

Σχολή Θετικών Επιστημών & Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στην ανάπτυξη και τη θεραπεία του
καρκίνου του πνεύμονα

Ιωάννης Τσαγγαρούλιας

Επιβλέπων καθηγητής: Ανδρέας Σκορίλας

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίας στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στην ανάπτυξη και τη θεραπεία του
καρκίνου του πνεύμονα

Ιωάννης Τσαγγαρούλιας

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας,

Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής
Βιολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Καθηγητής Βιοχημείας,

Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Στην οικογένειά μου,

Περίληψη

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία αυτών. Κυριότεροι μηχανισμοί, για να επιτευχθεί αυτό, είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η λειτουργία των μη κωδικών RNA. Τις τελευταίες δεκαετίες, παρουσιάστηκαν αποδείξεις για την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της επιγενετικής και ορισμένων ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Ειδικότερα, και ο καρκίνος του πνεύμονα έχει αποδεδειγμένη σχέση με το φαινόμενα αυτά. Πρόκειται για το νεόπλασμα με την υψηλότερη θνησιμότητα και συνδέεται με τους επιγενετικούς μηχανισμούς αφού η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η υπομεθυλίωση των ογκογονιδίων, η αποακετυλίωση των ιστονών σε γονιδιακούς τόπους ογκοκατασταλτικών και η απορρύθμιση των ncRNAs έχουν σαφή ρόλο στην ανάπτυξή του. Αντίθετα, η στόχευση σε αυτούς τους μηχανισμούς θα μπορούσε να αποδώσει πολλά εφόδια για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Στοχεύοντας σε ένζυμα που εμπλέκονται στις αλλαγές, με αναστολείς όπως αυτοί των μεθυλοτρανσφερασών του DNA και των αποακετυλασών των ιστονών, αλλά και με εκμετάλλευση των ρυθμιστικών ιδιοτήτων των ncRNAs θα οδηγηθεί σε υποσχόμενες λύσεις για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι να ασχοληθεί με τους επιγενετικούς μηχανισμούς και τη συσχέτισή τους με την ογκογένεση και την προσπάθεια ερευνητών για θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Λέξεις – Κλειδιά

Επιγενετικές τροποποιήσεις, επιγενετική, καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα

Epigenetic modifications in the development and treatment of lung cancer

Ioannis Tsangaroulis

Abstract

Epigenetic modifications constitute the phenomenon where changes in gene expression are being made without modifying the sequence. The main mechanisms, in order to achieve this, are DNA methylation, histone modifications and the role of non-coding RNAs (ncRNAs). During the last decades, evidence presented that there is an association between epigenetics and certain diseases, including cancer. In particular, lung cancer is connected with these phenomena too. This is the neoplasm with the highest mortality and is linked with epigenetic modifications because of the hypermethylation of tumor suppressor genes, the hypomethylation of oncogenes, the deacetylation of histones at tumor suppressor gene loci and the deregulation of ncRNAs that have distinct role in its development. However, targeting these mechanisms could yield many benefits towards the treatment of lung cancer. By targeting the enzymes involved in these changes, with, for instance, inhibitors like these for DNA methyltransferases and these for histone deacetylases and by using the regulatory characteristics of ncRNAs will lead to promising solutions for the management of the disease. Aim of this thesis is to engage with the epigenetic modifications and their association with tumorigenesis and the researchers' effort to find a cure for lung cancer.

Keywords

Epigenetic modifications, epigenetics, cancer, lung cancer

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	x
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xi
1. Η επιγενετική	1
1.1 Οι επιγενετικές τροποποιήσεις.....	2
1.1.1 Μεθυλίωση DNA	2
1.1.2 Τροποποίηση των ιστονών.....	4
1.1.3 Τα μη κωδικά RNAs	6
2. Ο καρκίνος του πνεύμονα	11
2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα	12
2.2 Παράγοντες κινδύνου.....	13
2.2.1. Κάπνισμα.....	14
2.2.2. Διατροφή και αλκοόλ.....	15
2.2.3. Έκθεση σε καρκινογόνα.....	15
2.2.4. Ατμοσφαιρική ρύπανση	15
2.2.5. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου	16
2.3. Διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα	16
2.3.1.Σταδιοποίηση	16
2.3.2. Μέθοδοι διάγνωσης.....	18
2.4. Θεραπεία	19
3. Η επιγενετικές τροποποιήσεις στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα	21
3.1. DNA μεθυλίωση και καρκίνος του πνεύμονα.....	22
3.1.1. Μέθοδοι ανίχνευσης μεθυλίωσης DNA.....	24
3.2. Τροποποιήσεις ιστονών και καρκίνος του πνεύμονα.....	29
3.2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης τροποποιήσεων ιστονών	31
3.3 RNA και καρκίνος του πνεύμονα	36
3.3.1 Οι τροποποιήσεις του RNA	36
3.3.2 Τα lncRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα.....	38
3.3.3. Τα miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα	40
3.3.4. Μέθοδοι ανίχνευσης ncRNAs	42
4. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.....	49
4.1 Αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTi).....	49
4.2 Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών (HDACi).....	50
4.2.1. Vorinostat, SAHA	51
4.2.2. Τριχοστατίνη A (Trichostatin A,TSA).....	53
4.3 ncRNAs και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.....	53
5. Συμπεράσματα	55
Βιβλιογραφία.....	57

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1-0-1. Περιοχές CpG στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Όπως φαίνεται, όταν είναι μεθυλιωμένες οι περιοχές αυτές η γονιδιακή έκφραση καταστέλλεται (Fessele & Wright, 2018).	3
Εικόνα 1-0-2. Α) Η μεθυλίωση της κυτοσίνης, Β) CpG μεθυλίωση και non-CpG μεθυλίωση, Γ) Απομεθυλίωση με ενεργό ή παθητικό τρόπο (Jang et al., 2017).	3
Εικόνα 1-0-3 Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης και του μηχανισμού δράσης του miRNA(Inoue & Inazawa, 2021)	10
Εικόνα 2-0-1 Απεικόνιση δεξιού και αριστερού πνεύμονα, όπου φαίνεται η παρουσία όγκου αλλά και μετάστασης στους λεμφαδένες(Lung Cancer Q&A / Stanford Health Care, n.d.)	12
Εικόνα 3-0-1.α)κατεργασία με διθειώδες άλας, b) Αλληλούχηση άμεσα και αλληλούχηση με κλωνοποίηση, c) αλληλούχηση με πυροφωσφορικό και πυρόγραμμα(Yokoï et al., 2017).	27
Εικόνα 3-0-2 Η τεχνική ανοσοστυπώματος Western σε στάδια (Meftahi et al., 2021).	31
Εικόνα 3-0-3 Η διαδικασία της ανοσοκαθίζησης χρωματίνης (Amatori et al., 2018).	35
Εικόνα 3-0-4 Σχηματική αναπαράσταση κυριότερων τροποποιήσεων μεθυλίωσης στο ευκαρυωτικό RNA(Romano et al., 2018)	37
Εικόνα 3-0-5. Ο ρόλος των μη κωδικών RNAs και των τροποποιήσεών τους στον καρκίνο(Rong et al., 2021).	42
Εικόνα 3-0-6.(Α) Η διαδικασία της RNA-seq από την απομόνωση RNA μέχρι την ανάλυση των δεδομένων.(Β),(C) Τα σύνολα των αποτελεσμάτων δεδομένων σε διαφορετικού τύπου αναλύσεις RNA-seq, single cell RNA-seq και Bulk RNA-seq(Thomas et al., 2022).	45
Εικόνα 3-0-7. Απλοποιημένο πρωτόκολλο για την εφαρμογή ανάλυσης μικροσυστοιχιών RNA(Simplified Protocol for Microarray Analysis. a) RNA or mRNA from Sample... / Download Scientific Diagram, n.d.)	46
Εικόνα 4-1. Η δυναμική της επιγενετικής. Φαίνονται η ακετυλίωση των ιστονών και η DNA μεθυλίωση αλλά και οι κυριότεροι αναστολείς DNMTi, HDACi (Munteanu et al., 2023b)	51
Εικόνα 4-2. Το φάρμακο vorinostat και οι επιδράσεις αυτού στις HDAC και, κατά συνέπεια, στις διεργασίες των κύτταρων (Bajbouj et al., 2021b)	52

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Τα κυριότερα μη κωδικά RNAs στην επιγενετική ρύθμιση (Wei et al., 2017) ..9	
Πίνακας 2.Το σύστημα ταξινόμησης κακοήθι όγκου, TNM (Nooreldeen & Bach, 2021) 17	
Πίνακας 3 Λίστα με συχνά υπερμεθυλιωμένα γονίδια στο καρκίνο του πνεύμονα και οι διαδικασίες που εμπλέκονται (NSCLC:non small cell lung cancer, SCLC:small cell lung cancer)(Hoang & Landi, 2022)24	
Πίνακας 4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων για την ανίχνευση και την ανάλυση των ncRNAs(Li, 2020b).....48	

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ncRNAs	non coding ribonucleic acids (μη κωδικά ριβονουκλεϊκά οξέα)
DNMTs	DNA methyltransferases (μεθυλοτρανσφεράσες DNA)
5hmC	5-hydroxymethylcytosine (5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη)
SAM	S-adenosyl-methionine (S-αδενοσυλ-μεθειονίνη)
NSCLC	non-small cell lung cancer (μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα)
HDAC	histone deacetylase (αποακετυλάση ιστονών)
ChIP	chromatin immunoprecipitation (ανοσοκαθίζηση χρωματίνης)

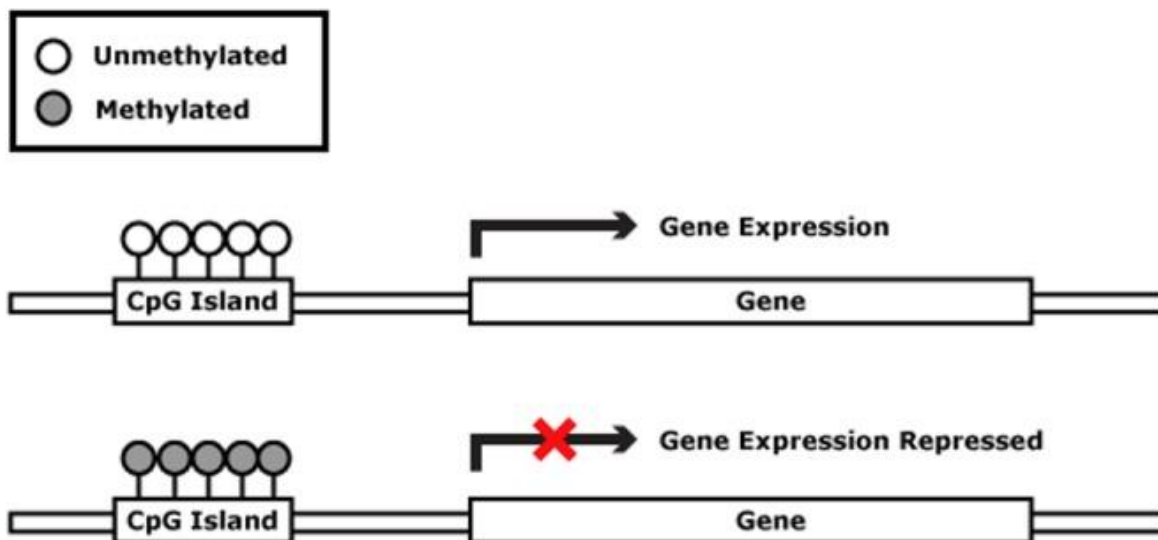
1. Η επιγενετική

Η επιγενετική (σε ορισμένες περιπτώσεις καλούμενη και επιγονιδιωματική) είναι ο τομέας μελέτης που επικεντρώνεται σε αλλαγές στο DNA οι οποίες δεν περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στην υποκείμενη αλληλουχία. Οι βάσεις του DNA και οι πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με αυτό μπορούν να έχουν χημικές τροποποιήσεις που διαμορφώνουν τους βαθμούς με τους οποίους τα γονίδια ενεργοποιούνται ή όχι. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να μεταβιβαστούν από το γονικό στο θυγατρικό κύτταρο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης ή από τη μια γενιά στην επόμενη. Η συλλογή όλων των επιγενετικών τροποποιήσεων σε ένα γονιδίωμα καλείται επιγονιδίωμα (Epigenetics, n.d.). Ο Conrad Waddington εισήγαγε τον όρο επιγενετική στις αρχές της δεκαετίας του 1940. Αυτός όρισε την επιγενετική ως ‘τον κλάδο της βιολογίας που μελετά τις αιτιώδεις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και των και των προϊόντων τους οι οποίες δημιουργούν τον φαινότυπο’. Με την αρχική έννοια αυτού του ορισμού, η επιγενετική αναφέρεται σε όλα τα μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση ενός γονότυπου σε ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Τα επόμενα χρόνια, με την ραγδαία ανάπτυξη της γενετικής, η σημασία της λέξης επιγενετική έχει σταδιακά στενέψει. Σήμερα, η επιγενετική είναι γενικά αποδεκτή ως: η μελέτη των αλλαγών στη λειτουργία του γονιδίου που είναι μιτωτικά ή/και μειωτικά κληρονομήσιμες και αυτό δεν συνεπάγεται αλλαγή στην αλληλουχία DNA. Μια τεράστια ποικιλία διαδοχικών επιγενετικών τροποποιήσεων διασφαλίζει την δημιουργία ενός υγιούς ατόμου (Dupont et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια, μια ευρεία γκάμα ασθενειών, συμπεριφορών και άλλων δεικτών υγείας παρουσιάζει ορισμένα επίπεδα αποδείξεων που να τη συνδέει με επιγενετικούς μηχανισμούς. Τέτοιες ασθένειες και συμπεριφορές αποτελούν ο καρκίνος σχεδόν όλων των τύπων, γνωστικές δυσλειτουργίες, οι αναπνευστικές, καρδιαγγειακές, αναπαραγωγικές, αυτοάνοσες και νευροσυμπεριφορικές διαταραχές (Weinhold, 2006). Οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η DNA μεθυλίωση (DNA methylation), η τροποποίηση των ιστονών (histone modification) και τα μη κωδικά RNA (noncoding RNA, ncRNA). Αντί να αλλάζουν την αλληλουχία DNA, αυτοί οι μηχανισμοί δρουν πάνω σε αυτή, έτσι ώστε να αλλάξουν την γονιδιακή έκφραση (Gayon, 2016).

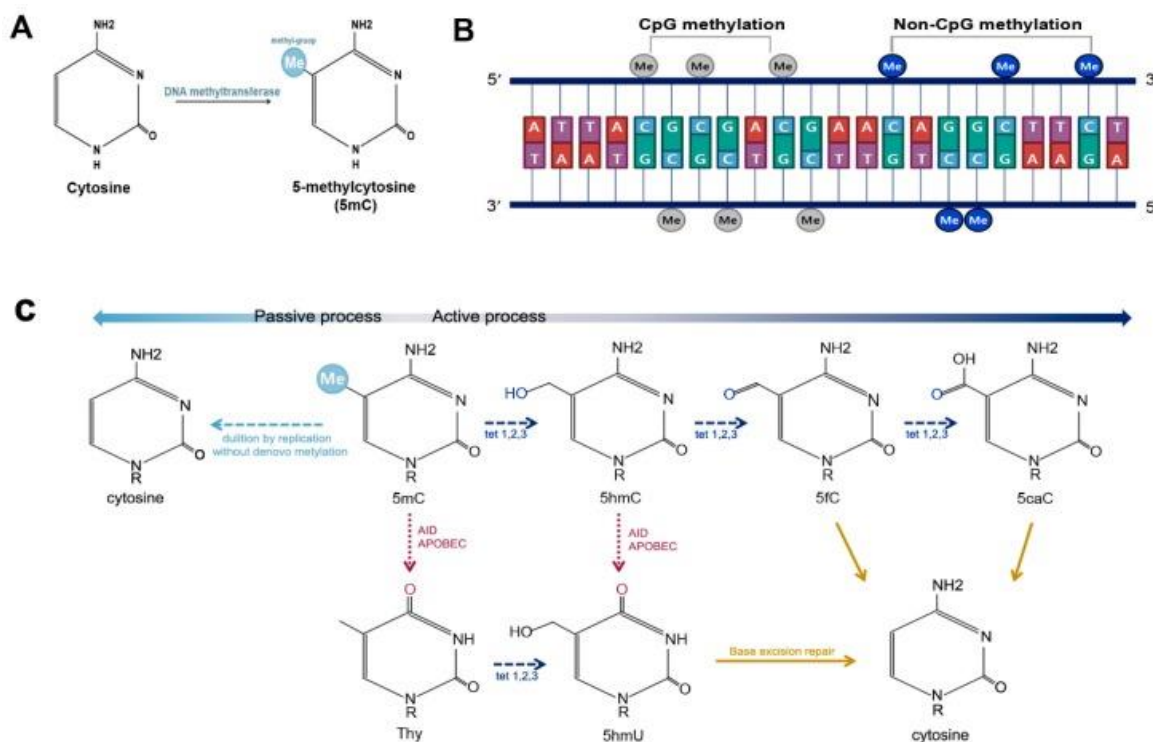
1.1 Οι επιγενετικές τροποποιήσεις

1.1.1 Μεθυλίωση DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη βάση κυτοσίνη, σχηματίζοντας έτσι μια 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC), σε μια αντίδραση που καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs). Η μεθυλίωση αυτή εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε βάσεις κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Αυτός ο τύπος μεθυλίωσης καλείται και CpG μεθυλίωση (Fessele & Wright, 2018). Η μεθυλομάδα προστίθεται στον 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου. Η κυριότερη λειτουργία της τροποποίησης αυτής είναι η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης και έχει αξιοσημείωτες επιδράσεις στη κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Εικόνα 1-1). Η 5-mC είναι ένα καλά συντηρημένο επιγενετικό σημάδι (epigenetic mark) σε ζώα και φυτά. Πέρα από την CpG μεθυλίωση, η κυτοσίνη μπορεί να δεχτεί μια μεθυλομάδα ακόμα και αν ακολουθείται από αδερίνη, θυμίνη, ή μια επόμενη κυτοσίνη. Πρόκειται για την non-CpG μεθυλίωση, που φαίνεται να είναι διαδεδομένη στα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells) και στον ιστό του εγκεφάλου, και αποτελεί το 0,02% της συνολικής μεθυλοκυτοσίνης στα διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα κάτι που εξηγεί την κυριαρχία της CpG μεθυλίωσης. Επιπλέον, η 5-mC μπορεί να απομεθυλωθεί με τρόπο είτε παθητικό ή ενεργό. Η απομεθυλίωση DNA με παθητικό τρόπο πραγματοποιείται κατά την σύνθεση του DNA χωρίς de novo μεθυλίωση, όπου η 5-mC αραιώνεται μετά την αντιγραφή. Η ενεργή απομεθυλίωση συνεπάγεται την τροποποίηση της κυτοσίνης μέσω απαμίνωσης ή/και οξείδωσης με την βοήθεια ενζύμων όπως οι πρωτεΐνες TET (Ten-Eleven-Translocation) οι οποίες οξειδώνουν τη 5-μεθυλομάδα της κυτοσίνης και την μετατρέπουν σε 5 υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC-5-hydroxymethylcytosine). Με περαιτέρω οξειδώσεις δημιουργούνται και άλλες ενώσεις όπως οι 5-φορμυλοκυτοσίνη και 5- καρβοξυλοκυτοσίνη οι οποίες μπορούν να αποκοπούν μέσω γλυκοζιλίωσης από γλυκοζιλίαση της θυμίνης του DNA για να ακολουθήσουν έπειτα οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βάσεων του DNA με τελικό αποτέλεσμα την απομεθυλίωση (Εικόνα 1-2) (Jang et al., 2017). Η DNA μεθυλίωση πραγματοποιείται, όπως προαναφέρθηκε, από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs),



Εικόνα 1-0-1. Περιοχές CpG στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Όπως φαίνεται, όταν είναι μεθυλιωμένες οι περιοχές αυτές η γονιδιακή έκφραση καταστέλλεται (Fessele & Wright, 2018).



Εικόνα 1-0-2. Α) Η μεθυλίωση της κυτοσίνης, Β) CpG μεθυλίωση και non-CpG μεθυλίωση, Γ) Απομεθυλίωση με ενεργό ή παθητικό τρόπο (Jang et al., 2017).

ένζυμα τα οποία μπορούν να μεταφέρουν μια μεθυλομάδα στον πέμπτο άτομο άνθρακα του καταλοίπου κυτοσίνη για να σχηματιστεί η 5- μεθυλοκυτοσίνη. Σαν δότης χρησιμοποιείται η S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (S-adenosyl-methionine, SAM). Η οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών DNMT περιλαμβάνει τις DNMT1, DNMT2 και την υπό-οικογένεια DNMT3 που αποτελείται από τις DNMT3a, DNMT3b και την DNMT3L. Η DNMT1 είναι υπεύθυνη για την μεθυλίωση του DNA έπειτα από την αντιγραφή και ικανή για να μεθυλιώνει ταχέως την νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα συμπληρωματικά με την αλυσίδα εκμαγείο. Η DNMT3 υποοικογένεια εμπλέκεται στην de novo DNA μεθυλίωση. Η DNMT2/DRMT1, tRNA (κυτοσίνη-5-)-μεθυλοτρανσφεράση, δεν αποτελεί DNA μεθυλοτρανσφεράση, αλλά εμπλέκεται στη μεθυλίωση της κυτοσίνης στο κατάλοιπο 38 του βρόχου του αντικωδικονίου tRNA. Η μεθυλίωση των θέσεων CpG στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου χρησιμοποιεί τις πρωτεΐνες MBD (methyl-binding domain, επικράτειες δέσμησης μεθυλίου) που είναι ικανές να καταστείλουν την γονιδιακή έκφραση μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Η πρώτη απάντηση στη μεθυλίωση στον υποκινητή είναι η συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων MBD, που περιλαμβάνουν και τις συγκατασταλτικές πρωτεΐνες Rep και παρέχουν ταχεία καταστολή της έκφρασης εμποδίζοντας τη δέσμηση των μεταγραφικών παραγόντων. Για μακροπρόθεσμη και σταθερή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, οι πρωτεΐνες MBD μπορούν να στρατολογήσουν τις αποακετυλάσες των ιστονών και κατά αυτό το τρόπο να εκκινήσουν ένα δεύτερο μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης, ο οποίος μέσω της τροποποίησης ιστονών οδηγεί στη συμπύκνωση της χρωματίνης (Kiselev et al., 2021).

