



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ – ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

**Ο ρόλος του γονιδίου *ARID1A*
στον καρκίνο του ενδομητρίου**

Ραφαέλα Αβρααμίδου του Αντώνη

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων
για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Λάρισα 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



PROGRAM OF MASTER SCIENCES
"BIOLOGY OF REPRODUCTION - BIOMARKERS IN
OBSTETRICS AND GYNECOLOGY - PERINATAL MEDICINE"
Director of MSc: Professor ALEXANDROS I. DAPONTE

The role of the *ARID1A* gene
in endometrial cancer

Rafaela Avraamidou Antoni

Submitted to meet part of the requirements
for obtaining the Master Science Diploma

Larissa 2022

Επιβλέπων καθηγήτρια:

Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π. Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Ιατρικής κ. Μαρίας Σαμαρά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Μαρία Σαμαρά, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική της καθοδήγηση σε καθημερινή βάση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Αλέξανδρο Δαπόντε και κ. Μαρία Σάτρα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για τη συνεργασία, τη βοήθεια και τη συμβολή τους για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Μαρία Παπαθανασίου, για την άψογη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συνεχή συμπαράσταση. Τέλος, ευχαριστίες προς τους φίλους μου και την οικογένεια μου, που ήταν πάντα το στήριγμα μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1	Μορφολογία του ενδομητρίου	8
1.2	Ανάπτυξη και μεταβολές του ενδομητρίου.....	9
1.2.1	Οδοί σηματοδότησης των οιστρογονικών επιδράσεων	10
1.3	Παθολογικές καταστάσεις του ενδομητρίου.....	12
1.4	Καρκίνος- Γενικά.....	13
1.4.1	Καρκίνος του ενδομητρίου	14
1.4.1.1	Παράγοντες κινδύνου.....	16
1.4.1.2	Ταξινόμηση καρκίνου του ενδομητρίου	17
1.4.1.3	Μοριακές οδοί σηματοδότησης στον καρκίνο του ενδομητρίου	25
1.4.2	Επιγενετικές αλλαγές.....	28
1.4.2.1	Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF	29
1.4.2.2	Η δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF	31
1.4.2.3	Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF και το γονίδιο <i>ARID1A</i>	33
1.4.2.4	Ο ρόλος του <i>ARID1A</i> γονιδίου.....	35
1.4.2.5	Το γονίδιο <i>ARID1A</i> και ο καρκίνος του ενδομητρίου.....	38
2	ΣΚΟΠΟΣ	40
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
3.1	Αποπαραφίνωση του ιστού και απομόνωση DNA	41
3.1.1	Αποπαραφίνωση των FFPEΤ δειγμάτων	41
3.1.2	Λύση των κυττάρων και απομόνωση του γενωμικού DNA	42
3.1.3	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	44
3.1.3.1	Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA των δειγμάτων	44
3.1.3.2	Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA των δειγμάτων	47
3.1.3.3	Εκτίμηση της καθαρότητας του DNA	49
3.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	50
3.2.1	Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	56
3.3	Καθαρισμός των PCR προϊόντων	56
3.3.1	Καθαρισμός των ενισχυμένων PCR προϊόντων.....	57
3.4	Ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας – Αλληλούχιση.....	58
3.4.1	Αλληλούχιση κατά Sanger.....	59
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί τον έκτο σε συχνότητα καρκίνο στα θήλεα άτομα. Η ανάπτυξη του όγκου επιτυγχάνεται με ποικίλους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι η καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά είναι μεταλλαγμένα και οι πρωτεΐνες δεν διαθέτουν τη λειτουργία τους καθώς, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αναστέλλουν προσωρινά την πορεία του κυτταρικού κύκλου έως ότου να διορθωθεί η βλάβη που υπέστη το DNA. Οι επιγενετικές αλλαγές που προκύπτουν στον καρκίνο και ιδιαίτερα οι τροποποιήσεις των ιστονών που προκαλούν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, είναι κρίσιμες στην καρκινογένεση. Το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF και οι επιμέρους υπομονάδες του θεωρούνται ογκοκατασταλτικές και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι εν λόγω υπομονάδες, μέσω των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, συμβάλλουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων. Οι υποδοχείς αυτοί δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Η πρωτεΐνη *ARID1A*, ως μέλος του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF, φαίνεται να αλληλοεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες και συνδέεται με πολλές μοριακές σηματοδοτικές οδούς. Απώλεια του γονιδίου *ARID1A*, που κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη του συμπλέγματος, έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. Στον καρκίνο του ενδομητρίου καταγράφεται πλήθος μεταλλάξεων στο γονίδιο *ARID1A*, γεγονός που υποδεικνύει τον σημαντικό του ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου. Η περαιτέρω μελέτη του γονιδίου αυτού καθώς και οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε αυτό κρίνεται σημαντική. Για το λόγο αυτό, στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *ARID1A*, και συγκεκριμένα τέσσερα από τα είκοσι εξόνιά του, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και επακόλουθης αλληλούχισης κατά Sanger, με σκοπό την αναζήτηση μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Απώτερος σκοπός είναι να εξεταστεί εάν το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να συμβάλλει, ως πρόσθετος δείκτης στην κλινική πράξη, στη διάγνωση και στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του ενδομητρίου.

Λέξεις κλειδιά: Ενδομήτριο, Καρκίνος ενδομητρίου, Σύμπλοκο Αναδιαμόρφωσης Χρωματίνης SWI/SNF, Επιγενετικές αλλαγές, Γονίδιο *ARID1A*

ABSTRACT

Endometrial cancer is the sixth most common cancer in women. Tumor growth is known to be enabled by various ways, suspension of tumor suppressor gene activity being among them. Tumor suppressor genes are mutated, and their proteins do not retain their function as, under normal conditions, tumor suppressor genes temporarily inhibit cell cycle until DNA damage has been repaired. Epigenetic alterations during the process of carcinogenesis, specifically histone modifications are considered a hallmark of cancer. The SWI/SNF chromatin remodeling complex, and its subunits are tumor suppressors as they participate in cell cycle regulation. These subunits, through nuclear hormone receptor interactions, also contribute to the transcriptional activation of genes. These receptors act as transcription factors and regulate gene expression. *ARIDIA*, a member of SWI/SNF chromatin remodeling complex, has been shown to interact with transcription factors and participate in numerous molecular pathways. *ARIDIA* gene loss has been observed in various human malignancies. In endometrial carcinomas, numerous alterations have been identified in the *ARIDIA* gene, showcasing its role on disease onset and progression. Further study of this gene as well as its mutations is considered important. To this end, the present diploma thesis studied the *ARIDIA* gene by performing multiplication in four of its twenty exons through application of PCR, followed by Sanger sequencing of the amplified products to identify gene alterations in endometrial cancer patients. Its utter goal is to evaluate whether the *ARIDIA* gene is a suitable companion biomarker in clinical practice, diagnosis, and targeted therapy of endometrial cancer.

Key words: Endometrium, Endometrial Cancer, SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex, epigenetic alterations, *ARIDIA* Gene

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως ενδομήτριο ορίζεται ο βλεννογόνος που επενδύει την ενδομήτριο κοιλότητα. Αποτελείται από το καλυπτήριο επιθήλιο, τους αδένες, το στρώμα και τα αιμοφόρα αγγεία. Το ανθρώπινο ενδομήτριο, θεωρείται ορμονο–εξαρτώμενος ιστός, καθώς εξαρτάται από τη δράση των στεροειδών ορμονών.

