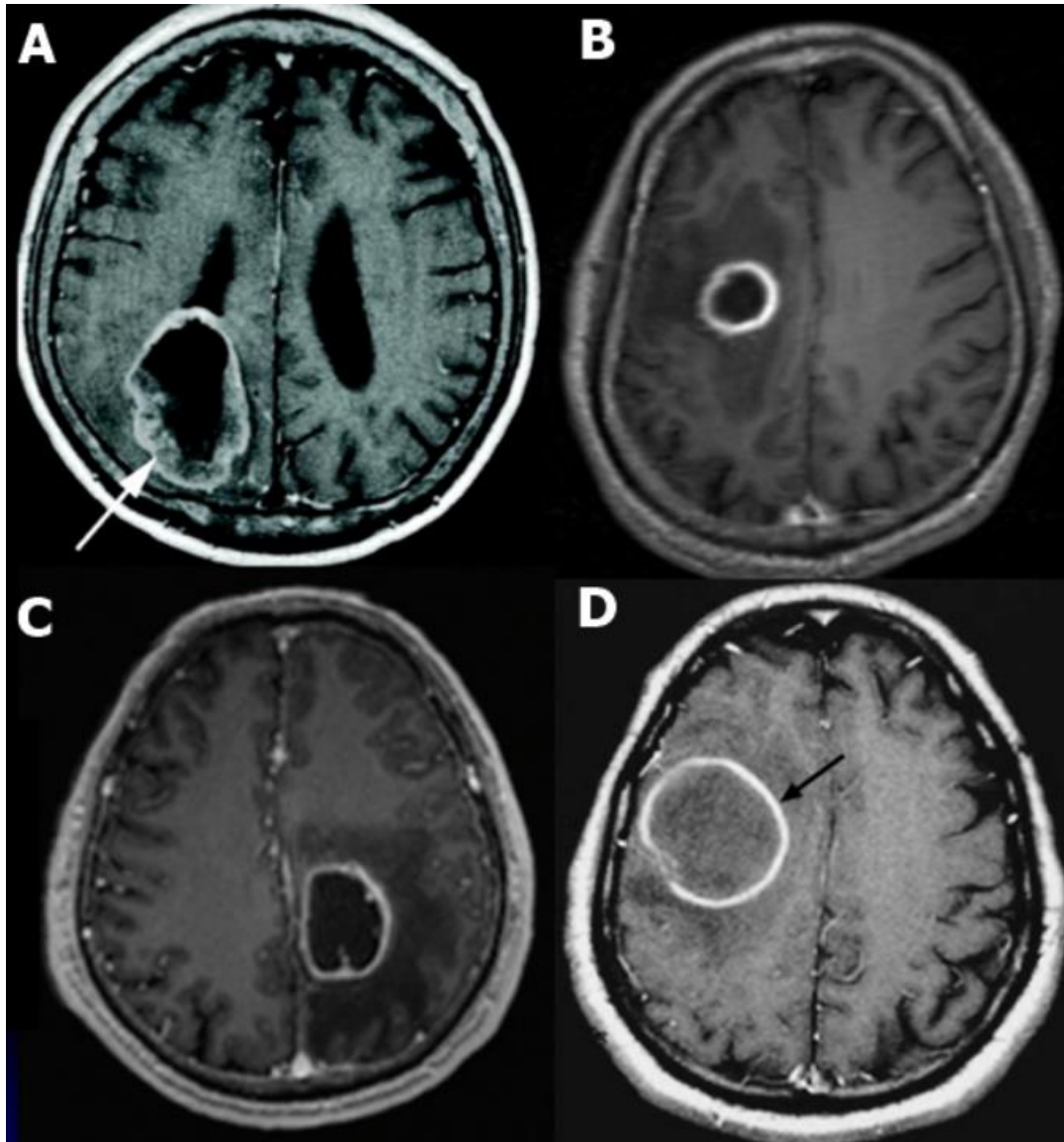
### **1.3 Απεικονιστικές εξετάσεις**

Εξέταση εκλογής για την ανάδειξη του γλοιοβλαστώματος είναι η μαγνητική τομογραφία [7]. Η τυπική εικόνα του γλοιοβλαστώματος είναι αυτή μιας χωροκατακτητικής βλάβης του εγκεφάλου με δακτυλιοειδή πρόσληψη σκιαγραφικού και περιεσσιακό οίδημα. [Εικόνα 2]



Εικόνα 2. Περίπτωση γλιοβλαστώματος με περιεστιακό οίδημα και δακτυλιοειδή πρόσληψη σκιαγραφικού.

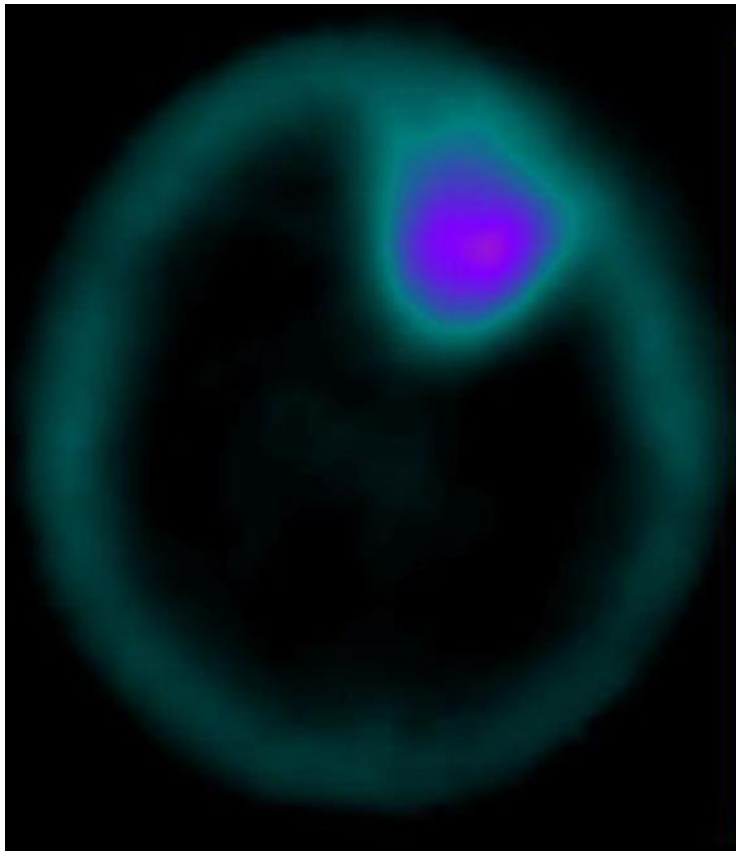
Η εικόνα στη μαγνητική τομογραφία δεν είναι διαφοροδιαγνωστική μιας και μπορεί να μιμείται αυτή του πρωτοπαθούς λεμφώματος του ΚΝΣ, μιας μεταστατικής βλάβης, ενός αποστήματος καθώς και της ογκόμορφης πολλαπλής σκλήρυνσης [Εικόνα 3].



Εικόνα 3. Α. Περίπτωση μετάστασης, αποστήματος (B), γλοιοβλαστώματος (C) και λεμφώματος του ΚΝΣ (D).

Αναφορικά με τις νεότερες τεχνικές της μαγνητικής τομογραφίας, αυτές αφορούν την αιμάτωση, διάχυση και φασματοσκοπία, και χρησιμοποιούνται, κυρίως, για χωροκατακτητικές εξεργασίες του εγκεφάλου τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά [8]. Η Πυρηνική Ιατρική με τις τεχνικές της τομογραφικής απεικόνισης εκπομπής μονήρους φωτονίου (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT), και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου (Positron Emission Tomography, PET) μπορούν

επίσης να προσφέρουν για τη στόχευση σε στερεοτακτική βιοψία ενός όγκου εγκεφάλου, για τον προσδιορισμό της φύσης μιας βλάβης, του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού γλοιωμάτων και μηνιγγιωμάτων, της διάκρισης υποτροπής γλιώματος από ακτινονέκρωση, τη διάκριση νεοπλασματικής από μη νεοπλασματικής αιτιολογίας ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας και τον προσδιορισμό της πρόγνωσης γλοιοβλαστώματος [Εικόνα 4] [9-11].



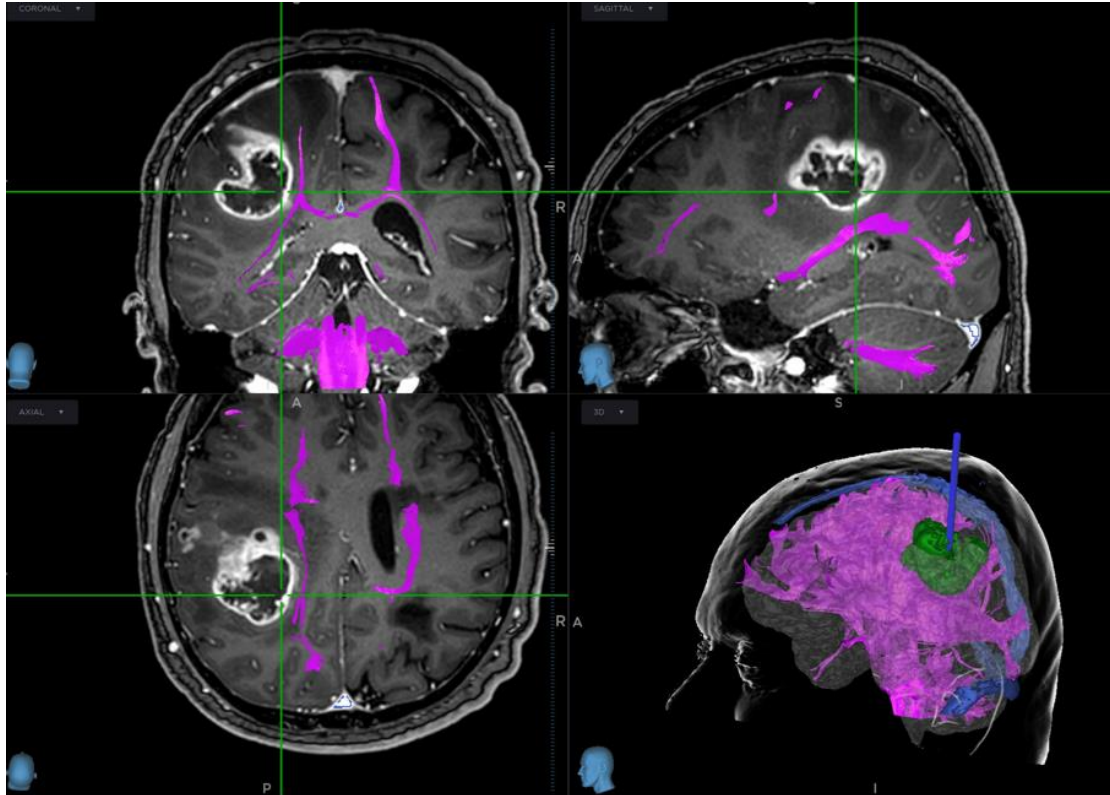
Εικόνα 4. SPECT εγκεφάλου. Υψηλή πρόσληψη ραδιοφαρμάκου αριστερά μετωπιαία σε ασθενή με γλοιοβλάστωμα στην περιοχή αυτή.

#### **1.4 Θεραπεία - Πρόγνωση**

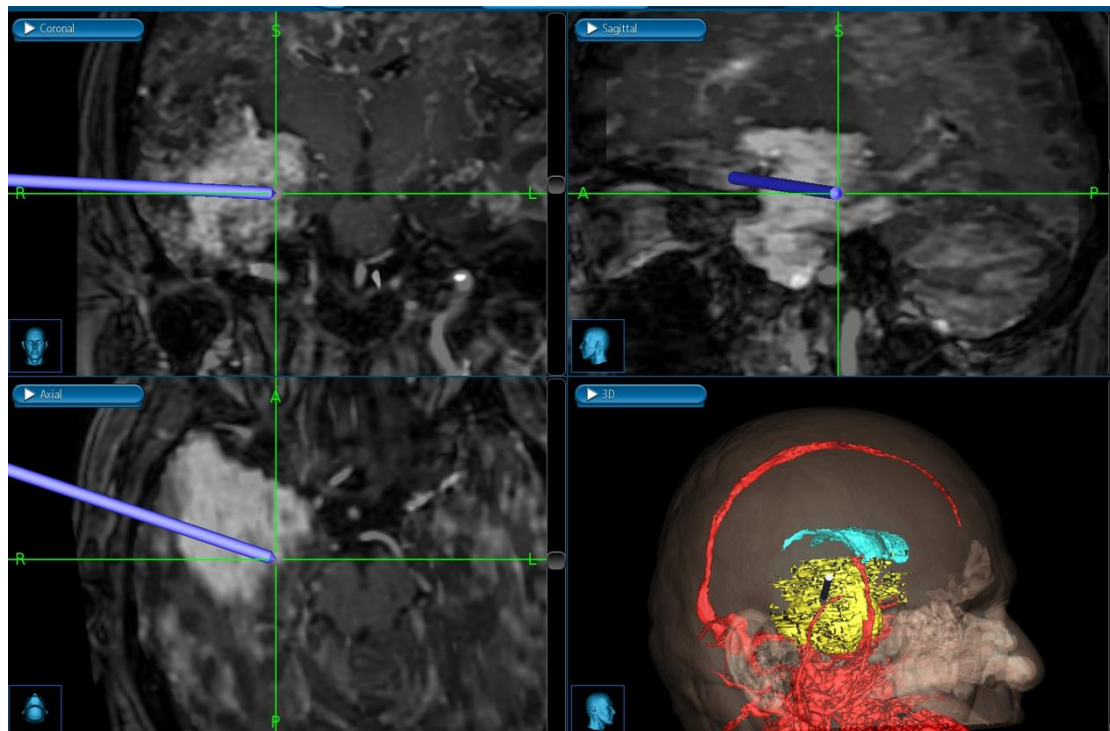
Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου αποτελεί την πρωταρχική θεραπεία, ωστόσο ήδη κατά τη στιγμή της διάγνωσης καρκινικά κύτταρα ανευρίσκονται και στο αντίθετο ημισφαίριο. Έτσι η χειρουργική αφαίρεση σκοπό έχει την μακροσκοπική αφαίρεση



του νεοπλασματικού ιστού χωρίς αν δύναται να προκληθούν μόνιμες νευρολογικές βλάβες στον ασθενή [6]. Σε αυτό προσφέρουν νεότερες τεχνολογίες όπως η χρήση νευροπλοηγού διεγχειρητικά με δυνατότητες δεσμιδογραφίας. Έτσι μειώνονται οι πιθανότητες μόνιμου μετεγχειρητικού νευρολογικού ελλείματος [Εικόνα 5,6].



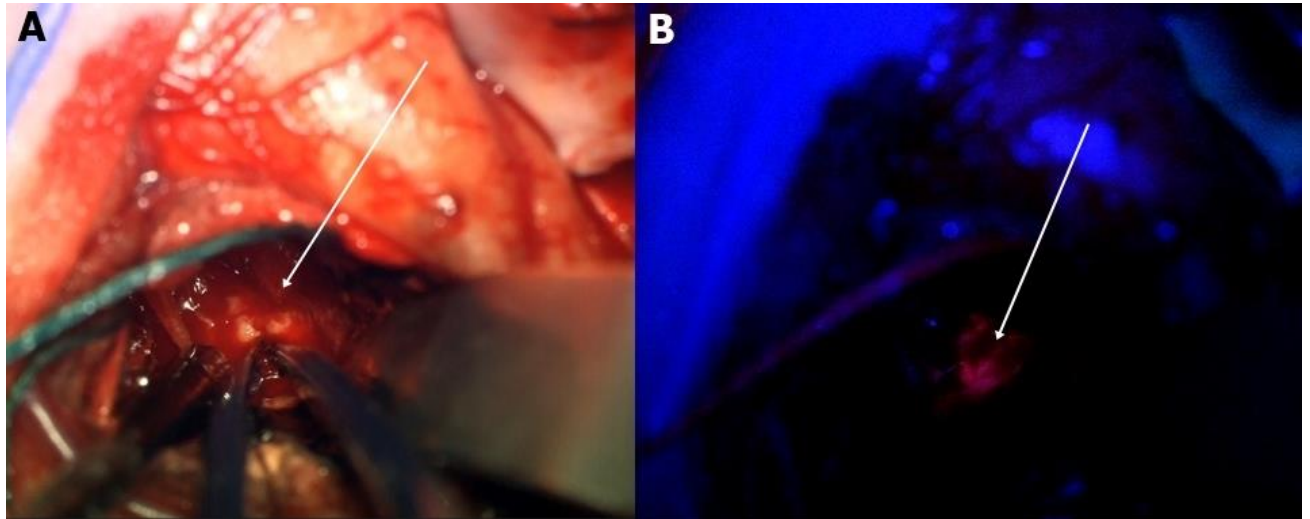
Εικόνα 5. Ασθενής 54 ετών με γλοιοβλάστωμα ΔΕ μετωποβρεγματικά. Διεγχειρητική χρήση νευροπλοηγού με δεσμιδογραφία (Medtronic).