1.1.2 Τροποποίηση των ιστονών

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν την διαμόρφωση της χρωματίνης εντός του κυτταρικού πυρήνα. Η χρωματίνη αποτελείται, πρωτίστως, από DNA μήκους 146-147 ζευγών βάσεων τυλιγμένων γύρω από ένα οκταμερές αποτελούμενο από τέσσερις πυρηνικές πρωτεΐνες ιστόνες (histone proteins), τις H2A, H2B, H3 και H4. Κάθε ξεχωριστή συσκευασία DNA- οκταμερούς ιστονών καλείται νουκλεόσωμα. Ορισμένες παραλλαγές των ιστονών, όπως η H2A.Z και η H3.3 μπορούν να εισαχθούν στο νουκλεόσωμα, μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση της χρωματίνης και, επομένως, επιδρώντας στη μεταγραφή. Σε μη-διαιρούμενα κύτταρα, η χρωματίνη υφίσταται σε δύο καταστάσεις: την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη είναι μια υψηλά συμπυκνωμένη διαμόρφωση

που κάνει το DNA απρόσιτο για τη μεταγραφική μηχανική σιγάζοντας κατά αυτό το τρόπο αποτελεσματικά την γονιδιακή έκφραση. Η ευχρωματίνη, εν αντιθέσει, είναι μια σχετικά ανοικτή διαμόρφωση, επιτρέποντας στη μεταγραφική μηχανή να προσεγγίσει τον υποκινητή και να διεγείρει την έκφραση των γονιδίων. Συνεπώς, τα γονίδια που υπόκεινται σε ενεργή μεταγραφική ρύθμιση συνήθως περιέχονται εντός της ευχρωματίνης. Οι ιστόνες μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη ή την αφαίρεση λειτουργικών ομάδων και να μεταβάλλουν έτσι τη δομή της χρωματίνης αφού επιδρούν στις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ (και εντός) των νουκλεοσωμάτων. Επιπροσθέτως, αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να στρατολογήσουν ένζυμα για περαιτέρω αλλαγές στα νουκλεοσώματα. Οι περισσότερες (αλλά όχι όλες) από τις τροποποιήσεις των ιστονών συμβαίνουν στην αμινοτελική τους ουρά. Υπάρχουν τουλάχιστον δεκαέξι γνωστοί τύποι τροποποιήσεων μεταξύ των οποίων είναι η μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, ουβικιτινίλωση, σουμοϋλίωση, ο ισομερισμός προλίνης και η ριβοζυλίωση της διφωσφορικής αδενοσίνης. Οι δύο πιο κοινοί και μελετημένοι μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση των ιστονών και η ακετυλίωση των ιστονών (Duarte, 2013). Η μεθυλίωση των ιστονών, που συνήθως συμβαίνει στα κατάλοιπα λυσίνης (K) των ιστονών H3 και H4 προσθέτοντας ομάδες μεθυλίου, είναι μια από τις σημαντικότερες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Αυτός ο τύπος μεθυλίωσης καταλύεται από την μεθυλοτρανσφεράση ιστονών (HMT, histone methyltransferase) που χρησιμοποιεί την SAM ως υπόστρωμα για να μεταφέρει μεθυλόμαδες στα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών. Αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να είναι μονό-, δις- και τρι-μεθυλιωμένα για να δράσουν είτε ως ενεργητικό ή ως κατασταλτικό σήμα της γονιδιακής έκφρασης. Γενικά, τα κατάλοιπα H3K4, H3K36 και H3K79 θεωρούνται ως ενεργητικά σήματα που καταλαμβάνουν τις ενεργές μεταγραφικά περιοχές της χρωματίνης. Τα κατάλοιπα H3K9, H3K27 και H3K79 είναι γνωστά ως κατασταλτικά σήματα που είναι συνήθως συσχετισμένα με τη σίγαση της γονιδιακής έκφρασης και τη συμπυκνωμένη χρωματίνη. Αξίζει να σημειωθεί, ότι αυτές οι τροποποιήσεις των ιστονών δεν είναι αποκλειστικές μεταξύ τους στη χρωματίνη και μπορούν να συνυπάρχουν με δύο ή τρεις τροποποιήσεις στον ίδιο γονιδιωματικό τόπο. Η ακετυλίωση των ιστονών ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών (histone acetyltransferases, HATs) και των αποακετυλασών (histone deacetylases, HDACs). Η ακετυλίωση μπορεί να μειώσει το θετικό φορτίο των καταλοίπων λυσίνης, τα οποία έπειτα αναστέλλουν τη σύνδεση μεταξύ των ουρών των ιστονών και του αρνητικά φορτισμένου DNA, αφήνοντας έτσι το DNA εκτεθειμένο. Κατά συνέπεια, η ακετυλίωση

των ιστονών θεωρείται συνήθως ένα επιγενετικό σημάδι που ενεργοποιεί την έκφραση. Εξάλλου, η ακετυλίωση και η μεθυλίωση στο ίδιο κατάλοιπο λυσίνης δρουν ανταγωνιστικά μεταξύ τους με σκοπό να αναστείλουν ή μια την άλλη, οδηγώντας στην αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών τροποποιήσεων των ιστονών (Y. Zhang et al., 2021). Όσο για τα ένζυμα της ακετυλίωσης των ιστονών (histone acetyltransferases, HATs), αυτά ανήκουν στη κατηγορία των ενζύμων που μεταφέρουν ακετυλομάδες στην ε αμινομάδα του καταλοίπου λυσίνης εντός της ουράς της ιστόνης. Όπως προαναφέρθηκε, με αυτή τη δράση, το θετικό φορτίο του αμινοξέος ουδεροποιείται και η αλληλεπίδραση μεταξύ της ουράς των ιστονών και του DNA γίνεται πιο ανίσχυρη. Αντιθέτως, οι αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases, HDACs) αφαιρούν ακετυλομάδες από τις λυσίνες και επαναφέρουν το θετικό φορτίο. Επομένως, οι HATs αποτελούν μεταγραφικούς ενεργοποιητές ενώ οι HDACs θεωρούνται μεταγραφικοί καταστολείς (Tammen et al., 2013).

1.1.3 Τα μη κωδικά RNAs

Τα μη κωδικά RNAs (non-coding RNAs) τα οποία δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: τα RNAs συντήρησης (housekeeping RNAs- transfer RNA, ribosomal RNA, small nuclear RNA) και τα ρυθμιστικά RNAs (regulatory RNAs- microRNA, small interfering RNA, long non-coding RNA, piwi-interacting RNA). Τα τελευταία χρόνια, ένας τεράστιος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι τα μη κωδικά RNAs διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στις επιγενετικές τροποποιήσεις και μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση σε επίπεδο γονιδίου και σε επίπεδο χρωμοσώματος για να ελέγξουν την κυτταρική διαφοροποίηση (Πίνακας 1). Το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (small interfering RNA, siRNA) προέρχεται από μακρά δίκλιωνα μόρια RNA (συμπεριλαμβανομένων RNAs που προκύπτουν από αντιγραφή ιών, από δραστηριότητες μεταθετών στοιχείων ή από μεταγραφή γονιδίων), τα οποία μπορούν να κοπούν από το ένζυμο Dicer σε θραύσματα 19-24 νουκλεοτιδίων, με τα τελικά θραύσματα RNA να λειτουργούν όταν φορτωθούν στις πρωτεΐνες AGO (Argonaute). Έχειδειχθεί σε πρόσφατες έρευνες ότι το siRNA μπορεί να οδηγήσει σε σίγαση της μεταγραφής στα κύτταρα μέσω των μηχανισμών της DNA μεθυλίωσης και των τροποποιήσεων των ιστονών. Αυτά τα ευρήματα δημιουργούν την πιθανότητα ότι τα μονοπάτια της παρεμβολής του RNA (RNAi) μπορεί να έχουν σπουδαίους ρόλους στη συντήρηση και ρύθμιση του επιγονιδιώματος. Τα piRNAs είναι μια ομάδα μορίων RNA που έχουν μήκος περίπου 26-31 νουκλεοτιδίων. Το

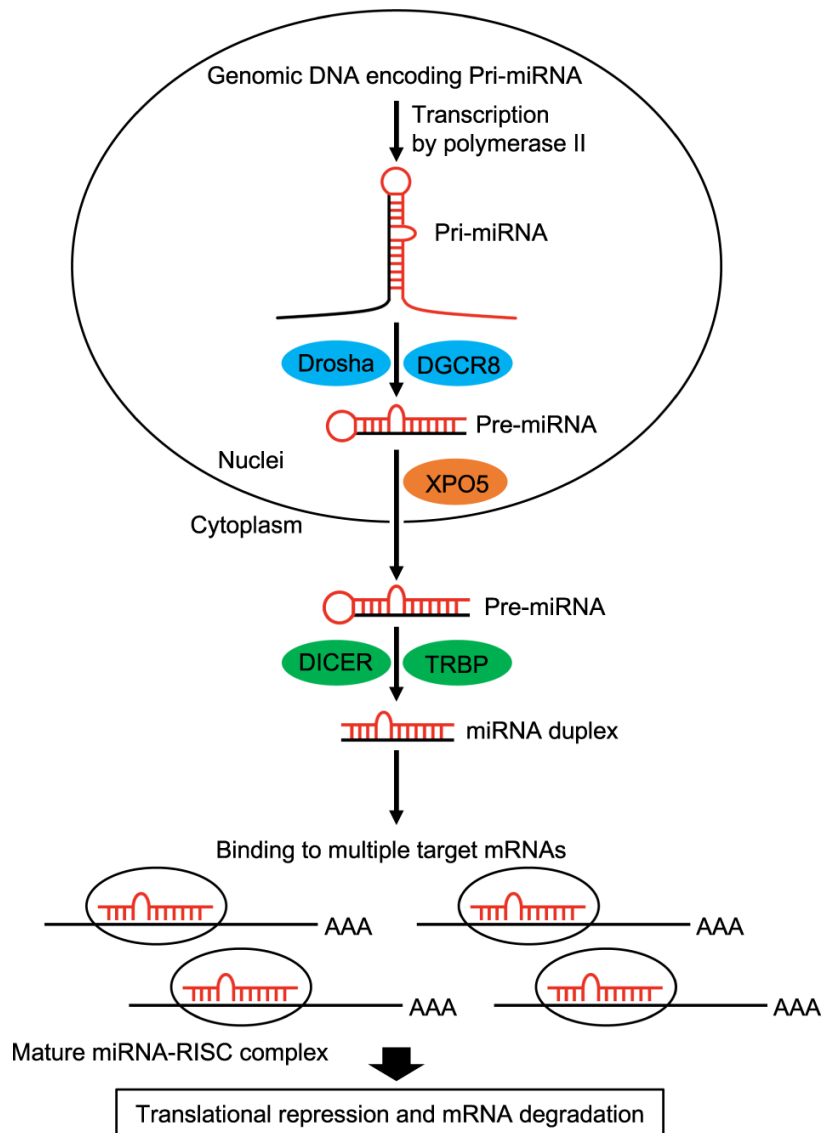
όνομά τους, piRNAs, δηλαδή RNAs που αλληλοεπιδρούν με τις Piwi πρωτεΐνες (Piwi-interacting RNA) αντανakλά το ρόλο τους υπό φυσιολογικές συνθήκες. Σαν επιγενετικός ρυθμιστικός παράγοντας, η πρωτεΐνη Piwi αποσιωπά το γονίδιο homeobox μέσω σύνδεσης με τα γονιδιωματικά στοιχεία απόκρισης PcG μαζί με τις πρωτεΐνες PcGs (polycomb group proteins). Επομένως, έχουν γίνει υποθέσεις ότι τα piRNAs, τα οποία σχετίζονται με την Piwi πρωτεΐνη, θα έχουν σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση. Εντούτοις, η βιοσύνθεση και ο ακριβής μηχανισμός δράσης του μορίου RNA αυτού παραμένει ασαφής προς το παρόν (Wei et al., 2017). Τα μακρά μη κωδικά RNA (long non-coding RNA, lncRNA) αντιπροσωπεύουν μια υψηλά ποικιλόμορφη ομάδα ρυθμιστικών μη κωδικών RNA σε σχέση με τα χαρακτηριστικά, την εντόπιση και το μηχανισμό δράσης τους. Αν εξαιρεθούν το ελάχιστο μήκος των 200 νουκλεοτιδίων και η έλλειψη δυνατότητας κωδικοποίησης πρωτεϊνών, τότε μένουν ελάχιστα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά σε όλα τα lncRNAs των θηλαστικών. Παρά τις συνθήκες αυτές, δηλαδή τις δυσκολίες στη κατηγοριοποίηση των lncRNAs, έχει γίνει προσπάθεια για να ομαδοποιηθούν με βάση το μηχανισμό δράσης τους. Έτσι, ειδικά για το πυρήνα των κυττάρων, τα lncRNAs εμπλέκονται σε καταστάσεις γονιδιακής ρύθμισης όπως: ειδική για τον υποκινητή ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής και επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση. Η ειδική για τον υποκινητή ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιείται με άμεσο τρόπο όταν τα lncRNAs που έχουν μεταγραφεί ανοδικά του γονιδιακού τόπου της αναγωγής του διυδροφολικού οξέος (dihydrofolate reductase, DHFR) αλληλοεπιδρούν με το προ-εναρκτήριο μεταγραφικό σύμπλοκο στη περιοχή του DHFR υποκινητή. Κατά αυτό το τρόπο καταστέλλεται η μεταγραφή. Πέρα από αυτό το μηχανισμό, τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA λειτουργούν και σε διαδικασίες επιγενετικής ρύθμισης επιδρώντας σε πολλαπλούς γενετικούς τρόπους ταυτόχρονα αφού μεταβάλλουν την προσβασιμότητα στη χρωματίνη. Πράγματι, τα lncRNAs φαίνονται να καθοδηγούν μόρια για την αναδιάταξη της χρωματίνης όπως είναι το PRC2 (polycomb repressive complex 2) ή το trithorax complex για να στοχεύσουν γονιδιωματικούς τρόπους DNA στο πυρήνα του κυττάρου. Για παράδειγμα, το lncRNA HOTAIR που βρίσκεται στο γενετικό τόπο HOXC λειτουργεί in trans ως οδηγός για το PRC2 σύμπλοκο οδηγώντας το στο HOXD, με αποτέλεσμα την αποσίωπηση της μεταγραφής μεσολαβούμενη από το PRC2 πάνω στο HOXD τόπο. Συγχρόνως, το lncRNA HOTAIR είναι ικανό να συνδεθεί με το σύμπλοκο LSD1/CoREST/REST και να δράσει ως σκελετός για τα σύμπλοκα τροποποιήσεων ιστονών (Hombach & Kretz, 2016). Τα miRNAs (micro RNAs) αποτελούν μη κωδικά μόρια

RNA με 18-19 έως 24-25, τα οποία ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση μετα-μεταγραφικά. Αυτά τα μόρια εμπλέκονται στην παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) αφού συνδέονται στις αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions, UTRs) του mRNA για να μην πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση ή να αποσυντεθεί το mRNA. Έχει αναφερθεί ότι το κάθε miRNA στοχεύει εκατοντάδες μόρια mRNA. Η βιοσύνθεση των miRNAs εκκινεί από την RNA πολυμεράση II, η οποία μεταγράφει το DNA σε μακρά, πολυ-αδενυλιωμένα και με κάλυμμα μόρια RNA τα οποία καλούνται primary miRNAs (pri-miRNAs). Αυτά αναγνωρίζονται από ένα μικρο-επεξεργαστικό σύμπλοκο, που περιέχει την RNA-ειδική ριβονουκλεάση Drosha και την πρωτεΐνη πρόσδεσής της την DGCR8, στον πυρήνα. Το σύμπλοκο αυτό τέμνει το pri-miRNA σε RNA 60-100 νουκλεοτιδίων, γνωστό ως πρόδρομο miRNA (precursor miRNA, pre-miRNAs), το οποίο μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από τον πυρήνα μέσω του μεταφορέα Εξπορτίνη-5. Εκεί, υπόκειται σε επεξεργασία από την RNAση III ενδονουκλεάση Dicer σε μια τελική μορφή δίκλωνου RNA. Τότε, φορτώνεται στο RNA- επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC) και η μια αλυσίδα αποικοδομείται ενώ η άλλη ενσωματώνεται στο RISC το οποίο οδηγεί στο mRNA στόχο. Το σημείο στόχος του miRNA είναι συνήθως τοποθετημένο στην 3' UTR στο mRNA. Η ενσωμάτωση του RISC προκαλεί κυρίως την αποικοδόμηση ή την καταστολή του mRNA στόχου (Εικόνα 1-3). Επιπλέον, τα miRNAs μπορούν να επιδράσουν στους άλλους δύο επιγενετικούς μηχανισμούς στοχεύοντας στα σχετιζόμενα ένζυμα όπως οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες DNMT και οι αποακετυλάσες των ιστονών HDAC (Yao et al., 2019).

RNA	Μέγεθος (σε ζεύγη βάσεων)	Προέλευση	Κύρια λειτουργία
siRNA	19-24	Δίκλωνο RNA	Αποσιώπηση μεταγραφής
miRNA	19-24	Pri-miRNA	Αποσιώπηση μεταγραφής

piRNA	26-31	Μονόκλωνο πρόδρομο μόριο	Καταστολή τρανσποζονίων, μεθυλίωση DNA
lncRNA	>200	Διάφορες πηγές	Γονιδιακό εντύπωμα, απενεργοποίηση X-χρωμοσώματος

Πίνακας 1 Τα κυριότερα μη κωδικά RNAs στην επιγενετική ρύθμιση (Wei et al., 2017) .

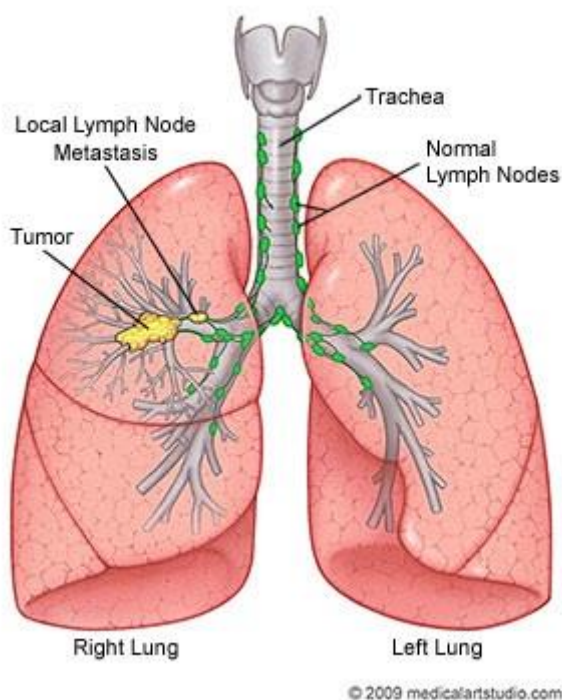


Εικόνα 1-0-3 Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης και του μηχανισμού δράσης του **miRNA** (Inoue & Inazawa, 2021)

2. Ο καρκίνος του πνεύμονα

Καρκίνος καλείται μια μεγάλη ομάδα ασθενειών που μπορούν να ξεκινήσουν σε σχεδόν κάθε όργανο ή ιστό του σώματος όταν μη φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα, διαπερνούν τους συνήθεις φραγμούς για να εισβάλλουν σε παρακείμενα μέρη του σώματος ή να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Η τελευταία διαδικασία ονομάζεται μετάσταση και είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Άλλα κοινοί χαρακτηρισμοί για τον καρκίνο είναι ο όρος νεόπλασμα και κακοήθης όγκος. Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, υπεύθυνος για περίπου 9,6 εκατομμύρια απώλειες, ήτοι 1 στους 6 θανάτους, το έτος 2018. Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου στους άνδρες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του στομάχου και του ήπατος ενώ στις γυναίκες ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας, του πνεύμονα και του θυροειδή. Η επιβάρυνση από την ασθένεια του καρκίνου συνεχίζει να αυξάνεται σε παγκόσμιο επίπεδο, προκαλώντας τεράστια σωματική, συναισθηματική και οικονομική πίεση σε άτομα, οικογένειες, κοινότητες και συστήματα υγείας. Πολλά εθνικά συστήματα υγείας σε χώρες με χαμηλά και μεσαία εισοδήματα είναι λιγότερο προετοιμασμένα για να διαχειριστούν αυτή τη πίεση, με αποτέλεσμα μεγάλος αριθμός ασθενών με νεοπλασματικές ασθένειες να μην έχει πρόσβαση σε έγκαιρη και ποιοτική διάγνωση και θεραπεία. Σε χώρες όπου τα συστήματα υγείας είναι ισχυρά, τα ποσοστά επιβίωσης σε πολλούς τύπους καρκίνου δείχνουν βελτίωση εξαιτίας της πρόσβασης σε πρώιμη ανίχνευση, ποιοτική θεραπεία και φροντίδα επιβίωσης (Cancer, n.d.). Ο καρκίνος του πνεύμονα ή βρογχογενές καρκίνωμα αναφέρεται σε όγκους που προέρχονται στο πνευμονικό παρέγχυμα ή εντός του βρόγχου (Εικόνα 2. Από το 1987, αυτός ο τύπος καρκίνου ευθύνεται για περισσότερους θανάτους στις γυναίκες από τον καρκίνο του μαστού. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι στις αρχές του προηγούμενου αιώνα ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν μια σχετικά σπάνια ασθένεια. Η δραματική αύξηση των περιστατικών τις μετέπειτα δεκαετίες έχει κυρίως αποδοθεί στο κάπνισμα μεταξύ ανδρών και γυναικών. Η παθοφυσιολογία της νόσου είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και ατελώς κατανοητή. Έχει προταθεί ότι η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε καρκινογόνα, όπως ο καπνός του τσιγάρου και ο αμίαντος προκαλεί δυσπλασία στο επιθήλιο του πνεύμονα. Αν η έκθεση συνεχίζεται, οδηγεί σε μεταλλάξεις και επιδρά στην πρωτεϊνική σύνθεση. Αυτά, με τη σειρά τους, διαταράσσουν τον κυτταρικό κύκλο και προάγουν την καρκινογένεση (Siddiqui et al.,

2023). Οι όγκοι στον καρκίνο του πνεύμονα χωρίζονται σε δύο ευρείες ιστολογικές κατηγορίες: το μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (small-cell lung carcinoma, SCLC). Το NSCLC αντιπροσωπεύει πάνω από το 80-85% των περιπτώσεων του καρκίνου αυτού εκ των οποίων περίπου το 40% πρόκειται για αδενοκαρκίνωμα, 25-30% είναι καρκίνωμα στα πλακώδη κύτταρα και 10-15% είναι μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα. Το SCLC αντιστοιχεί σε περίπου 15% των περιστατικών. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες ιστολογικές υποκατηγορίες που είναι λιγότερο κοινές, όπως το αδενοπλακώδες καρκίνωμα (Schabath & Cote, 2019).



Εικόνα 2-0-1 Απεικόνιση δεξιού και αριστερού πνεύμονα, όπου φαίνεται η παρουσία όγκου αλλά και μετάστασης στους λεμφαδένες (Lung Cancer Q&A / Stanford Health Care, n.d.)