1.1 Μορφολογία του ενδομητρίου

Το ενδομήτριο αποτελείται από δύο στιβάδες, τη βασική και τη λειτουργική. Η βασική στιβάδα περιλαμβάνει πυκνό στρώμα και μικρούς αδένες. Το στρώμα αποτελεί μια ιδιαίτερη μορφή συνδετικού ιστού, ευαίσθητου στην επίδραση των ωοθηκικών ορμονών. Οι αδένες του ενδομητρίου είναι κυρίως απλοί, σωληνώδεις, ενώ ορισμένοι παρουσιάζουν διακλάδωση. Το επιθήλιό τους είναι μονόστιβο κυλινδρικό κροσσωτό. Η λειτουργική στιβάδα είναι το τμήμα του ενδομητρίου που αναπτύσσεται, διαφοροποιείται, αποπίπτει και αναγεννάται σε κάθε κύκλο. Σε μερικές θέσεις χωρίς κροσσούς, οι αδένες εκκρίνουν βλέννη και γλυκογόνο.

Η αγγείωση είναι ειδική, διαφέρει μεταξύ των στιβάδων και παρουσιάζει ικανότητες προσαρμογής στις τοπικές και χρόνιες ανάγκες, αναλόγως πάντα με το στάδιο του κύκλου. Τα αρτηρίδια της βασικής στιβάδας δεν μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κύκλου, σε αντίθεση με τα εντόνως διακλαδιζόμενα αρτηρίδια που εισδύουν στη λειτουργική στιβάδα και μετέχουν ενεργά στις λειτουργικές μεταβολές.

Το ενδομήτριο μεταβάλλεται στη διάρκεια του κύκλου. Οι μεταβολές αφορούν στους αδένες, στα αγγεία και στο στρώμα του ενδομητρίου και είναι αποτέλεσμα απόκρισης έναντι της δράσης των στεροειδών ορμονών του θήλεος ατόμου, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Οι ορμόνες αυτές παράγονται στις ωοθήκες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται σε όργανα στόχους, όπως είναι το ενδομήτριο, ο ενδοτράχηλος και το επιθήλιο του κόλπου (Μεσσήνης 2005).

1.2 Ανάπτυξη και μεταβολές του ενδομητρίου

Το ενδομήτριο, κατά την αναπαραγωγική ηλικία, υφίσταται κυκλικής φύσεως μορφολογικές αλλαγές, ως αποτέλεσμα της απόκρισής του στη δράση των στεροειδών ορμονών. Η ορμονική δράση επιτυγχάνεται με ειδικούς υποδοχείς που φέρουν τα κύτταρα του ενδομητρίου. Ο αριθμός των υποδοχέων διαφοροποιείται στα διάφορα στάδια του κύκλου. Σε έναν συνήθη κύκλο 28 ημερών, διακρίνονται η παραγωγική φάση, κατά την οποία κυριαρχεί η επίδραση των οιστρογόνων, η εκκριτική φάση, όπου συνδυάζεται η επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης και η φάση της εμμηνορρυσίας, εφόσον δεν υπάρχει εγκυμοσύνη.

Η ανάπτυξη του ενδομητρίου ξεκινά από την παραγωγική φάση. Η ανάπλαση του ενδομητρίου αρχίζει τις πρώτες ημέρες της εμμήνου ρύσης υπό την επίδραση των οιστρογόνων, ενώ παράλληλα, συνεχίζεται η απόπτωσή του. Τα οιστρογόνα που παράγονται υπό την επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), έχουν μιτωτική δράση και προκαλούν αύξηση του μήκους των αδένων και ανάπτυξη του βλεννογόνου του ενδομητρίου. Καθώς αναπτύσσονται οι αδένες, πραγματοποιείται και η αγγειογένεση. Στην αρχή της παραγωγικής φάσης, 5^η έως 7^η ημέρα του κύκλου, οι αδένες είναι ευθείς, μικροί και επενδύονται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Λόγω της υπερπλασίας των κυττάρων των αδένων, παρουσιάζονται πολυάριθμες μιτώσεις στα κύτταρα του στρώματος και των αδένων. Οι αδένες γίνονται εσπειραμένοι και αποκτούν υψηλό, ψευδοπολύστιβο επιθήλιο. Οι αδένες με τα αγγεία τους στηρίζουν το ενδομήτριο. Κάθε ενδομήτριος αδένας αιματώνεται από δύο αρτηριόλια, ένα επίμηκες σπειροειδές για το άνω τμήμα και ένα βραχύ βαθύ για τη βάση του αδένος. Η πάχυνση του ενδομητρίου σταματά πριν την ωοθυλακιορρηξία.

Κατά την εκκριτική φάση, μετά την ωοθυλακιορρηξία, η προγεστερόνη που παράγεται από το ωχρό σωματίο, υπό την επίδραση της ωχρινोटρόπου ορμόνης (LH), μειώνει τις μιτωτικές διαδικασίες. Η πρώτη μορφολογική αλλαγή που παρατηρείται είναι η εμφάνιση υποπυρηνικών κενотоπίων στα αδενικά κύτταρα. Τα κενотоπία είναι πλούσια σε γλυκογόνο και δηλώνουν εκκριτική δραστηριότητα. Σταδιακά, τις επόμενες ημέρες, τα κενотоπία μετατοπίζουν τους πυρήνες στο μέσο του κυττάρου. Οι αδένες παρουσιάζουν μεγαλύτερο όγκο, είναι υπερελικωμένοι και πλήρεις από το έκκριμα των αδένων. Το στρώμα παρουσιάζει έντονο οίδημα. Η μείωση των επιπέδων της παραγόμενης προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο, σε συνδυασμό με την αγγειοσύσπαση των αρτηριολίων, προκαλούν τη ρήξη της αρχιτεκτονικής και την απόπτωση της

λειτουργικής στιβάδας του ενδομητρίου, με αποτέλεσμα την εμμηνορρυσία (Amant, Moerman et al. 2005, Μεσσήνης 2005, Sherwood 2013). Συγκεκριμένα, την 9^η ημέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία, γίνεται ορατή η φθορά των κυττάρων του στρώματος γύρω από τα σπειροειδή αρτηρίδια. Αυξάνει το κυτταρόπλασμα των συγκεκριμένων κυττάρων. Η φθαρτοειδής μετατροπή συνεχίζεται και κατά την 12^η έως 14^η ημέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία, το στρώμα διηθείται από λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα και κοκκιοκύτταρα.

Στη φάση της εμμηνορρυσίας, η πτώση των επιπέδων οιστραδιόλης και προγεστερόνης δημιουργεί αγγειακές διαταραχές, που οδηγούν στην ισχαιμική νέκρωση και απόπτωση του λειτουργικού ενδομητρίου. Η εμμηνορρυσία χαρακτηρίζεται μορφολογικά από συρρίκνωση, αιμορραγία και κατακερματισμό του στρώματος και των αδένων (Waugh and Grant 2009).

1.2.1 Οδοί σηματοδότησης των οιστρογονικών επιδράσεων

Η εμμηνορρυσία αποτελεί ένα καθολικό γεγονός του ενδομητρίου. Εμφανίζει περίπλοκη κυτταρική ρύθμιση και οποιαδήποτε διαταραχή των μοριακών, κυτταρικών και αγγειακών φαινομένων, που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του κύκλου, ενδέχεται να οδηγήσει σε παθολογική ανάπτυξη του ενδομητρίου και εμφάνιση εμμηνορρυσιακών διαταραχών.