Εικόνα 6. Διεγχειρητική εικόνα νευροπλοηγού (Medtronic) σε ασθενή με γλοίωμα δεξιού κροταφικού λοβού.

Διεγχειρητικά είναι δύσκολος ο προσδιορισμός των ορίων του όγκου. Ο βαθμός εξαίρεσης έχει προγνωστική σημασία. Τεχνικές όπως ο διεγχειρητικός μαγνήτης και η χρήση φθορίζουσων ουσιών που προσλαμβάνονται από τον όγκο μπορούν να βοηθήσουν στην όσο το δυνατόν μεγαλύτερου βαθμού εξαίρεση [Εικόνα 7] [12].

Μετά την χειρουργική εξαίρεση ακολουθεί χημειο-ακτινοθεραπεία [6].



Εικόνα 7. Χρήση αμινολεβουλινικού οξέως (5-aminolevulinic acid – 5-ALA, GLIOLAN) κατά την εξαίρεση γλοιοβλαστώματος. Με τη χρήση του κλασικού φωτισμού του μικροσκοπίου δεν είναι ευχερής η αναγνώριση του νεοπλασματικού ιστού (Α). Με τη χρήση 5-ALA ο νεοπλασματικός ιστός αναγνωρίζεται να φθορίζει έντονα (Β).

Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία δρουν επικουρικά, βελτιώνοντας το προσδόκιμο ζωής των ασθενών [13]. Το χημειοθεραπευτικό φάρμακο πρώτης γραμμής που χρησιμοποιείται έναντι του γλοιοβλαστώματος, είναι η τεμοζολομίδη (TMZ). Η TMZ προκαλεί μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση αλλοιώνει το DNA και ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης. Μερικοί όγκοι χρησιμοποιώντας το ένζυμο MGMT (Ο6-μεθύλ,-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση) επιδιορθώνουν τη αλλοίωση του DNA και παρουσιάζουν αντίσταση στο TMZ. Γι' αυτό ύπαρξη φυσιολογικής MGMT σε γλοίωμα προδηλώνει ανθεκτικότητα σε θεραπεία με TMZ. Καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία υπάρχει όταν το ένζυμο MGMT είναι ανενεργό, όταν υπάρχουν μεταλλάξεις των γονιδίων *IDH1/2* (Isocitrate dehydrogenase, καταλύτες της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης του ισοκιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ) και σε Co-deletion των χρωμοσωμάτων 1p/19q. Ωστόσο, η

TMZ προσφέρει αύξηση της επιβίωσης για λίγες βδομάδες [13]. Στο 95% των ασθενών θα υποτροπιάσει το νεόπλασμα εντός 7-9 μήνες μετεγχειρητικά. Σε υποτροπή έχουν δοκιμαστεί αναστολέας αγγειογένεσης καθώς και η Irinotecan (αναστολέας της DNA τοποϊσομεράσης I) [14,15]. Οι αιτίες αποτυχίας στη δημιουργία αποτελεσματικών φαρμάκων για γλοιώματα οφείλονται στο γεγονός ότι τα διηθητικά κύτταρα των γλοιωμάτων ευρίσκονται προστατευμένα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επίσης, υπάρχει γενικά υποτίμηση της σημασίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων υποψηφίων φαρμάκων (μέγεθος, φορτίο, και υδροφιλία) για τη παθητική πρόσβαση στα κακοήθη κύτταρα και τέλος η ετερογένεια στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και πρωτεϊνών στα κακοήθη κύτταρα.

Η ανοσοθεραπεία έχει επίσης δοκιμαστεί. Στο γλοιοβλαστώματα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού απενεργοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο στα γλοιοβλαστώματα εκφράζουν συχνά το μόριο PD-L1 και ιντερλευκίνη 17, που αδρανοποιούν την επίθεση στον όγκο από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, με αντικρουόμενα δεδομένα για τη συσχέτισή τους με την επιβίωση των ασθενών. Οι ανοσοκατασταλτικές πρωτεΐνες αυτές στοχεύονται από τους αναστολείς του PDL1, οι οποίοι δεν έχουν ως τώρα καταφέρει να φέρουν τα αποτελέσματα που έχουμε συνηθίσει από άλλους όγκους και στο γλοιοβλάστωμα [16]. Το pembrolizumab είναι η πρώτη ανοσοθεραπεία (anti-PD1 παράγοντας) που επιτυγχάνει αύξηση της συνολικής επιβίωσης ως θεραπεία σε ασθενείς με υποτροπή γλοιοβλαστώματος. Το pembrolizumab εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του PD-1 και των συνδετών του (των PD-L1 και PD-L2) ενεργοποιώντας έτσι τα T-λεμφοκύτταρα και αυξάνοντας τα επίπεδα ιντερφερόνης-γ γεγονός που μπορεί να έχει επίδραση τόσο στα νεοπλασματικά αλλά και τα υγιή κύτταρα [17]. Σε μελέτη με 35

ασθενείς με υποτροπή γλοιοβλαστώματος η χορήγηση pembrolizumab πριν το χειρουργείο οδήγησε σε μεγαλύτερη επιβίωση (13.7 vs 7.5 μήνες). Εμβόλια έχουν επίσης δοκιμαστεί στο γλοιοβλάστωμα. Τα εμβόλια συνδυάζουν πεπτίδια με ανοσοδιεγερτικά μόρια [18]. Υπάρχει ωστόσο δυσκολία στο να βρεθεί μία πρωτεΐνη που θα προκαλέσει ανοσιακή αντίδραση έναντι του όγκου, αλλά όχι στον περιβάλλοντα υγιή ιστό. Μία προσέγγιση για να διεγερθεί το κατασταλμένο ανοσιακό περιβάλλον των όγκων εγκεφάλου είναι και η προσέγγιση των ογκολυτικών ιών. Οι ογκολυτικοί ιοί εισχωρούν στον όγκο και δημιουργούν μια κατάσταση που αναγνωρίζεται ως λοίμωξη και άρα διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένας τέτοιος ιός βασισμένος στον ιό του έρπητα, ενώ ένας άλλος είναι βασισμένος στον ιό της πολιομυελίτιδας [19]. Ένας ογκολυτικός ιός με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στηρίζεται στον αδενοϊό Δ 24 [20].

## **2. Μοριακοί υποτύποι γλοιοβλαστώματος**

### **2.1 Γλοιοβλάστωμα και μοριακοί υπότυποι**

Το γλοιοβλάστωμα είναι ένα εξαιρετικά ετερογενές νεόπλασμα. Υπάρχει ετερογένεια στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και πρωτεϊνών στα κακοήθη κύτταρα. Διαφορετικά κύτταρα μέσα στον ίδιο όγκο παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια π.χ. *p53* ή *Rb* ή *p16*. Πολλαπλές μελέτες εστιάζονται στη διερεύνηση του μοριακού υποβάθρου του γλοιοβλαστώματος, με βάση το μεταγραφικό προφίλ γονιδίων, γενετικές αλλαγές/μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλαγές (μεθυλίωση του DNA). Η γνώση αυτών των μοριακών χαρακτηριστικών μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην προσπάθεια για στοχευμένη θεραπεία [21].

Αναφορικά με πιθανούς μοριακούς υπότυπους μελέτη του 2006 διέκρινε στο γλοιοβλάστωμα τρεις βασικούς υποτύπους: τον προ-νευρικό (proneural), τον παραγωγικό (proliferative) και των μεσεγχυματικό (mesenchymal), με βάση τα

μοναδικά προφίλ έκφρασης mRNA 35 γονιδίων [22]. Αργότερα, και συγκεκριμένα το 2010, με βάση το προφίλ έκφρασης mRNA 840 γονιδίων, προτάθηκε από τους Verhaak και συν., η κατηγοριοποίηση του γλοιοβλαστώματος σε τέσσερις υποτύπους: τον νευρικό, τον κλασικό, τον μεσεγχευματικό και τον προνευρικό υπότυπο [23].

Πιο πρόσφατα, με την single-cell RNA-sequencing ανάλυση από πρωτογενή GBMs αποκαλύφθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ του ίδιου του υποτύπου. Επιπλέον, το προφίλ μεθυλίωσης DNA του προαγωγέα του TCGA GBM αποκάλυψε ότι ο πυρηνικός υποτύπος περιελάμβανε ένα διακριτό υποσύνολο με σχετιζόμενη με τον υποκινητή κυτοσίνη-φωσφορική-νησιωτική γουανίνη Η υπερμεθυλίωση χαρακτηρίζεται ως φαινότυπος μεθλωτή νησίδα γλοιώματος-CpG (G-CIMP). Τα G-CIMP γλοιοβλαστώματα είναι πιο συχνά δευτερογενή, δηλαδή προέρχονται από αποδιαφοροποίηση γλοιωμάτων χαμηλού βαθμού κακοήθειας ή υποτροπιάζοντα GBM και χαρακτηρίζονται από συχνές μεταλλάξεις στο *IDH1*, καλύτερη πρόγνωση, και μικρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση [24].

### 3. Κύρια μονοπάτια παθογένεσης στο γλοιοβλάστωμα

Στο γλοιοβλάστωμα, αλλαγή ή/και υπερέκφραση του Wnt, του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β), του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάση 2A (CDKN2A), του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), της φωσφατιδυλινοσιτολ-3-κινάση (PI3K)/AKT/στόχος ραπαμυκίνης σε θηλαστικά (mTOR) μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεση της νόσου και την επιθετική συμπεριφορά του όγκου. Έτσι, σε κυτταρικό επίπεδο, οι βασικές διεργασίες που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και εξέλιξη του

γλοιοβλαστώματος περιλαμβάνουν την απώλεια από το κύτταρο της δυνατότητας ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων, την επαγωγή της αγγειογένεσης, την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και την γενετική αστάθεια [25].

### **3.1 Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι**

Το Wnt είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη, την αναγέννηση και την ομοιόσταση, επιδρώντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την πολικότητα, τη διαφοροποίηση και την δραστηριότητα των βλαστοκυττάρων [26]. Η αυξημένη δραστηριότητα της οδού του Wnt μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία, καθώς και για την ανάπτυξη, την επιθετικότητα και τη δυνατότητα μετανάστευσης των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος. Ο EGFR (επίσης γνωστός ως ErbB1/HER1) είναι ένας τύπος υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK) που έχει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την προσκόλληση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων [27]. Η υπερέκφραση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) και των προσδετών τους είναι από τις πιο συχνές μεταβολές στην ογκογένεση του γλοιώματος. Τα RTKs αποτελούνται από μια διαμεμβρανική περιοχή, μια εξωκυτταρική περιοχή δέσμησης συνδέτη, μια ενδοκυτταρική περιοχή κινάσης τυροσίνης και υπολείμματα τυροσίνης που οδηγούν σε καθοδική ενεργοποίηση μετά τη φωσφορυλίωση τους. Λόγω μιας ποικιλίας μοριακών αλλαγών, όπως οι ογκογόνες μεταλλάξεις, η αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η γονιδιακή ενίσχυση ή οι επιγενετικές αλλαγές, τα υπερενεργοποιημένα RTKs μπορεί να συμβάλλουν στον ογκογόνο φαινότυπο [28].

Υπό κανονικές συνθήκες, ο TGF- $\beta$  είναι μια φλεγμονώδης οδός υπεύθυνη για την έκφραση της p21. Στα καρκινικά κύτταρα, ωστόσο, ο TGF- $\beta$  διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο [29]. Ο VEGF είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της ανάπτυξης των

ενδοθηλιακών κυττάρων και ένας βασικός ρυθμιστής της φυσιολογικής και παθολογικής ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων και της αγγειογένεσης [29].

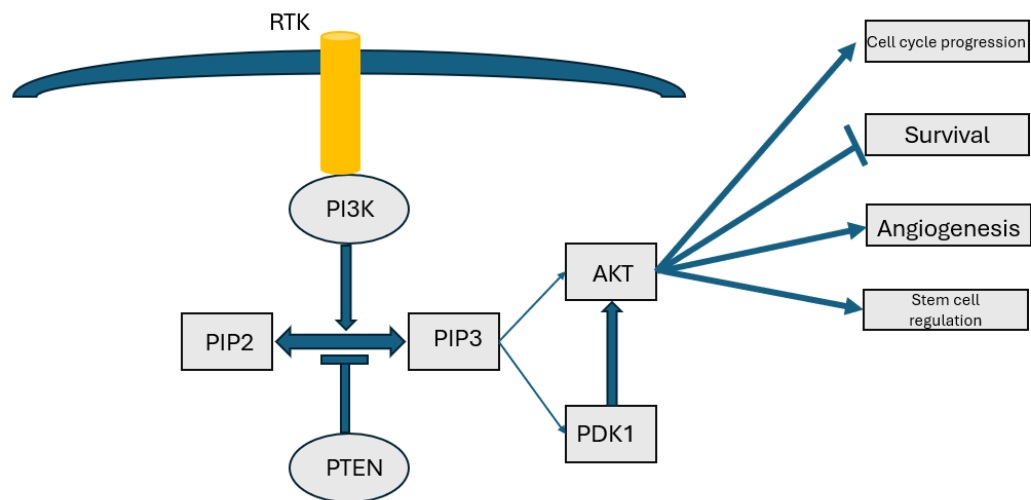
### **3.2 RAS/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι**

Η οδός σηματοδότησης RAS/MAPK παίζει επίσης κεντρικό ρόλο στη γλοιοματογένεση, ιδιαίτερα σε γλοιώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Ο καταρράκτης σηματοδότησης ξεκινά με το RAS και επεκτείνεται σε κύρια συστατικά όπως το BRAF, η εξωκυτταρική ρυθμιζόμενη πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο (MEK) και οι εξωκυτταρικές κινάσες που ρυθμίζονται από το σήμα (ERK), που προάγουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και αντι-αποπτωτικά γονίδια [30].

### **3.3 PI3K/AKT/PTEN σηματοδοτικό μονοπάτι**

Το μονοπάτι PI3K/AKT/PTEN, το οποίο εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός της γλυκόζης ή η κυτταρική επιβίωση εμπλέκεται στο γλοιοβλάστωμα. Το πρώτο στάδιο εντός της ενεργοποιημένης οδού είναι η 3-κινάσης της φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PI3K), η οποία φωσφορυλιώνει τη διφωσφορική φωσφατιδυλνινοσιτόλη σε τριφωσφορική (PIP2 έως PIP3). Κανονικά, το PTEN (ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης) εμποδίζει τη σηματοδότηση PIP3 και την ενεργοποίηση της AKT (πρωτεϊνική κινάση B), αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό [Εικόνα 8] [31]. Οι συχνές μεταλλάξεις PTEN στα γλοιοβλαστώματα οδηγούν σε διακοπή της ανασταλτικής δράσης και σε πλήρη ενεργοποίηση αυτής της οδού σηματοδότησης με το κύριο μόριο τελεστή της, την κινάση σερίνης/θρεονίνης mTOR (στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά). Το ίδιο το mTOR οδηγεί σε προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και της κυτταροσκελετικής οργάνωσης μέσω της ενεργοποίησης των πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, mTORC1 και mTORC2.





Εικόνα 8. Το Pten/PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι.

### 3.4 Σηματοδοτικό μονοπάτι p53

Η σηματοδότηση p53 παραμένει απαραίτητη για την αθανασία με την ενίσχυση του MDM2, το οποίο δεσμεύει το γονίδιο *TP53* και αναστέλλει τον ρυθμιστικό του ρόλο στις μεταλλάξεις. Η οδός σηματοδότησης p53-ARF-MDM2 απορρυθμίζεται στα 4/5 των ασθενών με γλοιοβλάστωμα και στο 94% των κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος [32]. Η συχνότητα εμφάνισης μετάλλαξης στο γονίδιο *TP53* δεν είναι ίδια στους διάφορους υπότυπους γλοιοβλαστώματος (54% στον προνευρικό, 32% στο μεσεγχυματικό και σχεδόν 0% στον κλασικό). Η απορρύθμιση του μονοπατιού αυτού σχετίζεται με σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, και η αναστολή της απόπτωσης. Η οδός της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι επίσης μεγάλης σημασίας για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του

πολλαπλασιασμού [33]. Η πρωτεΐνη Rb αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο από τη φάση G1 στη S του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της μίτωσης [33]. Αυτά τα δύο τελευταία μονοπάτια ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και η στοχευμένη αναστολή τους μπορεί να μετριάσει την διεισδυτικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων γλοιοβλαστώματος.