2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο καρκίνος του πνεύμονα, με σχεδόν 2,5 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και πάνω από 1,8 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρκίνο το 2022, υπεύθυνος για περίπου 1 στις 8 (12,4%) διαγνώσεις και 1 στους 5 (18,7%)

θανάτους από καρκίνο, σύμφωνα με δεδομένα από το Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Η ασθένεια κατατάσσεται πρώτη μεταξύ των ανδρών και δεύτερη μεταξύ των γυναικών όσον αφορά την επίπτωση και τη θνησιμότητα, με την αναλογία άνδρες προς γυναίκες να βρίσκεται γύρω στο 2. Αυτά τα δεδομένα, βεβαίως, ποικίλουν εξαρτώμενα από την περιοχή, από κοντά στη μονάδα στη βόρεια Αμερική και βόρεια Ευρώπη σε τέσσερις με πέντε φορές στη βόρεια Αφρική και την ανατολική Ευρώπη (Bray et al., 2024). Όσον αφορά την ηλικία, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι πιο κοινός σε άνδρες και γυναίκες άνω των 70 ετών. Έχει γίνει η πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο σε άνδρες ηλικίας από 40 και άνω και σε γυναίκες από 60 και άνω. Η μέση ηλικία των διαγνωσθέντων είναι τα 70 έτη, και η μέση ηλικία των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα είναι τα 72 έτη. Όσο για τη φυλή, συνολικά, η επίπτωση και η θνησιμότητα του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζονται υψηλότερες σε Αφροαμερικανούς άνδρες και χαμηλότερες σε ισπανόφωνες γυναίκες. Η υψηλότερη θνησιμότητα σχετιζόμενη με το καρκίνο το πνεύμονα και τη φυλή είναι μάλλον πολυπαραγοντική καθώς εξαρτάται από την επικράτηση του καπνίσματος, την πρόσβαση σε ιατρική ασφάλεια και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση. Παρομοίως, για τις γεωγραφικές τάσεις στο καρκίνο του πνεύμονα, φαίνεται ότι το ποσοστό των καπνιστών καθορίζει τις περιοχές όπου η επίπτωση είναι είτε μεγαλύτερη ή μικρότερη. Τέλος, η χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση και εκπαίδευση συνεισφέρουν στο κίνδυνο του καρκίνου και δυσχεραίνουν τα αποτελέσματα, ειδικά στους άνδρες. Σε φτωχές χώρες, η θνησιμότητα στους άνδρες είναι πάνω από 40% υψηλότερη σε σχέση με τις ανεπτυγμένες. Εντούτοις, έρευνες έχουν δείξει ότι η καλή διαχείριση σε εκπαίδευση, κοινωνικοοικονομικό στάτους και κάπνισμα μπορεί να μειώσει αλλά δεν ομαλοποίησε τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα. Συνεπώς, φαίνεται ξεκάθαρο ότι αυτός ο κίνδυνος είναι αποτέλεσμα μιας περίπλοκης σχέσης μεταξύ των παραγόντων που περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλο, τη φυλή, το κάπνισμα, την γεωγραφική τοποθεσία και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση (Bade & Dela Cruz, 2020).

2.2 Παράγοντες κινδύνου

Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του πνεύμονα είναι η κατανάλωση καπνού. Άλλοι παράγοντες, που δύναται να συνεισφέρουν ανεξάρτητα ή σε συνεργασία με

το καπνό, είναι η γενετική προδιάθεση, η κακή διατροφή σε συνδυασμό με το αλκοόλ, η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνα, όπως ο αμίαντος, και η ρύπανση του αέρα.

2.2.1. Κάπνισμα

Όλοι οι κύριοι ιστολογικοί τύποι καρκίνου του πνεύμονα έχουν σαν κύρια αιτία το κάπνισμα. Η καρκινογόνα δράση του καπνού έχει παρουσιαστεί σε επιδημιολογικές έρευνες από τις αρχές της δεκαετίας του 1950 και έχει αναγνωριστεί από τη δημόσια υγεία και τις ρυθμιστικές αρχές από τα μέσα της δεκαετίας του 1960. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου ανάμεσα σε καπνιστές και μη καπνιστές είναι 20 με 50 φορές μεγαλύτερος για τους καπνιστές. Η διάρκεια που κάποιος καπνίζει θεωρείται ο ισχυρότερος παράγοντας που καθορίζει τον κίνδυνο ασθένειας με καρκίνο του πνεύμονα ανάμεσα στους καπνιστές. Επιπλέον, υπάρχουν επιδημιολογικές αποδείξεις που υποστηρίζουν την αιτιολογική σχέση μεταξύ του δευτερογενούς (παθητικού) καπνίσματος από μη καπνιστές με το νεόπλασμα. Η μη οικειοθελής αυτή έκθεση στο καπνό φαίνεται να είναι παρούσα σε εσωτερικούς χώρους όπως το σπίτι και ο επαγγελματικός χώρος (Malhotra et al., 2016). Όπως έχει αποδειχθεί, οι ενώσεις που προέρχονται από την καύση του τσιγάρου είναι υπεύθυνες για αυτή την αιτιολογική σύνδεση. Στο καπνό περιέχονται πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, όπως το βενζο(α)πυρένιο, και οι προερχόμενες από νικοτίνη νιτροζαμίνες NNN (N-nitroso-nor-nicotine) και NNK (N-nitroso-nicotine-ketone) οι οποίες προκαλούν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS και στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 με αποτέλεσμα την επαγωγή του καρκίνου του πνεύμονα. Επιπροσθέτως, οι αλδεΐδες, όπως η ακρολεΐνη, έχει πρόσφαταδειχθεί ότι προωθούν το σχηματισμό μεταλλαξιγόνων DNA προσμίξεων ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την επιδιόρθωση του DNA συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στη καρκινογένεση. Προκλινικές έρευνες έδειξαν ότι η νικοτίνη, το εθιστικό συστατικό του καπνού, έχει ισχυρές επιδράσεις προαγωγής καρκίνου στα ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) που προωθεί την κυτταρική ανάπτυξη, μετανάστευση και αγγειογένεση ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την απόπτωση. Βέβαια, η ανακάλυψη ότι οι νιτροζαμίνες NNN και NNK είναι αγωνιστές του παραπάνω υποδοχέα με σημαντικά υψηλότερη συγγένεια από την νικοτίνη εξάγει το συμπέρασμα ότι, στους καπνιστές, ο επαγόμενος καρκίνος αυτού του τύπου προκαλείται από τις νιτροζαμίνες και όχι από την νικοτίνη (Schuller, 2019).

2.2.2. Διατροφή και αλκοόλ

Διάφορες μελέτες υποδηλώνουν ότι η παχυσαρκία και διατροφικοί παράγοντες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Χαμηλές συγκεντρώσεις β-καροτίνης, βιταμίνης C και Α-τοκοφερόλης (μιας ισομορφής της βιταμίνης E) συνδέονται με την ανάπτυξη νεοπλάσματος. Έρευνα στην Ουρουγουάη με 256 περιστατικά με καρκίνο του πνεύμονα και 284 μάρτυρες, δηλαδή άτομα χωρίς την ασθένεια, κατέδειξε μια αύξηση στο κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα που οφείλεται στη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, βοδινού και τηγανητών κρεάτων. Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καθώς σχετίζεται με μεταλλάξεις στο p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, προάγοντας την υπόθεση ότι το αλκοόλ μπορεί να ενδυναμώσει τις μεταλλαξιγόνες επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου στον πνεύμονα (Akhtar & Bansal, 2017).

2.2.3. Έκθεση σε καρκινογόνα

Η έκθεση σε καρκινογόνα διαφορετικής προέλευσης πιθανόν καταλαμβάνει την τρίτη θέση στη κατάταξη των αιτιολογικών παραγόντων με σύνδεση με το 5 έως 10 % των περιστατικών. Η έκθεση στον αμίαντο αποτελεί την πιο σημαντική έκθεση και σχετίζεται με πέντε φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό το πρόβλημα παρατηρείται κυρίως στις αναπτυγμένες χώρες, αν και στις αναπτυσσόμενες υπάρχουν δεδομένα που ενισχύουν την παραπάνω άποψη. Άλλοι καθοριστικοί παράγοντες για τον τύπο νεοπλάσματος αυτό είναι η έκθεση σε αρσενικό, χρώμιο και ιοντίζουσα ακτινοβολία. Αυτοί οι παράγοντες αφορούν κυρίως εργαζόμενους που εφαρμόζουν φυτοφάρμακα, που ασχολούνται με τη ξυλεία ή την παραγωγή ανοξειδωτού σιδήρου και εργάτες σε ορυχεία (Corrales et al., 2020).

2.2.4. Ατμοσφαιρική ρύπανση

Η δεύτερη κύρια αιτία καρκίνου του πνεύμονα είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, η οποία δρα σε συνέργεια με το κάπνισμα. Η ρύπανση του αέρα μπορεί να χειροτερεύσει την πιθανότητα επιβίωσης από αυτή τη νεοπλασία. Σύμφωνα με δεδομένα από τη διεθνή ένωση για τη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC) υπολογίζεται ότι οι θάνατοι από την ασθένεια έχουν αυξηθεί κατά περίπου 30%

από το 2007 σε εποχές που οι καπνιστές έχουν μειωθεί και η ατμοσφαιρική ρύπανση έχει αυξηθεί (Berg et al., 2023). Ευρωπαϊκές και αμερικανικές μελέτες έχουν εκτιμήσει την σχέση μεταξύ ατμοσφαιρικής ρύπανσης και κινδύνου εμφάνισης κακοήθειας στον πνεύμονα. Η συγκέντρωση σωματιδίων στον αέρα βρέθηκε ότι είναι σημαντικά συνδεδεμένη με τη νόσο, συγκεκριμένα με το αδενοκαρκίνωμα. Έρευνες στον Καναδά, την Ολλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο επίσης έδειξαν ότι σωματίδια με μέση διάμετρο 2,5 μm , σε συνδυασμό με οξείδια του αζώτου, διοξείδιο του αζώτου και διοξείδιο του θείου σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο. Τέλος, άλλες αναλύσεις στις ΗΠΑ έδειξαν αύξηση στη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σωματιδίων στους καπνιστές και στους μη καπνιστές (Barta et al., 2019).

2.2.5. Γενετικοί παράγοντες κινδύνου

Ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό για τον καρκίνο του πνεύμονα έχει βρεθεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου σε πολλές έρευνες που αναφέρονται σε πρώιμη έναρξη της ασθένειας. Μια ανάλυση σύνδεσης γενεαλογικών δέντρων υψηλού κινδύνου εντόπισε ένα σημαντικό γονιδιακό τόπο με ευαισθησία στο χρωμόσωμα 6q23-25. Πρόσφατες γονιδιωματικές μελέτες κατάφεραν να προσδιορίσουν πολλαπλούς γενετικούς πολυμορφισμούς με υποκείμενο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα χρησιμοποιώντας έως και ένα εκατομμύριο πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) για να εντοπίσουν κοινές γενετικές παραλλαγές. Οι τρεις κύριοι γονιδιακοί τόποι που εντοπίστηκαν είναι στην περιοχή του χρωμοσώματος 15q25, στην 5p15 και στην 6p21. Οι μελέτες αυτές, αν και εξηγούν ένα μικρό κομμάτι από τη συνολική εικόνα για τον καρκίνο του πνεύμονα, ενισχύουν την υπόθεση ότι η γενετική ευαισθησία μάλλον συνεισφέρει στην καρκινογένεση καθώς είναι γεγονός ότι μόνο μια μειοψηφία από τους καπνιστές αναπτύσσουν την νόσο (Malhotra et al., 2016).

2.3. Διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα

2.3.1. Σταδιοποίηση

Η έκταση του καρκίνου τη περίοδο της διάγνωσης είναι παράγοντας κλειδί για να οριστεί η θεραπεία και να εκτιμηθεί η πιθανότητα επιτυχημένου θεραπευτικού αποτελέσματος. Τα

συστήματα σταδιοποίησης των νεοπλασμάτων κωδικοποιούν αυτή την έκταση για να προσφέρουν στους ιατρούς και τους ασθενείς τα μέσα για να ποσοτικοποιήσουν την πρόγνωση για μεμονωμένα περιστατικά και να συγκρίνουν ομάδες ασθενών σε κλινικές δοκιμές. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα μεταξύ ιατρών είναι το σύστημα TNM από την Αμερικανική Κοινή Επιτροπή για το Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) και την Διεθνή Ένωση για τον Έλεγχο του Καρκίνου (International Union for Cancer Control, UICC). Αυτό η σταδιοποίηση δείχνει την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου (tumors, T), την εξάπλωση του όγκου στους λεμφικούς αδένες (lymph nodes, N) και την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων (metastases, M) και έτσι παρέχει μια ομαδοποίηση σταδίων βασισμένη στο T, N και M (Πίνακας 2). Το TNM αναβαθμίζεται και ενημερώνεται κατά τακτά χρονικά διαστήματα στηριζόμενο στην πρόοδο στην κατανόηση της πρόγνωσης του καρκίνου για να παραμένει σύγχρονο και σχετικό με τη κλινική πρακτική (Edge & Compton, 2010).

Μέγεθος όγκου (cm)		Λεμφικοί αδένες		Μετάσταση	
T1	<3	N0	Χωρίς λεμφαδένες	M0	Απουσία μετάστασης
T2	T2a → 3-5 T2b → 5-7	N1	Ομόπλευροι βρογχοπνευμονικοί	M1	Παρουσία μετάστασης
T3	>7	N2	Ομόπλευροι μεσοθωρακικοί		
T4	Στάδιο εισβολής	N3	Ετερόπλευροι υπερκλείδιοι		

Πίνακας 2. Το σύστημα ταξινόμησης κακοήθης όγκου, TNM (Nooreldeen & Bach, 2021)

2.3.2. Μέθοδοι διάγνωσης

Απεικονιστικές τεχνικές

Αρκετοί τρόποι απεικόνισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Στην πραγματική πρακτική, ο συνδυασμός πολλών απεικονιστικών μεθόδων χρειάζεται για να διασφαλιστεί η ακρίβεια της διάγνωσης. Η αξονική τομογραφία θώρακος (chest computed tomography) αποτελεί θεμελιώδες εργαλείο για την αξιολόγηση του πνευμονικού νεοπλάσματος και χρησιμοποιείται συνήθως σαν ένα μη επεμβατικό μέσο για τον έλεγχο και την σταδιοποίηση της νόσου. Είναι ειδικά χρήσιμο για να ορίσει το μέγεθος, την εντόπιση και το χαρακτηρισμό των πνευμονικών βλαβών, οι οποίες περιβάλλονται από γεμάτο από αέρα πνευμονικό ιστό. Πέραν αυτού, προσφέρει τη δυνατότητα για αξιολόγηση πολλών συστατικών της θωρακικής κοιλότητας. Το τελευταίο διάστημα, έχει υιοθετηθεί και η μέθοδος της αξονικής τομογραφίας θώρακος χαμηλής δόσης (low doses chest CT, LDCT) για τον έλεγχο σε άτομα υψηλού κινδύνου. Αυτός ο τύπος ελέγχου είναι αποτελεσματικός στο να ανιχνεύει μικρά πνευμονικά οζίδια, οδηγώντας σε πρόωπη παρέμβαση και βελτιώνει την πρόγνωση των ασθενών σε σχέση με τη συμβατική ακτινογραφία θώρακος. Άλλο ένα τεστ που χρησιμεύει στη σταδιοποίηση και, επομένως, την απόφαση για το θεραπευτικό μοντέλο που θα ακολουθηθεί είναι η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography). Σε αυτή χρησιμοποιείται η πρόσληψη του ραδιοσημασμένου ανάλογου γλυκόζης, της 18F-φθορο-2-δεοξυγλυκόζης από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα για να εξαχθούν αποτελέσματα (Park et al., 2020).

Βιοψίες ιστού πνεύμονα

Η βιοψία ιστών είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της πάθησης από καρκίνο. Τα δείγματα από ιστό πνεύμονα θα πρέπει να έχουν επαρκές υλικό από τον ιστό για να καθοριστεί ο τύπος πνευμονικού νεοπλάσματος μέσω ιστοπαθολογικών εργαστηριακών διαδικασιών. Η αρχική βιοψία είναι κρίσιμη για την επιβεβαίωση της πρώιμης διάγνωσης, αποφεύγοντας τις επαναλήψεις που ενέχουν τον κίνδυνο επιπλοκών και καθυστερήσεων στην έναρξη της θεραπείας. Μερικά παραδείγματα συχνά χρησιμοποιούμενων διαδικασιών στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν: τη βρογχοσκόπηση οπτικών

ινών ,τη μεσοθωρακοσκόπηση, την θωρακοκέντηση ή ανάλυση υπεζωκοτικού υγρού (Nooreldeen & Bach, 2021).

Μοριακές τεχνικές

Ο μοριακός έλεγχος έχει αναδυθεί ως ένα απαραίτητο συστατικό της διαχείρισης του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στα γονίδια των EGFR (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, epidermal growth factor receptor), BRAF(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) και MET (υποδοχέας μεσεγχυματικού επιθηλιακού παράγοντα μετατροπής, mesenchymal epithelial transition factor receptor) όπως επίσης και η ανάλυση των μετατοπίσεων στα ALK(anaplastic lymphoma kinase), ROS1(c-ros oncogene 1), RET (rearranged during transfection) και NTRK (neurotrophic tyrosine kinase receptor) έχουν ενσωματωθεί στα διαγνωστικά πρότυπα. Οι έλεγχοι για αυτούς τους δείκτες απαιτούν την ανάλυση βιολογικών μορίων και, επομένως, την χρήση διαφόρων τεχνικών όπως την PCR, την DNA sequencing, την ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry,IHC) και τον φθορίζων in situ υβριδισμού (fluorescence in situ hybridization, FISH). Για τις μεταλλάξεις EGFR χρησιμοποιείται συνήθως η αλληλούχηση επομένης γενιάς (next generation sequencing, NGS). Για τις μετατοπίσεις των ROS1 και ALK προτείνονται οι τεχνικές FISH και IHC. Τέλος, για τα BRAF, MET, RET και NTRK παρόλο που έχουν ενσωματωθεί στα πρότυπα διάγνωσης, η χρήση των παραπάνω τεχνικών παραμένει περίπλοκη σε αρκετές χώρες. Για τα BRAF και MET μπορούν να γίνουν PCR ή NGS, για τις μετατοπίσεις RET συνήθως πραγματοποιείται ανίχνευση με PCR, NGS ή FISH ενώ για το NTRK χρησιμοποιείται IHC (Imyanitov et al., 2021).

2.4. Θεραπεία

Παρά την πρόοδο στην ανάπτυξη μεθόδων για τη διάγνωση και την θεραπεία, η θνησιμότητα από τον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει εντυπωσιακά υψηλή. Στη θεραπεία συγκαταλέγονται η χημειοθεραπεία, η χημειοακτινοθεραπεία, η στοχευμένη θεραπεία, η ανοσοθεραπεία, η αντιαγγειογενετική θεραπεία και η συνδυαστική θεραπεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτές η θεραπείες χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιώσουν την επιτυχία ή αποτυχία της χειρουργικής επέμβασης ή να συνδυαστούν με τη χειρουργική επέμβαση με

στόχο τα καλύτερα αποτελέσματα. Η χημειοθεραπεία επικρατούσε στη κλινική φροντίδα του καρκίνου πριν εμφανιστεί η στοχευμένη θεραπεία. Χημικοθεραπευτικά φάρμακα όπως το cisplatin και το gemcitabine λειτουργούν διαταράσσοντας το σύστημα επιδιόρθωσης DNA, δημιουργώντας βλάβη σε αυτό και επάγοντας την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Άλλα, όπως οι ταξάνες εμπλέκονται στη δυναμική των μικροσωληνίσκων, προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επάγουν αποπτωτικούς μηχανισμούς. Όμως, στη χημειοθεραπεία υπάρχουν περιορισμοί που έχουν να κάνουν με την εγγενή αντίσταση ακόμα και αν οι ουσίες προσφέρουν αποτελέσματα στην αρχική θεραπεία. Οι όγκοι μπορούν να αποκτήσουν αντίσταση στη δράση των ουσιών αυτών τάχιστα (Guo et al., 2022). Η χημειοακτινοθεραπεία συνήθως χρησιμοποιείται σε διάφορα στάδια καρκίνου του πνεύμονα και κυρίως στον μη εγχειρήσιμο μη μικροκυτταρικό καρκίνο σταδίου III. Οι παρενέργειες από την ακτινοθεραπεία έχουν υποχωρήσει εξαιτίας της ανάπτυξης νέων διαδικασιών όπως η στερεοστατική ακτινοθεραπεία σώματος (stereostatic body radiotherapy, SBRT) και η ακτινοθεραπεία ρυθμιζόμενης έντασης (intensity-modulated radiotherapy, IMRT). Εντούτοις, το ποσοστό επιβίωσης δεν φαίνεται να βελτιώνεται για τους ασθενείς τρίτου σταδίου. Όσον αφορά το μηχανισμό, οι ακτινοθεραπείες στοχεύουν στη βλάβη στο DNA με αποτέλεσμα να επάγονται ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του καρκίνου (Vinod & Hau, 2020)

3. Η επιγενετικές τροποποιήσεις στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι θεμελιώδους σημασίας για την φυσιολογική ανάπτυξη και την γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, παρεκκλίνουσες επιγενετικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στη παθογένεση ασθενειών, ειδικά στον καρκίνο. Χαρακτηριστικές μοριακές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων παραλλαγών σε ένζυμα που τροποποιούν ιστόνες και στην γονιδιακή έκφραση, διαφέρουν μεταξύ των κυτταρικών τύπων και είναι ισχυρά συσχετισμένα με ποικίλους τύπους καρκίνου. Αυτές οι μοριακές ανακατατάξεις οδηγούν σε τροποποιημένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης επηρεάζοντας κυτταρικά χαρακτηριστικά όπως η αύξηση και η διεισδυτικότητα. Οι βασικές αλλαγές περιλαμβάνουν τη μη φυσιολογική DNA μεθυλίωση που προκαλεί την καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και τις τροποποιήσεις των ιστονών που επιδρούν στην δομή της χρωματίνης και στη γονιδιακή έκφραση (Gu et al., 2024). Άλλα βασικά επιγενετικά στοιχεία σχετιζόμενα με το καρκίνο είναι τα μη κωδικά RNA. Ένας μεγάλος αριθμός μη κωδικών RNA έχει κατηγοριοποιηθεί είτε ως ογκογόνος ή ως ογκοκατασταλτικός. Στον καρκίνο του πνεύμονα, που αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο παγκοσμίως, οι ασθενείς πέρα από τις γενετικές μεταβολές, όπως μεταλλάξεις στα ογκογονίδια KRAS και EGFR και στο ογκοκατασταλτικό TP53, παρουσιάζουν συχνές μεταλλάξεις σε επιγενετικούς τροποποιητές όπως είναι τα γονίδια των DNMTs, PRC1, PRC2 και HDACs (J. E. Lee & Kim, 2022). Διαφορετικές γονιδιωματικές μελέτες μεγάλου αριθμού ασθενών έχουν υπογραμμίσει τη σημασία των επιγενετικών γεγονότων στο καρκίνο του πνεύμονα. Ανάλυση του επιπολασμού των μεταλλάξεων σε γονίδια με επιγενετικές λειτουργίες έχει αποκαλύψει ότι οι πνευμονικοί όγκοι είναι μεταξύ των συχνότερα επηρεαζόμενων, με έμφαση στις αποακετυλάσεις των ιστονών. Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να σχετίζονται και με τον κύριο παράγοντα κινδύνου, το κάπνισμα. Επιπλέον, αυτός ο αιτιολογικός παράγοντας έχει αναφερθεί ότι επιδρά στη μεθυλίωση DNA και μάλιστα φαίνεται ότι επιμένει και χρόνια μετά τη διακοπή (Quintanal-Villalonga & Molina-Pinelo, 2019).