Η σηματοδότηση μέσω των οιστρογόνων διεξάγεται στα κύτταρα στόχους, που εκφράζουν τόσο τους κλασικούς υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptor – ERs, ER α and ER β), όσο και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς GPER (G protein-coupled ER), μέσω σηματοδοτικών οδών (**Εικόνα 1**). Οι ER α και ER β εκφράζονται σε ποικίλους ιστούς και κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασής τους είναι υψηλότερα στις ωοθήκες και στο ενδομήτριο της μήτρας, καθώς το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο των οιστρογόνων.

Οι ER α και ER β υποδοχείς, μήκους 66 kD και 55 kD αντίστοιχα, αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζονται από τη σύνδεσή τους με μόρια-συνδέτες. Πρόκειται για δύο διακριτές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ESR1* (χρωμοσωμική θέση 6q25.1) και *ESR2* (χρωμοσωμική θέση 14q23-24.1) αντίστοιχα. Διαφέρουν σε ποσοστό της τάξης του 41% στην αμινοξική τους αλληλουχία στην περιοχή σύνδεσης με το μόριο-συνδέτη (Heldring, Pike et al. 2007). Εκτός από τις εν λόγω πρωτεΐνες, απαντώνται και άλλες ισομορφές, μικρότερου συνήθως μήκους, όπως οι ER α 36, οι ER α 46 και ER Δ 7. Η ER α 36 πρωτεΐνη στερείται τόσο την trans περιοχή ενεργοποίησης, όσο και τη φυσική μεταγραφική δραστηριότητα. Στερείται επίσης την

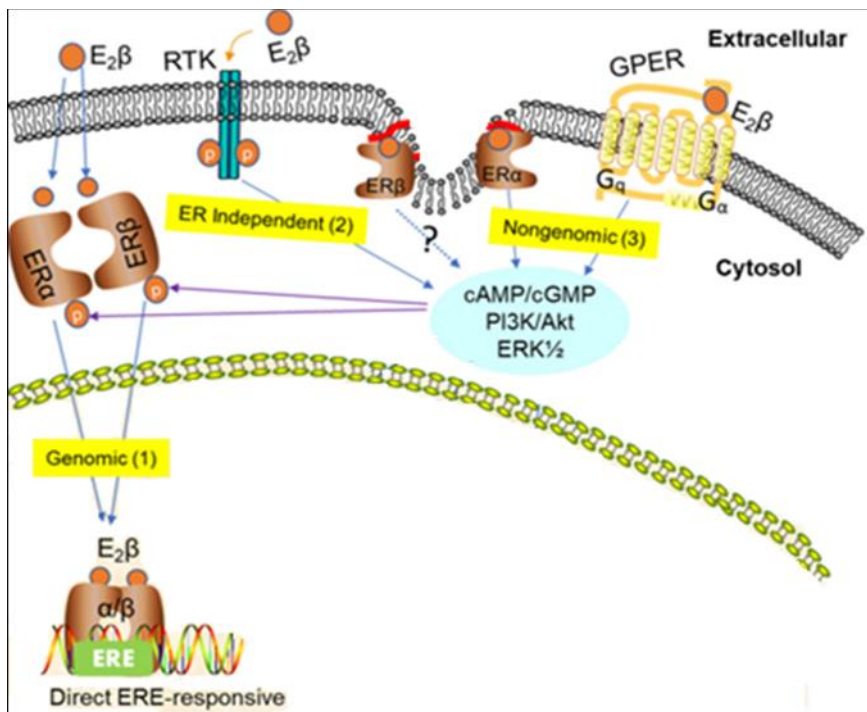
αμινοτελική περιοχή και βρίσκεται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. Ανταγωνίζεται τον ERα66 ως προς τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που διαθέτουν ERE στοιχεία στους υποκινητές τους. Η ERα46 αποτελεί μία άλλη μορφή που στερείται επίσης τμήμα της αμινοτελικής αλληλουχίας, ενώ από την ERΔ7 απουσιάζει η αμινοξική περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο 7. Η ERα46 μετέχει στον μηχανισμό παραγωγής NO από τα οιστρογόνα, ενώ η ERΔ7 αποτελεί κυρίαρχο καταστολέα της μητροτονικής δράσης στο μυομήτριο (Bai, Qi et al. 2020).

Στη μήτρα, ο GPER συνεργάζεται με τα κλασικά ERs, ώστε να ρυθμίσουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις των οιστρογόνων της μήτρας. Το mRNA των GPER υποδοχέων εκφράζεται ευρέως σε όργανα όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο προστάτης, οι ωοθήκες, ο πλακούντας και η μήτρα. In vitro μελέτη έδειξε ότι ο GPER παίρνει μέρος στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επάγεται από τα οιστρογόνα (Bai, Qi et al. 2020). Οι υποδοχείς των ορμονών εντοπίζονται κυρίως στο αδενικό επιθήλιο και λιγότερο στο στρώμα. Ο αριθμός των υποδοχέων οιστρογόνων αποκτά τη μέγιστη τιμή κατά την παραγωγική φάση του κύκλου και την ελάχιστη τιμή μετά την ωοθυλακιορρηξία, λόγω της επίδρασης της προγεστερόνης (Μεσσήνης 2005).

Οι πυρηνικοί ERs ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με στοιχεία του DNA που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα (Estrogen Responsive Elements - EREs) ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων (crosstalk) με άλλα στοιχεία απόκρισης, δεσμεύοντας τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες (Bai, Qi et al. 2020). Αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες εξαρτώμενους από τον προσδέτη. Διαθέτουν μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA και μία περιοχή σύνδεσης με την ορμόνη. Η πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα, επάγει τον διμερισμό (ομο- ή ετεροδιμερισμό), με επακόλουθη ενεργοποίηση και μετατόπιση στον πυρήνα, προκειμένου να προσδεθεί στο DNA και να επιδράσει στην μεταγραφή (Yoshinaga, Peterson et al. 1992, Robertshaw, Bian et al. 2016).

Τα οιστρογόνα μεταφέρουν πληροφορίες και μέσω ανεξάρτητων ER οδών, καθώς ορισμένα γονίδια, που μεταγράφονται ανταποκρινόμενα στα οιστρογόνα, δε φέρουν ERE στοιχεία στους υποκινητές τους. Η μεταγραφή των γονιδίων αυτών πραγματοποιείται μέσω σηματοδοτικών οδών που αναφέρονται ως “ταχεία” ή “μη πυρηνική” ER-σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, μέσω της trans ενεργοποίησης του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases - RTKs), αλλά και μέσω της φωσφορυλίωσης των ER, ενεργοποιούνται οι σηματοδοτικές οδοί των ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) και PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) / AKT (PKB - protein kinase B cascades). Η σηματοδότηση μέσω των οιστρογόνων εξασφαλίζεται και από ERs