### **3.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Notch**

Η οδός σηματοδότησης Notch ρυθμίζει τη μετανάστευση των κυττάρων, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αυτοανανέωση και την ομοίωση. Αυτή η οδός αποτελείται από τέσσερις κυτταροπλασματικούς υποδοχείς (Notch 1-4) και τους αντίστοιχους συνδέτες τους, Jagged-1, Jagged-2 και DII 1-4. Το επίπεδο έκφρασης του Notch 1 σχετίζεται με την συνολική επιβίωση σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες, αστροκύτταρα, πρόδρομα/επενδυματικά και ενδοθηλιακά κύτταρα [34]. Η οδός σηματοδότησης Notch επίσης σχετίζεται και με την υποτροπή του όγκου. Η σηματοδότηση Notch μέσω των στοχευόμενων γονιδίων *Hes1/Hey1* θα μπορούσε να είναι ένας στόχος που επιδέχεται φαρμακευτική θεραπεία. Το Brontictuzumab (BRON) είναι το πρώτο εξανθρωπισμένο αντι-Notch 1 ανασταλτικό αντίσωμα για να μειώσει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [35].

### **3.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog**

Εκτός από το ότι είναι απαραίτητο τόσο για την εμβρυογένεση όσο και για την καρκινογένεση, το σύστημα σηματοδότησης Hedgehog (Hh) είναι επίσης σημαντικό για την ιστική επιδιόρθωση [36]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες δακτύλιου-ψευδαργύρου που συνδέονται με το ομόλογο ογκογονιδίου που σχετίζεται με το γλοιώμα (GLI1) είναι οι τελικοί τελεστές της οδού Hh στα γλοιώματα. Τα VEGFR1,

VEGF-A, VEGF-C, TEM7, HPSE, CD24 και CD44 είναι μεταξύ των στοχευόμενων γονιδίων που το tGLI1 ρυθμίζει, το οποίο με τη σειρά του προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, τη μετανάστευση, την εισβολή και την αγγειογένεση.

Ωστόσο, η πολυπλοκότητα αυτής της νεοπλασίας που οφείλεται μεταξύ άλλων στην υψηλή ετερογένεια, τόσο μεταξύ ασθενών που φέρουν όγκους ίδιου ιστολογικού τύπου (intertumoural heterogeneity), όσο και μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στον ίδιο ασθενή (intratumoural heterogeneity) καθιστά αδύνατη την θεώρηση του γλοιοβλαστώματος σαν μια ενιαία καρκινική οντότητα. Για το λόγο αυτό, η προηγούμενη κατηγοριοποίησή του σε υποτύπους με βάση τόσο ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όσο και μοριακούς/γενετικούς δείκτες κρίνεται απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση αυτής της νόσου, και τελικώς για την εύρεση πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων που θα αυξήσουν τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

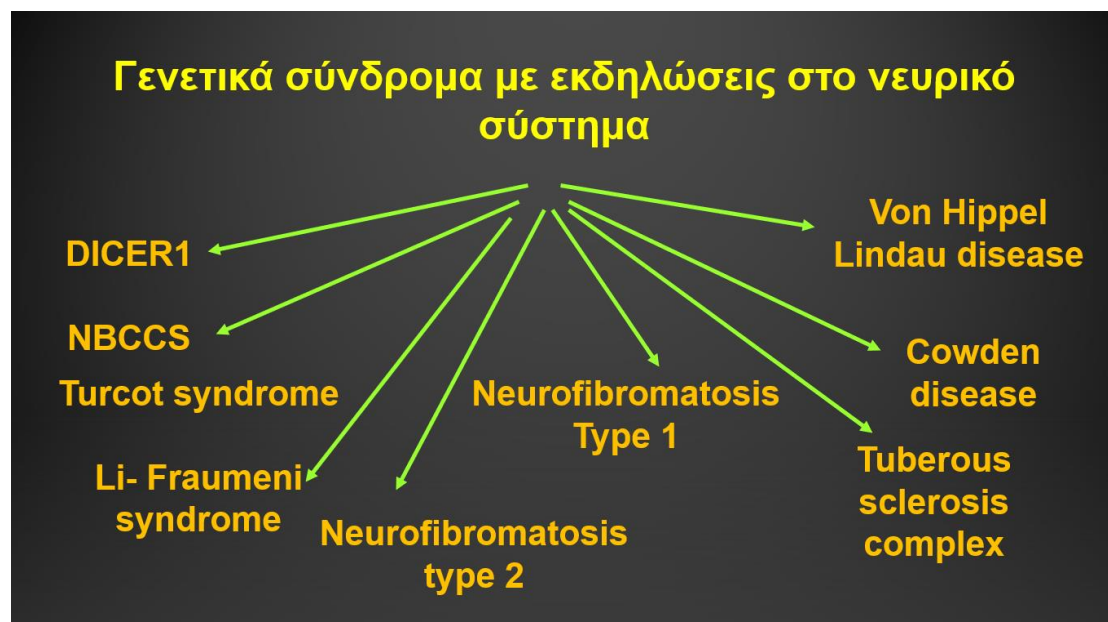
## 4. Γενετική

### 4.1 Γενετικές αλλοιώσεις στο γλοιοβλάστωμα

Οι γενετικές αλλοιώσεις αφορούν ανωμαλίες ή αλλαγές στον γενετικό κώδικα ενός οργανισμού. Στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος μπορεί να συμβούν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την κανονική λειτουργία των κυττάρων και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων. Σημαντικά γονίδια που σχετίζονται με το γλοιοβλάστωμα περιλαμβάνουν τα *TP53*, *PTEN* και *EGFR*, μεταξύ άλλων. Οι αλλοιώσεις σε αυτά τα γονίδια μπορεί να επηρεάσουν το κυτταρικό κύκλο και να οδηγήσουν σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό και δημιουργία όγκων [37].

## 4.2 Γενετικά σύνδρομα και νευρικό σύστημα

Διάφορα γενετικά σύνδρομα σχετίζονται με εκδηλώσεις στο νευρικό σύστημα όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9. Γενετικά σύνδρομα με εκδηλώσεις στο νευρικό σύστημα.

Αν και δεν υπάρχει τεκμηριωμένη μενδελική κληρονομικότητα στα γλοιώματα, υπάρχουν ισχυρές επιδημιολογικές ενδείξεις οικογενειακής προδιάθεσης αυτού του όγκου [38]. Τα οικογενή γλοιώματα εμφανίζονται σε περίπου 5% όλων των περιπτώσεων γλοιώματος, η πλειονότητα των οποίων σχετίζεται με νεοπλασματικά σύνδρομα. Δύο τέτοια σύνδρομα είναι η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και στο σύνδρομο Li Fraumeni.

## 4.3 Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Νόσος του von Recklinghausen)

Η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Νόσος του von Recklinghausen) παρουσιάζει αυτοσωματική επικρατή κληρονομικότητα, και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *NF1* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q11.2, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ογκοκατασταλτική δράση και πιο συγκεκριμένα μειωμένη αναστολή του

RAS σηματοδοτικού μονοπατιού. Η μετάλλαξη μπορεί είτε να προέρχεται από ένα προσβεβλημένο γονέα είτε περίπου στο 50% να είναι de novo και επηρεάζει 1/3.000 άτομα. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από νευροϊνώματα, πολλαπλές κηλίδες café-au-lait, οπτικά γλοιώματα, οστικές αλλοιώσεις και αμαρτώματα της ίριδας (οζίδια Lisch). Λιγότερο συχνά παρατηρούνται υψηλής κακοήθειας διάχυτα αστροκυτώματα και γλοιοβλάστωμα [Εικόνα 10].



Εικόνα 10. Νεοπλάσματα του ΚΝΣ σε NF1.

#### 4.4 Σύνδρομο Li-Fraumeni

Το σύνδρομο Li-Fraumeni αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1969 από τους Frederick Li και Joseph Fraumeni και επηρεάζει 1/5.000 με 1/20.000 άτομα [39]. Το σύνδρομο αυτό παρουσιάζει αυτοσωματική επικρατή κληρονομικότητα και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p13, που

κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p53. Το ογκοκατασταλτικό αυτό γονίδιο θεωρείται ως «ο φύλακας του γονιδιώματος». Οι μεταλλαγμένες μορφές της p53 εμπλέκονται σχεδόν στο 40% των περιπτώσεων καρκίνου. Η συχνότητα όγκων του νευρικού συστήματος σε μελέτη συνόλου 708 όγκων που περιγράφονται ως επιβεβαιωμένα κρούσματα είναι 13%. Το εξήντα τοις εκατό των όγκων ήταν αστροκυτταρικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου του χαμηλού βαθμού αστροκυτώματος, αναπλαστικό αστροκύτωμα και γλοιοβλάστωμα, ενώ όγκοι εγκεφάλου σε παιδιά περιελάμβαναν το μυελοβλάστωμα και λιγότερο συχνά όγκοι του χοριοειδούς πλέγματος.

Στο γλοιοβλάστωμα όπως προαναφέρθηκε παρατηρούνται μεταλλάξεις σε κοινά καρκινικά γονίδια, όπως το *TP53* και το *PTEN*, αλλά δεν έχουν προγνωστική σημασία. Στο γλοιοβλάστωμα έχουν επίσης εντοπιστεί σημειακές μεταλλάξεις του *EGFR*. Ο *EGFR*vIII στερείται 267 αμινοξέων στο εξωκυτταρικό τμήμα, με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργοποιημένος ο υποδοχέας χωρίς να χρειάζεται πλέον τον συνδέτη του EGF ώστε να ενεργοποιήσει το μονοπάτι. Το Phosphatase and tensin homologue located on chromosome 10 (10q23.3) (*PTEN*) αναγνωρίστηκε το 1997 ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Το *PTEN* βρέθηκε μεταλλαγμένο σε μεγάλο αριθμό νεοπλασμάτων σε υψηλή συχνότητα, συμπεριλαμβανομένων των όγκων του εγκεφάλου [40]. Μεταλλάξεις *PTEN* έχουν βρεθεί στο 20-40% των GBM, κυρίως στα πρωτογενή GBM. Απώλεια του *PTEN* σχετίζεται με αύξηση του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων και σχετίζεται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου πέρα από την φάση G1. Το *PTEN* επίσης έχει εμπλακεί στην αγγειογένεση, στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και έχει ρυθμιστικό ρόλο στα βλαστικά κύτταρα. Όχι πολύ συχνά έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις σε ορισμένα καρκινικά γονίδια, όπως τα γονίδια *BRAF* και *RAS*, στο γλοιοβλάστωμα, αδρανοποιητικές μεταλλάξεις και

διαγραφές έχουν εντοπιστεί στο ανασταλτικό τους ογκοκατασταλτικό γονίδιο *NF1*. Έχουν επίσης περιγραφεί μεταλλάξεις στα γονίδια *PIK3CA* και *PIK3R1*, που κωδικοποιούν, αντίστοιχα, την καταλυτική υπομονάδα PI3K p110α και τη ρυθμιστική υπομονάδα P85α [41].

#### **4.5 Ισοιτρική αφυδρογονάση 1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)**

Ένα ενδιαφέρον γονίδιο που βρέθηκε ότι περιέχει μεταλλάξεις στο γλοιοβλάστωμα είναι της ισοιτρικής αφυδρογονάσης 1 (isocitrate dehydrogenase 1, *IDH1*), το οποίο κωδικοποιεί το IDH1 και εμπλέκεται στον ενεργειακό μεταβολισμό [42]. Η ισοιτρική αφυδρογονάση 1 είναι ένα μεταβολικό ένζυμο που μετατρέπει το ισοκιτρικό σε α-κετογλουταρικό (α-KG) μέσω οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης χρησιμοποιώντας NADP<sup>+</sup> ως δέκτη ηλεκτρονίων και παράγοντας NADPH. Σε παρουσία υποξίας, το IDH1 καταλύει την αντίστροφη αντίδραση, μετατρέποντας το α-KG σε ισοκιτρικό άλας το οποίο μπορεί εν συνεχεία να μετατραπεί σε ακετυλο-CoA για μεταβολισμό λιπιδίων και πολλές άλλες βιοχημικές αντιδράσεις. Το 90% των μεταλλάξεων *IDH1* αφορούν το εξόνιο 4 στο κωδικόνιο 132, αντικαθιστώντας την αργινίνη με ιστιδίνη (R132H). Από το υπόλοιπο 10% των μεταλλάξεων *IDH1*, το 4,7% οφείλεται στην αντικατάσταση της αργινίνης με κυστεΐνη (R132C), 2,1% με γλυκίνη (R132G), 1,7% με σερίνη (R132S), 0,8% με λευκίνη (R132L) και 0,3% με γλουταμίνη (R132Q).

Αυτό το γονίδιο δείχνει διαφορετική έκφραση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς γλοιοβλαστώματος, ενώ η απώλεια *PTEN*, η ενίσχυση *EGFR* και η απώλεια ετεροζυγωτικότητας (LOH) του χρωμοσώματος 10 σχετίζονται με πρωτογενές γλοιοβλάστωμα και μετάλλαξη *ATRX*, απώλεια p53 και LOH του χρωμοσώματος 19 είναι κοινές στο δευτερογενές γλοιοβλάστωμα. Η μετάλλαξη *IDH1* προβλέπει το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα καλύτερα από ό,τι αυτές οι άλλες μεταλλάξεις

προβλέπουν τον αντίστοιχο υποτύπο γλοιοβλαστώματος τους. Πράγματι, οι μεταλλάξεις *IDH1* έχουν εντοπιστεί κυρίως στο δευτερογενές γλοιοβλάστωμα και σε γλοιώματα χαμηλού βαθμού, με μεταλλάξεις σε περισσότερο από το 70% των περιπτώσεων. Εντοπίζονται μόνο σποραδικά στο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα. Επειδή οι ασθενείς με πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα μεταλλαγμένο από *IDH1* είναι γενικά νεότεροι και έχουν μεγαλύτερη διάμεση επιβίωση και wild-type *EGFR*, που είναι χαρακτηριστικά του δευτεροπαθούς γλοιοβλαστώματος, υποτίθεται ότι πρόκειται στην πραγματικότητα για δευτερογενή γλοιοβλαστώματα για τα οποία δεν υπάρχουν ιστολογικά στοιχεία εξέλιξης από λιγότερο κακοήθη γλοιώματα. Επομένως, η μετάλλαξη *IDH1* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση του πρωτοπαθούς από το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα [43].

#### **4.6 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphism – SNP – SNP's)**

Από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study–GWAS) πολλοί μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphism – SNP – SNP's) σχετίστηκαν με τα γλοιώματα. Σε μελέτη 590 ασθενών με γλοιοβλάστωμα ο διάμεσος χρόνος επιβίωσης ήταν 22,63 μήνες. Μεταξύ αυτών των 590 ασθενών με GBM, οι 202 είχαν μικρή επιβίωση και οι 97 μακρά επιβίωση (52 επιβίωσαν  $\geq 5$  χρόνια). Η διάμεση επιβίωση ήταν 7,8 και 76,1 μήνες σε αυτούς με μικρή και μεγάλη επιβίωση αντίστοιχα. Βρέθηκαν ότι τα *LIG4* rs7325927, *BTBD2* rs11670188, *RGS22* rs4734443, και στο χρωμόσωμα 3 rs13099725 SNPs σχετίζονται με μικρή επιβίωση, ενώ τα *RTEL1* rs2297440 και rs6010620 σχετίζονται με αυξημένη επιβίωση. Οι μεγαλύτεροι ασθενείς (> 50 ετών) με παραλλαγή τύπου *LIG4* rs7325927 εμφάνισαν τη χειρότερη πρόγνωση. ενώ νεαροί



ασθενείς ( $\leq 50$  ετών) με συνδυασμένο τύπο παραλλαγής RTEL1 rs2297440 και HMGA2 rs1563834 είχαν την καλύτερη πρόγνωση [4].

## 5.Επιγενετική

### 5.1 Επιγενετική και γλοιοβλάστωμα

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1940 από τον Conrad Waddington ως η αιτιώδης αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων και των τελικών τους προϊόντων που επιτρέπουν τη φαινοτυπική έκφραση [44]. Αν και μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές τροποποιημένες παραλλαγές του ορισμού της επιγενετικής, φαίνεται πως ο πλέον αποδεκτός ορισμός προσδιορίζει την επιγενετική ως το σύνολο των κληρονομήσιμων αλλαγών του φαινοτύπου που προκύπτουν από μοριακές αλλαγές οι οποίες δεν αφορούν την αλληλουχία του γενετικού υλικού. Έτσι, λοιπόν, η επιγενετική έρχεται να αναγνωρίσει την υπό προϋποθέσεις δυνατότητα απόκτησης και διαγενεακής μεταβίβασης φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν των μεταλλάξεων [45].