3.1. DNA μεθυλίωση και καρκίνος του πνεύμονα

Η μεθυλίωση του DNA χαρακτηρίζεται από την ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας στον άνθρακα-5 μιας βάσης κυτοσίνης από τα ένζυμα DNMTs. Στα θηλαστικά, η τροποποίηση προτιμάται να συμβαίνει σε περιοχές του γονιδιώματος πλούσιες σε CpG δινουκλεοτίδια, οι οποίες καλούνται νησίδες CpG (CpG islands, CGI) και συνήθως βρίσκονται κοντά σε ή εντός της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου. Μια συνολική μείωση στη μεθυλίωση CpG πιστεύεται ότι ενεργοποιεί ογκογονίδια και ρετροτρανσποζόνια που είχαν σιγαστεί και αυξάνει τη γονιδιωματική αστάθεια. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συχνά απενεργοποιούνται από την υπερμεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση έχει προταθεί ότι ρυθμίζεται δυναμικά από τη τοπική δράση των DNMTs και DNA απομεθυλασών όπως τα ένζυμα TET καθώς και από το ρυθμό αντιγραφής του DNA. Η απορρύθμιση των ενζύμων DNMTs και TET έχει συνδεθεί με την μεταμόρφωση όγκου στον καρκίνο του πνεύμονα (Hoang & Landi, 2022). Ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των DNMTs και συγκεκριμένα του DNMT1 και DNMT3b συσχετίζεται με την υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και, κατά συνέπεια, τον σχηματισμό όγκων και την κακή πρόγνωση. Για αυτή την απορρύθμιση των DNMTs είναι πιθανόν να ευθύνονται τα καρκινογόνα συστατικά του καπνού (Lin et al., 2007). Επιπλέον, υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους η μη φυσιολογική δράση των DNMTs συνεισφέρει στην καρκινογένεση στον πνεύμονα. Η υψηλότερη έκφραση DNMTs έχειδειχθεί ότι συνδέεται και με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η απορρύθμισή τους διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο (Sato et al., 2002). Από την αυξημένη ενεργότητα των μεθυλοτρανσφερασών μπορεί να πραγματοποιηθεί σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω άμεσης ή/και έμμεσης αναστολής. Η άμεση περιλαμβάνει τη διακοπή στην αλληλεπίδραση μεταξύ του μεθυλιωμένου DNA και των μεταγραφικών παραγόντων. Εναλλακτικά, το μεθυλιωμένο DNA στρατολογεί την επικράτεια δέσμευσης m5CpG (MBD), η οποία περιέχει πρωτεΐνες για να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο που εμποδίζει τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Η έμμεση αναστολή περιλαμβάνει τη στρατολόγηση των HDACs στο σύμπλοκο MBD, με αποτέλεσμα το σχηματισμό κατασταλτικών δομών χρωματίνης (Lopez-Serra et al., 2006). Αν και οι αναφορές για υπομεθυλίωση είναι περιορισμένες, υπάρχει πληθώρα μελετών για τους στόχους και τους ρόλους της υπερμεθυλίωσης στους τύπους του καρκίνου του πνεύμονα. Πολλές CpG νησίδες πιθανόν ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν αναγνωρισθεί ως υπερμεθυλιωμένα.

Τέτοια γονίδια διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε κυτταρικές λειτουργίες που είναι συνήθως απορυθμισμένες στις νεοπλασματικές ασθένειες, όπως είναι η απόπτωση- με τα CASP8, DAPK, TNFRSF6, DR4 και DR5-, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου- με τα CDKN2A/p16, PTEN και RASSF1A-, η επιδιόρθωση DNA- με τα MGMT, MLH1 και MSH2-, η ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών- APC, RARβ-2, RUNX3 και SHOX2- και η κυτταρική προσκόλληση και εισβολή με τα CDH1, CDH13, TSLC1 (Πίνακας 3) (Rauch et al., 2008).

ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
Υπερμεθυλίωση	<i>CASP8</i>	Απόπτωση	SCLC
	<i>DAPK</i>	Απόπτωση	NSCLC
	<i>TNFRSF6</i>	Απόπτωση	SCLC
	<i>DR4</i>	Απόπτωση	SCLC
	<i>DR5</i>	Απόπτωση	SCLC
	<i>CDKN2A</i>	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	NSCLC, SCLC
	<i>PTEN</i>	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	NSCLC
	<i>RASSF1A</i>	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	NSCLC, SCLC
	<i>MGMT</i>	DNA επιδιόρθωση	NSCLC, SCLC
	<i>MLH1</i>	DNA επιδιόρθωση	NSCLC
	<i>MSH2</i>	DNA επιδιόρθωση	NSCLC
	<i>APC</i>	Ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών	NSCLC, SCLC
	<i>RARβ</i>	Ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών	NSCLC, SCLC

	<i>RUNX3</i>	Ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών	NSCLC, SCLC
	<i>SHOX2</i>	Ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών	NSCLC, SCLC
	<i>CDH1</i>	Κυτταρική προσκόλληση και εισβολή	NSCLC, SCLC
	<i>CDH13</i>	Κυτταρική προσκόλληση και εισβολή	NSCLC, SCLC
	<i>TSLC1</i>	Κυτταρική προσκόλληση και εισβολή	NSCLC, SCLC

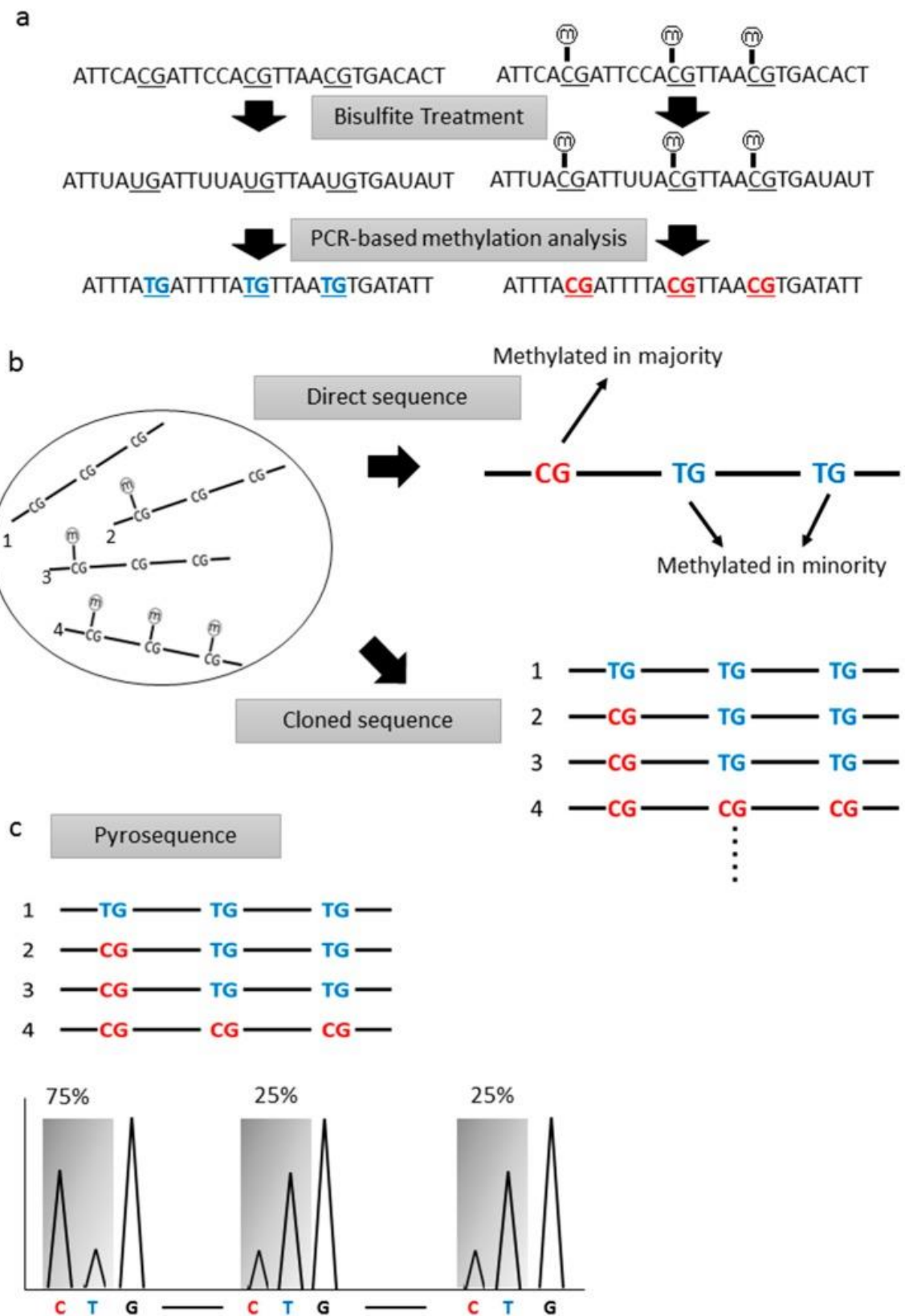
Πίνακας 3 Λίστα με συχνά υπερμεθυλιωμένα γονίδια στο καρκίνο του πνεύμονα και οι διαδικασίες που εμπλέκονται (NSCLC:non small cell lung cancer, SCLC:small cell lung cancer)(Hoang & Landi, 2022)

3.1.1. Μέθοδοι ανίχνευσης μεθυλίωσης DNA

Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να αναλυθεί χρησιμοποιώντας τρεις γενικές προσεγγίσεις: την κατεργασία με διθειώδες άλας, τη χρήση ευαίσθητων για τη μεθυλίωση περιοριστικών ενζύμων και τις τεχνικές που βασίζονται στον εμπλουτισμό συγγένειας. Η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου εξαρτάται αποκλειστικά από το στόχο της ανάλυσης. Βέβαια, η ποιότητα και η ποσότητα του DNA, η ευαισθησία και η ειδικότητα της επιλεγμένης μεθόδου, το κόστος ανά δείγμα και η διαθεσιμότητα του εξοπλισμού παίζει σημαντικό ρόλο τη διαδικασία επιλογής (Martisova et al., 2021). Οι τεχνικές με βάση τον εμπλουτισμό συγγένειας χρησιμοποιούν είτε τη συγγένεια μεταξύ της 5mC και των MBD πρωτεϊνών ή την ανοσοκατακρήμνιση με αντισώματα έναντι της 5mC (MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation). Στη πρώτη περίπτωση, μια στήλη που περιέχει το MBD προσαρτημένο σε στερεή βάση διαιρεί το DNA σε κλάσματα ανάλογα με το βαθμό της CpG μεθυλίωσης, κρατώντας ισχυρά της αλληλουχίες που είναι υψηλά μεθυλιωμένες. Αυτή η

διαδικασία είναι καλύτερη για χρήση σε dsDNA (δίκλωνο DNA) (Cross et al., 1994). Για το αποδιαταγμένο μονόκλωνο ssDNA με χαμηλή πυκνότητα σε CpGs προτιμάται η χρήση αντισωμάτων. Σε αυτή τη μέθοδο, το γονιδιωματικό DNA τεμαχίζεται τυχαία με υπερήχους και ανοσοκατακρημνίζεται με μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τη 5mC. Το τελικό κλάσμα του μεθυλιωμένου DNA μετά την ανοσοκατακρήμνιση μπορεί να καθοριστεί με PCR για να γίνει γνωστή η κατάσταση μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών (Mohn et al., 2009). Οι μέθοδοι περιορισμού για την ποσοτικοποίηση της μεθυλίωσης του DNA είναι απλές, γρήγορες και δεν χρειάζονται κατεργασία με διθειώδες άλας. Η επιλεκτική πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα ειδικά για τη μεθυλίωση είναι, ιστορικά, η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν τα επίπεδα μεθυλίωσης. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ένζυμο αποτελεί το HpaII με αλληλουχία αναγνώρισης CCGG. Η ανάλυση βασίζεται στην επιλεκτική πέψη του DNA από αυτό το ένζυμο το οποίο δεν κόβει τη περιοχή όταν μια μεθυλιωμένη κυτοσίνη είναι παρούσα. Είναι, επιπλέον, πιθανό να γίνει χρήση ενός ζεύγος ισοσχιζομερή ενζύμων (δύο ένζυμα που μοιράζονται την ίδια αλληλουχία αναγνώρισης αλλά δεν τέμνουν απαραίτητα στο ακριβώς ίδιο σημείο), όπου το ένα είναι ευαίσθητο για τη DNA μεθυλίωση και το άλλο όχι. Σε τέτοια περίπτωση, εκτός από το HpaII, χρησιμοποιείται και το MspI που τέμνει την αλληλουχία CCGG ανεξαρτήτως από το αν είναι μεθυλιωμένη (Šestáková et al., 2019). Στη συνέχεια, ακολουθεί qPCR (quantitative polymerase chain reaction, ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) με εκκινητές που περικλείουν την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Το ποσοστό μεθυλίωσης υπολογίζεται από τους κύκλους Ct (threshold cycles) για το κομμένο και το μη κομμένο DNA μάρτυρα (Kurdyukov & Bullock, 2016). Το μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι ότι δεν μπορούν να αναλυθούν τα επίπεδα μεθυλίωσης μιας μόνο συγκεκριμένης περιοχής CpG γιατί απαιτούνται τουλάχιστον δύο σημεία περιορισμού να βρίσκονται εντός του αμπλικονίου για να μετρηθεί αξιόπιστα η μεθυλίωση DNA. Η μετατροπή στο DNA μετά από κατεργασία με διθειώδες άλας είναι ένα κρίσιμο βήμα στις περισσότερες αναλύσεις μεθυλίωσης DNA. Έχει ανακαλυφθεί από το έτος 1970 ότι η κατεργασία με διθειώδες νάτριο μεσολαβεί στην μετατροπή της κυτοσίνης σε σουλφονυλιομένη κυτοσίνη, έπειτα σε απαμινωμένη ουρακίλη και τελικά σε ουρακίλη. Επακόλουθη αντίδραση PCR ενισχύει τις ουρακίλες ως θυμίνες. Στη περίπτωση, όμως, των μεθυλιωμένων κυτοσινών αυτές παραμένουν ανέπαφες και στην PCR ενισχύονται ως κυτοσίνες. Για να επιτύχει η μετατροπή πρέπει το DNA να έχει υποστεί αποδιάταξη και να μην περιέχει πρωτεΐνες (Warnecke et al., 2002). Κατόπιν της μετατροπής ακολουθεί μια τεχνική ανίχνευσης. Ένας

τρόπος είναι να κλωνοποιηθεί το ενισχυμένο PCR προϊόν εντός πλασμιδίων, να γίνει βακτηριακός μετασχηματισμός, να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA από μεμονωμένες αποικίες και τελικά να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση κατά Sanger του πλασμιδιακού DNA. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, που αναφέρεται με αγγλική ορολογία ως Bisulfite-Cloning Sequencing, αποτελεί το γεγονός ότι προσφέρει πληροφορίες για τη μεθυλίωση για ένα αλληλόμορφο ανά κλώνο. Από την άλλη πλευρά, είναι χρονοβόρα και χρειάζεται εντατική εργασία στο εργαστήριο (Huang et al., 2013). Μια άλλη διαδικασία που μπορεί να επιλεγεί είναι η αλληλούχηση με χρήση πυροφωσφορικού (pyrosequencing) μετά τη κατεργασία με διθειώδες άλας. Αυτή η τεχνική απαιτεί ένα μονόκλωνο PCR προϊόν (ssDNA) που λειτουργεί ως DNA εκμαγείο, τέσσερα διαφορετικά ένζυμα, την DNA πολυμεράση, την ATP σουλφορυλάση, τη λουσιφεράση, την απυράση και δύο διαφορετικά υποστρώματα, την 5' φωσφοθειϊκή αδενοσίνη (adenosine 5' phosphosulfate, APS) και την λουσιφερίνη. Αρχικά, ένας εκκινητής αλληλούχησης ξεκινά στο εκμαγείο. Με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου, η πολυμεράση ενσωματώνει το dNTP στη αναπτυσσόμενη αλυσίδα και απελευθερώνεται πυροφωσφορικό. Η σουλφορυλάση τότε δημιουργεί ATP από το πυροφωσφορικό και το APS υπόστρωμα, κάτι που ενεργοποιεί την μετατροπή μεσολαβούμενη από λουσιφεράση της λουσιφερίνης στην οξυλουσιφερίνη που εκπέμπει φως. Το φως αυτό εκπέμπεται ανάλογα με το νουκλεοτίδιο που προστίθεται στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα και καταγράφεται από ειδική κάμερα. Η απυράση έπειτα αποικοδομεί τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Τέλος, συγκρίνοντας της μέγιστης εκπομπής φωτός της ενσωμάτωσης κυτοσίνης ή θυμίνης στις CpG περιοχές εντός του ενισχυθέντος μορίου λαμβάνεται ένα ακριβές μέτρο του ποσοστού της μεθυλίωσης στη θέση του δείγματος. Με αυτή τη διαδικασία είναι δυνατό να μετρηθεί και η συνολική μεθυλίωση αλλά και η μεθυλίωση σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές σε δείγματα θηλαστικών αναλύοντας το αποτέλεσμα σε ένα πυρόγραμμα (Εικόνα 3-0-1)(Delaney et al., 2015).



Εικόνα 3-0-1.α)κατεργασία με διθειώδες άλας, β) Αλληλούχηση άμεσα και αλληλούχηση με κλωνοποίηση, γ) αλληλούχηση με πυροφωσφορικό και πυρόγραμμα(Yokoi et al., 2017).

Αλληλούχηση τρίτης γενιάς (Third generation sequence)

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί από τους επιστήμονες μια νέα μεθοδολογία που ξεκίνησε μια καινούρια εποχή για τις μεθόδους αλληλούχησης. Αυτή είναι η καλούμενη αλληλούχηση τρίτης γενιάς και χαρακτηρίζεται από εξελιγμένη χημεία αλληλούχησης, πραγματικού χρόνου συνθήκες και την παραγωγή των long reads, τα οποία έχουν μέσο μήκος περισσότερο των 10 kb. Αυτή η σημαντική ιδιότητα στοχεύει στην ενίσχυση της ποιότητας της γονιδιωματικής ανάλυσης μαζί και με την παράκαμψη της PCR ενίσχυσης που χρειαζόταν στις αναλύσεις της προηγούμενης γενιάς, κάτι που είχε και ορισμένους περιορισμούς (Scarano et al., 2024). Αυτή η νέα τεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί από ερευνητές για να χαρακτηριστούν επιγενετικά σημάδια, όπως είναι η DNA μεθυλίωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλληλούχηση nanopore που, ταυτόχρονα, ανιχνεύει μεθυλίωση και αλληλουχεί το DNA. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, μια λεπτή μεμβράνη, που περιέχει έναν πόρο μεγέθους νανομέτρων, χωρίζει ένα διάλυμα άλατος σε δύο πηγάδια, το cis και το trans. Μια τάση κατά μήκος της μεμβράνης δημιουργεί ένα ρεύμα ιόντων μέσω του πόρου και οδηγεί το DNA εντός αυτού. Καθώς το DNA περνά, τα νουκλεοτίδια στο στενότερο τμήμα του πόρου ρυθμίζουν το ρεύμα ιόντων. Αν καταγραφεί το ρεύμα αυτό, τότε κάποιος μπορεί να αναγνωρίσει την ταυτότητα και την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Η επίδραση της μεθυλίωσης στο ρεύμα ιόντων μπορεί να φανεί συγκρίνοντας τη καταγραφή του ρεύματος από reads με μεθυλιωμένο DNA με reads με μη-μεθυλιωμένο DNA της ίδιας αλληλουχίας. Η μεθυλομάδα στη μεθυλιωμένη κυτοσίνη αυξάνει το ρεύμα σε σχέση με τη μη-μεθυλιωμένη (Laszlo et al., 2013).

3.2. Τροποποιήσεις ιστονών και καρκίνος του πνεύμονα

Όπως έχει αναφερθεί, το DNA του ευκαρυωτικού κυττάρου συσκευάζεται στη δομή της χρωματίνης, με τα νουκλεοσώματα να αποτελούν τις λειτουργικές της μονάδες. Κάθε νουκλεόσωμα σχηματίζεται από ένα οκταμερές από τέσσερις ιστόνες (H3, H4, H2A και H2B) περιτυλιγμένα από 147 ζ.β. DNA. Οι, προεξέχουσες από το νουκλεόσωμα, αμινοτελικές ουρές των ιστονών γίνονται θέσεις για μια ποικιλία από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που καταλύονται από ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης όπως οι HATs, HDACs, HMTs και HDMs (histone demethylases, απομεθυλάση ιστόνης), μπορούν να δράσουν συντονισμένα ή μόνες τους για να προωθήσουν την ενεργοποίηση ή τη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, την απόπτωση, την γήρανση και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιπρόσθετα με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα (Bajbouj et al., 2021a). Η αφετηρία και η περαιτέρω ανάπτυξη του καρκίνου, παραδοσιακά θεωρούμενη ως γενετική ασθένεια, πιστεύεται τώρα πως εμπεριέχει και επιγενετικές ανωμαλίες. Η

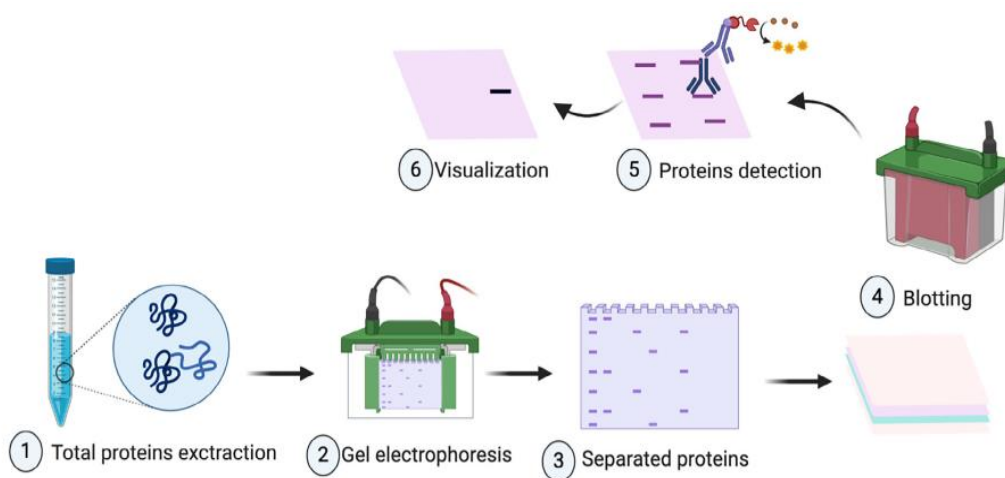
απορρύθμιση των παραπάνω μετα-μεταφραστικών αλλαγών έχει συνδεθεί με τη διαδικασία πολλαπλών βημάτων της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, η τριμεθυλίωση της H3 στο τέταρτο κατάλοιπο λυσίνης (H3K4me3) σχετίζεται με τη μεταγραφική ικανότητα και ενεργοποίηση, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται κοντά στα σημεία εκκίνησης της μεταγραφής στα γονίδια με υψηλά ποσοστά έκφρασης. Μια μείωση της H3K4me3 παρατηρείται σε μια ποικιλία νεοπλασματικών ιστών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας παράγοντας πρόβλεψης για το κλινικό αποτέλεσμα μερικών από αυτών. Τα επίπεδα έκφρασης της LSD1, ενός HDM ενζύμου που αφαιρεί το H3K4me3 σημάδι, είναι σημαντικά αυξημένα στον καρκίνο του πνεύμονα (Füllgrabe et al., 2011). Επιπλέον, η κατάσταση τριμεθυλίωσης στο εικοστό κατάλοιπο λυσίνης έχει αναγνωριστεί ως πρώιμος επιγενετικός βιοδείκτης στον πνεύμονα. Η απώλεια, λοιπόν, της H4K20me3 έχει δείχθει ότι σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα σταδίου I (Van Den Broeck et al., 2008). Παρομοίως, αλλαγές στην ακετυλίωση των ιστονών έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα. Η ακετυλίωση ιστονών είναι ζωτικής σημασίας ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης και οι ακανόνιστες μεταβολές μπορούν να οδηγήσουν σε απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Στα νεοπλάσματα του πνεύμονα, έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4, που πιστεύεται ότι συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (Ramazi et al., 2023). Η ακετυλίωση ρυθμίζεται από τις αντίθετες δράσεις των HATs και HDACs. Στον άνθρωπο, υπάρχουν 18 HDACs που απαρτίζουν τέσσερις κατηγορίες, βασισμένες στην ομολογία τους με τις αντίστοιχες στο ζυμομύκητα HDACs, στον εντοπισμό τους στο κύτταρο και τις ενζυμικές τους λειτουργίες (Grunstein, 1997). Η αποακετυλάση των ιστονών 1 (HDAC1) είναι ένας σημαντικός επιγενετικός παράγοντας που ρυθμίζει την κατάσταση ακετυλίωσης και είναι γνωστό πως συνδέεται στενά με την καρκινική ανάπτυξη. Έχει βρεθεί ότι, η έκφρασή της συσχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης του καρκίνου του πνεύμονα. Επίσης, στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα το επίπεδο έκφρασης είναι υψηλότερο από ότι στο αδενοκαρκίνωμα. Συνολικά, η έκφραση της αποακετυλάσης αυτής είναι αρνητικά συσχετισμένη με το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (L. L. Cao et al., 2017).