(ER α , ER β) που εντοπίζονται στην μεμβράνη και δε διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή. Οι ERs ενδέχεται να φωσφορυλιώνονται άμεσα από πρωτεϊνικές κινάσες της MAPK σηματοδοτικής οδού, υποδεικνύοντας έναν μηχανισμό ανατροφοδότησης. Στη σηματοδότηση των οιστρογόνων λαμβάνει μέρος και ο GPER, ενεργοποιώντας τις οδούς PI3K / AKT και ERK (Bai, Qi et al. 2020).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των οδών σηματοδότησης των οιστρογονικών αποκρίσεων. Οδός 1^η - πυρηνική (γενωμική) σηματοδότηση: Δεσμεύεται ο συνδέτης - ορμόνη στον πυρηνικό ER και σχηματίζεται ομο- ή ετεροδιμερές, το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία διαθέτουν ERE στοιχεία. Οδός 2^η – ανεξάρτητη από ER σηματοδότηση: Οι RTKs υποδοχείς ενεργοποιούνται trans, μέσω των οιστρογόνων, και επάγεται η ενεργοποίηση των δευτερογενών αγγελιοφόρων cAMP μορίων (cyclic Adenosine Monophosphate) και cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate) και των σηματοδοτικών οδών των ERK και PI3K /AKT κινασών. Οδός 3^η- μη πυρηνική (μη γενωμική) σηματοδότηση: Οι ERs (ER α , ER β) που εντοπίζονται στη μεμβράνη και δε διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή, καθώς και οι GPER, ενεργοποιούνται από τα οιστρογόνα με επακόλουθη ενεργοποίηση των δευτερογενών αγγελιοφόρων μορίων (cAMP και cGMP) και των οδών των ERK και PI3K / AKT κινασών. (Bai, Qi et al. 2020).

1.3 Παθολογικές καταστάσεις του ενδομητρίου

Οι συνήθεις μορφές ανώμαλης παθολογίας του ενδομητρίου περιλαμβάνουν την ανωοθυλακιορρηκτική δυσλειτουργική αιμορραγία, την ωοθυλακιορρηκτική δυσλειτουργική αιμορραγία, την αιμορραγία περί την ωοθυλακιορρηξία και την αιμορραγία που προκαλείται από

διαταραχή της λειτουργίας του ωχρού σωματίου. Σε όλες τις προαναφερόμενες διαταραχές προκαλείται αιμορραγία στη μήτρα.

Το 70% περίπου των δυσλειτουργικών αιμορραγιών είναι αποτέλεσμα της ανωοθυλακιωρρηξίας. Πρόκειται για διαταραχή της κυκλικής έκκρισης των ωοθηκικών ορμονών με αποτέλεσμα τη συνεχή διέγερση του ενδομητρίου. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την παραμονή του παραγωγικού ενδομητρίου, με χαρακτηριστικό εύρημα την απουσία του εκκριτικού ενδομητρίου.

Η ωοθυλακιωρρηκτική δυσλειτουργική αιμορραγία παρατηρείται σπανιότερα, σε ένα 10% των δυσλειτουργικών ανωμαλιών και χαρακτηρίζεται από τακτικές εμμηνορρυσίες, με μεγάλη απώλεια αίματος κατά τις τρεις πρώτες ημέρες. Στην περίπτωση αυτή δε φαίνεται να διαταράσσεται ο μηχανισμός αποδόμησης, απόπτωσης και αναγέννησης του ενδομητρίου. Τα επίπεδα των οιστρογόνων και των γοναδοτροπινών δεν παρουσιάζουν παθολογικές διακυμάνσεις, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν υπάρχει διαταραχή στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες.

Η αιμορραγία περί την ωοθυλακιωρρηξία αναφέρεται σε συχνή σταγονοειδή αιμορραγία στο μέσο των φυσιολογικών ωοθυλακιωρρηκτικών κύκλων. Οφείλεται στην απότομη πτώση των οιστρογόνων τόσο κατά τη διάρκεια, όσο και αμέσως μετά την ωοθυλακιωρρηξία.

Η αιμορραγία που προκαλείται από τη διαταραχή της λειτουργίας του ωχρού σωματίου ορίζεται ως βράχυνση ή επιμήκυνση του βιολογικού χρόνου δράσης του ωχρού σωματίου. Ιστολογικά σημειώνεται ακανόνιστη απόπτωση του ενδομητρίου. Αποδίδεται σε πρόωρη μείωση της παραγωγής προγεστερόνης και εμφανίζεται συνήθως ως μικρού βαθμού αιμορραγία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση μεγάλης αιμορραγίας με τη μορφή μηνορραγίας (Gaunt and Mayeaux 2007).

1.4 Καρκίνος- Γενικά

Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο. Στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου συμβάλλουν εξωγενείς παράγοντες, παραδείγματος χάριν οι περιβαλλοντικοί, καθώς και ενδογενείς που αφορούν σε γενετικές και επιγενετικές επιδράσεις. Η τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους κατά την καρκινογένεση, καθώς οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Lipsick 2020). Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στον σχηματισμό κυτταρικών αθροίσεων που ενδέχεται

να εξελιχθούν σε νεοπλάσματα. Όταν οι κυτταρικές αυτές αθροίσεις δεν απειλούν την ζωή του ατόμου αναφέρονται ως καλοήθεις όγκοι. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα εισβάλλουν και διαταράσσουν τους γειτονικούς ιστούς, μετατρέπονται σε κακοήθεις μάζες και παρουσιάζουν μεταστατικό δυναμικό (Russell 2006).

Σε γενετικό υπόβαθρο, η καρκινογένεση αποτελεί μία διαδικασία που εξελίσσεται σταδιακά και προϋποθέτει τη συσσώρευση μεταλλαγών σε πολυάριθμα γονίδια κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Η συσσώρευση των γενετικών αλλαγών που επιδρούν στην αλληλουχία του DNA συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, σε συνδυασμό με τη δράση των επιγενετικών μηχανισμών στην έκφραση των γονιδίων-στόχων, προκαλεί τροποποιήσεις που ενεργοποιούν ογκογονίδια και αδρανοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια (Russell 2006). Οι επιγενετικές αλλαγές αφορούν σε διαταραχές στην μεθυλίωση του DNA – υπομεθυλίωση ή υπερμεθυλίωση, καθώς και τροποποιήσεις ιστονών που συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Wu and Roberts 2013).

1.4.1 Καρκίνος του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί τον έκτο σε συχνότητα γυναικολογικό καρκίνο. Στην Ευρώπη φαίνεται να είναι ο συχνότερος γυναικολογικός καρκίνος με πενταετή επιπολασμό της τάξης του 34.7%. Ο εκτιμώμενος αριθμός νέων περιπτώσεων το 2018 ήταν 121.578, ενώ οι θάνατοι είναι 29.638. Ωστόσο, η συχνότητα διαφέρει μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών (Braun, Overbeek-Wager et al. 2016). Στη μελέτη EURO CARE-5 (2015), αναφέρεται πενταετής επιβίωση της τάξης του 76% για γυναίκες που διαγνώστηκαν με καρκίνο του ενδομητρίου κατά το χρονικό διάστημα 2000-2007, με το ποσοστό να διαφοροποιείται από 72.9% στην Ανατολική Ευρώπη έως και 83.2% στη Βόρεια Ευρώπη. Η γεωγραφική διαφορά που παρατηρείται μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές ως προς τον επιπολασμό των υποτύπων στις διαφορετικές περιοχές, καθώς και σε διαφορές στα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, τα οποία επηρεάζουν τόσο την πρόγνωση, όσο και την θεραπευτική προσέγγιση (Sant, Chirlaque Lopez et al. 2015).