Η μεταβίβαση των επιγενετικών πληροφοριών θεωρήθηκε, αρχικά, πως περιορίζεται στις κυτταρικές μιτώσεις, είναι όμως πλέον γνωστό πως οι επιγενετικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα και στους μειωτικούς κύκλους και αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες τόσο της μείωσης όσο και της σπερματογένεσης, μεταβιβάζοντας με αυτό τον τρόπο τις πληροφορίες από γενιά σε γενιά [46].

Η επιγενετική στους ευκαρυώτες σχετίζεται με την οργάνωση του γενετικού υλικού σε χρωματίνη, μια δυναμική και περίπλοκη δομή αποτελούμενη κατ' εξοχήν από DNA και πρωτεΐνες – ιστόνες και μη ιστόνες. Βασική δομική και λειτουργική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από 146 ζεύγη βάσεων DNA που περιτυλίγουν ένα οκταμερέςιστονών (2 μόρια από καθεμία εκ των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4). Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες που σε ουδέτερο

PH εμφανίζονται θετικά φορτισμένες. Και οι τέσσερις πυρηνικές ιστόνες έχουν μια καλά συντηρημένη - εξελικτικά – κεντρική επικράτεια, η οποία διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αναδίπλωσή τους (Histone Fold Domain – HFD). Με τη μορφή ετεροδιμερών H2A-H2B και H3-H4 δημιουργούν τον υδρόφοβο πυρήνα του νουκλεοσώματος ενώ τα θετικά φορτισμένα αμινοτελικά άκρα των ιστονών προβάλλουν εξωτερικά του συμπλόκου. Εκτός από τις κλασικές ιστόνες έχουν αναφερθεί και αρκετές κυρίως δομικές παραλλαγές, κάποιες εκ των οποίων είναι ειδικές συγκεκριμένων ιστών [47]. Η δομή του νουκλεοσώματος ολοκληρώνεται από μια πέμπτη ιστόνη πρωτεΐνη, την H1 η οποία είναι πλούσια σε λυσίνη και προσδένεται στα σημεία εισόδου και εξόδου του γενετικού υλικού από τον πυρήνα του συμπλόκου, προστατεύοντας το μεταξύ των νουκλεοσωμάτων συνδετικό DNA (linkerDNA) [48]. Έτσι, στην απλούστερη μορφή της, η χρωματίζει θυμίζει την εικόνα που έχουν οι χάντρες πάνω σε ένα κομπολόι [49]. Παρούσες είναι επίσης και συνοδές πρωτεΐνες των ιστονών, που συμβάλλουν στην συγκρότηση της χρωματίνης. Υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης της χρωματίνης σε επόμενα στάδια, επιτρέπουν το γενετικό υλικό να διατάσσεται υπό μορφή χρωμοσωμάτων στον συγκριτικά πολύ μικρότερο κυτταρικό πυρήνα.

Τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά, η χρωματίνη μπορεί να διακριθεί στην πυκνά διαμορφωμένη, πτωχή σε γονίδια και μεταγραφικά ανενεργή ετεροχρωματίνη και στην αραιή, πλούσια σε γονίδια και μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία οργάνωσης της ευχρωματίνης και της ετεροχρωματίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σταθερότητα του γονιδιώματος, τον κυτταρικό κύκλο και εν γένει την κυτταρική λειτουργία [50].

Η δυναμική δομή της χρωματίνης, αν και ανεξάρτητη από την αλληλουχία βάσεων του γενετικού υλικού, εδράζεται πάνω στο γενετικό κώδικα και, τελικά, είναι και αυτή κληρονομήσιμη. Το συνδυαστικό αυτό μοτίβο των επιγενετικών τροποποιήσεων αποτελεί έναν «επιγενετικό κώδικα», ο οποίος διαμορφώνει μοτίβα γονιδιακής έκφρασης επιτρέποντας ή περιορίζοντας το μεταγραφικό δυναμικό του γονιδιώματος. Ο κώδικας αυτός συντάσσεται από εξειδικευμένα ένζυμα τροποποίησης θέσης/ αλληλουχίας και ερμηνεύεται από μόρια – τελεστές που μεσολαβούν στο σχηματισμό δομών χρωματίνης υψηλότερης τάξης. Το σύνολο των κληρονομήσιμων τροποποιήσεων που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να είναι απότοκος μεταβολών της αλληλουχίας του γενετικού υλικού ονομάζονται επιγένωμα [51]. Γίνεται, επομένως, σαφές πως η επιγενετική διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε μια σειρά φαινομένων: τη γονιδιακή έκφραση [52], την αντιγραφή [53] και την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού [54], την κυτταρική διαφοροποίηση [55] και την ανάπτυξη βλαστοκυττάρων [56].

## 6. Επιγενετικοί Μηχανισμοί

### 6.1 Μεθυλίωση DNA

Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζεται ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ μιας μεθυλομάδας από S-Αδενοσυλο-Μεθειονίνη (S-adenosyl-methionine) στον άνθρακα στη θέση 5 στο δακτύλιο της κυτοσίνης, μπορεί δε να συμβεί και στους δακτυλίους της αδενίνης ή της θυμίνης [57] (Εικόνα 1Α). Μερικές φορές, μια μεθυλομάδα προσκολλάται σε έναν από τους «κλώνους» του DNA. Το κύτταρο δεν μπορεί πλέον να διαβάσει το τμήμα του DNA στο οποίο έχει προσκολληθεί η

μεθυλομάδα, γι' αυτό αγνοεί τις γενετικές εντολές που περιέχονται σε αυτό τον κλώνο. Ουσιαστικά, ένα ή περισσότερα γονίδια έχουν αποσιωπηθεί. Αυτή η διεργασία είναι δυναμική και μπορεί να αντιστραφεί. Αυτή τη στιγμή, μερικά κύτταρα στο σώμα μας πεθαίνουν ενώ άλλα αναπαράγονται. Μπορεί την προηγούμενη εβδομάδα η πλειονότητα των κυττάρων μας να ήταν μεθυλιωμένη, οπότε τα «φιμωμένα γονίδια» να ήταν αδρανή. Μπορεί όμως αυτή την εβδομάδα, λόγω μιας αλλαγής στη διατροφή μας ή στο επίπεδο του στρες στη ζωή μας, τα επίπεδα μεθυλίωσης να μειώθηκαν ή να αυξήθηκαν και τα γονίδια που επάγουν την ογκογένεση ή συγκρατούν το λίπος να είναι πάλι ενεργά [58].

Υπάρχουν περιοχές του DNA που έχουν υψηλότερη συγκέντρωση των CpG θέσεων (> 60%) αυτές οι περιοχές ονομάζονται νησίδες (islands) CpG. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει συνήθως σε δινουκλεοτίδια CpG (CpG islands), όπου μια κυτοσίνη ακολουθείται από μια γουανίνη. Τα νησίδα CpG συνίστανται από 300-3000 ζεύγη βάσεων, αποτελούν περίπου το 1-2% του γονιδιώματος και τυπικά βρίσκονται σχεδόν στο 40% των υποκινητών των γονιδίων. Τα περισσότερα νησίδα CpG είναι μη μεθυλιωμένα σε φυσιολογικά κύτταρα [59]. Η διαδικασία μεθυλίωσης διευκολύνεται από μια DNA μεθυλοτρανσφεραση (DNMT) (Εικόνα 11B). Οι μεθυλοτρανσφεράσες DNA (DNMTs) είναι τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα τόσο για την εγκατάσταση όσο και για την διατήρηση της κυτταρικής μεθυλίωσης του DNA. Τα DNMTs έχουν μία ρυθμιστική περιοχή στο N-τελικό και μια καταλυτική περιοχή στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης [60]. Όλες οι μεθυλοτρανσφεράσες χρησιμοποιούν ένα κοινό καταλυτικό μηχανισμό και χρησιμοποιούν τον συμπαράγοντα AdoMet (S-adenosylmethionine) ως πηγή του μεθυλίου [61]. Τα DNMTs ταξινομούνται σε εκείνα που γενικά ρυθμίζουν την de novo μεθυλίωση των δινουκλεοτιδίων CpG (DNMT3a / b) και εκείνων που αφορούν τη διατήρηση της καθιερωμένης

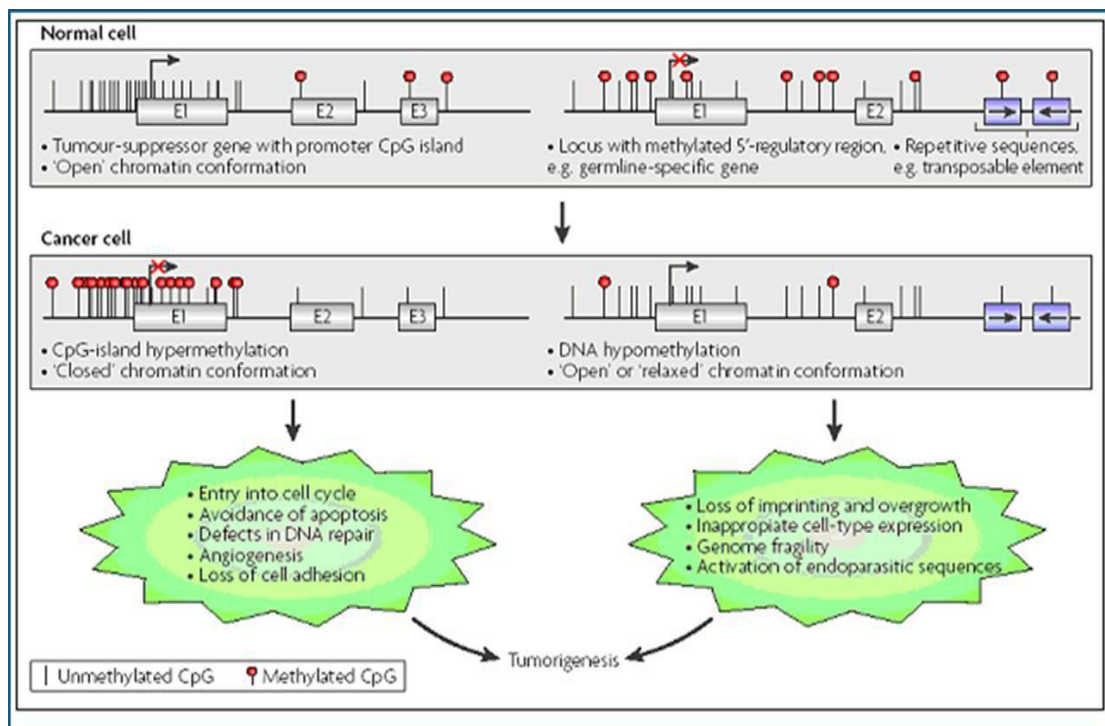
κατάστασης (maintenance) της μεθυλίωσης, το DNMT1. Οι τρεις DNA methyltransferases που παρατηρούνται στα θηλαστικά, DNMT1, DNMT3a και DNMT3b κάνουν de novo μεθυλίωση [62,63].

Η μεθυλίωση του δινουκλεοτιδίου CpG σχετίζεται με την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA. Αυτή η αποσιώπηση μπορεί να μεταφερθεί σε πολλές γενιές κυττάρων. Στο γονιδίωμα ενός ενήλικου κυττάρου σπονδυλωτών, το 60-90% των κυτοσινών στα δινουκλεοτίδια CpG είναι μεθυλιωμένα με μεθυλτρανσφεράση DNA και οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες υφίστανται απαμίνωση, με αποτέλεσμα την μετάβαση της κυτοσίνης σε θυμίνη [64]. Η υπερμεθυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 1B). Μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σχηματίζουν ομάδες στην 5' ρυθμιστική περιοχή ενεργών γονιδίων (CG νησίδα - CG islands). Η Μεθυλίωση του DNA (σχηματισμός νησιδίων 5mCpG) οδηγεί σε απενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων [65].

Η DNA μεθυλτρανσφεράση DNMT1 και αρκετές πρωτεΐνες δέσμευσης με μεθυλ-CpG, όπως οι MeCP2, MBD2 και MBD3, συνδέονται με αποακετυλάση ιστόνης (HDAC-histone deacetylase). Οι Πρωτεΐνες HDAC (histone deacetylase), μια κατηγορία ενζύμων που απομακρύνουν τις ακετυλομάδες, προσελκύνονται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA και αποακετυλιώνουν τα αμινοξέα στην ιστόνη H3 λυσίνη 9 (H3-K9). Η Μεθυλίωση της H3-K9 σχετίζεται με το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης. Αυτές οι παρατηρήσεις συνδέουν τη μεθυλίωση του DNA με τις τροποποιήσεις της χρωματίνης.

Επίσης, πρωτεΐνες που αλλάζουν τη στερεοδομή του DNA προσελκύνονται μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA και προκαλούν συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής [66]. Η υπερμεθυλίωση

των υποκινητών αποτελεί μηχανισμό απενεργοποίησης των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Σε καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται υπερμεθυλίωση (απενεργοποίηση) των υποκινητών των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση στα νησίδα CpG σχετίζεται άμεσα με τον καρκίνο διότι μπορεί να αδρανοποιήσει τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, να επηρεάσει σημαντικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου, να επιδράσει στην επιδιόρθωση του DNA, και το μεταβολισμό των καρκινογόνων ουσιών [67], (Εικόνα 11C). Το προφίλ των υπερμεθυλιωμένων CpG νησιδίων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι ειδικό για κάθε τύπο καρκίνου [68].



**Εικόνα 11:** Η μεθυλίωση του DNA στα καρκινικά κύτταρα. [69].

Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA είναι σημαντική για τη μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση, τη γονιδιωματική αποτύπωση, τη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την αδρανοποίηση του X χρωμόσωματος (θηλυκά), τον αναπτυξιακό έλεγχο και ειδικούς ελέγχους έκφρασης σε ιστούς [70]. Είναι γνωστό ότι όλοι έχουμε τρισεκατομμύρια κύτταρα, με πανομοιότυπες πληροφορίες DNA στον πυρήνα τους. Για να «αποσιωπηθεί» ένα γονίδιο, η μεθυλίωση πρέπει να γίνει σε ένα σημαντικό μέρος αυτών των κυττάρων. Η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει δύο πλευρές της γενετικής μας κληρονομιάς: τις ιδιότητες που δεν μπορούμε να αλλάξουμε αφού εδραιωθούν (όπως το χρώμα των ματιών, το χρώμα του δέρματος και την ομάδα αίματος) και τις ιδιότητες που μπορούμε να αλλάξουμε (όπως το μεταβολισμό, την ανοσοποιητική ανταπόκριση και τη ζωτικότητα) [71]. Επιπλέον διαταραχές του μηχανισμού μεθυλίωσης έχουν συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (SLE), η ανοσοανεπάρκεια, και το σύνδρομο ανωμαλιών προσώπου (Facial anomalies syndrome, ICF) [62].

Συμπερασματικά, η μεθυλίωση του DNA, είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός που επιδρά στην ανάπτυξη των μεταλλάξεων, στην γονιδιακή έκφραση και στις τροποποιήσεις της χρωματίνης.

Αναφορικά με το γλοιοβλάστωμα πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA είναι διαφορετικά στα κύτταρα του γλοιώματος από τα φυσιολογικά κύτταρα. Αξιοσημείωτο είναι η συνύπαρξη υπερμεθυλίωσης και οι βαθμοί υπομεθυλίωσης των νησών CpG είναι επίσης χαρακτηριστικό του καρκίνου. Έτσι, η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA διαφόρων σχετικών γονιδίων σε κύτταρα γλοιώματος είναι ένας τυπικός βιοδείκτης για τη διάγνωση του όγκου. Επιπλέον, το *MGMT* είναι σημαντικό για την επιδιόρθωση του DNA, το οποίο θα μπορούσε να

αποκαταστήσει τις αλκυλικές βλάβες που προκαλούνται από το χημειοθεραπευτικό BCNU. Έχει παρατηρηθεί ότι περίπου το 40% των ιστών γλοιώματος διαθέτουν υπερμεθυλίωση του επαγωγέα του γονιδίου. Το επίπεδο μεθυλίωσης συσχετίζεται με την πρόγνωση και τη συχνότητα εμφάνισης του όγκου. Επομένως, είναι πιο σημαντικό από τον βαθμό του όγκου και την ηλικία του ασθενή. Πολυάριθμες μελέτες έχουν βρει ότι το επίπεδο μεθυλίωσης του υποκινητή θεωρείται ως ο πιο σημαντικός δείκτης προς αξιολόγηση της ευαισθησίας του όγκου στην τεμοζολομίδη. Εκτός από τα γονίδια που αναφέρονται παραπάνω, η μεθυλίωση των νησίδων CpG στις περιοχές επαγωγέων του γονιδίου του LATS1, LATS2, p73 συνδέεται επίσης έντονα με την επίπτωση και την εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος.