3.2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης τροποποιήσεων ιστονών

Οι ιστόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας εντός του πυρήνα. Οι χωρικές και χρονικές αλλαγές στα επίπεδα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ουρές των ιστονών όπως επίσης και στις κεντρικές περιοχές καθορίζουν την ενεργή, ανενεργή ή την κατάσταση αναμονής ενός συγκεκριμένου γονιδιωματικού τόπου. Συνεπώς, η μελέτη αυτών των τροποποιήσεων σε διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες είναι αδιαπραγμάτευτης σημασίας εργαλείο για να κατανοηθούν ποικίλοι κυτταρικοί μηχανισμοί και ασθένειες. Δύο βασικές τεχνικές ανάλυσης με τις παραλλαγές τους που συνεισφέρουν σε αυτή τη μελέτη αποτελούν η τεχνική του Ανοσοστυπώματος κατά Western (Western Blot- WB- Immunoblot) και η Ανοσοκαθίζηση Χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation-ChIP)(Jayani et al., 2010).

Ανοσοστύπωμα Western

Το WB (Εικόνα 3-2) αποτελεί την μέθοδο εκλογής για να προσδιοριστεί και να ποσοτικοποιηθεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε ένα περίπλοκο μίγμα το οποίο έχει εξαχθεί από κύτταρα ή ιστούς που έχουν υποστεί λύση. Αυτές οι μετουσιωμένες ή μη πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη που δεσμεύει πρωτεΐνες και έπειτα η πρωτεΐνη- στόχος ανιχνεύεται μέσω ενός ειδικού αντισώματος . Τέλος, πραγματοποιείται οπτικοποίηση του αποτελέσματος και επικύρωση της μεθόδου (Saavedra et al., 2018).



Εικόνα 3-0-2 Η τεχνική ανοσοστυπώματος Western σε στάδια (Meftahi et al., 2021).

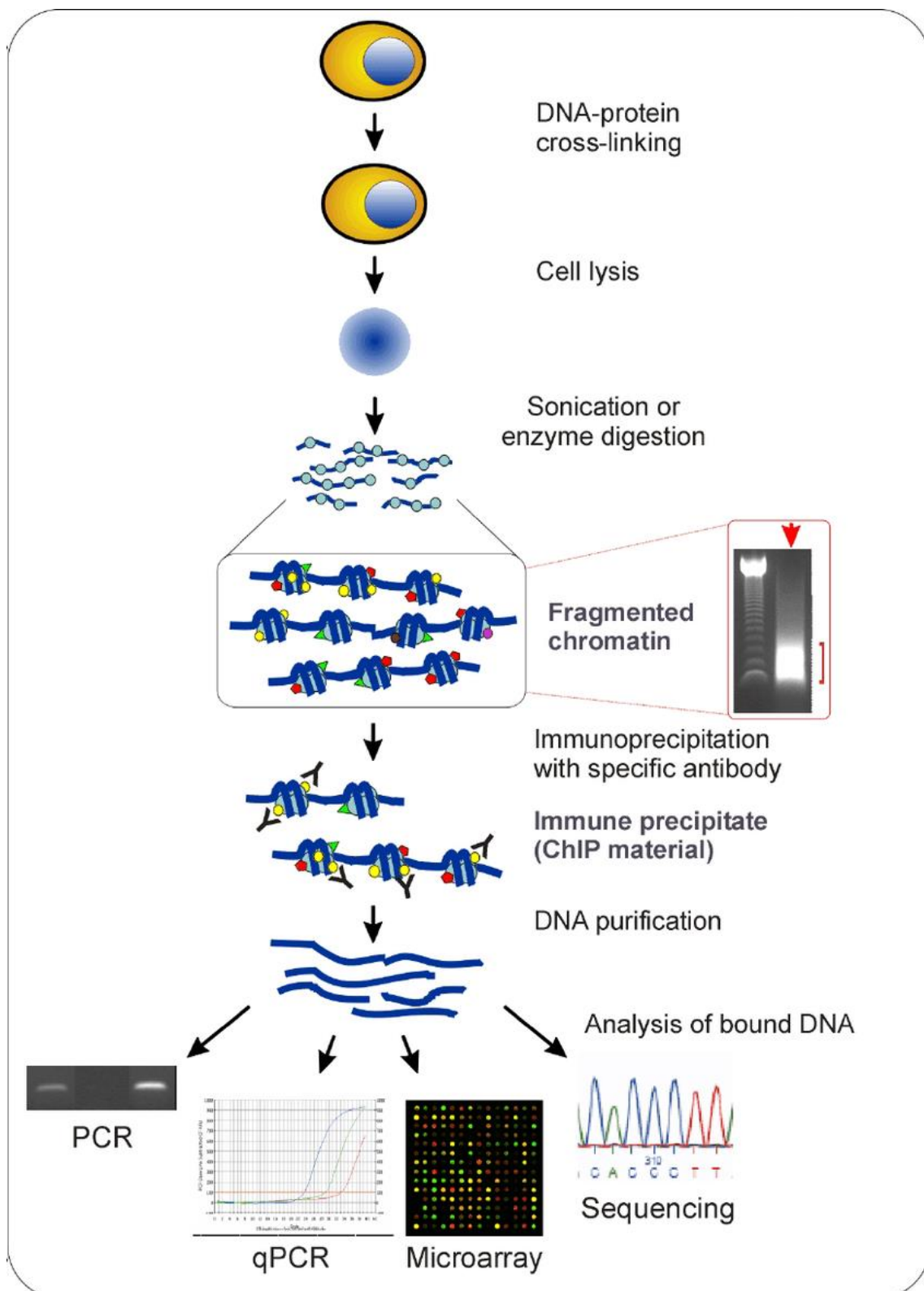
Για την ανίχνευση, την επικύρωση και τον χαρακτηρισμό μιας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης προτείνεται η χρήση περισσότερων από μια τεχνικών. Το WB είναι μια κατάλληλη τεχνική για χαμηλής απόδοσης αναλύσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων κυρίως γιατί δεν απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις και εξοπλισμό. Επιπλέον, παρέχει στους ερευνητές τη δυνατότητα να καταγράφουν τις χαμηλής αφθονίας, ενδογενείς και νέες τροποποιήσεις σε συνδυασμό με τις απομονωμένες πρωτεΐνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή του ειδικού αντισώματος για τη διαδικασία του ανοσοοστεντώματος θεωρείται το πιο κρίσιμο σημείο στην ανίχνευση της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης κατά αυτό το τρόπο (Meftahi et al., 2021).

Ανοσοκαθίζηση χρωματίνης

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για να προσδιοριστούν και να ποσοτικοποιηθούν οι τροποποιήσεις και τα μοτίβα αλληλεπίδρασης της χρωματίνης είναι η τεχνική της Ανοσοκαθίζησης χρωματίνης (ChIP). Η ανάλυση ChIP βασίζεται σε ειδικά αντισώματα που μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένους δείκτες τροποποιήσεων των ιστονών ή επιγενετικούς ρυθμιστές σε συνδυασμό με ειδικά DNA θραύσματα, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση τόπο-ειδικών λειτουργιών των τροποποιήσεων των ιστονών ή μεταγραφικών παραγόντων που μπορούν άμεσα ή έμμεσα να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης και την επακόλουθη απόδοση της μεταγραφικής μηχανής. Αυτή η τεχνική, όπως και η κατεργασία με διθειώδες άλας στη DNA μεθυλίωση, θεωρείται θεμελιώδους σημασίας για τη μελέτη των τροποποιήσεων των ιστονών (Li, 2020a). Αρχικά, στο DNA και τις πρωτεΐνες πραγματοποιείται η αντίδραση διασύνδεσης (cross-linking reaction), η οποία είναι αντιστρέψιμη, και συνδέει ομοιοπολικά τις πρωτεΐνες και τις αλληλουχίες στόχους του DNA. Συνήθως, για αυτή την αντίδραση χρησιμοποιείται φορμαλδεϋδη αν και είναι κατάλληλη μόνο για την παρατήρηση πρωτεϊνών που συνδέονται άμεσα με το DNA αφού θα πρέπει τα μόρια να απέχουν μεταξύ τους περίπου 2 Å. Για την εξέταση όμως των πρωτεϊνών που αντιδρούν έμμεσα με το DNA, όπως αυτές σε μεγάλα σύμπλοκα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι δι-λειτουργικοί διασυνδέτες (cross-linkers) μεγάλης εμβέλειας σε συνδυασμό με την φορμαλδεϋδη. Υπάρχει όμως και η ανοσοκαθίζηση χρωματίνης τύπου native (native ChIP) η οποία παραβλέπει το στάδιο της διασύνδεσης και είναι αρκετά χρήσιμη για την ανάλυση των ιστονών εξαιτίας της υψηλής συγγένειάς τους για το DNA.

Γενικά, και στις δύο διαδικασίες υπάρχει το στάδιο του κατακερματισμού της χρωματίνης (fragmentation), είτε με ενζυματική πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση (micrococcal nuclease, MNase), που κόβει το DNA αλλά αφήνει το νουκλεόσωμα άθικτο, είτε με υπερήχους ολόκληρων κυττάρων ή πυρήνων σε θραύσματα 200-1000 ζβ, με μέσο όρο τα 500 ζβ. Το προϊόν της λύσης καθαρίζεται με καθίζηση και τα σύμπλοκα DNA- πρωτεϊνών υποβάλλεται σε ανοσοκαθίζηση από το υπερκείμενο (χρωματίνη) με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Έπειτα, τα σύμπλοκα αυτά θα υποστούν έκπλυση υπό αυστηρές συνθήκες, για να απομακρυνθεί η μη ειδικά δεσμευμένη χρωματίνη, η διασύνδεση αντιστρέφεται, οι πρωτεΐνες πέπτονται και το DNA καθαρίζεται (Collas, 2009). Για να αναλυθούν τα προϊόντα της ανοσοκαθίζησης χρωματίνης χρησιμοποιούνται δύο τρόποι. Ο πρώτος εκλαμβάνει το DNA ως εκμαγείο για χαρτογράφηση μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας εκκινητές για συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος. Ο δεύτερος τρόπος έχει να κάνει με την ανάλυση υψηλής απόδοσης (high-throughput). Εκεί, το προϊόν της ανοσοκαθίζησης είτε υβριδίζεται με μια μικροσυστοιχία DNA, η οποία καλύπτει ένα υποσύνολο ή το ολόκληρο γονιδίωμα του οργανισμού μοντέλο (ChIP on chip), είτε πραγματοποιείται αλληλούχηση του ανοσοκαθαρισμένου DNA άμεσα (ChIP-seq)(Εικόνα 3-3). Αν η αλληλουχία της περιοχής-στόχου είναι γνωστή, τότε προτιμάται η PCR. Σε αυτή τη περίπτωση, η ενίσχυση του συγκεκριμένου θραύσματος DNA θα πραγματοποιηθεί μόνο αν υπάρχει αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες, ειδάλλως δεν θα παρατηρηθεί ενίσχυση. Για να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ανεξάρτητα από την μέθοδο ανάλυσης των δεδομένων, θα πρέπει να εκτελεστεί εξ ολοκλήρου η διαδικασία της ανοσοκαθίζησης χρωματίνης τουλάχιστον δύο φορές για κάθε αντίσωμα ξεκινώντας από ανεξάρτητα βιολογικά αντίγραφα (Wiehle & Breiling, 2016). Το ενισχυμένο DNA από τη διαδικασία της PCR μπορεί έπειτα να αναλυθεί με αλληλούχηση ChIP-seq και κατά αυτό τον τρόπο να χαρτογραφηθούν οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις (Nagarajan et al., 2013). Γενικά, η διατάραξη των ομαλών επιπέδων των τροποποιήσεων των ιστονών μπορεί να οδηγήσει σε αναπτυξιακές διαταραχές και σε καρκίνο, όπως προαναφέρθηκε. Συνεπώς, η ευαίσθητη και ακριβής ανίχνευση των τροποποιήσεων αυτών αποτελεί κάτι το ευεργετικό στη διάγνωση των ανθρώπινων ασθενειών. Εκτός από τις αναλύσεις που παρουσιάστηκαν (ChIP, WB), έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από μεθόδους που βασίζονται στο φθορισμό, την βιοφωταύγεια, την χρωματομετρία, την ηλεκτροχημεία, τη φασματοσκοπία Raman και τη φασματομετρία μάζας τα τελευταία χρόνια. Όλες αυτές οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για

ευαίσθητη και επιλεκτική *in vitro* ανίχνευση των τροποποιήσεων των ιστονών. Ειδικά, η ανάλυση που βασίζεται στο φθορισμό και τη βιοφωταύγεια μπορούν να εφαρμοστούν επιπλέον και για την *in vivo* απεικόνιση σε ζωντανά κύτταρα και ιστούς (Ma et al., 2019).

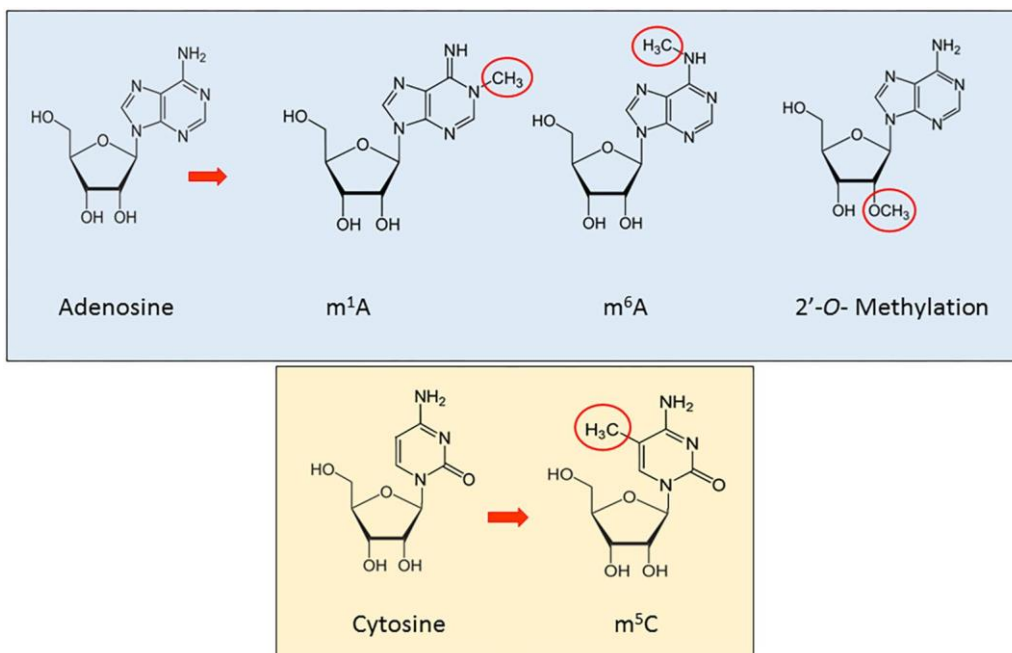


Εικόνα 3-0-3 Η διαδικασία της ανοσοκαθίζησης χρωματίνης (Amatori et al., 2018)

3.3 RNA και καρκίνος του πνεύμονα

3.3.1 Οι τροποποιήσεις του RNA

Η επιγενετική αναφέρεται σε αλλαγές στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης χωρίς να αλλάζει η αλληλουχία του γονιδίου, κάτι που περιλαμβάνει την DNA μεθυλίωση, τις τροποποιήσεις των ιστονών και τη ρύθμιση των RNAs. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις μεταβολές RNA έχει παρουσιάσει αύξηση τα τελευταία χρόνια. Η απορρύθμιση του RNA επιγενετικού μονοπατιού έχει συσχετιστεί με ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Μέχρι σήμερα, περισσότεροι από 170 διαφορετικοί τύποι τροποποιήσεων RNA έχουν αναφερθεί να μεταβάλλουν ποικίλες δομές RNA όπως το αγγελιοφόρο mRNA, το μεταφορικό tRNA, το ριβοσωμικό rRNA και το μακρύ μη- κωδικό lncRNA. Τέτοιου τύπου επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν η RNA μεθυλίωση- με την N6-μεθυλοαδενοσίνη (m6A)(μεθυλίωση στο άζωτο 6 στην αδενοσίνη) να είναι η πιο μελετημένη όσον αφορά τον καρκίνο- η ψευδοουριδυλίωση (pseudouridylation) και η επεξεργασία A-I(μετατροπή αδενοσίνης σε ινοσίνη). Επιπλέον με την m6A, υπάρχουν και οι παρακάτω μεθυλιώσεις RNA που απαντώνται στα θηλαστικά: 2'-O-Me (μεθυλίωση στο 2'-O), m1A (N1-μεθυλοαδενοσίνη), m3C(3-μεθυλοκυτιδίνη), 5mC(5-μεθυλοκυτοσίνη), m7G (N7-μεθυλογουανοσίνη) (L. Yang et al., 2024).



Εικόνα 3-0-4 Σχηματική αναπαράσταση κυριότερων τροποποιήσεων μεθυλίωσης στο ευκαρυωτικό RNA (Romano et al., 2018)

Αυτές οι τροποποιήσεις RNA αναγνωρίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές ενός μετάγραφου από πρωτεΐνες αναγνώστες (readers) και καταλύονται από ένζυμα ικανά να τις προσθέτουν ή να τις αφαιρούν. Συνολικά, αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται πρωτεΐνες τροποποίησης RNA (RNA-modifying proteins, RMPs) και ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: τα ένζυμα που εναποθέτουν χημικά σημάδια στο RNA, γνωστά ως συγγραφείς (writers), τους απαλειφείς (erasers) που αφαιρούν τις τροποποιήσεις και τους αναγνώστες, οι οποίοι, όπως προαναφέρθηκε, αναγνωρίζουν ειδικά και συνδέονται σε συγκεκριμένες χημικές αλλαγές στο RNA. Η απορρύθμιση των RMPs έχει συνδεθεί με ασθένειες του ανθρώπου όπως ο καρκίνος (Esteve-Puig et al., 2020). Η μεθυλίωση στο N6 της αδενοσίνης αποτελεί την πιο άφθονη και διαδεδομένη εσωτερική τροποποίηση του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα και διαμορφώνει μια μεγάλη ποικιλία από διαδικασίες. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει τον σημαντικό ρόλο της απορρύθμισης της τροποποίησης αυτής στον καρκίνο του πνεύμονα καθώς η μη ομαλή έκφραση των RNA μεθυλοτρανσφερασών (writers) και των απομεθυλασών (erasers) έχουν συνδεθεί με τη δυσλειτουργία των RNA-εξαρτώμενων λειτουργιών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ο ογκογόνος ρόλος της m6A writer πρωτεΐνης METTL3 (Methyltransferase-like 3). Η METTL3 μαζί με τη METTL14 συνιστούν ένα ετεροδιμερές το οποίο μαζί με διάφορες βοηθητικές υπομονάδες κατέχουν την ενεργότητα

της μεταφοράς μεθυλίου. Στους ιστούς ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί η METTL3 να υπερεκφράζεται. Τα αυξημένα επίπεδά της έχουν δείξει να προάγουν την ανάπτυξη των όγκων καταλύοντας την μεθυλίωση όχι μόνο των mRNAs, αλλά και των ncRNAs, σε δείγματα ατόμων με αδενοκαρκίνωμα. Πειράματα με γονιδιακή καταστολή (knockdown) της METTL3 είχαν ως αποτέλεσμα την αυξημένη κυτταρική απόπτωση και την τροποποίηση της p53 σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Επιπρόσθετα με τη λειτουργία του ως writer, το METTL3 μπορεί να έχει ρόλο στην καρκινογένεση δρώντας και ως reader πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, μπορεί να δεσμευθεί σε περιοχές m6A στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' Untranslated Region-UTR) των mRNAs κοντά σε κωδικόνιο λήξης και να αλληλοεπιδράσει με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 3H των ευκαρυωτών eIF3H (eukaryotic translation initiation factor 3H) στο 5' άκρο του mRNA, οδηγώντας κατά αυτό τον τρόπο στη δημιουργία βρόχων mRNA (loops). Συνεπώς, με την μετάφραση που μεσολαβείται από την παραπάνω διαδικασία ρυθμίζονται εκατοντάδες mRNA στόχοι που συνδέονται με την ανάπτυξη του καρκίνου και την απόπτωση. Στην περίπτωση των erasers πρωτεϊνών, η ανοδική ρύθμιση των απομεθυλασών FTO και ALKBH5 έχει συσχετιστεί με ογκογόνο ρόλο διευκολύνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και αναστέλοντας την απόπτωση στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (Teng et al., 2021).