Ο καρκίνος του ενδομητρίου προέρχεται από το αδενικό επιθήλιο. Το 80% των περιπτώσεων εκδηλώνεται σε ηλικίες άνω των 50 ετών, πρόκειται δηλαδή για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ωστόσο, σε ένα ποσοστό της τάξης του 14%, εμφανίζεται σε ηλικίες μικρότερες των 50 ετών, σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ως αποτέλεσμα του αυξημένου δείκτη μάζας σώματος (BMI-

Body Mass Index). Η πενταετής επιβίωση ποικίλει και εξαρτάται από το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Σε ασθενείς που ο όγκος είναι εντοπισμένος στη μήτρα, η πενταετής επιβίωση ξεπερνά το 95%. Ωστόσο, όταν ο όγκος διηθεί και βγαίνει εκτός της μήτρας, μειώνεται δραματικά σε ποσοστό της τάξης του 69% σε ασθενείς εάν η διήθηση είναι τοπική και σε ποσοστό 17% σε ασθενείς που φέρουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Οι περισσότεροι καρκίνοι του ενδομητρίου είναι σποραδικοί. Ωστόσο, απαντώνται ορισμένες κληρονομικές μορφές, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων της γαμετικής σειράς, που αφορούν κυρίως σε γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (Yen, Wang et al. 2020). Οι οικογενείς μορφές σχετίζονται συνήθως με το σύνδρομο Lynch (κληρονομικός μη πολυποδισιακός καρκίνος του παχέος εντέρου) και αποτελούν ποσοστό της τάξης του 10% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου (Braun, Overbeek-Wager et al. 2016). Η μη φυσιολογική αιμορραγία της μήτρας αποτελεί το συχνότερο σύμπτωμα του καρκίνου του ενδομητρίου, ωστόσο σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο είναι δυνατόν να εμφανισθούν κοιλιακό ή πυελικό άλγος (Morice, Leary et al. 2016).

Η ενδομητρική υπερπλασία αποτελεί πρόδρομη αλλοίωση του καρκίνου του ενδομητρίου και η παρουσία της αυξάνει κατά 1-3% τον κίνδυνο εμφάνισης του εν λόγω καρκίνου. Η άτυπη υπερπλασία αυξάνει περισσότερο τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου συγκριτικά με την απλή ή σύνθετη υπερπλασία. Οι ασθενείς με άτυπη υπερπλασία, σε ένα ποσοστό της τάξης 30-40% έχουν ταυτόχρονα και αδενοκαρκίνωμα (Sorosky 2012).

Ο καρκίνος του ενδομητρίου, τα τελευταία 30 χρόνια, διακρίνεται σε δύο τύπους, I και II, με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, το grade και την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων (**Πίνακας 1**) (Bokhman 1983).

	Type I	Type II
Associated clinical features	Metabolic syndrome: obesity, hyperlipidaemia, hyperglycaemia, and increased oestrogen concentrations	None
Grade	Low	High
Hormone receptor expression	Positive	Negative
Histology	Endometrioid	Non-endometrioid (serous, clear-cell carcinoma)
Genomic stability	Diploid, frequent microsatellite instability (40%)	Aneuploid
TP53 mutation	No	Yes
Prognosis	Good (overall survival 85% at 5 years)	Poor (overall survival 55% at 5 years)

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά στοιχεία τύπου I και τύπου II καρκίνων του ενδομητρίου (Bokhman 1983).

1.4.1.1 Παράγοντες κινδύνου

Ο τύπος I – ενδομητριοειδής - είναι ο συχνότερος και αποτελεί το 70% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων με καρκίνο του ενδομητρίου. Στους κύριους παράγοντες κινδύνου, συγκαταλέγεται η μακροχρόνια και ανεπιθύμητη έκθεση του ενδομητρίου, σε ενδογενή και εξωγενή οιστρογόνα, ειδικότερα στον ενδομητριοειδή τύπο (Τύπος I). Στα αίτια των υψηλών επιπέδων οιστρογόνων συγκαταλέγονται η θεραπεία με οιστρογόνα, η πρόωμη εμμηναρχή, η καθυστερημένη έναρξη της εμμηνόπαυσης και τα νεοπλάσματα που παράγουν οιστρογόνα όπως αυτά των κυττάρων της θήκης (Braun, Overbeek-Wager et al. 2016). Στα αίτια συγκαταλέγεται επίσης και η ανωοθυλακιορρηξία που οδηγεί σε συνεχή, μη επιθυμητή διέγερση οιστρογόνων, καθώς δεν υπάρχει ωχρό σωματίο ώστε να παραχθεί προγεστερόνη (Sorosky 2012). Ο τύπος I έχει συνδεθεί με τη γενετική προδιάθεση (σύνδρομο Lynch), το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και την παχυσαρκία (αυξημένος δείκτης μάζας σώματος, Body Mass Index, BMI). Η πλειοψηφία των ασθενών με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων είναι υπέρβαρα (BMI 25-30) ή παχύσαρκα άτομα (BMI > 30). Στα άτομα αυτά πραγματοποιείται περιφερική μετατροπή των οιστρογόνων μέσω της αρωματοποίησης στον λιπώδη ιστό (Trojano, Olivieri et al. 2019). Η υπέρταση σχετίζεται με την παχυσαρκία και τον διαβήτη και δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου (Sorosky 2012). Επιπρόσθετα, η υπογονιμότητα, η μη τεκνοποίηση, η έκθεση σε ταμοξιφαίνη, αλλά και η μη ισορροπημένη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, συγκαταλέγονται στους παράγοντες κινδύνου.

Ο τύπος II περιλαμβάνει τα μη ενδομητριοειδή καρκινώματα, με υψηλό κίνδυνο υποτροπής και μετάστασης και κακή πρόγνωση. Αν και συνιστούν μόλις το 10% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου, ωστόσο, ευθύνονται για το 40% περίπου των θανάτων (2015) (2015). Παρουσιάζεται κυρίως σε θήλεα άτομα της μαύρης φυλής, σε ηλικίες άνω των 50 ετών και δε σχετίζεται με την έκθεση σε οιστρογόνα ή την απώλεια υποδοχέων οιστρογόνων/προγεστερόνης.

Η υπερδιέγερση του ενδομητρίου, λόγω της υψηλής ποσότητας οιστρογόνων, προκαλεί την ανάπτυξη πρόδρομης μορφής νεοπλασίας που ονομάζεται σύνθετη άτυπη υπερπλασία (CAH - complex atypical hyperplasia) και πρόωμο καρκίνο του ενδομητρίου (Lu and Broaddus 2020). Η σύνθετη άτυπη υπερπλασία παρουσιάζει διογκωμένους και ακανόνιστους αδένες, ενώ τα κύτταρα παρουσιάζουν άτυπα χαρακτηριστικά. Ο βαθμός εξέλιξης προς καρκίνο φτάνει το 29% και

συνήθως περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις με σύνθετη άτυπη υπερπλασία συνυπάρχουν με ενδομητριοειδές καρκίνωμα (Travaglino, Raffone et al. 2019).