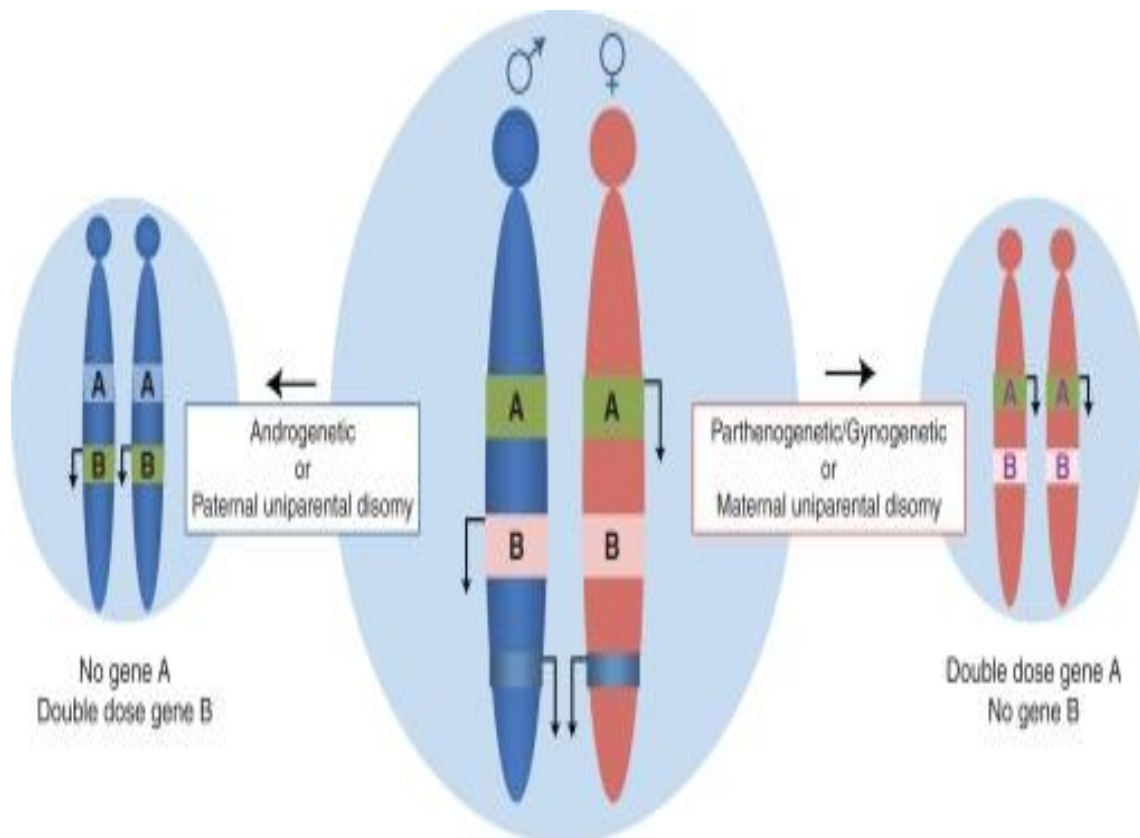
## **6.2 Αποτύπωση (imprinting)**

Η γονιδιοματική αποτύπωση (Imprinting) είναι ένα επιγενετικό φαινόμενο που επάγει την έκφραση των γονιδίων με τρόπο συγκεκριμένο σε σχέση με την πηγή προέλευσής τους. Η αποτύπωση προτάθηκε σε πειράματα αναπαραγωγής σε μύες που φέρουν αμοιβαίες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και μπορεί να είναι ένα χαρακτηριστικό της ανάπτυξης των θηλαστικών [72]. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταμόσχευσης πυρήνων σε ζυγωτό ποντικού, τα οποία επιβεβαίωσαν ότι η φυσιολογική ανάπτυξη απαιτεί τη συμβολή των γονιδιωμάτων της μητέρας και του πατέρα. Η τεράστια πλειοψηφία των εμβρύων ποντικού που προέρχονται από την παρθενογένεση (ονομάζονται παρθενογονιδώματα με δύο μητρικά γονιδιώματα ή γονιδιώματα αυγών) και την ανδρογένεση (ονομάζονται ανδρογονιδιώματα, με δύο πατρικά γονιδιώματα ή γονιδιώματα σπερματοζωαρίων) πεθαίνουν κατά το στάδιο της βλαστοκύστης/εμφύτευσης. Στις σπάνιες περιπτώσεις που εξελίσσονται σε στάδια μετα-εμφυτεύματος, τα έμβρυα με δύο θηλυκούς προπυρήνες εμφανίζουν καλύτερη εμβρυϊκή ανάπτυξη σε σχέση με την



ανάπτυξη του πλακούντα, ενώ για τα έμβρυα με δύο αρσενικούς προπυρήνες συμβαίνει το αντίστροφο [73-75].

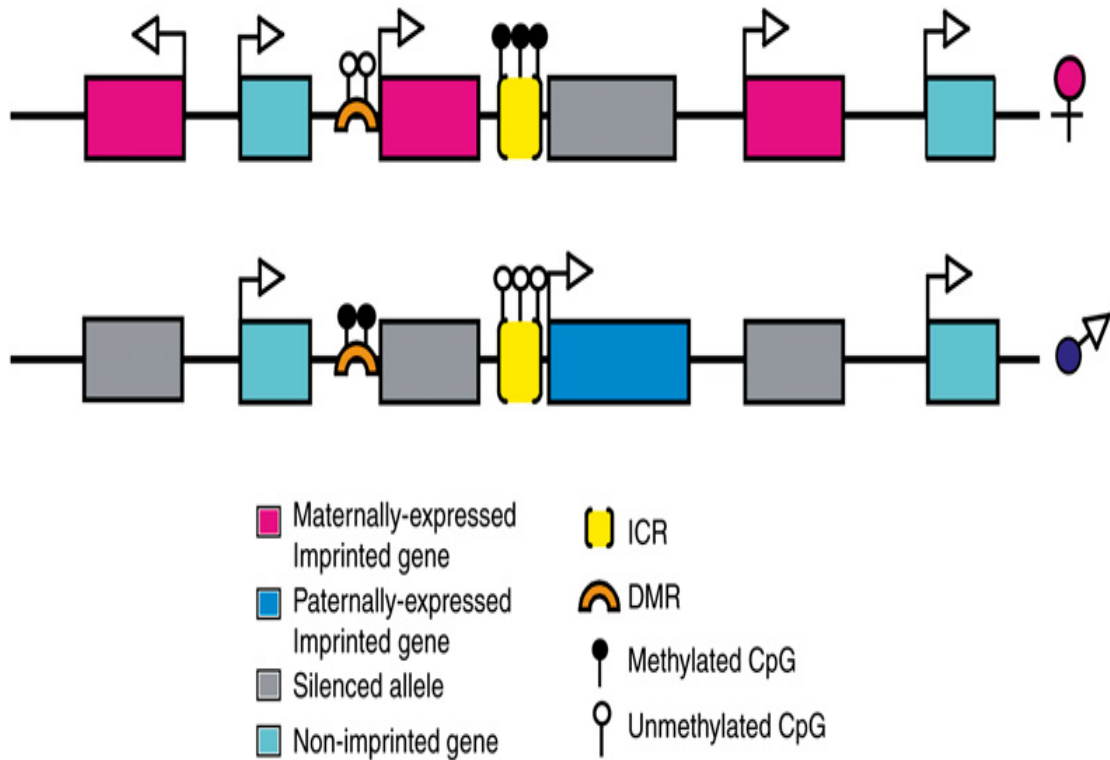
Στα θηλαστικά, ένας μικρός αριθμός γονιδίων εκφράζονται ανάλογα με την γονική τους προέλευση με αποτέλεσμα να εκφράζεται μόνο ένα γονικό αλληλόμορφο. Αυτά τα γονίδια, τα οποία ονομάζονται "αποτυπωμένα", εξαρτώνται από τον επιγενετικό μηχανισμό για τον αρχικό προσδιορισμό της γονικής ταυτότητας τους καθώς και για την καθιέρωση και διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου προέλευσής τους [76] (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Στο κέντρο, απεικονίζεται ένα κύτταρο με ένα χρωμόσωμα μητρικής (κόκκινο) ή πατρικής (μπλε) προέλευσης και δύο αποτυπωμένα γονίδια. Το γονίδιο A μεταγράφεται από το μητρικό αλληλόμορφο (πράσινο, το βέλος δείχνει την μεταγραφή) και το οποίο καταστέλλεται από το πατρικό αλληλόμορφο (γαλάζιο), το

γονίδιο B μεταγράφεται από το πατρικό αλληλόμορφο (πράσινο και βέλος) και καταστέλλεται από το μητρικό αλληλόμορφο (ροζ) [77].

Περίπου 100 αποτυπωμένα (imprinting) γονίδια έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στα θηλαστικά. Τα αποτυπωμένα γονίδια ελέγχονται από ρυθμιστικές περιοχές που λειτουργούν με *cis* ισομέρεια, οι οποίες ονομάζονται περιοχές ελέγχου αποτύπωσης (ICRs). Οι ICRs περιοχές μεθυλιώνονται με *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράσες κατά την ανάπτυξη της γενετικής γραμμής [77]. Οι περιοχές ελέγχου αποτύπωσης (ICRs) αποτελούνται συχνά από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πλευρικά ή εσωτερικά στα αποτυπωμένα γονίδια και στις περισσότερες περιπτώσεις η απομάκρυνση μιας ICR θα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αποτύπωσης. Οι επιγενετικοί τροποποιητές της γονιδιακής έκφρασης όπως η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών, το non-RNA (μη κωδικοποιημένο RNA ή μικρό RNA) και ο σχηματισμός χρωματίνης ενεργούν εντός των ICRs για να καθιερώσουν και να διατηρήσουν την αποτυπωμένη κατάσταση. Οι ICR περιοχές δρουν ως θέσεις πυρήνωσης για σίγαση ή ενεργοποίηση γονιδίων και είναι σε θέση να ρυθμίζουν την έκφραση ενός μόνο γονιδίου ή ενός πλήρους συμπλέγματος γονιδίων (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Συστατικά ενός αποτυπωμένου γονιδιακού συμπλέγματος.

Εικονίζονται τα μητρικά (επάνω) και τα πατρικά (κάτω) αλληλόμορφα μιας ομάδας γονιδίων με αποτύπωση. Τα γονιδιακά συμπλέγματα με αποτύπωση περιλαμβάνουν γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο (ροζ), γονίδια που εκφράζονται από το πατρικό αλληλόμορφο (μπλε) και διαλληλόμορφα (μη αποτυπωμένα) εκφρασμένα γονίδια (πράσινα πλαίσια). Αυτά τα μη αποτυπωμένα γονίδια μπορούν να βρεθούν στη μέση ενός συμπλέγματος που περιβάλλεται από αποτυπωμένα γονίδια. Το ICR (κίτρινο) ελέγχει την αποτύπωση πολλαπλών γονιδίων. Η διαγραφή αυτού του διαφορεικά μεθυλιωμένου στοιχείου οδηγεί σε απώλεια αποτύπωσης των συνδεδεμένων γονιδίων. Πολλές αποτυπωμένες συστάδες περιέχουν επίσης επιπλέον DMRs (πορτοκαλί) που αποκτούν μεθυλίωση του DNA μετά το στάδιο προ-εμφύτευσης [78].

Αυτές οι γονικές ειδικές τροποποιήσεις πρέπει να διατηρηθούν μετά τη γονιμοποίηση όταν το γονιδίωμα είναι εκτεταμένα επαναπρογραμματισμένο. Η διαδικασία που ρυθμίζει τη γονιδιωματική αποτύπωση έχει τέσσερις σημαντικές ιδιότητες: (1) Το "σήμα" πρέπει να είναι σε θέση να επηρεάσει τη μεταγραφή. (2) πρέπει να είναι κληρονομική σε σωματικές γενεές έτσι ώστε μια μνήμη γονικής προέλευσης να μεταδίδεται πιστά στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. (3) το "σήμα" είναι πιθανό να ενσωματωθεί στα πατρικά και μητρικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης ή ίσως αμέσως μετά τη γονιμοποίηση). (4) πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός διαγραφής του "σήματος" ώστε τα πατρικά κληρονομικά χρωμοσώματα στη θηλυκή γενετική γραμμή να μπορούν να καθιερώσουν ένα νέο "σήμα" ενδεικτικό της μητρικής τους προέλευσης και αντιστρόφως [79].

Δεδομένης της έκφρασης του ενός αλληλομόρφου και της πολυπλοκότητας της ρύθμισής τους, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι πολλά αποτυπωμένα γονίδια φαίνονται να είναι ευαίσθητα στη δόση με λειτουργικές συνέπειες στη μεταβολή των επιπέδων έκφρασής τους. Από πολλές μελέτες φαίνεται ότι τα αποτυπωμένα γονίδια είναι σημαντικά για τον έλεγχο της προγεννητικής ανάπτυξης, για την ανάπτυξη συγκεκριμένων γενετικών οντοτήτων, για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και τη μεταγεννητική ομοίωση της ενέργειας. Η κατανόηση της αποτυπωμένης γονιδιακής λειτουργίας στον άνθρωπο προέρχεται από μελέτες γονότυπου-φαινοτύπου σε ασθενείς με διαταραχές αποτύπωσης. Αυτές περιλαμβάνουν τις διαταραχές της συμπεριφοράς και του νευροαναπτυξιακού συστήματος όπως τα σύνδρομα Prader-Willi και Angelman [80], τις αποτυπωμένες διαταραχές της ανάπτυξης Syndrome Beckwith-Wiedemann και Silver-Russell [81,82] και τα

σύνδρομα της μητρικής και/ή της πατρικής μονογονικής δισωμίας 14 [83] και τον παροδικό νεογνικό διαβήτη [84].

Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA συνδέεται με την φυσιολογική ανάπτυξη και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα νησίδια CpG, τα οποία είναι συνήθως μη μεθυλιωμένα, συνδέονται κυρίως με τους υποκινητές των γονιδίων βασικών λειτουργιών (housekeeping) (γονίδια που εκφράζονται ευρέως και σπάνια καταστέλλονται) [56]. Τα νησίδια CpG βρίσκονται επίσης στους υποκινητές γονιδίων που έχουν υποστεί αποτύπωση και οι περισσότεροι, αν και όχι όλοι, υποκινητές CG-νησιδίου των αποτυπωμένων γονιδίων διαφοροποιούνται με μεθυλίωση, όπου το κατασταλαμένο αλληλόμορφο μεθυλιώνεται και το ενεργό αλληλόμορφο δεν μεθυλιώνεται. Αυτές οι διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές ονομάζονται DMRs (differentially methylated regions) .

Ετσι, ατέλειες στη μεθυλίωση του DNA είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε διαταραχές που επηρεάζουν την εμβρυογένεση και τη γονιδιωματική αποτύπωση. Η γονιδιωματική αποτύπωση έχει μελετηθεί και στο γλοιοβλάστωμα. Για παράδειγμα, η καταστολή του ογκοκατασταλτικού *CDKN1C* (p57KIP2), ενός γονιδίου που εκφράζεται από τη μητέρα ή η υπερέκφραση ενός ογκογονιδίου, όπως το εκφρασμένο από τον πατέρα αποτυπωμένο γονίδιο *IGF2*, αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης της νεοπλασματικής εξαλλαγής. Επίσης, το μητρικά εκφρασμένο *H19* υπερεκφράζεται σε δείγματα γλοιοβλαστώματος σε σύγκριση με υγιή ιστό και ο ρόλος του ως ογκογόνου lncRNA μέσω της αναστολής της έκφρασης β-κατενίνης είναι αναγνωρισμένος.