3.3.2 Τα lncRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα

Η απορρύθμιση των μακρών μη κωδικών RNAs (long non-coding RNA) έχει συνδεθεί με ποικίλες ασθένειες και ειδικότερα με τον καρκίνο. Στους μελέτες έχουν αναφερθεί στα προφίλ έκφρασης των lncRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, ιδιαίτερα μετά από την ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Παρόμοια με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα lncRNAs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στα ογκογόνα και στα ογκοκατασταλτικά lncRNAs. Τα ογκογονίδια είναι γονίδια τα προϊόντα των οποίων προάγουν την ανάπτυξη όγκων και η απορρύθμισή στους αποτελεί ένα βασικό βήμα στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πολλαπλά ογκογόνα lncRNAs, στους τα HOTAIR, MALAT1, PVT1, ANRILL και άλλα, διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση των ογκογονιδίων και στον καρκίνο του πνεύμονα. Αυτά τα lncRNAs ρυθμίζονται στους τα άνω στα καρκινικά κύτταρα και προωθούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Z. Chen et al., 2020). Για παράδειγμα, η έκφραση του MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript) σε NSCLC ιστούς είναι υψηλότερη από ότι στους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς και ενδέχεται να ρυθμίζει αρνητικά τα κατασταλτικά κύτταρα. Σε καλλιέργεια NSCLC κυττάρων, η αποσιώπηση του MALAT1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το σχηματισμό αποικιών. Επιπλέον, το ογκογόνο αυτό lncRNA ρυθμίζει αρνητικά την ογκοκατασταλτική δραστηριότητα του p53 (tumor protein 53) υποκινητή σε κυτταρικές σειρές στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ η εξάντλησή του οδηγεί στην ρύθμιση στους τα άνω των p21 και FAS και, συνεπώς, τον κυτταρικό κύκλο σε παύση στη φάση G1. Συνολικά, το MALAT1 έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα μέσω πολλαπλών μηχανισμών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης και στόχος για θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ένα άλλο ογκογόνο lncRNA είναι το HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA), του οποίου η έκφραση είναι σημαντικά υψηλότερη στους καρκινικούς ιστούς και η έκφρασή του συσχετίζεται με προχωρημένο παθολογικό στάδιο, λεμφαδενική μετάσταση και φτωχή πρόγνωση. In vitro, το HOTAIR ρυθμίζει την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο και εμπλέκεται στην αντίσταση στη σισπλατίνη (cisplatin) στα κύτταρα του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα (LUAD). Επιπρόσθετα, τα σύμπλοκα που μεσολαβούν για τη μεθυλίωση ιστονών και την αναδιαμόρφωση χρωμοσώματος έχουν και αυτά σχέση με το HOTAIR. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο PRC2 (Polycomb repressive complex 2), το οποίο αποτελεί μια μεθυλοτρανσφεράση ιστονών και οδηγεί στην επιγενετική αποσιώπηση, συνδέεται με το 5' άκρο του HOTAIR και οδηγεί στην τριμεθυλίωση του καταλοίπου λυσίνης 27 στην H3 ιστόνη. Μέσω αυτής της τριμεθυλίωσης στο p53, το HOTAIR καταστέλλει την έκφραση του p53 και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση. Κατά συνέπεια, αυτό το lncRNA έχει θεωρηθεί ότι αποτελεί έναν από στους σημαντικότερους ρυθμιστές στους γονιδιακής έκφρασης και στους ανάπτυξης του καρκίνου του πνεύμονα (Z. Cao et al., 2022). Από την άλλη πλευρά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη όγκων. Όταν ένα τέτοιο γονίδιο απενεργοποιείται μπορεί να επέλθει καρκινογένεση. Τα ογκοκατασταλτικά lncRNAs, όπως τα MEG3, GAS5 SPRY4-IT1 και άλλα, ρυθμίζονται προς τα κάτω στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και οδηγούν στην ανάπτυξη όγκων. Το ανθρώπινο MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) είναι το πρώτο lncRNA που βρέθηκε να έχει ογκοκατασταλτική δράση καθώς ενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

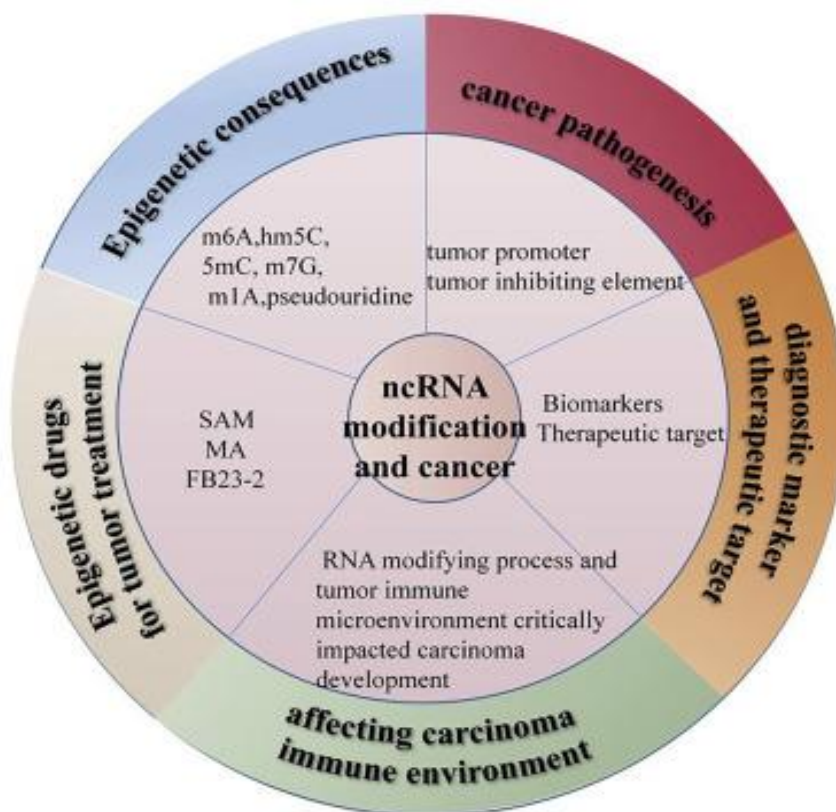
λειτουργώντας ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης. Στον NSCLC, το MEG3 είναι απορυθμισμένο, εξαιτίας μεθυλίωσης στον υποκινητή του, και η χαμηλή έκφρασή του έχει βρεθεί να συνδέεται με προχωρημένα παθολογικά στάδια και μέγεθος όγκου (Ghafouri-Fard & Taheri, 2019). Επίσης, το GAS5 (Growth Arrest Specific 5) αποτελεί άλλο ένα ογκοκατασταλτικό lncRNA. Η μειωμένη έκφρασή του έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με προχωρημένα TNM στάδια και αυξημένο μέγεθος όγκου. Αντιθέτως, η αυξημένη έκφραση του στα NSCLC κύτταρα απορυθμίζει το μεταγραφικό παράγοντα E2F1 και οδηγεί στην έκφραση των p53 και p21, με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την προώθηση της απόπτωσης (Y. Wu et al., 2016). Συνολικά, τα lncRNAs λειτουργούν ως σημαντικοί ρυθμιστικοί παράγοντες στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα. Είτε ρυθμίζονται προς τα άνω ή προς τα κάτω στους καρκινικούς ιστούς έχει παρατηρηθεί ισχυρή συσχέτιση με παθολογικά στάδια, με μεταστάσεις και, γενικά, με την επιβίωση του ασθενή.

3.3.3. Τα miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα

Τα μικρο ριβονουκλεϊκά οξέα (microRNAs, miRNAs) είναι μικρά μη κωδικά RNAs, μονόκλωνα, με μήκος περί τα 21-23 νουκλεοτίδια που περιέχουν μια ουριδίνη U στο 5' άκρο τους. Είναι, δηλαδή, μερικώς συμπληρωματικά με το 3' άκρο (αμετάφραστη περιοχή) του mRNA. Τα miRNAs στρατολογούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Argonaute (AGO) σε ένα συμπληρωματικό mRNA στόχο, με αποτέλεσμα να οδηγούν στην καταστολή της μετάφρασης ή στην αποδιάταξη ή αποαδενυλίωση του στόχου. Αυτά τα μόρια, είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης στον καρκίνο αφού έχουν ρόλο στην ανάπτυξη όγκων, στην μετάσταση αλλά και στη θεραπεία (Vishnoi & Rani, 2017). Στον καρκίνο του πνεύμονα εμπλέκονται σε διεργασίες όπως στη διατήρηση της σηματοδότησης για πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην ενεργοποίηση της μετάστασης, στην αποφυγή της απόπτωσης, στην αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό και, γενικότερα στη αστάθεια του γονιδιώματος. Η διατήρηση της σηματοδότησης προς πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη θεωρείται ως το θεμελιώδες χαρακτηριστικό στα νεοπλάσματα. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) και το μονοπάτι σηματοδότησής του αποτελούν το πιο γνωστό παράδειγμα στον καρκίνο του πνεύμονα. Συνδέτες, όπως ο EGF ή ο TGF- α (Transforming Growth Factor), συνδέονται στον EGFR και τον ενεργοποιούν.

Τα miRNAs, miR-7, miR-27a3p, miR-30 και άλλα, στοχεύουν τον EGFR και απορρυθμίζουν τους φέρει επιπτώσεις όσον αφορά την κυτταρική ανάπτυξη (K. L. Wu et al., 2019). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η αποφυγή της απόπτωσης, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Εκεί, έχει δειχθεί ότι το miR-130b καταστέλλει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα αφού ρυθμίζει προς τα άνω και έμμεσα την οικογένεια BCL-2 μέσω του μονοπατιού (PPAR-γ)/VEGF. Αυτή η ρύθμιση αποτελεί παράδειγμα που παρουσιάζει ότι τα αγγειογενετικά και αποπτωτικά μονοπάτια διασταυρώνονται (Tian et al., 2016). Παράλληλα, τα miRNAs εμπλέκονται και στην αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η οικογένεια miR-34, και ειδικότερα το miR-34a, έχει συσχετιστεί με την έκφραση του PD-L1. Το μονοπάτι του PD-L1/PD-1 (Programmed Death-Ligand 1) έχει να κάνει με την απώλεια της ικανότητας των κυττάρων του ανοσοποιητικού, που διεισδύουν στο μικροπεριβάλλον των όγκων, να εξολοθρεύουν τα καρκινικά κύτταρα και αντίθετα να τα εφοδιάζουν με αυξητικούς παράγοντες, ενισχύοντας την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Όταν το PD-1 αλληλοεπιδρά με το PD-L1 ανασταλτικά σήματα εκκινούν και αποτρέπουν την επακόλουθη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Το miR-34a μπορεί να συνδεθεί με την 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του PD-L1 και να καταστείλει την έκφραση του PD-L1. Επιπλέον, η οικογένεια miRNAs miR-200, στοχεύουν και αυτά την έκφραση του παραπάνω μορίου PD-L1 στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Όσο χαμηλότερη η έκφραση του miR-200, τόσο περισσότερη η καταστολή της διείσδυσης των CD8+ κυττάρων που παρατηρείται ως επίπτωση της αύξησης του PD-L1. Αυτό, φυσικά, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την μετάσταση (L. Chen et al., 2014; Cortez et al., 2015). Τέλος, η γονιδιωματική αστάθεια, δηλαδή η αυξημένη τάση προς αλλαγές- αλλοιώσεις στο γονιδίωμα κατά την διαίρεση των κυττάρων, αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για την εκκίνηση του καρκίνου και είναι παρόν σαν φαινόμενο σε όλους τους τύπους καρκίνου και σε όλα τα στάδια. Τα φυσιολογικά κύτταρα προφυλάσσουν την γονιδιωματική σταθερότητά τους με διάφορους μηχανισμούς όπως τα σημεία ελέγχου στη μίτωση, στην βλάβη και την επιδιόρθωση του DNA. Οποιαδήποτε βλάβη αυτών των μηχανισμών προσδίδει αστάθεια στο γονιδίωμα. Τα miRNAs έχουν και εδώ τον ρόλο τους αφού ρυθμίζουν ή απορρυθμίζουν τους μηχανισμούς της επιδιόρθωσης του DNA και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Vincent et al., 2014). Έχει διαπιστωθεί ότι η υπερέκφραση του miR-128 εμπόδισε εντυπωσιακά την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA των καρκινικών κυττάρων συνεισφέροντας στην αντικαρκινική

λειτουργία του φαρμάκου Mitomycin C (MMC) και βελτίωσε την ευαισθησία σε χημειοθεραπείες με αυτόν τον παράγοντα στον καρκίνο του πνεύμονα. Γενικότερα, όμως, η μη ομαλή έκφραση του miR-128 συμβαίνει σε πολλούς κακοήθεις όγκους με το miRNA αυτό να αποτελεί ρυθμιστή με ογκογόνες ιδιότητες (R. Zhang et al., 2016). Συνολικά, τα μη κωδικά RNAs συνεισφέρουν στον καρκίνο με ποικίλους τρόπους και σε πολλές διεργασίες όπως παρουσιάζεται και στην παρακάτω απεικόνιση (Rong et al., 2021)



Εικόνα 3-0-5. Ο ρόλος των μη κωδικών RNAs και των τροποποιήσεών τους στον καρκίνο (Rong et al., 2021)

3.3.4. Μέθοδοι ανίχνευσης ncRNAs

Οι κυριότερες μέθοδοι ανίχνευσης των μη κωδικών RNAs βασίζονται στις ίδιες τεχνολογίες με αυτές που επεξεργάζονται τα ριβονουκλεϊκά οξέα όπως είναι, για παράδειγμα, τεχνικές που βασίζονται στην rt-PCR, οι τεχνικές αλληλούχησης RNA-seq, οι τεχνικές με μικροσυστοιχίες, η μέθοδος HITS-CLIP, μια μέθοδος που συνδυάζει την ανοσοκαθίζηση με την αλληλούχηση, και άλλες.

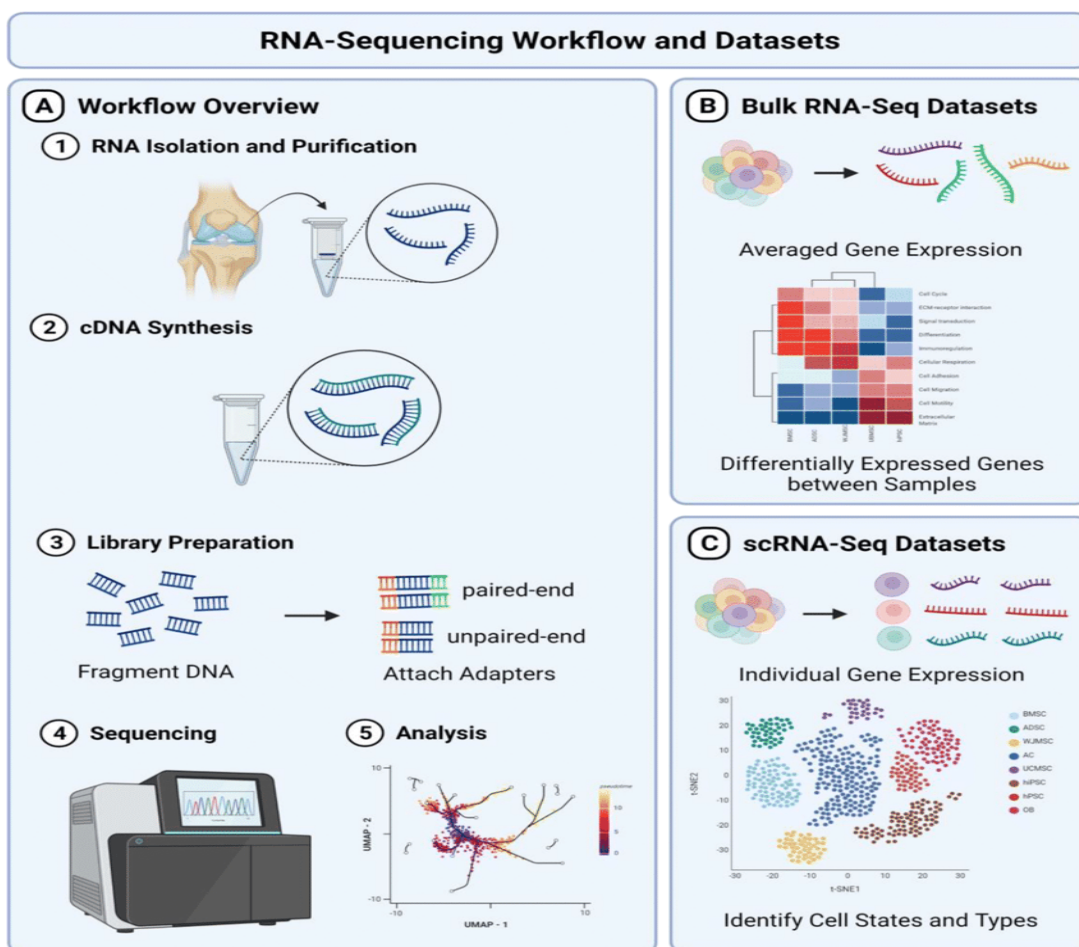
Quantitative Reverse Transcription-PCR (qRT-PCR)

Η ποσοτική αντίστροφη μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR) είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων RNA σε ένα δείγμα. Η διαδικασία ξεκινά με την αντίστροφη μεταγραφή του RNA στο συμπληρωματικό cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Έπειτα, το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπου γίνεται ενίσχυση του DNA και μετριέται η συσσώρευση του PCR προϊόντος σε συνθήκες πραγματικού χρόνου μέσω φθορισμού (*Basic Principles of RT-QPCR* - GR, n.d.). Ο φθορισμός που εκπέμπεται κατά τους κύκλους της αντίδρασης καταγράφεται, και το σημείο στο οποίο αυτός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης αναφέρεται ως threshold cycle (Ct-κύκλος κατωφλιού). Αυτή η τιμή είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του RNA στόχου στο δείγμα. Κατά συνέπεια, μια χαμηλή τιμή Ct δείχνει ότι υπήρχε μεγαλύτερη αρχική ποσότητα RNA (Arya et al., 2005). Μια ελκυστική πτυχή αυτής της προσέγγισης αποτελεί η ευκολία ενσωμάτωσης για τα εργαστήρια που είναι οικεία με τεχνολογία RT-PCR. Για να λειτουργήσει για τα miRNAs αυτή η μέθοδος, πρέπει οι αντιδράσεις να πραγματοποιηθούν με μορφή υψηλής απόδοσης και παράλληλα, δηλαδή εκατοντάδες αντιδράσεις qRT-PCR να μετρούν διαφορετικά miRNAs χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης. Υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά kit που μπορούν να διαμορφωθούν και να εξετάσουν ένα μικρό σύνολο από μη κωδικά RNAs που ρυθμίζουν ένα μονοπάτι ενδιαφέροντος. Φυσικά, εδώ, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι εκκινητές που θα επιλεγθούν για την αντίδραση (Pritchard et al., 2012).

Τεχνικές αλληλούχησης RNA-seq

Η αλληλούχηση RNA (RNA sequencing, RNA-seq) χρησιμοποιεί τις δυνατότητες των υψηλής απόδοσης μεθόδων αλληλούχησης για να παρέχει εικόνα για το μεταγράφημα ενός κυττάρου. Η εισαγωγή της τεχνολογίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) έχει φέρει την επανάσταση στην μελέτη του μεταγραφώματος και αυτό το άλμα υπερκέρασε πολλές προκλήσεις και περιορισμούς που υπήρχαν σε μεθόδους με βάση την υβριδοποίηση και την αλληλούχηση κατά Sanger, δηλαδή μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος για να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση (Kukurba &

Montgomery, 2015). Η μέθοδος RNA-seq συνίσταται σε τέσσερα βασικά στάδια-αρχές (Εικόνα 3-6). Αρχικά, το ολικό RNA εξάγεται από το δείγμα και αναλόγως την εστίαση της έρευνας μπορεί να ενισχυθεί. Ακολούθως, το απομονωμένο RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε συμπληρωματικό cDNA με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης. Το cDNA, τότε, θραυσματοποιείται (fragmentation) και στα άκρα των θραυσμάτων συνδέονται προσαρμογείς αλληλούχησης (sequencing adapters). Αυτοί οι προσαρμογείς είναι απαραίτητοι για τα επακόλουθα βήματα ενίσχυσης και αλληλούχησης. Στη συνέχεια, η προετοιμασμένη βιβλιοθήκη cDNA υπόκειται σε αλληλούχηση με χρήση πλατφόρμας NGS υψηλής απόδοσης και παράγονται εκατομμύρια από μικρές αλληλουχίες ανάγνωσης (short sequence reads) (*RNA-Seq Workflow / Bio-Rad*, n.d.). Χαρακτηριστικό παράδειγμα πλατφόρμας NGS, αποτελεί η τεχνολογία της Illumina που στηρίζεται στην αλληλούχηση μέσω σύνθεσης με σήμανση με φθορισμό. Σύμφωνα με αυτή, η αλληλούχηση βασίζεται στην οπτική ανάγνωση των σημειωμένων με φθορισμό νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται μαζί με έναν αντιστρέψιμο τερματιστή από μια DNA πολυμεράση. Κάθε dNTP που φέρει τα παραπάνω ενσωματώνεται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αλληλούχησης και το προκύπτον σήμα φθορισμού καταμετράται. Έπειτα, ο τερματιστής και η φθορίζουσα βαφή αποκόπτονται από το ενσωματωμένο dNTP για να επιτραπεί η επόμενη προσθήκη στην αλυσίδα και να συνεχιστεί η διαδικασία της αλληλούχησης (Hu, 2021). Τέλος, πραγματοποιείται η ανάλυση δεδομένων. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται με ένα γονιδίωμα αναφοράς ή συναρμολογούνται de novo αν αυτό δεν είναι διαθέσιμο. Αυτές οι συγκρίσεις επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης, την ταυτοποίηση νέων RNAs και συνεισφέρουν στην έρευνα για την ανάλυση ncRNAs (*RNA-Seq Workflow / Bio-Rad*, n.d.). Με αυτή τη τεχνική μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος αλλά γενικά απαιτεί αρκετά εξειδικευμένο εξοπλισμό και περισσότερα υλικά εισόδου, ενώ είναι λιγότερο ευαίσθητη από την qPCR (Li, 2020b).

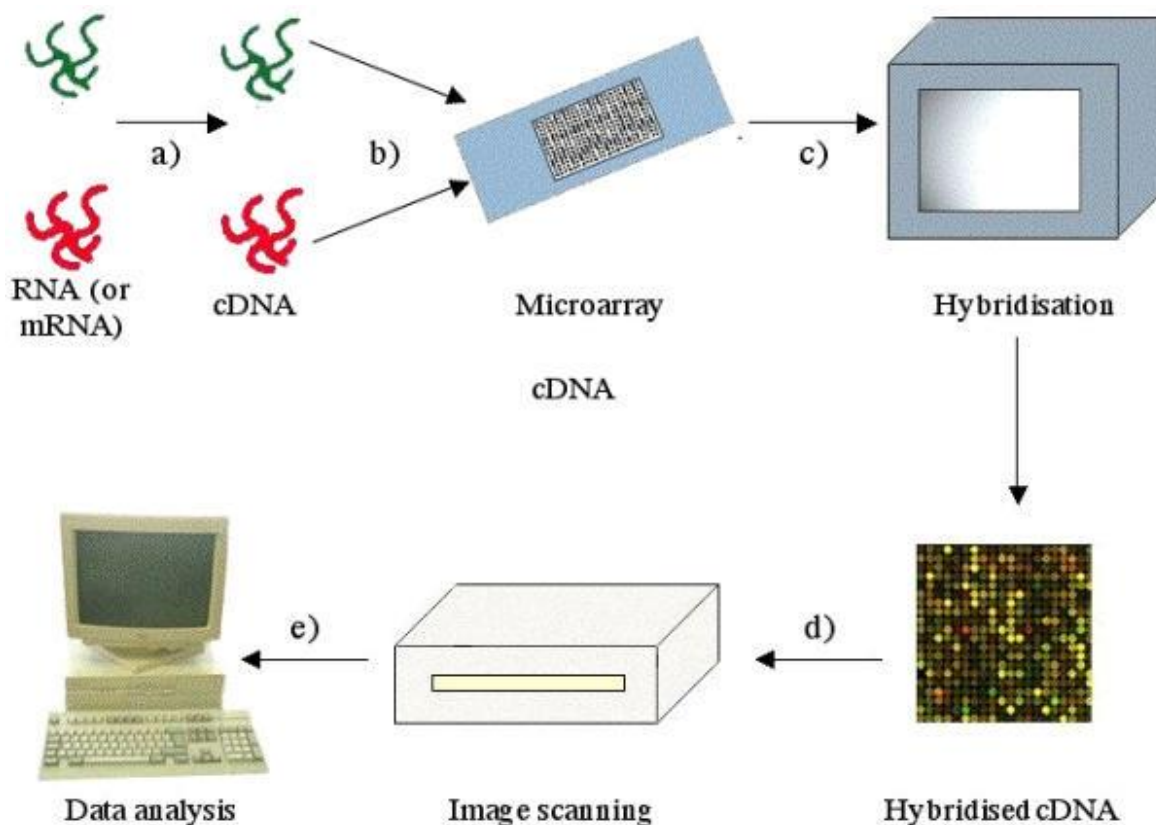


Εικόνα 3-0-6.(A) Η διαδικασία της RNA-seq από την απομόνωση RNA μέχρι την ανάλυση των δεδομένων.(B),(C) Τα σύνολα των αποτελεσμάτων δεδομένων σε διαφορετικού τύπου αναλύσεις RNA-seq, single cell RNA-seq και Bulk RNA-seq(Thomas et al., 2022)

Μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση RNA

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarray technology) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, την ανίχνευση ειδών RNA και τη μελέτη ρυθμιστικών μηχανισμών όπου εμπλέκονται μόρια RNA καθώς επιτρέπουν την υψηλής απόδοσης ποσοτικοποίηση των μορίων αυτών (Εικόνα 3-7). Αρχικά, πρέπει να σχεδιαστούν ανιχνευτές (probes) οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί για τις αλληλουχίες RNA στόχους και να απομονωθεί το RNA από το δείγμα. Έπειτα, γίνεται σήμανση του στόχου, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, όπως με φθορίζουσες χρωστικές ή να πραγματοποιηθεί αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA και ακολουθεί η διαδικασία της

υβριδοποίησης του σημασμένου RNA ή του cDNA με τους συμπληρωματικούς ανιχνευτές στις μικροσυστοιχίες. Τέλος, γίνεται έκπλυση του RNA που δεν συνδέθηκε και στο chip των μικροσυστοιχιών μετρούνται παράμετροι όπως ένταση σήματος φθορισμού για να υπολογιστεί η αφθονία του RNA με τελικό στάδιο την ανάλυση των δεδομένων (N. H. Lee & Saeed, 2007).