1.4.1.2 Ταξινόμηση καρκίνου του ενδομητρίου

Η ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου είναι σημαντική, καθώς με αυτόν τον τρόπο οι ασθενείς διαφοροποιούνται σε ομάδες με παρόμοιες προοπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις (Morice, Leary et al. 2016). Τα συστήματα FIGO 2009 (International Federation of Gynecology and Obstetrics) και TNM (Tumor–Node–Metastasis) χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου. Βασίζονται στη χειρουργική σταδιοποίηση και εκτιμούν τον βαθμό της διήθησης στο μυομήτριο και την παρουσία τοπικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων (Morice, Leary et al. 2016). Τα δύο συστήματα απεικονίζονται συγκριτικά στην **Εικόνα 2** (Lu and Broaddus 2020).

Primary Tumor (T)		
TNM system, T category	FIGO system	T criteria
TX		Primary tumor cannot be assessed
T0		No evidence of primary tumor
T1	I	Tumor confined to corpus uteri, including endocervical glandular involvement
T1a	IA	Tumor limited to the endometrium or invading less than half of the myometrium
T1b	IB	Tumor invading one half or more of the myometrium
T2	II	Tumor invading the stromal connective tissue of the cervix but not extending beyond the uterus Does not include endocervical glandular involvement
T3	III	Tumor involving serosa, adnexa, vagina, or parametrium
T3a	IIIA	Tumor involving the serosa, adnexa, or both (direct extension or metastasis)
T3b	IIIB	Vaginal involvement (direct extension or metastasis) or parametrial involvement
T4	IVA	Tumor invading the bladder mucosa, bowel mucosa, or both Bullous edema is not sufficient to classify a tumor as T4

Regional Lymph Nodes (N)		
TNM system, N category	FIGO system	N criteria
NX		Regional lymph nodes cannot be assessed
N0		No regional lymph node metastasis
N0(i+)		Isolated tumor cells in regional lymph node, ≤ 0.2 mm in diameter
N1mi	IIIC1	Regional lymph node micrometastasis (>0.2 mm to 2.0 mm in diameter) to pelvic lymph nodes
N1	IIIC1	Regional lymph node macrometastasis (>2.0 mm in diameter) to pelvic lymph nodes
N2mi	IIIC2	Regional lymph node micrometastasis (>0.2 mm to 2.0 mm in diameter) to paraaortic lymph nodes, with or without positive pelvic lymph nodes
N2	IIIC2	Regional lymph node macrometastasis (>2.0 mm in diameter) to paraaortic lymph nodes, with or without positive pelvic lymph nodes

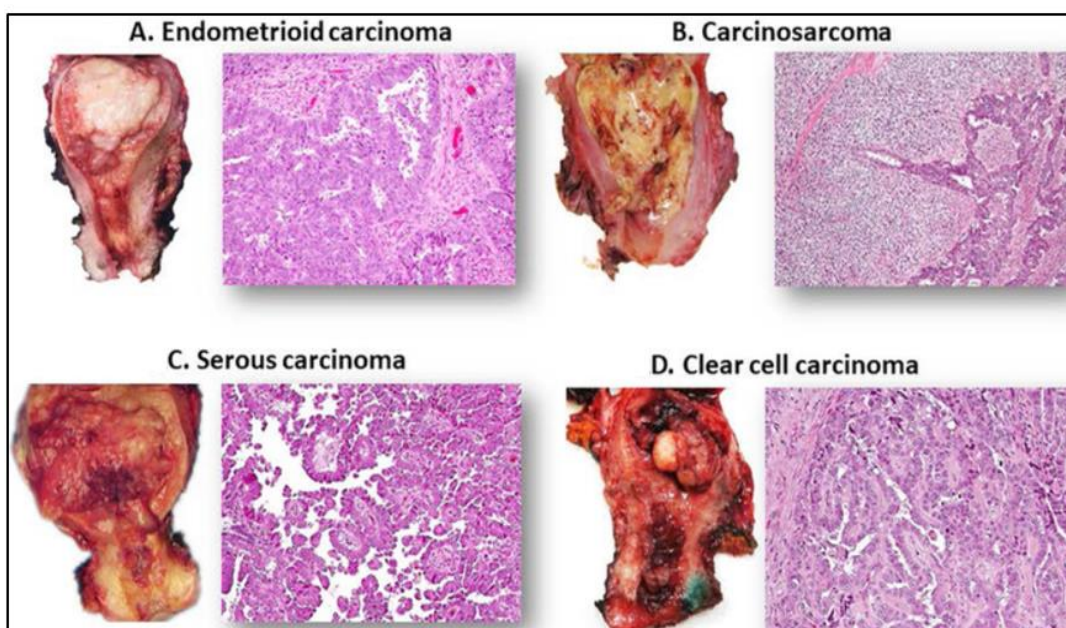
Distant Metastasis (M)		
TNM system, M category	FIGO system	M criteria
cM0		No distant metastasis on clinical (c) assessment
cM1	IVB	Distant metastasis (includes metastasis to inguinal lymph nodes, lung, liver, or bone or intraperitoneal disease) Also includes metastasis to pelvic or paraaortic lymph nodes, vagina, uterine serosa, or adnexa
pM1	IVB	Distant metastasis (includes metastasis to inguinal lymph nodes, liver, or bone or intraperitoneal disease) microscopically confirmed on pathological (p) assessment Excludes metastasis to pelvic or paraaortic lymph nodes, vagina, uterine serosa, or adnexa

Εικόνα 2. Συγκριτική ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου βάσει των συστημάτων FIGO 2009 και TNM. Οι τρεις πίνακες εκτιμούν τον αρχικό όγκο, την έκταση και την κατεύθυνση της εξάπλωσής του, καθώς και την παρουσία/απουσία μεταστάσεων (Lu and Broaddus 2020).

Η πρώτη ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου σε τύπους I και II, προτάθηκε το 1983, από τον Bokhman, με βάση τα κλινικά και ορμονικά χαρακτηριστικά (Yen, Wang et al. 2020). Ο Τύπου I – ενδομητριοειδής, επηρεάζει ποσοστό της τάξης του 80% των ασθενών, εμφανίζεται σε

προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και έχει συνήθως ευνοϊκή έκβαση λόγω του μικρού βαθμού διήθησης στο μυομήτριο (Trojano, Olivieri et al. 2019, Lu and Broaddus 2020). Ο Τύπου II - μη ενδομητριοειδής, επηρεάζει το υπόλοιπο 20% περίπου των ασθενών, εμφανίζεται συνήθως σε μεγαλύτερης ηλικίας, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και διηθεί σε βάθος το μυομήτριο (Sorosky 2012, Lu and Broaddus 2020). Η σύνθετη άτυπη ενδομητρική υπερπλασία που συνοδεύεται από επιθηλιακή ατυπία, αποτελεί την πρόδρομη μορφή του ενδομητριοειδούς καρκίνου (τύπος I) (Lu and Broaddus 2020). Ο μη ενδομητριοειδής τύπος (II) παρουσιάζει μη ορμονοεξαρτώμενη παθογένεση, χωρίς σαφείς παράγοντες κινδύνου. Επιπλέον δεν χαρακτηρίζεται από γνωστές πρόδρομες αλλοιώσεις (Sorosky 2012, Lu and Broaddus 2020).