### **6.3 RNA παρέμβαση (interference)**

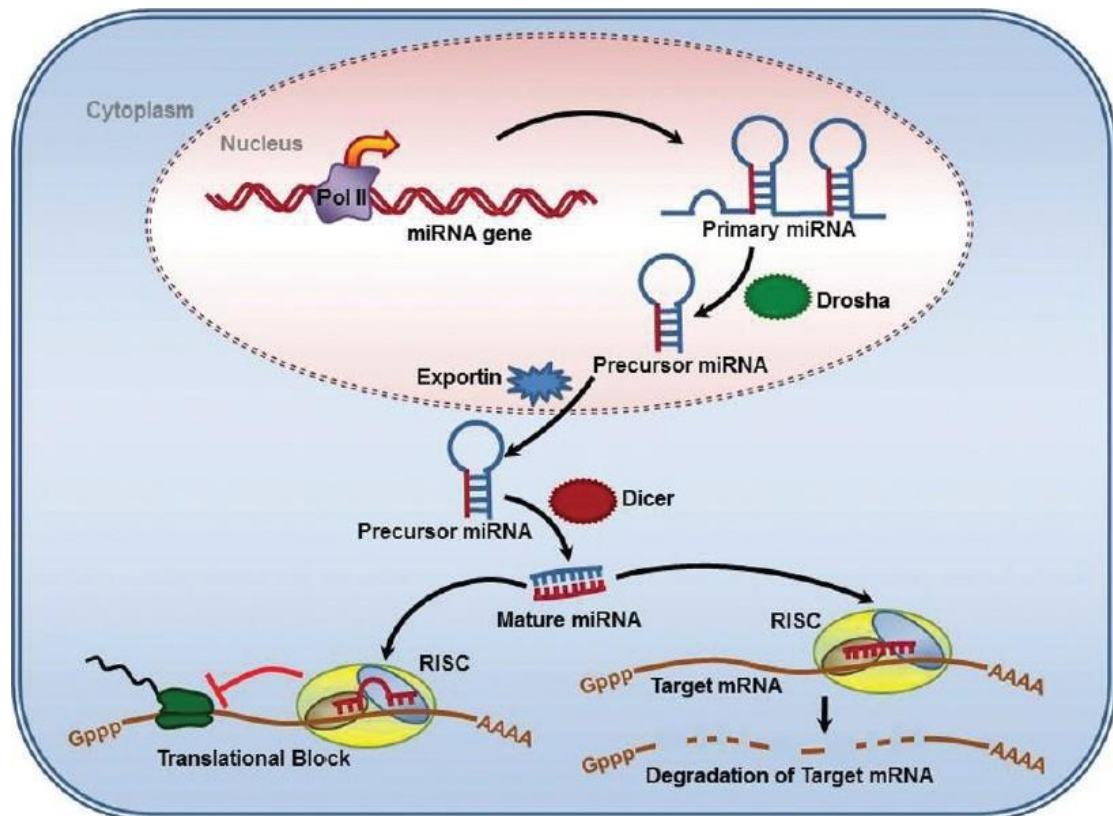
Η μετά μεταγραφική (transcriptional) ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων συμβαίνει μέσω ενός επιγενετικού μηχανισμού που λέγεται παρέμβαση RNA

(interference). Εκτός από τη σύνδεση της παρέμβασης RNA με τη μετά-μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου στο κυτταρόπλασμα, πολλές άλλες λειτουργίες συνδέονται με την παρέμβαση RNA στο πυρήνα. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που κατευθύνονται από μικρά RNA έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν μεταγραφική καταστολή σε φυτά, μύκητες και ζώα. Επιπλέον, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η παρέμβαση RNA ρυθμίζει τη μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς μηχανισμούς. Τα πυρηνικά μικρά RNA περιλαμβάνουν μικρά παρεμβατικά RNA (siRNAs) και τα PIWI- αλληλεπιδρώντα RNAs (piRNAs είναι η μεγαλύτερη κατηγορία μικρών μη κωδικοποιούμενων RNAs που εκφράζονται σε ζωικά κύτταρα), τα οποία εμπλέκονται σε πυρηνικές διεργασίες όπως η ρύθμιση των μεταθετών, ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης, η ρύθμιση του γονιδιώματος κατά την ανάπτυξη και η σταθερότητα του γονιδιώματος [85], (Εικόνα 14). Τα μικροRNAs (miRNAs) είναι μια ομάδα μικρών μη κωδικοποιούμενων RNAs (~21 nucleotides), που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο [86]. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs έχει ως αποτέλεσμα επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά την ογκογένεση. Όλες οι γνώσεις των τελευταίων ετών έχουν δείξει τη σύνδεση των miRNAs με πολλές βιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στον καρκίνο, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Αρκετές μελέτες έχουν προσδιορίσει το προφίλ έκφρασης των miRNAs ειδικά για διαφορετικούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου το οποίο συσχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών, υποδηλώνοντας την πιθανή χρησιμότητα των miRNAs στην πρόβλεψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου [87-89]. Σε ένα καρκινικό περιβάλλον, τα miRNAs μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια ή κατασταλτικά γονίδια όγκων σύμφωνα με τους στόχους των mRNA τους και τα ίδια τα miRNAs μπορούν να ασκήσουν μια αντίθετη λειτουργία ανάλογα

με το κυτταρικό περιβάλλον. Η υπερέκφραση των miRNAs στα νεοπλασματικά κύτταρα έχει ογκογόνο δράση, ενώ η μειωμένη έκφρασή τους δρα ογκοκατασταλτικά. Επιπλέον, το miR-34a βρέθηκε να έχει αντιμεταστατική δράση αναστέλοντας την επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial mesenchymal transition, EMT) των σχετιζόμενων πρωτεϊνών σε διάφορα καρκινώματα [90].

Δεδομένου ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να ελέγξουν την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ότι τα miRNAs μεταγράφονται επίσης από την RNA πολυμεράση II (Pol II), οι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να διαδραματίσουν θεμελιώδεις ρόλους και στον έλεγχο της έκφρασης του miRNA.

Πρόσφατα, η παρέμβαση RNA (RNAi) έχει εμφανιστεί ως μια νέα θεραπευτική στρατηγική για πληθώρα νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος. Οι θεραπείες που βασίζονται στο RNAi συνίστανται στη χρήση μικρών ολιγονουκλεοτιδίων RNA για τη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Παρά το θεραπευτικό δυναμικό των μορίων RNAi, συστημικοί περιορισμοί συμπεριλαμβανομένης της βραχείας σταθερότητας του και της μικρής απελευθέρωσης στον όγκο έχουν περιορίσει την χρήση τους. Η αποτελεσματική διέλευση των μορίων RNAi μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον εμπόδιο.



Εικόνα 14: Το miRNA μεταγράφεται από το δικό του γονίδιο ή από ένα γονίδιο ξενιστή ως ένα μακρύ μετά-miRNA (pri-miRNA) αντίγραφο. Αυτό εξελίσσεται σε προ-miRNA (pre-miRNA), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από το Exportin-5, όπου υφίσταται περαιτέρω τροποποίηση από το Dicer και σχηματίζεται το τελικό μόριο miRNA, έτοιμο για τη γονιδιακή σίγαση.

Ran: RAs-related nuclear protein ή GTP-binding nuclear protein,

Dicer: ενδοριβονουκλεάση,

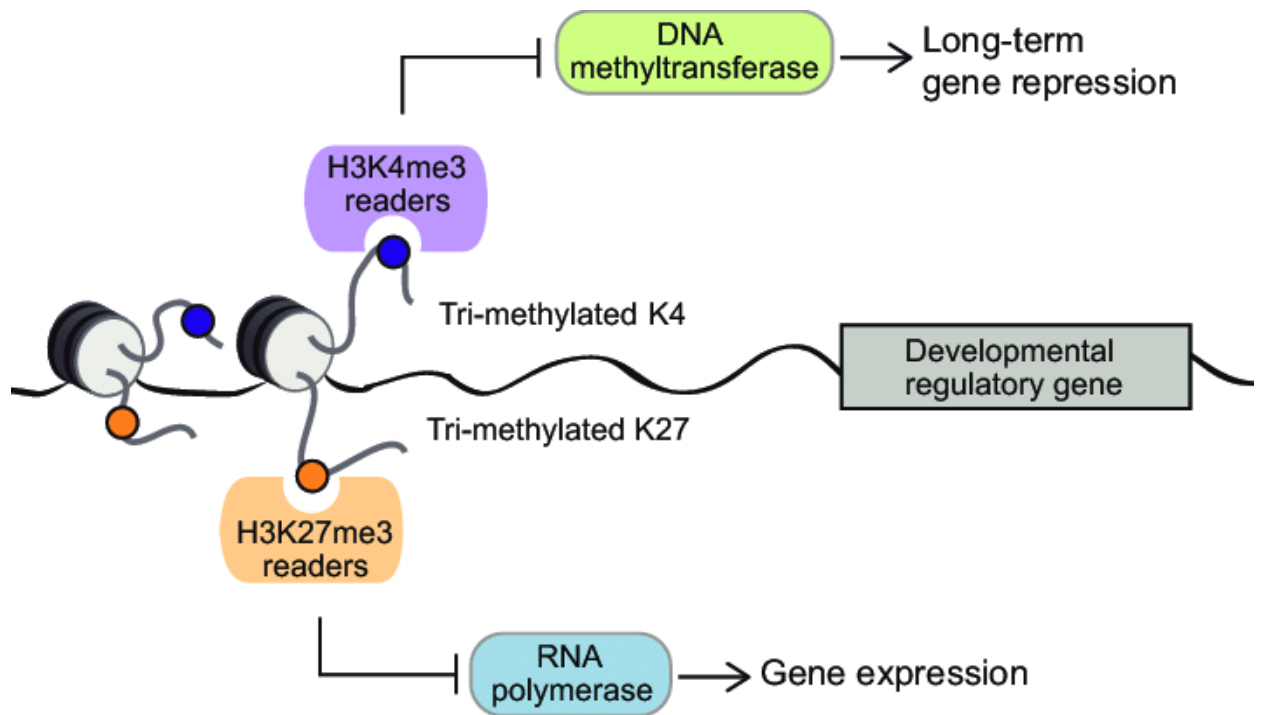
Drosha: ριβονουκλεάση III. [91]

#### 6.4 Τροποποιήσεις Ιστονών

Οι ιστονές είναι πρωτεΐνες που περιβάλλουν τη διπλή έλικα του DNA, σχηματίζοντας δομές, που ονομάζονται νουκλεοσώματα. Κάθε νουκλεόσωμα



περιέχει 8 μόρια ιστονών (οκταμερή). Τόσο οι ιστόνες όσο και το DNA μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να αποσιωπήσουν ή να ενεργοποιήσουν γονίδια. Η δομή των ιστονών αποτελείται από δύο περιοχές, μια σφαιρική περιοχή και μια «ουρά» που περιέχει NH<sub>2</sub> κατάληξη. Οι τροποποιήσεις τυπικά συμβαίνουν στην περιοχή της «ουράς» σε διαφορετικές θέσεις αμινοξέων. Το νουκλεόσωμα θεωρείται η βασική μονάδα της ευκαρυωτικής χρωματίνης. Η γενική (global) χρωματίνη περιλαμβάνει την ευχρωματίνη, την ετεροχρωματίνη και διδύναμες (bivalent) περιοχές σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs). Η ετεροχρωματίνη είναι πολύ συμπυκνωμένη, βρίσκεται στα κεντρομερή και τελομερή, περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, είναι γονιδιακά φτωχή και συνδέεται με κατασταλαμένη μεταγραφή. Επιπλέον, είναι δύσκολο να αντιγραφεί κι έτσι επιτυγχάνεται ουσιαστικά η αποσιώπηση των περισσότερων γονιδίων μέσα σε αυτή. Η ευχρωματίνη είναι πιο χαλαρά πακεταρισμένη, είναι πλούσια σε γονίδια, βρίσκεται στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων, συνδέεται με ενεργή μεταγραφή έτσι τα γονίδια αντιγράφονται πιο εύκολα. Η χρωματίνη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων έχει "διδύναμες" περιοχές που επάγουν τόσο την γονιδιακή ενεργοποίηση όσο και την καταστολή. Σε αυτές τις περιοχές, η ουρά της πρωτεΐνης ιστόνης H3 έχει μία ομάδα μεθυλίου προσαρτημένη στην λυσίνη 4 (K4) που είναι ενεργοποιημένη και μια μεθυλομάδα στη λυσίνη 27 (K27) η οποία είναι κατασταλτική (εικόνα 15). Αυτή η αντιφατική κατάσταση μπορεί να κρατήσει τα γονίδια σιωπηλά αλλά έτοιμα να ενεργοποιηθούν εάν χρειαστεί [92].

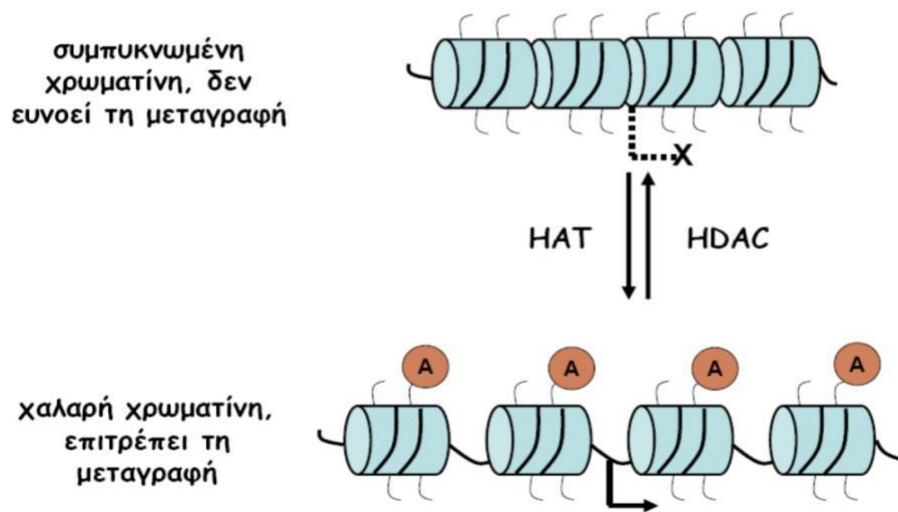


**Εικόνα 15:** Η χρωματίνη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων έχει "διδύναμες" περιοχές που επάγουν τόσο την γονιδιακή ενεργοποίηση όσο και την καταστολή. Η ουρά της πρωτεΐνης ιστόνης H3 έχει μία ομάδα μεθυλίου προσαρτημένη στην λυσίνη 4 (K4) που είναι ενεργοποιημένη και μια μεθυλομάδα στη λυσίνη 27 (K27) η οποία είναι κατασταλτική [87]

Οι τροποποιήσεις των ιστονών περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, την μεθυλίωση, την φωσφορυλίωση, την ουβικιτινυλίωση. Οι Ακετυλιώσεις Ιστονών διευκολύνουν τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης (η συμυκνωμένη χρωματίνη δεν ευνοεί τη μεταγραφή, ενώ η χαλαρή χρωματίνη επιτρέπει τη μεταγραφή). Επιπλέον, η Ακετυλίωση Ιστονών σχετίζεται με την ενεργοποίηση ενώ η αποακετυλίωση με καταστολή της μεταγραφής [Εικόνα 16]. Υποακετυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με καταστολή της

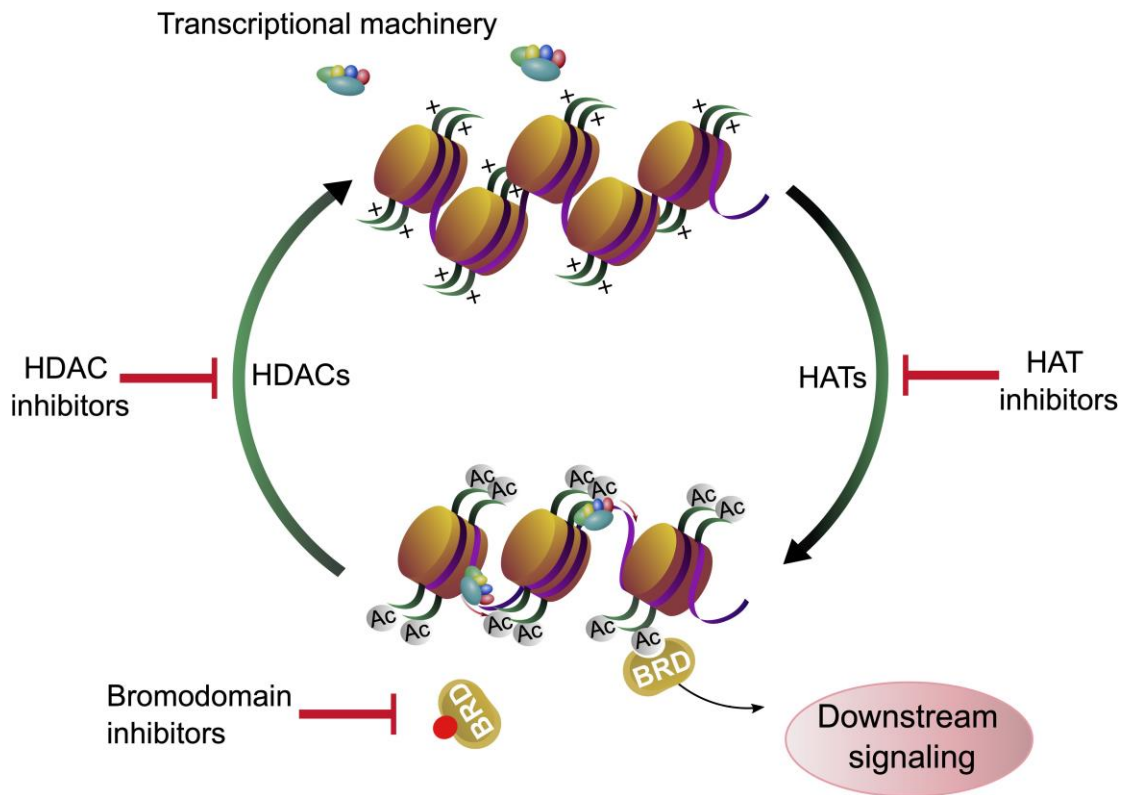
γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό ότι ένα σωστό είδος ακετυλίωσης ιστόνης αυξάνει επίσης το προσδόκιμο ζωής [Εικόνα 17] [94].