Εικόνα 3-0-7. Απλοποιημένο πρωτόκολλο για την εφαρμογή ανάλυσης μικροσυστοιχιών RNA (Simplified Protocol for Microarray Analysis. a) RNA or MRNA from Sample... / Download Scientific Diagram, n.d.)

HITS-CLIP

Η μέθοδος HITS-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation, αλληλούχηση υψηλής απόδοσης RNA απομονωμένου μέσω διασταυρούμενης ανοσοκαθίζησης) αποτελεί μια ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων που συνδυάζει την ανοσοκαθίζηση και την RNA-seq. Χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση, περίπλοκοι ιστοί μπορεί να ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία για να συνδεθούν ομοιοπολικά σύμπλοκα RNA- πρωτεϊνών. Μετά τη σύνδεση, τα σύμπλοκα μπορούν να

καθαριστούν υπό αυστηρές συνθήκες, ενώ μετά την UV ακτινοβολήση οι ιστοί έχουν διαλυτοποιηθεί και το RNA έχει υποστεί πέψη, αφήνοντας μόλις ένα μικρό θραύσμα του προσκολλημένο στην πρωτεΐνη. Έπειτα, πραγματοποιείται ανοσοκαθίζηση και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE για να καθαριστεί πλήρως το σύμπλοκο και να αφαιρεθεί το μη συνδεδεμένο RNA. Το καθαρό σύμπλοκο απομονώνεται και υπόκειται σε επεξεργασία με πρωτεΐνάση K, η οποία αφαιρεί την πρωτεΐνη και αφήνει το RNA του συμπλόκου άθικτο. Τότε, το RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω αναλύσεις όπως RT-PCR και RNA-seq (Chi et al., 2009; Jensen & Darnell, 2008). Ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των παραπάνω αναφερόμενων μεθόδων (Πίνακας 4).

Μέθοδος ανάλυσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα Οικονομικά αποδοτική Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ειδών και μεγεθών από ncRNAs 	<ul style="list-style-type: none"> Απαίτηση για επικυρωμένους εκκινητές
RNA-seq	<ul style="list-style-type: none"> Ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος Ανάλυση μιας βάσης (single-base resolution) 	<ul style="list-style-type: none"> Λιγότερο ευαίσθητη από qPCR Απαίτηση για περισσότερο υλικό προς είσοδο Απαίτηση για εξειδικευμένη βιοπληροφορική ανάλυση

RNA microarrays	<ul style="list-style-type: none"> • Υψηλής απόδοσης • Οικονομικά αποδοτική • Εδραιωμένη τεχνική με υπάρχοντα πρωτόκολλα και πλατφόρμες 	<ul style="list-style-type: none"> • Λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με την RNA-seq • Αντιδράσεις διασταυρούμενου υβριδισμού, μη ειδικές, που επηρεάζουν την ακρίβεια • Απαίτηση για την ύπαρξη ανιχνευτών που έχουν σχεδιαστεί βάσει γνωστών αλληλουχιών στόχων
HITS-CLIP	<ul style="list-style-type: none"> • Ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος • Λειτουργική ανάλυση αλληλεπιδράσεων ncRNAs-πρωτεϊνών 	<ul style="list-style-type: none"> • Απαίτηση για υψηλής ποιότητας αντίσωμα • Λιγότερο ευαίσθητη από την qPCR • Απαίτηση για εξειδικευμένη βιοπληροφορική ανάλυση

Πίνακας 4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων για την ανίχνευση και την ανάλυση των ncRNAs (Li, 2020b).

4. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν κληρονομικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που συμβαίνουν χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία DNA, που μεσολαβείται από μηχανισμούς όπως η μεθυλίωση DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα μη-κωδικά RNAs. Στον καρκίνο του πνεύμονα, η μεθυλίωση DNA μπορεί να αποσιωπά ογκοκατασταλτικά γονίδια, οι τροποποιήσεις ιστονών να αλλάζουν την προσβασιμότητα στην χρωματίνη και να απορρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση ενώ τα μη-κωδικά RNAs έχουν διττό ρόλο στην καταστολή των όγκων και την ογκογένεση. Οι θεραπευτικές στρατηγικές στοχεύουν σε αυτές τις επιγενετικές μεταβολές, για παράδειγμα με αναστολείς των μεθυλοτρανσφερασών, αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών και με θεραπείες με βάση το RNA. Αυτές οι στρατηγικές προσεγγίσεις έχουν σκοπό την επανενεργοποίηση των γονιδίων που έχουν υποστεί σίγαση, την ενεργοποίηση της απόπτωσης και την ενίσχυση της ανοσοαπάντησης. Επιπλέον, συνδυάζοντας επιγενετικές θεραπείες με τις συμβατικές όπως η χημειοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία μπορεί να μεγιστοποιηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα αλλά και να ανοίξουν δρόμοι προς την εξατομίκευση και την ιατρική ακριβείας.

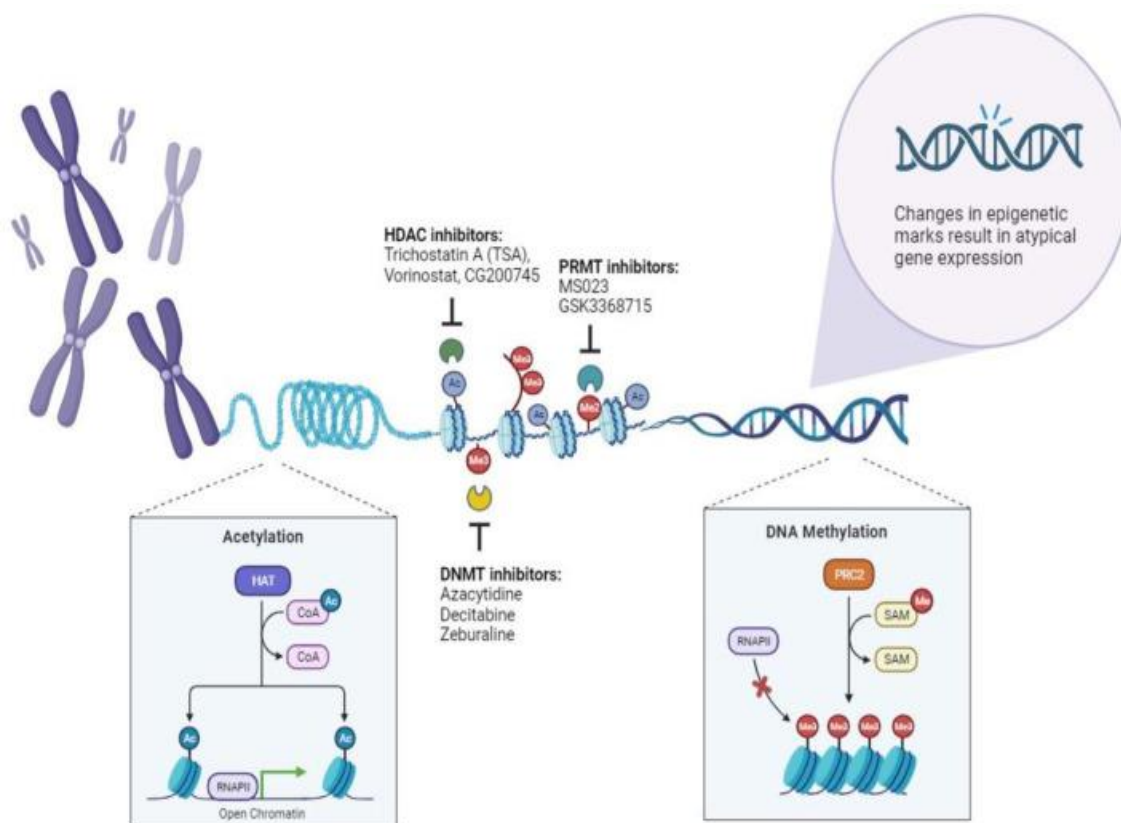
4.1 Αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTi)

Η επιγενετική θεραπεία περικλείει ένα ευρύ φάσμα από τροποποιήσεις, περιλαμβάνοντας την απομεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την αναστροφή της υπερμεθυλίωσης των ογκογονιδίων, με στόχο την επαναφορά του μοτίβου της φυσιολογικής γονιδιακής έκφρασης και την αναστολή της ανάπτυξης όγκων. Σε απάντηση σε αυτή την ανάγκη για νέες θεραπείες, οι ερευνητές μελετούν ενεργά ενώσεις οι οποίες μπορούν να μεταβάλλουν τα μοτίβα της DNA μεθυλίωσης. Ο μηχανισμός δράσης των αναστολέων των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferase inhibitors, DNMTi) περιλαμβάνει την μη αντιστρεπτή αναστολή των ενζύμων DNMT με έναρξη και της πρωτεασωμικής αποσύνθεσής τους και οδηγεί στην απομεθυλίωση των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων, όπως είναι τα ογκοκατασταλτικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση εκ

νέου των παραπάνω γονιδίων και την επαναφορά των φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, κάτι που μπορεί να σταματήσει την πρόοδο του καρκίνου (Munteanu et al., 2023a). Αρχικά, οι DNMTi συντέθηκαν ως πιθανοί κυτταροτοξικοί παράγοντες στα τέλη της δεκαετίας του 1960, αλλά αποδείχθηκαν τόσο τοξική που αμφισβητήθηκε η θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Μειωμένες δόσεις των φαρμάκων αποδείχθηκαν στη δεκαετία του 1990 αποτελεσματικές για τη θεραπεία του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, οδηγώντας στην έγκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες (Ahuja et al., 2016). Οι DNMTi αποτελούν μια κατηγορία ανάλογων κυτιδίνης και χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες. Στην μια υποκατηγορία, ένα νουκλεοτιδικό ανάλογο συνδέεται στο DNA για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο που προωθεί την αποδιάταξη του DNMT. Στην άλλη υποκατηγορία, ένα μη νουκλεοτιδικό ανάλογο DNMTi συνδέεται απευθείας με τη μεθυλιωμένη περιοχή της μεθυλοτρανσφεράσης. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα νουκλεοτιδικών ανάλογων είναι το decitabine (DAC) και το azacitidine (AZA) (Dan et al., 2019). Στην ιστοσελίδα clinicaltrials.gov υπάρχουν κλινικές μελέτες που αναφέρονται σε αυτά τα φάρμακα που είναι είτε ολοκληρωμένες ή συνεχίζονται για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητά τους στον καρκίνο του πνεύμονα (Home / [ClinicalTrials.Gov](https://clinicaltrials.gov), n.d.).

4.2 Αναστολείς των αποακετυλασών των ιστονών (HDACi)

Οι αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases-HDACs) έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα. Μελέτες έχουν δείξει πως οι αναστολείς HDACi μπορεί να έχουν αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και αυτή η ικανότητά τους ερευνάται ως πιθανή θεραπευτική επιλογή σε κλινικές δοκιμές (Εικόνα 4-1). Οι αναστολείς HDACi επηρεάζουν την έκφραση πολλών γονιδίων προκαλώντας κυτταροτοξικότητα και, κατά συνέπεια, διαταράσσουν τις διεργασίες των καρκινικών κυττάρων όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Τυπικά, οι ενώσεις αυτές έχουν ταξινομηθεί σε διάφορες υποκατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή, όπως είναι, ενδεικτικά, τα αλειφατικά οξέα, τα κυκλικά πεπτίδια και τα υδροξαμικά οξέα (Eckschlager et al., 2017). Κλασσικό παράδειγμα τέτοιου αναστολέα αποτελεί το vorinostat που ανήκει στα υδροξαμικά οξέα.

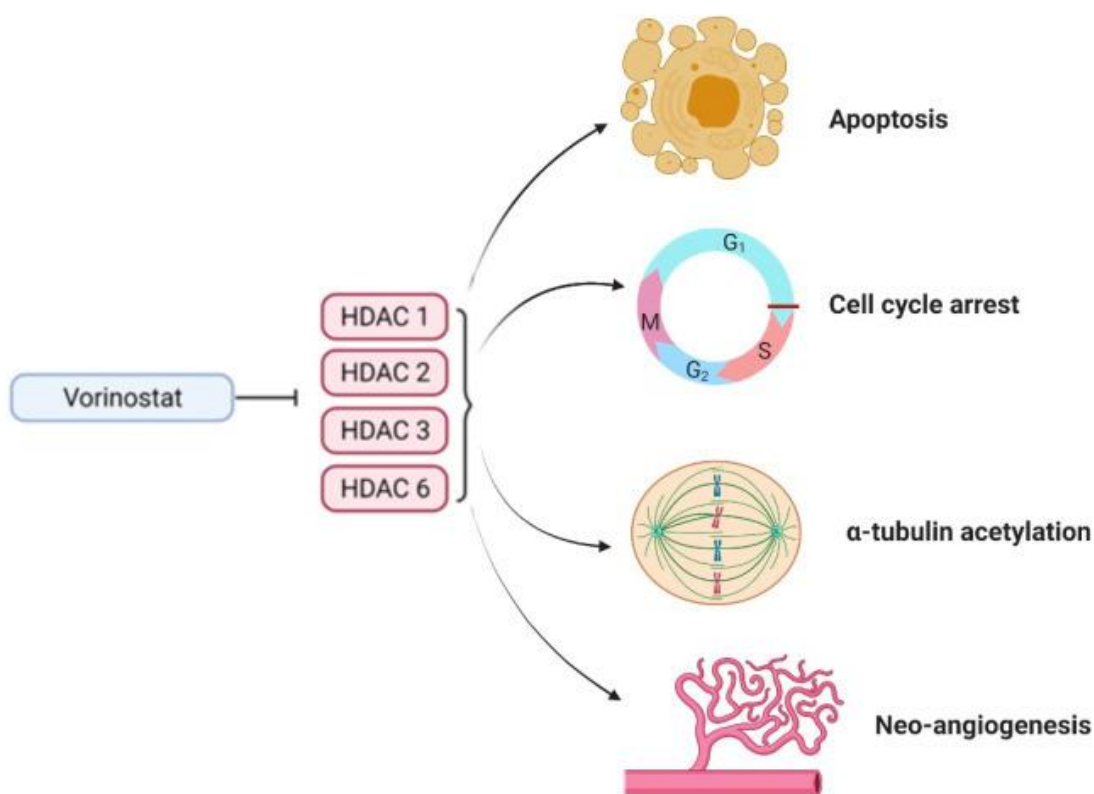


Εικόνα 4-1. Η δυναμική της επιγενετικής. Φαίνονται η ακετυλίωση των ιστονών και η DNA μεθυλίωση αλλά και οι κυριότεροι αναστολείς DNMTi, HDACi (Munteanu et al., 2023b)

4.2.1. Vorinostat, SAHA

Το φάρμακο vorinostat ή SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) είναι μέλος της ομάδας των υδοξαμικών οξέων, η οποία είναι η πιο ποικιλόμορφη κατηγορία από αναστολείς με αυξημένη συγγένεια για τις αποακετυλάσες των ιστονών και έχει φανερωθεί ότι καταστέλλουν τις HDACs τάξης I και II. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις, αυτή η ένωση αποτρέπει την ενζυματική δραστηριότητα των HDAC1, HDAC2, HDAC3(τάξη I) και HDAC6 (τάξη II). Αποτελεί φάρμακο δεύτερης γενιάς που προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και/ή απόπτωση σε μια ποικιλία από μετασχηματισμένα κύτταρα. Επιπλέον, επηρεάζει την κατάσταση ακετυλίωσης της τουμπουλίνης και τις σχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες αφού αναστέλλει τη δράση της

HDAC6 και λειτουργεί αποτρεπτικά στην νέο-αγγειογένεση (Εικόνα 4-2) (Bajbouj et al., 2021b).



Εικόνα 4-2. Το φάρμακο vorinostat και οι επιδράσεις αυτού στις HDAC και, κατά συνέπεια, στις διεργασίες των κύτταρων (Bajbouj et al., 2021b)

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη δράση του vorinostat σε συνδυασμό με κυτταροτοξικούς παράγοντες που στοχεύουν τη χρωματίνη, όπως είναι η σισπλατίνη, η 5-φθορο-ουρακίλη και άλλα, και αποκάλυψαν την συνεργιστική και προσθετική δράση σε ένα μεγάλο εύρος σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (Marchion et al., 2004). Επίσης, η επίδραση στην κατάσταση του γονιδίου p53 από την αλληλεπίδραση του vorinostat και της καρβοπλατίνης, ενός παράγοντα που στοχεύει το DNA, έχει μελετηθεί σε NSCLC κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, το επιγενετικό φάρμακο αύξησε την κυτταροτοξικότητα που επάγεται από την καρβοπλατίνη σε NSCLC κύτταρα με p53 αγρίου τύπου, αλλά όχι σε κύτταρα χωρίς p53, δηλώνοντας έτσι την ύπαρξη ενός p53-εξαρτώμενου μονοπατιού. Σαν αποτέλεσμα, η προσθήκη vorinostat μπορεί να οδηγήσει σε μια μείωση στη δόση της συμβατικής καρβοπλατίνης βελτιώνοντας, παράλληλα, τον γενικό θεραπευτικό δείκτη (Hershberger et al., 2007).

4.2.2. Τριχοστατίνη Α (Trichostatin A, TSA)

Η Τριχοστατίνη Α (TSA) είναι ένα αντιμυκητιασικό και αντιβιοτικό που είναι γνωστό ότι δρα ως αναστολέας των αποακετυλασών των ιστονών σε συγκεντρώσεις nanomole. Η χορήγηση αυτού του παράγοντα σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα (H157) είχε ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση στη βιωσιμότητά τους. Η TSA προκάλεσε απόπτωση των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών (Petita et al., 2013). Επιπλέον, έχει φανερωθεί η πιθανή κυτταροτοξική δράση της σε κύτταρα NSCLC αλλά και SCLC. Στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η TSA προκάλεσε μορφολογική διαφοροποίηση και απόπτωση, γεγονός που σχετίστηκε με τη ρύθμιση προς τα άνω στην ακετυλιωμένη ιστόνη H4, στα p21 και p27, τη διάσπαση της πρωτεΐνης PARP και τη μείωση των επιπέδων της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 στην κυτταρική σειρά DMS53 (Platta et al., 2007). Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η HDACi αυτή επάγει την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω απόπτωσης, αφού έχει ενισχύσει την ακετυλίωση στην H4 και την έκφραση του p21 σε τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Συνεπώς, η ένωση TSA έδειξε την ισχυρή της δράση εναντίον του καρκίνου του πνεύμονα in vitro, κάτι που δημιουργεί την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες όσον αφορά την αποτελεσματικότητα και την ασφάλειά της in vivo (Bouyahya et al., 2022).

4.3 ncRNAs και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

Οι θεραπείες με βάση τα ncRNAs λαμβάνουν ειδική προσοχή τόσο ακαδημαϊκά όσο και από βιοτεχνολογικές εταιρίες. Αν και από τα μόρια αυτά, τα πιο μελετημένα είναι τα miRNAs, η σημασία των lncRNAs έχει αρχίσει να αναδεικνύεται. Τα miRNAs για τα οποία γίνεται προσπάθεια στη θεραπεία του καρκίνου λειτουργούν είτε ρυθμίζοντας προς τα κάτω ή σταματώντας τη δράση των ογκογόνων miRNAs, ή αυξάνοντας την έκφραση των miRNAs με ογκοκατασταλτικό ρόλο. Οι μοριακές προσεγγίσεις που ακολουθούνται, στοχεύουν σε αντιστροφή της επιγενετικής αποσιώπησης ή ενίσχυση της βιογένεσης miRNAs και τα επίπεδα των miRNAs μπορούν να ανακτηθούν με την άμεση χορήγηση σκευασμάτων τους είτε ελεύθερα μέσω φορέων ή να μεταφερθούν μέσω υϊκών φορέων. Παρομοίως, για στρατηγικές όπου επιθυμητή είναι η παρεμπόδιση της δράσης των

miRNAs, γίνεται έρευνα για αναστολή μέσω μικρών μορίων (small molecule targeting miRNAs, SMIRs) και ολιγονουκλεοτιδίων (anti-miRs) (Ling et al., 2013). Ένα παράδειγμα αντίστοιχης στρατηγικής αποτελεί η χρήση ενδογενών ανταγωνιστικών RNAs (ceRNAs, competitive endogenous ribonucleic acid). Τα ceRNAs είναι μετάγραφα RNA, όπως mRNA, lncRNAs, circRNAs και άλλα, τα οποία μπορούν να ρυθμίζουν το ένα το άλλο μέσω ανταγωνισμού για το ίδιο αλλά περιορισμένο σύνολο από miRNAs για να μειώσουν τη διαθεσιμότητα από miRNA και να ελαττώσουν την επίδραση αυτών στα γονίδια-στόχους. Το LINC00336, ένα πυρηνικό lncRNA, αποτελεί τέτοιο ceRNA για το miR-6852 και στον καρκίνο του πνεύμονα ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων, προάγοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο εξαρτώμενο από σίδηρο (Fe) και, κατά αυτόν τον τρόπο, αναστέλοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη, υπάρχουν miRNAs που δρουν ως ογκοκατασταλτικά και συνήθως είναι σε χαμηλό ή μηδενικό ποσοστό στα καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι η οικογένεια let-7, miRNAs της οποίας υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα σε υψηλό βαθμό ενώ ρυθμίζονται καθοδικά στα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα. Η θεραπεία με βάση τα let-7 είναι πολλά υποσχόμενη καθώς η ρύθμισή τους μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη όγκων στοχεύοντας διάφορα ογκογονίδια και αναστέλοντας σημαντικούς ρυθμιστές των μονοπατιών της μίτωσης (H. Yang et al., 2023).