Σήμερα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου γίνεται με βάση τη μορφολογία και τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (αρχιτεκτονική αδενίων, βαθμός πυρηνικής ατυπίας). Συγκεκριμένα, διακρίνονται οι ακόλουθοι ιστολογικοί υπότυποι καρκινωμάτων: το ενδομητριοειδές (Endometrioid), το ορώδες (Serous), το διαυγοκυτταρικό (Clear Cell), το καρκινοσάρκωμα, το μικτού τύπου αδενοκαρκίνωμα, καθώς και σπανιότεροι τύποι, όπως είναι το βλενωδές αδενοκαρκίνωμα, νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα, το αποδιαφοροποιημένο καρκίνωμα και το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Όλοι οι υπότυποι εκτός του ενδομητριοειδούς ανήκουν στον μη-ενδομητριοειδή τύπο II (Lu and Broaddus 2020). Στην **Εικόνα 3** απεικονίζεται ακροσκοπική και μικροσκοπική εικόνα των συχνότερων υπότυπων του καρκίνου του ενδομητρίου (Yen, Wang et al. 2020).



Εικόνα 3. Μακροσκοπική και μικροσκοπική εικόνα των συχνότερων ιστολογικών τύπων του καρκίνου του ενδομητρίου (Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). **A.** Ο ενδομητριοειδής τύπος εμφανίζεται με ορισμένου βαθμού αδενικές ή βλεννοπαραγωγές δομές. Για τη διαφοροποίηση σε χαμηλού – και υψηλού βαθμού ενδομητριοειδών όγκων συνεκτιμώνται η αδενική διαφοροποίηση και η μορφολογία των κυττάρων. **B.** Το καρκινοσάρκωμα αποτελεί μείγμα κακοήθων επιθηλιακών και μεσεγχυματικών στοιχείων. Μακροσκοπικά, συνιστά νεκρωτικό και αιμορραγικό νεόπλασμα που καταλαμβάνει την κοιλότητα του ενδομητρίου. Ιστολογικά, αποτελείται από κακοήθη αδενικά χαρακτηριστικά του επιθηλίου και υψηλού βαθμού αδιαφοροποίητα στοιχεία του σαρκώματος. **C.** Το ορώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται μακροσκοπικά και ιστολογικά από θηλώδες αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης. **D.** Τα καρκινικά κύτταρα των διαυγών κυττάρων είναι γεμάτα με γλυκογόνο, στοιχείο που δείχνει ότι περιβάλλονται από ένα «διαυγές» στεφάνι (Yen, Wang et al. 2020).

Ο ενδομητριοειδής τύπος (EEC - Endometrioid endometrial carcinoma), με βάση το σύστημα FIGO, ταξινομείται περαιτέρω, σε μία κλίμακα από 1 έως 3, σύμφωνα με τις σχετικές αναλογίες των αδενικών στοιχείων και των συστατικών του συμπαγούς όγκου. Αναλυτικότερα, στην βαθμίδα 1 ταξινομούνται τα νεοπλάσματα με ποσοστό συμπαγών στοιχείων <6 %. Η βαθμίδα 2 αφορά σε νεοπλάσματα με συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης μεταξύ 6% και 50%, ενώ τα νεοπλάσματα με συμπαγές στοιχείο άνω του 50% ταξινομούνται στη βαθμίδα 3. Τα νεοπλάσματα των βαθμίδων 1 και 2, θεωρούνται χαμηλού βαθμού κακοηθείας και συνδέονται γενικότερα με καλή πρόγνωση. Αντιθέτως, τα νεοπλάσματα της βαθμίδας 3 έχουν ενδιάμεση προς κακή πρόγνωση (Lu and Broaddus 2020).

Το ορώδες καρκίνωμα της μήτρας είναι ο δεύτερος συχνότερος ιστολογικός υπότυπος και αντιστοιχεί στο 10% περίπου των καρκίνων του ενδομητρίου. Είναι εξαιρετικά επιθετικό νεόπλασμα και σχετίζεται με πρόιμη ανάπτυξη εξωμήτριας νόσου σε προχωρημένο στάδιο - 45% στα ορώδη καρκινώματα, έναντι 9% των βαθμίδων 1-2 στα ενδομητριοειδή καρκινώματα- είναι σταδίου III ή IV κατά τη διάγνωση (Brinton, Felix et al. 2013). Το καρκίνωμα εκ διαυγών κυττάρων (ECCC - Endometrial Clear Cell Carcinoma) συνιστά λιγότερο από 6% του συνόλου των καρκίνων του ενδομητρίου. Το ECCC έχει τυπικά χαρακτηριστικά τόσο του Τύπου I, ως προς το ανοσοϊστοχημικό και μοριακό προφίλ, όσο και του Τύπου II, δεδομένου ότι συνδέεται με ατροφικό ενδομήτριο, δεν είναι ορμονοεξαρτώμενο και παρουσιάζει επιθετική συμπεριφορά και κακή πρόγνωση. Τα καρκινοσαρκώματα, γνωστά και ως κακοήθεις μικτοί Μυλεριανοί όγκοι (Malignant Mixed Mullerian Tumors, MMMTs), αποτελούνται από υψηλού βαθμού καρκινωμάτωση και σαρκωμάτωση στοιχεία (Yen, Wang et al. 2020). Τα καρκινοσαρκώματα, αν

και σύμφωνα με τον WHO ταξινομούνται ως μικτοί επιθηλιακοί και μεσεγγυματικοί όγκοι, μοιάζουν περισσότερο με τα ενδομητριοειδή καρκινώματα, ως προς τη συμπεριφορά και τους παράγοντες κινδύνου. Για το λόγο αυτό σταδιοποιούνται και αντιμετωπίζονται ως υψηλού βαθμού καρκινώματα του ενδομητρίου (Menczer 2015, NCCN 2017).

Η ιστολογική ταξινόμηση παρέχει υψηλής αξίας προγνωστικές πληροφορίες και συμβάλλει στην επιλογή της κατάλληλης χειρουργικής και επικουρικής θεραπείας. Επιδέχεται ωστόσο βελτίωση με την ενσωμάτωση των μοριακών χαρακτηριστικών του όγκου που έχουν καθοριστικό ρόλο στην συγκεκριμένη καρκινογένεση. Παρατηρείται συχνά αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των ιστολογικών υποτύπων, παραδείγματος χάριν το grade 3 ενδομητριοειδές καρκίνωμα διακρίνεται δύσκολα από τα ορώδη καρκινώματα. Ωστόσο η σαφής διάκριση είναι απαραίτητη για την κλινική αντιμετώπιση και φροντίδα του ασθενούς, καθώς τα ορώδη καρκινώματα τείνουν να δίνουν νωρίς μεταστάσεις και η χημειοθεραπεία αποτελεί θεραπεία εκλογής για την κατηγορία αυτή, ενώ για τα ενδομητριοειδή καρκινώματα σταδίου 3 η ακτινοβολία αποτελεί την βέλτιστη επιλογή.

Η συνδυασμένη μορφομοριακή ταξινόμηση παρέχει τη δυνατότητα της έγκαιρης ανίχνευσης του καρκίνου του ενδομητρίου ή των πρόδρομων αλλοιώσεων, δίνοντας παράλληλα και την δυνατότητα εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων, πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση (Chang, Talukdar et al. 2019, Yen, Wang et al. 2020). Παράλληλα, η ενσωμάτωση των μοριακών χαρακτηριστικών προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς τον προσδιορισμό των διαφόρων υποτύπων του καρκίνου του ενδομητρίου (Yen, Wang et al. 2020).