## Ακετυλίωσεις Ιστονών διευκολύνουν τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης



**Εικόνα 16:** Η ακετυλίωση της ουράς της Ιστόνης επάγει το σχηματισμό χαλαρής Χρωματίνης [89]

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται με ακετυλίωση λυσίνης των πρωτεϊνών ιστόνης:



**Εικόνα 17:** Οι ακετυλο τρανσφεράσες ιστόνης (HATs) καταλύουν τη μεταφορά ακετυλομάδων σε πρωτεΐνες. Η ακετυλίωση των ιστονών επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης και μπορεί να διευκολύνει την έκφραση των γονιδίων. Οι αποακετυλάσες ιστόνης (HDACs) αφαιρούν τα σημάδια ακετυλίωσης από τις ιστόνες. Η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση μπορούν να ρυθμιστούν από αναστολείς ακετυλτρανσφεράσης ιστόνης (HATi) και αναστολείς αποακετυλάσης ιστόνης (HDACi), αντίστοιχα. Τα σημάδια ακετυλίωσης αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες που περιέχουν bromodomain (BRD) των οποίων η δέσμευση μπορεί να αποκλειστεί από αναστολείς bromodomain (BDi).

## 6.5 Φωσφορυλίωση

Οι ιστόνες φωσφορυλιώνονται συνήθως σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης και η προσθήκη της φωσφορικής ομάδας καταλύεται από εξειδικευμένες πρωτεϊνικές κινάσες. Η φωσφορυλίωση των ιστονών φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Όσον αφορά τη μεταγραφή, αξίζει αναφοράς η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη θέση σερίνης 10 (H3S10P). Έχει προταθεί πως η H3S10P καταστέλλει τη μεταγραφή καθώς οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης. Παρά ταύτα υπάρχουν ενδείξεις ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων άλλων οργανισμών, όπως στη *Drosophila*, όπου η ενεργοποίηση γονιδίων θερμικού shock σχετίζεται με υπερφωσφορυλίωση της H3S10 [95]. Τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι, τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση της Ser 10 είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για μεταγραφική ενεργοποίηση χωρίς ακετυλίωση επιπλέον αμινοξέων. Ο μηχανισμός με τον οποίο η τροποποίηση επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης και την μεταγραφική ενεργοποίηση δεν είναι απόλυτα κατανοητή αν και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο η επαγόμενη από τη φωσφορυλίωση αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης από μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτό το γεγονός έρχεται σε αντίθεση με άλλες παρατηρήσεις που τονίζουν πως η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη Ser 10 είναι απαραίτητη για χρωμοσωμική συμπύκνωση κατά τη μίτωση. Η τροποποίηση ιστονών μέσω ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, ουβικουιτίνωσης και μεθυλίωσης μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων και μπορεί να παίζει ρόλο στην παθογένεση του GBM. Προκλινικές και κλινικές μελέτες στοχεύουν επί του παρόντος τα επιγενετικά ένζυμα στα γλοιώματα, συμπεριλαμβανομένης μιας νέας γενιάς αναστολέων αποακετυλάσης ιστόνης (HDAC).

## 6.6 Αδρανοποίηση του X Χρωμοσώματος

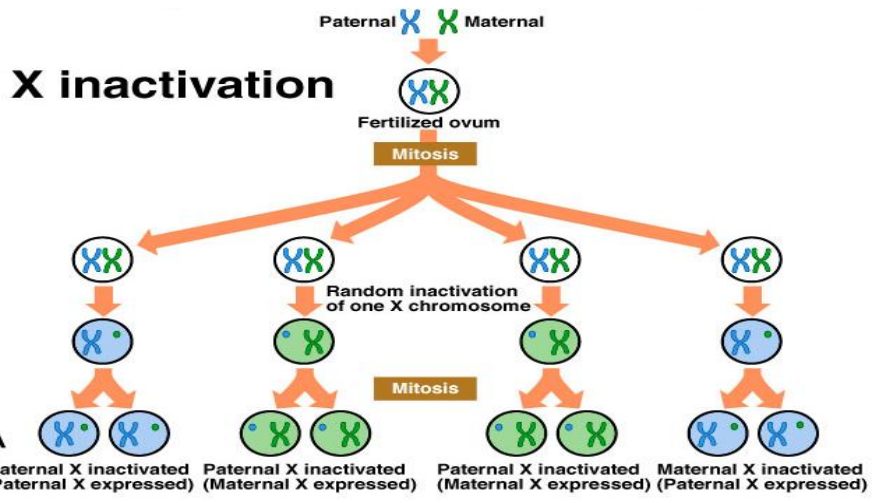
Η αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X (προέρχεται από το ονομα της Mary Lyon, Lyonization) είναι μια διαδικασία κατά την οποία αδρανοποιείται ένα από τα δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος X που υπάρχει στα θηλυκά θηλαστικά. Το ανενεργό χρωμόσωμα X «αποσιωπάται» με πακετάρισμα σε κατασταλτική ετεροχρωματίνη. Η επιλογή ποιο από το χρωμόσωμα X θα αδρανοποιηθεί είναι τυχαία στα ανώτερα θηλαστικά όπως σε ποντίκια και σε ανθρώπους. Μόλις απενεργοποιηθεί ένα χρωμόσωμα X, θα παραμείνει ανενεργό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου. Απαραίτητο για την αδρανοποίηση του Χρωμοσώματος X είναι το κέντρο απενεργοποίησης X (XIC) στο χρωμόσωμα X. Οι μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων που τοποθετούν το XIC σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα οδηγούν στην απενεργοποίηση του αυτοσωμικού και τα χρωμοσώματα X που στερούνται του XIC δεν απενεργοποιούνται. Το XIC περιέχει τέσσερα μη μεταφρασμένα γονίδια RNA, Xist, Tsix, Jpx και Ftx, τα οποία εμπλέκονται στην απενεργοποίηση του X Χρωμοσώματος. Το X-ανενεργό ειδικό μετάγραφο (Xist) κωδικοποιεί ένα μεγάλο μη κωδικοποιημένο RNA το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της σίγασης του χρωμοσώματος X από το οποίο μεταγράφεται [96]. Το αδρανές X χρωμόσωμα επικαλύπτεται με Xist RNA, [96] ενώ το ενεργό X όχι. Τα X χρωμοσώματα που δεν έχουν το γονίδιο Xist δεν μπορούν να αδρανοποιηθούν [98].

Πριν από την απενεργοποίηση, και τα δύο χρωμοσώματα X εκφράζουν ασθενώς το Xist RNA (X-inactive specific transcript) είναι ένα γονίδιο RNA στο χρωμόσωμα X των θηλαστικών που δρα στη διαδικασία απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αδρανοποίησης, το ενεργό X χρωμόσωμα παύει να εκφράζει το Xist, ενώ το ανενεργό X αυξάνει δραματικά την παραγωγή Xist RNA. Στο μελλοντικό ανενεργό X χρωμόσωμα, το Xist RNA

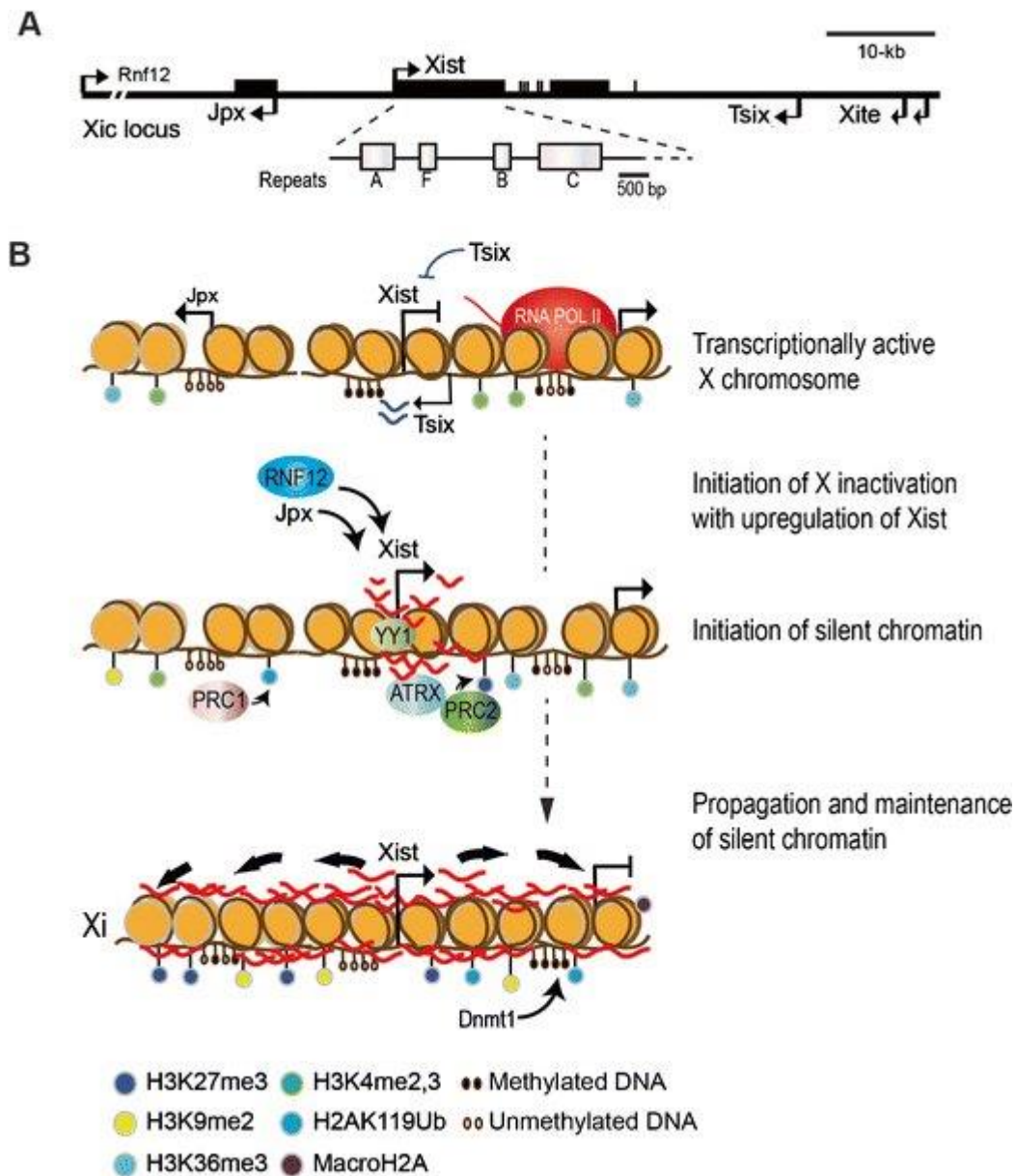
καλύπτει προοδευτικά το χρωμόσωμα, το Xist RNA δεν εντοπίζεται στο ενεργό X χρωμόσωμα. Η σίγαση των γονιδίων κατά μήκος του ανενεργού X χρωμοσώματος συμβαίνει αμέσως μετά την επικάλυψη με Xist RNA. Έτσι, η σίγαση ξεκινά στο Xic / XIC και εξαπλώνεται κατά μήκος του χρωμοσώματος [98]. Η μεταβολή του CpG του DNA των 5meC (5-Methylcytosine) παρατηρείται στα αδρανοποιημένα X χρωμοσώματα. Το 5meC δεσμεύει τον μεταγραφικό καταστολέα MeCP2 (Πρωτεΐνη-2 δέσμησης με μεθυλC, methyl CpG binding protein 2). Το MeCP2 δεσμεύει την πρωτεΐνη Sin3 (αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής) με αποακετυλάση ιστόνης RPD3 [93], (Εικόνα 8).

Συνεπώς, η απενεργοποίηση X είναι μια ζωτικής σημασίας διαδικασία και ένα σημαντικό ερευνητικό εργαλείο για τη μελέτη της επιγενετικής ρύθμισης του DNA η οποία είναι κρίσιμη τόσο για την φυσιολογική ανάπτυξη όσο και για την εμφάνιση ασθενειών [Εικόνα 18]. Στην απενεργοποίηση X, κάθε κύτταρο «απενεργοποιεί» ένα από τα χρωμοσώματα X, που επιλέγονται τυχαία, για να εξασφαλιστεί ο σωστός αριθμός γονιδίων που εκφράζονται και για να αποφευχθεί η ανώμαλη ανάπτυξη.

Το *ATRX* βρίσκεται στο Xq21.1 και η πρωτεΐνη του περιέχει ATPάσης/ελικάσης, που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF. Αυτό το γονίδιο είναι ένας κύριος επιγενετικός ρυθμιστής της μεταγραφής, της πυρηνικής διαμόρφωσης και της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα των θηλαστικών. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το *ATRX* συνδέεται με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, του καρκίνου του προστάτη, του καρκίνου του μαστού, του καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων του οισοφάγου και του γλοιοβλαστώματος. Απώλεια του *ATRX* συνδέεται με απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.







**Εικόνα 18:** Πορεία αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος [99, 100]

Οι επιγενετικές μεταβολές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος [101, 102]. Η επιγενετική αντιπροσωπεύει μιτωτικά κληρονομικές αλλοιώσεις στη γονιδιακή έκφραση που δεν οφείλονται σε αλλοιώσεις στην αλληλουχία του DNA. Οι περισσότερες από τις έρευνες σχετικά με τις

επιγενετικές αλλοιώσεις στο γλοιοβλάστωμα έχουν επισημάνει τον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA μέχρι τώρα, όπως π.χ υπομεθυλίωση σε όλο το γονιδίωμα, υπομεθυλίωση ειδική για γονίδιο και υπερμεθυλίωση.

## 7. Συμπεράσματα

Λόγω της προόδου της μοριακής βιολογίας οι τρέχουσες έρευνες έχουν συνδέσει την δημιουργία του γλοιώματος με γενετικές μεταβολές και επιγενετικά γεγονότα, όπως τροποποιήσεις ιστόνης, μεθυλίωση DNA, αναδιαμόρφωση χρωματίνης και μεταβολές των microRNAs. Επιπλέον, τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που ελέγχουν αυτές τις αλλοιώσεις έχουν γίνει νέοι στόχοι για τη θεραπεία του γλοιώματος λόγω της αναστρεψιμότητας των επιγενετικών τροποποιήσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, γονιδιακές μεταλλάξεις συμπεριλαμβανομένων των *P16*, *TP53* και *EGFR* και πολλών άλλων έχουν παρατηρηθεί στο GBM.

Μέχρι σήμερα η κύρια αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος περιλαμβάνει τη χειρουργική αντιμετώπιση ακολουθούμενη από ακτινοβολία και χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη. Η σύνδεση των γενετικών και επιγενετικών πληροφοριών που σχετίζονται με το γλοιοβλάστωμα ανοίγει νέους δρόμους για ανάδειξη πιθανών νέων βιοδεικτών για διάγνωση και για νέες εξατομικευμένες θεραπείες.