Ένας ακόμη σημαντικός ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η συμμετοχή τους στο φαινόμενο της αντίστασης στη θεραπεία όπως συμβαίνει με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Συγκεκριμένα, σε θεραπεία με σισπλατίνη, ένα κλασικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο για το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (LUAD), είναι γνωστό ότι η S-τρανσφεράση GSTP1 (glutathione S-transferase P1) συνεισφέρει στην αντίσταση στη σισπλατίνη. Το miR-513a-3p προκαλεί στα κύτταρα LUAD ευαισθησία στη σισπλατίνη αφού στοχεύει τη GTSP1. Παρόμοια δράση πρόκλησης ευαισθησίας σε αντικαρκινικά φάρμακα παρουσιάζουν και τα miR-181b και miR-27a έχοντας ως στόχο την BCL2 πρωτεΐνη που σχετίζεται με την απόπτωση το πρώτο και τη ρύθμιση του EMT (epithelial mesenchymal transition) η δεύτερη (Song et al., 2023).

5. Συμπεράσματα

Οι πληροφορίες, έπειτα από πρωτεομικές και γονιδιωματικές τεχνικές, έχουν δώσει απαντήσεις για πολλές από τις υποθέσεις που αφορούν τη μοριακή βάση του καρκίνου. Το δόγμα ότι ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που αρχίζει αλλά και αναπτύσσεται εξαιτίας των γενετικών ανωμαλιών παραμένει αδιαμφισβήτητο. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις, και τα μονοπάτια τους, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γένεση των όγκων. Είναι γεγονός ότι πολλά από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως η διαφοροποίηση, η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου και η ικανότητα διήθησης είναι σε βάθος επηρεαζόμενα από αλλαγές στο επιγονιδίωμα. Επιπλέον, οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις στις ιστόνες και τα ncRNAs, ενορχηστρώνουν την αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, οδηγώντας στη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Οι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα, όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η κακή διατροφή, το αλκοόλ και η έκθεση σε καρκινογόνα συνεισφέρουν έντονα στο επιγενετικό τοπίο του τύπου καρκίνου αυτού, συνδέοντας τον τρόπο ζωής και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες στην αιτία αυτής της ασθένειας.

Η αντιστρέψιμη φύση των επιγενετικών αλλαγών προσφέρει μια συναρπαστική ευκαιρία για θεραπευτική επέμβαση. Οι επιγενετικές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων των DNA μεθυλοτρανσφερασών, των αναστολέων των αποακετυλασών των ιστονών και των προσεγγίσεων που στοχεύουν στα ncRNAs, έχουν αναδειχθεί ως υποσχόμενα σχήματα για την βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών.

Τα παραπάνω έγινε προσπάθεια να αποτυπωθούν, αν και, όπως είναι κατανοητό, υπάρχουν και συγκεκριμένοι περιορισμοί. Πρώτον, πρόκειται για βιβλιογραφική μελέτη σε σταματημένο χρόνο, σε μια εποχή που οι εξελίξεις τρέχουν με ταχύτατους ρυθμούς και παράγονται συνεχώς νέα δεδομένα και αποτελέσματα. Δεύτερον, στο πεδίο της επιγενετικής του καρκίνου, ο όγκος της πληροφορίας είναι τεράστιος. Περιορισμό, βεβαίως, αποτελεί και η απειρία του ερευνητή.

Εν κατακλείδι, η μελλοντική έρευνα για τις επιγενετικές τροποποιήσεις στην ανάπτυξη και τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα οφείλει να επικεντρωθεί στην κατανόηση των

αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών και επιγενετικών μεταβολών. Η πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχησης και την βιοπληροφορική θα επιτρέψει την ταυτοποίηση περισσότερων νέων επιγενετικών στόχων. Επιπρόσθετα, οι προσπάθειες καλό θα ήταν να επικεντρώνονται ακόμα περισσότερο και στη δημιουργία επιγενετικών φαρμάκων με μεγαλύτερη ειδικότητα και μειωμένη τοξικότητα έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι παρενέργειες και να βελτιωθεί η θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Τέλος, αναγνωρίζοντας την επιγενετική βάση του καρκίνου του πνεύμονα, όχι μόνο βαθαίνει την γνώση για τη βιολογία της ασθένειας αλλά υπόσχεται να δείξει το δρόμο για θεραπευτικές στρατηγικές είτε σαν επιγενετικό φάρμακο ή σαν συνδυαστική θεραπεία, μαζί με χημειοθεραπεία για παράδειγμα. Οι μελλοντικές εξελίξεις κατέχουν την δυνατότητα να φέρουν τεράστιας σημασίας αλλαγές όσον αφορά την πρόληψη, την διάγνωση και την αντιμετώπιση αυτής της καταστροφικής ασθένειας.

Βιβλιογραφία

Ακολουθούν, αλφαβητικά, οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

- Ahuja, N., Sharma, A. R., & Baylin, S. B. (2016). Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annual Review of Medicine*, 67, 73. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-111314-035900>
- Akhtar, N., & Bansal, J. G. (2017). Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current Problems in Cancer*, 41(5), 328–339. <https://doi.org/10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2017.07.002>
- Amatori, S., Persico, G., Paolicelli, C., Hillje, R., Sahnane, N., Corini, F., Furlan, D., Luzi, L., Minucci, S., Giorgio, M., Pelicci, P. G., & Fanelli, M. (2018). Epigenomic profiling of archived FFPE tissues by enhanced PAT-ChIP (EPAT-ChIP) technology. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 143. <https://doi.org/10.1186/S13148-018-0576-Y>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 41(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2019.10.001>
- Bajbouj, K., Al-ali, A., Ramakrishnan, R. K., Saber-ayad, M., & Hamid, Q. (2021a). Histone Modification in NSCLC: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS222111701>
- Bajbouj, K., Al-ali, A., Ramakrishnan, R. K., Saber-ayad, M., & Hamid, Q. (2021b). Histone Modification in NSCLC: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11701. <https://doi.org/10.3390/IJMS222111701>
- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of Global Health*, 85(1). <https://doi.org/10.5334/AOGH.2419>
- Basic Principles of RT-qPCR - GR. (n.d.). Retrieved February 5, 2025, from <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
- Berg, C. D., Schiller, J. H., Boffetta, P., Cai, J., Connolly, C., Kerpel-Fronius, A., Kitts, A. B., Lam, D. C. L., Mohan, A., Myers, R., Suri, T., Tammemagi, M. C., Yang, D., & Lam, S. (2023). Air Pollution and Lung Cancer: A Review by International Association for the Study of Lung Cancer Early Detection and Screening Committee. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 18(10), 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/J.JTHO.2023.05.024>
- Bouyahya, A., El Omari, N., Bakha, M., Aanniz, T., El Menyiy, N., El Hachlafi, N., El Baaboua, A., El-Shazly, M., Alshahrani, M. M., Al Awadh, A. A., Lee, L. H., Benali, T., & Mubarak, M. S. (2022). Pharmacological Properties of Trichostatin A, Focusing on the Anticancer Potential: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* 2022, Vol. 15, Page 1235, 15(10), 1235. <https://doi.org/10.3390/PH15101235>

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>
- Cancer. (n.d.). Retrieved June 13, 2024, from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Cao, L. L., Song, X., Pei, L., Liu, L., Wang, H., & Jia, M. (2017). Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis. *Medicine*, 96(31), e7663. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007663>
- Cao, Z., Oyang, L., Luo, X., Xia, L., Hu, J., Lin, J., Tan, S., Tang, Y., Zhou, Y., Cao, D., & Liao, Q. (2022). The roles of long non-coding RNAs in lung cancer. *Journal of Cancer*, 13(1), 174. <https://doi.org/10.7150/JCA.65031>
- Chen, L., Gibbons, D. L., Goswami, S., Cortez, M. A., Ahn, Y. H., Byers, L. A., Zhang, X., Yi, X., Dwyer, D., Lin, W., Diao, L., Wang, J., Roybal, J. D., Patel, M., Ungewiss, C., Peng, D., Antonia, S., Mediavilla-Varela, M., Robertson, G., ... Qin, F. X. F. (2014). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature Communications*, 5, 5241. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS6241>
- Chen, Z., Lei, T., Chen, X., Gu, J., Huang, J., Lu, B., & Wang, Z. (2020). Long non-coding RNA in lung cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 504, 190–200. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2019.11.031>
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., & Darnell, R. B. (2009). Ago HITS-CLIP decodes miRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254), 479. <https://doi.org/10.1038/NATURE08170>
- Collas, P. (2009). The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 567, 1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-414-2_1
- Corrales, L., Rosell, R., Cardona, A. F., Martín, C., Zatarain-Barrón, Z. L., & Arrieta, O. (2020). Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 148. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2020.102895>
- Cortez, M. A., Ivan, C., Valdecanas, D., Wang, X., Peltier, H. J., Ye, Y., Araujo, L., Carbone, D. P., Shilo, K., Giri, D. K., Kelnar, K., Martin, D., Komaki, R., Gomez, D. R., Krishnan, S., Calin, G. A., Bader, A. G., & Welsh, J. W. (2015). PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 108(1), djv303. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV303>
- Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X., & Bird, A. P. (1994). Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nature Genetics*, 6(3), 236–244. <https://doi.org/10.1038/NG0394-236>
- Dan, H., Zhang, S., Zhou, Y., & Guan, Q. (2019). DNA Methyltransferase Inhibitors: Catalysts For Antitumour Immune Responses. *OncoTargets and Therapy*, 12, 10903. <https://doi.org/10.2147/OTT.S217767>
- Delaney, C., Garg, S. K., & Yung, R. (2015). Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1343, 249. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_19
- Duarte, J. D. (2013). Epigenetics primer: why the clinician should care about epigenetics. *Pharmacotherapy*, 33(12), 1362–1368. <https://doi.org/10.1002/PHAR.1325>

- Dupont, C., Armant, D. R., & Brenner, C. A. (2009). Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(5), 351. <https://doi.org/10.1055/S-0029-1237423>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/IJMS18071414>
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*, 17(6), 1471–1474. <https://doi.org/10.1245/S10434-010-0985-4>
- Epigenetics. (n.d.). Retrieved May 17, 2024, from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Epigenetics>
- Esteve-Puig, R., Bueno-Costa, A., & Esteller, M. (2020). Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer. *Cancer Letters*, 474, 127–137. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.01.021>
- Fessele, K. L., & Wright, F. (2018). Primer in Genetics and Genomics, Article 6: Basics of Epigenetic Control. *Biological Research for Nursing*, 20(1), 103. <https://doi.org/10.1177/1099800417742967>
- Füllgrabe, J., Kavanagh, E., & Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene*, 30(31), 3391–3403. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.121>
- Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7–8), 225–230. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2016.05.009>
- Ghafouri-Fard, S., & Taheri, M. (2019). Maternally expressed gene 3 (MEG3): A tumor suppressor long non coding RNA. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 118. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109129>
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>
- Gu, M., Ren, B., Fang, Y., Ren, J., Liu, X., Wang, X., Zhou, F., Xiao, R., Luo, X., You, L., & Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer. *MedComm*, 5(2). <https://doi.org/10.1002/MCO2.495>
- Guo, Q., Liu, L., Chen, Z., Fan, Y., Zhou, Y., Yuan, Z., & Zhang, W. (2022). Current treatments for non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.945102>
- Hershberger, P., Owonikoko, T. K., Ramalingam, S., & Belani, C. P. (2007). The effect of P53 gene status on the interaction of vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid-SAHA) with carboplatin in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18_suppl), 10567–10567. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.25.18_SUPPL.10567
- Hoang, P. H., & Landi, M. T. (2022). DNA Methylation in Lung Cancer: Mechanisms and Associations with Histological Subtypes, Molecular Alterations, and Major Epidemiological Factors. *Cancers*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14040961>
- Hombach, S., & Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 937, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1
- Home | ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved January 15, 2025, from <https://clinicaltrials.gov/>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>

- Huang, Z., Bassil, C. F., & Murphy, S. K. (2013). Bisulfite sequencing of cloned alleles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1049, 83–94. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-547-7_8
- Imyanitov, E. N., Iyevleva, A. G., & Levchenko, E. N. (2021). Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2020.103194>
- Inoue, J., & Inazawa, J. (2021). Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. *Journal of Human Genetics*, 66(9), 937–945. <https://doi.org/10.1038/S10038-021-00938-6>
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E., & Do, J. T. (2017). CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes*, 8(6), 2–20. <https://doi.org/10.3390/GENES8060148>
- Jayani, R. S., Ramanujam, P. L., & Galande, S. (2010). Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods in Cell Biology*, 98(C), 35–56. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)98002-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)98002-3)
- Jensen, K. B., & Darnell, R. B. (2008). CLIP: Crosslinking and ImmunoPrecipitation of In Vivo RNA Targets of RNA-Binding Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 488, 85. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-475-3_6
- Kiselev, I. S., Kulakova, O. G., Boyko, A. N., & Favorova, O. O. (2021). DNA Methylation As an Epigenetic Mechanism in the Development of Multiple Sclerosis. *Acta Naturae*, 13(2), 45. <https://doi.org/10.32607/ACTANATURAE.11043>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), 951. <https://doi.org/10.1101/PDB.TOP084970>
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY5010003>
- Laszlo, A. H., Derrington, I. M., Brinkerhoff, H., Langford, K. W., Nova, I. C., Samson, J. M., Bartlett, J. J., Pavlenok, M., & Gundlach, J. H. (2013). Detection and mapping of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine with nanopore MspA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 18904–18909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310240110>
- Lee, J. E., & Kim, M. Y. (2022). Cancer epigenetics: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 83, 4–14. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.03.025>
- Lee, N. H., & Saeed, A. I. (2007). Microarrays: an overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 353, 265–300. <https://doi.org/10.1385/1-59745-229-7:265>
- Li, Y. (2020a). Modern Epigenetics Methods in Biological Research. *Methods (San Diego, Calif.)*, 187, 104. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2020.06.022>
- Li, Y. (2020b). Modern Epigenetics Methods in Biological Research. *Methods (San Diego, Calif.)*, 187, 104. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2020.06.022>
- Lin, R. K., Hsu, H. S., Chang, J. W., Chen, C. Y., Chen, J. T., & Wang, Y. C. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 55(2), 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2006.10.022>
- Ling, H., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(11), 847. <https://doi.org/10.1038/NRD4140>
- Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M. F., Alaminos, M., Setien, F., & Esteller, M. (2006). A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of

- hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Research*, 66(17), 8342–8346. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1932>
- Lung Cancer Q&A / Stanford Health Care*. (n.d.). Retrieved June 15, 2024, from <https://stanfordhealthcare.org/newsroom/news/press-releases/2014/lung-cancer-qa.html>
- Ma, F., Jiang, S., & Zhang, C. yang. (2019). Recent advances in histone modification and histone modifying enzyme assays. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(1), 27–36. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1559053>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European Respiratory Journal*, 48(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Daud, A. I., Richon, V., Sullivan, D. M., & Munster, P. N. (2004). Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(2), 223–237. <https://doi.org/10.1002/JCB.20045>
- Martisoava, A., Holcakova, J., Izadi, N., Sebuyoya, R., Hrstka, R., & Bartosik, M. (2021). DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22084247>
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 49(4), 509–517. <https://doi.org/10.1002/BMB.21516>
- Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D., & Roloff, T. C. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 507, 55–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-522-0_5
- Munteanu, R., Tomuleasa, C., Iuga, C. A., Gulei, D., & Ciuleanu, T. E. (2023a). Exploring Therapeutic Avenues in Lung Cancer: The Epigenetic Perspective. *Cancers*, 15(22), 5394. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15225394>
- Munteanu, R., Tomuleasa, C., Iuga, C. A., Gulei, D., & Ciuleanu, T. E. (2023b). Exploring Therapeutic Avenues in Lung Cancer: The Epigenetic Perspective. *Cancers*, 15(22), 5394. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15225394>
- Nagarajan, R. P., Fouse, S. D., Bell, R. J. A., & Costello, J. F. (2013). Methods for Cancer Epigenome Analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 754, 313. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_15
- Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/IJMS22168661>
- Park, H. J., Lee, S. H., & Chang, Y. S. (2020). Recent advances in diagnostic technologies in lung cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 35(2), 257. <https://doi.org/10.3904/KJIM.2020.030>
- Petta, V., Gkiozos, I., Strimpakos, A., & Syrigos, K. (2013). Histones and lung cancer: Are the histone deacetylases a promising therapeutic target? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(5), 935–952. <https://doi.org/10.1007/S00280-013-2223-9>
- Platta, C. S., Greenblatt, D. Y., Kunnimalaiyaan, M., & Chen, H. (2007). The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of small cell lung cancer cells. *The Journal of Surgical Research*, 142(2), 219–226. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2006.12.555>

- Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews. Genetics*, 13(5), 358.
<https://doi.org/10.1038/NRG3198>
- Quintanal-Villalonga, Á., & Molina-Pinelo, S. (2019). Epigenetics of lung cancer: a translational perspective. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 42(6), 739–756.
<https://doi.org/10.1007/S13402-019-00465-9>
- Ramazi, S., Daddzadi, M., Sahafnejad, Z., & Allahverdi, A. (2023). Epigenetic regulation in lung cancer. *MedComm*, 4(6), e401. <https://doi.org/10.1002/MCO2.401>
- Rauch, T. A., Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K. H., Wang, Z., Riggs, A. D., & Pfeifer, G. P. (2008). High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 252. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0710735105>
- RNA-Seq Workflow / Bio-Rad. (n.d.). Retrieved February 5, 2025, from https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/rna-seq-workflow?ID=Q106ZUWDLBV5&utm_source=chatgpt.com
- Romano, G., Veneziano, D., Nigita, G., & Nana-Sinkam, S. P. (2018). RNA methylation in ncRNA: Classes, detection, and molecular associations. *Frontiers in Genetics*, 9(JUL), 365770. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00243/BIBTEX>
- Rong, D., Sun, G., Wu, F., Cheng, Y., Sun, G., Jiang, W., Li, X., Zhong, Y., Wu, L., Zhang, C., Tang, W., & Wang, X. (2021). Epigenetics: Roles and therapeutic implications of non-coding RNA modifications in human cancers. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 25, 67–82.
<https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2021.04.021/ASSET/E072C986-06CF-4444-B5CA-0C9A3DAB00FD/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Saavedra, F., Marty-Lombardi, S., & Loyola, A. (2018). Characterization of Posttranslational Modifications on Histone Variants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1832, 21–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8663-7_2
- Sato, M., Horio, Y., Sekido, Y., Minna, J. D., Shimokata, K., & Hasegawa, Y. (2002). The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, 21(31), 4822–4829.
<https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205581>
- Scarano, C., Veneruso, I., De Simone, R. R., Di Bonito, G., Secondino, A., & D'Argenio, V. (2024). The Third-Generation Sequencing Challenge: Novel Insights for the Omic Sciences. *Biomolecules*, 14(5), 568. <https://doi.org/10.3390/biom14050568>
- Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 28(10), 1563. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221>
- Schuller, H. M. (2019). The impact of smoking and the influence of other factors on lung cancer. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(8), 761–769.
<https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1645010>
- Šestáková, Š., Šálek, C., & Remešová, H. (2019). DNA Methylation Validation Methods: a Coherent Review with Practical Comparison. *Biological Procedures Online*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12575-019-0107-Z>
- Siddiqui, F., Vaqar, S., & Siddiqui, A. H. (2023). Lung Cancer. *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine, Second Edition*, 605–606.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511543579.138>

- Simplified protocol for microarray analysis. a) RNA or mRNA from sample... / Download Scientific Diagram.* (n.d.). Retrieved January 13, 2025, from https://www.researchgate.net/figure/Simplified-protocol-for-microarray-analysis-a-RNA-or-mRNA-from-sample-of-interest-is_fig1_9011699
- Song, Y., Kelava, L., & Kiss, I. (2023). MiRNAs in Lung Adenocarcinoma: Role, Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13302. <https://doi.org/10.3390/IJMS241713302/S1>
- Tammen, S. A., Friso, S., & Choi, S. W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(4), 753. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.07.018>
- Teng, P. C., Liang, Y., Yarmishyn, A. A., Hsiao, Y. J., Lin, T. Y., Lin, T. W., Teng, Y. C., Yang, Y. P., Wang, M. L., Chien, C. S., Luo, Y. H., Chen, Y. M., Hsu, P. K., Chiou, S. H., & Chien, Y. (2021). RNA Modifications and Epigenetics in Modulation of Lung Cancer and Pulmonary Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10592. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910592>
- Thomas, S. M., Ackert-Bicknell, C. L., Zuscik, M. J., & Payne, K. A. (2022). Understanding the Transcriptomic Landscape to Drive New Innovations in Musculoskeletal Regenerative Medicine. *Current Osteoporosis Reports*, 20(2), 141–152. <https://doi.org/10.1007/S11914-022-00726-X>
- Tian, J., Hu, L., Li, X., Geng, J., Dai, M., & Bai, X. (2016). MicroRNA-130b promotes lung cancer progression via PPAR γ /VEGF-A/BCL-2-mediated suppression of apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 35(1), 105. <https://doi.org/10.1186/S13046-016-0382-3>
- Van Den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., Khochbin, S., & Gazzeri, S. (2008). Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(22), 7237–7245. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0869>
- Vincent, K., Pichler, M., Lee, G. W., & Ling, H. (2014). MicroRNAs, Genomic Instability and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14475. <https://doi.org/10.3390/IJMS150814475>
- Vinod, S. K., & Hau, E. (2020). Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 25 Suppl 2(S2), 61–71. <https://doi.org/10.1111/RESP.13870>
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1509, 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1
- Warnecke, P. M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J. R., & Clark, S. J. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods (San Diego, Calif.)*, 27(2), 101–107. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00060-9)
- Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.5236>
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*, 114(3), A160. <https://doi.org/10.1289/EHP.114-A160>
- Wiehle, L., & Breiling, A. (2016). Chromatin Immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1480, 7–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6380-5_2

- Wu, K. L., Tsai, Y. M., Lien, C. T., Kuo, P. L., & Hung, J. Y. (2019). The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1611. <https://doi.org/10.3390/IJMS20071611>
- Wu, Y., Lyu, H., Liu, H., Shi, X., Song, Y., & Liu, B. (2016). Downregulation of the long noncoding RNA GAS5-AS1 contributes to tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 6, 31093. <https://doi.org/10.1038/SREP31093>
- Yang, H., Liu, Y., Chen, L., Zhao, J., Guo, M., Zhao, X., Wen, Z., He, Z., Chen, C., & Xu, L. (2023). MiRNA-Based Therapies for Lung Cancer: Opportunities and Challenges? *Biomolecules*, 13(6), 877. <https://doi.org/10.3390/BIOM13060877>
- Yang, L., Tang, L., Min, Q., Tian, H., Li, L., Zhao, Y., Wu, X., Li, M., Du, F., Chen, Y., Li, W., Li, X., Chen, M., Gu, L., Sun, Y., Xiao, Z., & Shen, J. (2024). Emerging role of RNA modification and long noncoding RNA interaction in cancer. *Cancer Gene Therapy*, 31(6), 816. <https://doi.org/10.1038/S41417-024-00734-2>
- Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2019.01.024>
- Yokoi, K., Yamashita, K., & Watanabe, M. (2017). Analysis of DNA Methylation Status in Bodily Fluids for Early Detection of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS18040735>
- Zhang, R., Liu, C., Niu, Y., Jing, Y., Zhang, H., Wang, J., Yang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C. Y., & Li, D. (2016). MicroRNA-128-3p regulates mitomycin C-induced DNA damage response in lung cancer cells through repressing SPTAN1. *Oncotarget*, 8(35), 58098. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12300>
- Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1283, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.