## 8. Βιβλιογραφία

1. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020. *Neuro Oncol.* 2023 Oct 4;25(12 Suppl 2):iv1-iv99. doi: 10.1093/neuonc/noad149.
2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffiatti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251.
3. Hoogstrate Y, Draaisma K, Ghisai SA, van Hijfte L, Barin N, de Heer I, Coppieters W, van den Bosch TPP, Bolleboom A, Gao Z, Vincent AJPE, Karim L, Deckers M, Taphoorn MJB, Kerkhof M, Weyerbrock A, Sanson M, Hoeben A, Lukacova S, Lombardi G, Leenstra S, Hanse M, Fleischeuer REM, Watts C, Angelopoulos N, Gorlia T, Golfinopoulos V, Bours V, van den Bent MJ, Robe PA, French PJ. Transcriptome analysis reveals tumor microenvironment changes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2023 Apr 10;41(4):678-692.e7.
4. Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, Tsavachidis S, Liang FW, Gilbert M, Aldape K, Armstrong T, Houlston R, Hosking F, Robertson L, Xiao Y, Wiencke J, Wrensch M, Andersson U, Melin BS, Bondy M. Polymorphisms of *LIG4*, *BTBD2*, *HMG2A*, and *RTEL1* genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *J Clin Oncol.* 2010 May 10;28(14):2467-74. doi: 10.1200/JCO.2009.26.6213.
5. Alexiou GA, Moschovi M, Stefanaki K, Sfakianos G, Prodromou N. Epidemiology of pediatric brain tumors in Greece (1991-2008). Experience

- from the Agia Sofia Children's Hospital. *Cent Eur Neurosurg*. 2011 Feb;72(1):1-4. doi: 10.1055/s-0030-1268495.
6. McKinnon C, Nandhabalan M, Murray SA, Plaha P. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ*. 2021 Jul 14;374:n1560. doi: 10.1136/bmj.n1560. PMID: 34261630.
  7. Zikou A, Alexiou G, Argyropoulou M. Advanced MR Imaging Techniques in the Diagnosis of Intraaxial Brain Tumors [Internet]. *Neurooncology - Newer Developments*. InTech; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/62840>
  8. Astrakas, L.G., Argyropoulou, M.I. (2022). Advances in Pediatric MRI. In: Alexiou, G., Prodromou, N. (eds) *Pediatric Neurosurgery for Clinicians*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80522-7\\_49](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80522-7_49)
  9. Tiefenbach J, Lu VM, Metzler AR, Palejwala A, Haider S, Ivan ME, Komotar RJ, Shah AH. The use of advanced neuroimaging modalities in the evaluation of low-grade glioma in adults: a literature review. *Neurosurg Focus*. 2024 Feb;56(2):E3. doi: 10.3171/2023.11.FOCUS23649. PMID: 38301240.
  10. Sadaghiani MS, Sheikhabaei S, Rowe SP, Pomper MG, Solnes LB. Cellular and Molecular Imaging with SPECT and PET in Brain Tumors. *Radiol Clin North Am*. 2021 May;59(3):363-375. doi: 10.1016/j.rcl.2021.01.005. PMID: 33926683.
  11. Alexiou GA, Tsiouris S, Kyritsis AP, Fotakopoulos G, Goussia A, Voulgaris S, Fotopoulos AD. The value of <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin brain SPECT in predicting survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Nucl Med*. 2010 Dec;51(12):1923-6. doi: 10.2967/jnumed.110.080929.
  12. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-

- aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
13. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
  14. Hiller-Vallina S, Mondejar-Ruescas L, Caamaño-Moreno M, Cómitre-Mariano B, Alcivar-López D, Sepulveda JM, Hernández-Lain A, Pérez-Núñez Á, Segura-Collar B, Gargini R. Sexual-biased necroinflammation is revealed as a predictor of bevacizumab benefit in Glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2024 Feb 27;noae033. doi: 10.1093/neuonc/noae033.
  15. Lee YP, Jung HA, Lee MS, Choi JW, Kong DS, Seol HJ, Nam DH, Lee JI, Lee SH. Bevacizumab plus irinotecan with or without gamma knife radiosurgery after failure of concurrent chemo-radiotherapy for high-grade glioma. *J Neurooncol.* 2022 Feb;156(3):541-549. doi: 10.1007/s11060-021-03930-4.
  16. Wang Y, Li S, Peng Y, Ma W, Wang Y, Li W. Progress in phase III clinical trials of molecular targeted therapy and immunotherapy for glioblastoma. *Cancer Innov.* 2023 Mar 5;2(2):114-130. doi: 10.1002/cai2.59.
  17. Lee EQ. Immune checkpoint inhibitors in GBM. *J Neurooncol.* 2021 Oct;155(1):1-11. doi: 10.1007/s11060-021-03859-8.

18. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, Wang AC, Ellingson BM, Rytlewski JA, Sanders CM, et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med.* 2019;25(3):477–86. doi: 10.1038/s41591-018-0337-7.
19. Kardani K, Sanchez Gil J, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex viruses for the treatment of glioma and targeting glioblastoma stem-like cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 May 31;13:1206111. doi: 10.3389/fcimb.2023.1206111.
20. Tsamis, KI.; Alexiou GA.; Kyritsis AP. Targeting glioblastoma with oncolytic adenovirus delta 24. *Neurosciences.* 2015, 2, 1-3. <http://dx.doi.org/10.4103/2347-8659.149392>
21. Esemeyen Y, Awan M, Parwez R, Baig A, Rahman S, Masala I, Franchini S, Giakoumettis D. Molecular Pathogenesis of Glioblastoma in Adults and Future Perspectives: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 26;23(5):2607. doi: 10.3390/ijms23052607.
22. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.
23. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson

- JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
24. Liang BB, Wang YH, Huang JJ, Lin S, Mao GC, Zhou ZJ, Yan WJ, Shan CY, Wu HZ, Etcheverry A, He YL, Liu FF, Kang HF, Yin AA, Zhang SQ. Genome-wide DNA methylation analysis identifies potent CpG signature for temzolomide response in non-G-CIMP glioblastomas with unmethylated MGMT promoter: MGMT-dependent roles of GPR81. *CNS Neurosci Ther*. 2023 Oct 13. doi: 10.1111/cns.14465.
25. Shafi O, Siddiqui G. Tracing the origins of glioblastoma by investigating the role of gliogenic and related neurogenic genes/signaling pathways in GBM development: a systematic review. *World J Surg Oncol*. 2022 May 10;20(1):146. doi: 10.1186/s12957-022-02602-5.
26. Lee Y, Lee JK, Ahn SH, Lee J, Nam DH. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Lab Invest*. 2016 Feb;96(2):137-50. doi: 10.1038/labinvest.2015.140.
27. Pan PC, Magge RS. Mechanisms of EGFR Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 11;21(22):8471. doi: 10.3390/ijms21228471. PMID: 33187135
28. Tilak M, Holborn J, New LA, Lalonde J, Jones N. Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 12;22(4):1831. doi: 10.3390/ijms22041831

29. Birch JL, Coull BJ, Spender LC, Watt C, Willison A, Syed N, Chalmers AJ, Hossain-Ibrahim MK, Inman GJ. Multifaceted transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ) signalling in glioblastoma. *Cell Signal*. 2020 Aug;72:109638. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109638.
30. Liu H, Tang T. MAPK signaling pathway-based glioma subtypes, machine-learning risk model, and key hub proteins identification. *Sci Rep*. 2023 Nov 4;13(1):19055. doi: 10.1038/s41598-023-45774-0. PMID: 37925483; PMCID: PMC10625624.
31. Alexiou GA, Voulgaris S. The role of the PTEN gene in malignant gliomas. *Neurol Neurochir Pol*. 2010 Jan-Feb;44(1):80-6. doi: 10.1016/s0028-3843(14)60408-4. PMID: 20358487.
32. Kung CP, Weber JD. It's Getting Complicated-A Fresh Look at p53-MDM2-ARF Triangle in Tumorigenesis and Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jan 26;10:818744. doi: 10.3389/fcell.2022.818744.
33. Adhikari AS, Sullivan T, Bargaje R, Lu L, O'Sullivan TN, Song Y, Van Dyke T. Abrogation of Rb Tumor Suppression Initiates GBM in Differentiated Astrocytes by Driving a Progenitor Cell Program. *Front Oncol*. 2022 Jun 24;12:904479. doi: 10.3389/fonc.2022.904479. PMID: 35814428; PMCID: PMC9263358.
34. Bazzoni R, Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. 2019 Mar 1;11(3):292. doi: 10.3390/cancers11030292.
35. Herrera-Rios D, Li G, Khan D, Tsiampali J, Nickel AC, Aretz P, Hewera M, Suwala AK, Jiang T, Steiger HJ, Kamp MA, Muhammad S, Hänggi D, Maciaczyk J, Zhang W, Kahlert UD. A computational guided, functional



- validation of a novel therapeutic antibody proposes Notch signaling as a clinical relevant and druggable target in glioma. *Sci Rep.* 2020 Oct 1;10(1):16218. doi: 10.1038/s41598-020-72480-y. PMID: 33004830; PMCID: PMC7531005.
36. Zhang L, Zhang Y, Li K, Xue S. Hedgehog signaling and the glioma-associated oncogene in cancer radioresistance. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Nov 13;11:1257173. doi: 10.3389/fcell.2023.1257173. PMID: 38020914; PMCID: PMC10679362.
37. Liu A, Hou C, Chen H, Zong X, Zong P. Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Front Oncol.* 2016 Jan 29;6:16. doi: 10.3389/fonc.2016.00016.
38. Farouk Sait S, Walsh MF, Karajannis MA. Genetic syndromes predisposing to pediatric brain tumors. *Neurooncol Pract.* 2021 Feb 13;8(4):375-390. doi: 10.1093/nop/npab012. PMID: 34277017; PMCID: PMC8278355.
39. Fang Z, Su Y, Sun H, Ge M, Qi Z, Hao C, Qian S, Ma X. Case Report : Li-Fraumeni Syndrome with Central Nervous System Tumors in Two Siblings. *BMC Pediatr.* 2021 Dec 27;21(1):588. doi: 10.1186/s12887-021-03070-8. PMID: 34961499; PMCID: PMC8711161.
40. Hashemi M, Etemad S, Rezaei S, Ziaolhagh S, Rajabi R, Rahmanian P, Abdi S, Koohpar ZK, Rafiei R, Raei B, Ahmadi F, Salimimoghadam S, Aref AR, Zandieh MA, Entezari M, Taheriazam A, Hushmandi K. Progress in targeting PTEN/PI3K/Akt axis in glioblastoma therapy: Revisiting molecular interactions. *Biomed Pharmacother.* 2023 Feb;158:114204. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114204. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36916430.

41. Zhao HF, Wang J, Shao W, Wu CP, Chen ZP, To ST, Li WP. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Mol Cancer*. 2017 Jun 7;16(1):100. doi: 10.1186/s12943-017-0670-3. PMID: 28592260; PMCID: PMC5463420.
42. Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*. 2020 May;122(11):1580-1589. doi: 10.1038/s41416-020-0814-x. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32291392; PMCID: PMC7250901.
43. Alzial G, Renoult O, Paris F, Gratas C, Clavreul A, Pecqueur C. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. *Oncogene*. 2022 Jan;41(5):613-621. doi: 10.1038/s41388-021-02056-1. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34764443; PMCID: PMC8799461.
44. (Waddington CH. Theepigenotype. *Endeavour* 1942;1:18–20.)
45. Jablonka E. Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline. *Prog Biophys Mol Biol*. 2013 Apr;111(2-3):99-107. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.014. Epub 2012 Sep 4. PMID: 22975443
46. Yao C, Liu Y, Sun M, et al. MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis. *Reproduction*. 2015;150(1):R25-R34. doi:10.1530/REP-14-0643
47. Koyama M, Kurumizaka H. Structural diversity of the nucleosome. *J Biochem*. 2018;163(2):85-95. doi:10.1093/jb/mvx081
48. Brocker K, Schneider R. Histone H1, the forgotten histone. *Epigenomics*. 2019;11(4):363-366. doi:10.2217/epi-2019-0018

49. Olins DE, Olins AL. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(10):809-814. doi:10.1038/nrm1225
50. Janssen A, Colmenares SU, Karpen GH. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2018;34:265-288. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062653
51. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-254. doi:10.1038/ng1089 ----- Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(2):127-135. doi:10.1016/s0959-437x(03)00026-1
52. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet.* 2010;11(4):285-296. doi:10.1038/nrg2752
53. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):192-206. doi:10.1038/nrm2640
54. Barreto G, Schäfer A, Marhold J, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature.* 2007;445(7128):671-675. doi:10.1038/nature05515
55. Khavari DA, Sen GL, Rinn JL. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell Cycle.* 2010;9(19):3880-3883. doi:10.4161/cc.9.19.13385
56. Wu H, Sun YE. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res.* 2006;59(4 Pt 2):21R-5R. doi:10.1203/01.pdr.0000203565.76028.2a
57. Singal, R. and G.D. Ginder, DNA methylation. *Blood,* 1999. 93(12): p. 4059-70.

58. Siedlecki, P. and P. Zielenkiewicz, Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol*, 2006. 53(2): p. 245-56.
59. Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002. 16(1): p. 6-21.
60. Pósfai, J., et al., Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1989. 17(7): p. 2421-2435.
61. Eden, A., et al., Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 2003. 300(5618): p. 455.
62. Bestor, T.H., The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(16): p. 2395-402.
63. Burton, A. and M.-E. Torres-Padilla, Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Briefings in Functional Genomics*, 2010. 9(5-6): p. 444-454.
64. Kass, S.U., D. Pruss, and A.P. Wolffe, How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet*, 1997. 13(11): p. 444-9.
65. Mohn, F., et al., Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell*, 2008. 30(6): p. 755-66.
66. Li, J., et al., Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*, 2002. 16(6): p. 687-92.
67. Ushijima, T., Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(3): p. 223-31.
68. Robertson, K.D., DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(8): p. 597-610.

69. Esteller M. *Nat Rev Genet* 2007 Vol 8, 286-298
70. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013. 38(1): p. 23-38.
71. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 2000. 1(1): p. 11-9.
72. Lyon, M.F. and P.H. Glenister, Factors affecting the observed number of young resulting from adjacent-2 disjunction in mice carrying a translocation. *Genetical Research*, 1977. 29(1): p. 83-92.
73. Barton, S.C., M.A. Surani, and M.L. Norris, Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 1984. 311(5984): p. 374-6.
74. Mann JR, L.-B.R., Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature*, 1984. 3120: p. 66-67.
75. McGrath J, S.D., Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984. 37: p. 179-83.
76. Kalish, J.M., C. Jiang, and M.S. Bartolomei, Epigenetics and imprinting in human disease. *Int J Dev Biol*, 2014. 58(2-4): p. 291-8.
77. Bartolomei, M.S. and A.C. Ferguson-Smith, *Mammalian Genomic Imprinting*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. 3(7): p. a002592.
78. Bartolomei, M.S., Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes & Development*, 2009. 23(18): p. 2124-2133.
79. MacDonald, W.A., *Epigenetic Mechanisms of Genomic Imprinting: Common Themes in the Regulation of Imprinted Regions in Mammals, Plants, and Insects*. Genetics Research International, 2012. 2012: p. 17.
80. Horsthemke, B. and K. Buiting, Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res*, 2006. 113(1-4): p. 292-9.

81. Weksberg, R., C. Shuman, and A.C. Smith, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2005. 137C(1): p. 12-23.
82. Abu-Amero, S., et al., The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, 2008. 45(4): p. 193-9.
83. Ogata, T., M. Kagami, and A.C. Ferguson-Smith, Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics*, 2008. 3(4): p. 181-7.
84. Temple, I.K., Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr Dev*, 2007. 12: p. 113-23.
85. Castel, S.E. and R.A. Martienssen, RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 2013. 14(2): p. 100-112.
86. Frixia, T., S. Donzelli, and G. Blandino, Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers*, 2015. 7(4): p. 2466-2485.
87. Bluma J. Lesch, and David C. Poised chromatin in the mammalian germ line *Development*, 2014. 141: 3619-26
88. Yanaihara, N., et al., Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006. 9(3): p. 189-98.
89. Sacconi, A., et al., miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer. *Cell Death Dis*, 2012. 3: p. e423.
90. Imani, S., et al., MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*, 2017. 8(13): p. 21362-21379.

91. MacFarlane, L.-A. and P.R. Murphy, MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 2010. 11(7): p. 537-561.
92. Harikumar, A. and E. Meshorer, Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Reports*, 2015. 16(12): p. 1609-1619.
93. Jin, V., Chromatin Structure & Dynamics Victor Jin Department of Biomedical Informatics The Ohio State University., K. Lover, Editor 2015.
94. Linda Anna Michelle Kulka, Pia-Victoria Fangmann, Diana Panfilova and Heidi Olzscha. Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Front Cell Dev Biol*, 2020 Jun 3:8:425.
95. Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 1991;65:775–83. ----- Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 2004;20:214–20)
96. Hoki, Y., et al., A proximal conserved repeat in the *Xist* gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development*, 2009. 136(1): p. 139-146.
97. Ng, K., et al., Xist and the order of silencing. *EMBO Reports*, 2007. 8(1): p. 34-39.
98. Penny, G.D., et al., Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 1996. 379(6561): p. 131-7.
99. Javaid, N. and S. Choi, Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes*, 2017. 8(8): p. 196.

100. Tianqi Yang, Eda Yildirim. Epigenetic and LncRNA-Mediated Regulation of X Chromosome Inactivation and Its Impact on Pathogenesis. *Current Pathobiology, Reports* March 2017.
101. Y. Lu, Y.T. Chan, H.Y. Tan, S. Li, N. Wang, Y. Feng, Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy, *Mol. Cancer* 19 (2020) 1–16, <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01197-3>.
102. M.J. Topper, M. Vaz, K.A. Marrone, J.R. Brahmer, S.B. Baylin, The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (2020) 75–90, <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0266-5>.