Το 2013 η ερευνητική ομάδα χαρτογράφησης του γονιδιώματος (TCGA - The Cancer Genome Atlas), έπειτα από εκτενή, γενωμική ανάλυση 373 καρκίνων του ενδομητρίου, στην οποία συμπεριέλαβε την ανάλυση όλων των εξονίων, των μεταγραφόμενων αλληλουχιών, του αριθμού των γονιδιακών αντιγράφων, την ανάλυση πρωτεϊνών, τη μικροδορυφορική αστάθεια και το προφίλ μεθυλίωσης των όγκων, προσδιόρισε τέσσερις κατηγορίες με διακριτά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά (**Εικόνα 4**).

Η ταξινόμηση περιλαμβάνει τις υποομάδες:

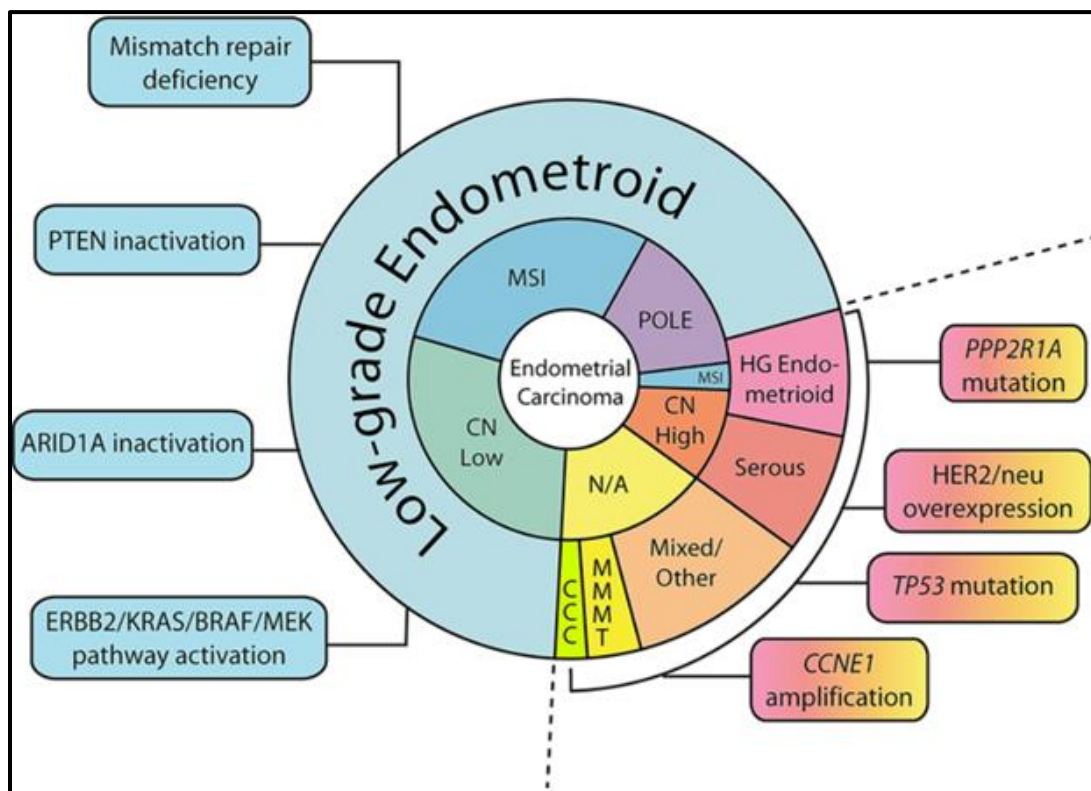
A) POLE Υπερμεταλλαγμένη ομάδα (Ultra-mutated) (7%),

B) Μικροδορυφορική Αστάθεια με υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων (Microsatellite Instability (MSI) – Hypermutated) (28%),

Γ) Χαμηλός Αριθμός Αντιγράφων / Μικροδορυφορική Σταθερότητα (Copy Number Low (CN) / Microsatellite Stable) (39%) και

Δ) Ορώδους τύπου / Υψηλός Αριθμός Αντιγράφων (Serous-like / Copy Number High (CN)) (26%) (Yen, Wang et al. 2020).

Οι TCGA υποομάδες με τις μοριακές παραλλαγές που περιέχουν και τους ιστολογικούς υποτύπους με τους οποίους συνδέονται, απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4. Συσχετισμοί των ιστολογικών υποτύπων και των ταξινομήσεων βάσει του TCGA στον καρκίνο του ενδομητρίου. Ο εξωτερικός κύκλος δείχνει τους ιστολογικούς υποτύπους. Ο εσωτερικός κύκλος δείχνει τη μοριακή ταξινόμηση του TCGA στα ενδομητριοειδή και ορώδη καρκινώματα. Τα εξωτερικά πλαίσια απεικονίζουν τις ποικίλες μοριακές οδούς σηματοδότησης που παραλλάσσονται συχνότερα στον καρκίνο του ενδομητρίου. Η TCGA ομάδα δεν ανέλυσε το διανογκυτταρικό καρκίνωμα, το καρκινοσάρκωμα και τους φτωχά διαφοροποιημένους όγκους. CCC: διανογκυτταρικό καρκίνωμα, HG: υψηλού βαθμού, LG: χαμηλού βαθμού, MMMT: κακοήθης μεικτός όγκος Mullerian. N/A: μη διαθέσιμο (Yen, Wang et al. 2020).

Η υποομάδα με υπερ-μεταλλαγμένη POLE χαρακτηρίζεται από υψηλό αριθμό σωματικών μεταλλάξεων (missense mutations) στην περιοχή της DNA πολυμεράσης ε με δραστικότητα εξωνουκλεάσης. Οι εν λόγω μεταλλάξεις προκαλούν υψηλά ποσοστά αντιγραφικών λαθών (232

$\times 10^{-6}$ μεταλλάξεις ανά Mb), καθώς η DNA πολυμεράση ϵ , είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της πιστότητας κατά την αντιγραφή του DNA (Chang, Talukdar et al. 2019). Στην υποομάδα αυτή συγκαταλέγονται τα υψηλού και χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδή καρκινώματα και έχουν πολύ καλή πρόγνωση, χωρίς υποτροπές (Murali, Delair et al. 2018, Yen, Wang et al. 2020).

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) προέρχεται από ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης των λανθασμένων ζευγών βάσεων (MMR - MisMatch Repair), που προκύπτουν κατά τον διπλασιασμό του DNA. Στη μελέτη της TCGA ομάδας, η πλειοψηφία των όγκων με μικροδορυφορική αστάθεια έδειξε μειωμένη έκφραση του MLH1 mRNA, ως δευτερεύον συμβάν μετά την μεθυλίωση του υποκινητή, ως ένδειξη απώλειας της έκφρασης. Τα νεοπλάσματα της κατηγορίας αυτής χαρακτηρίζονται ως μικροδορυφορικά σταθερά (MSS - microsatellite-stable), ως χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-L), εάν ένας έως δύο δείκτες έχουν τροποποιηθεί και ως υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H) εφόσον τροποποιούνται τουλάχιστον τρεις ή περισσότεροι δείκτες. Στην εν λόγω ομάδα καταγράφονται μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σηματοδοτική οδό PI3K/AKT/mTOR (Chang, Talukdar et al. 2019, Yen, Wang et al. 2020), καθώς και τα *PTEN* και *ARID5B* γονίδια. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τα ενδομητριοειδή καρκινώματα βαθμίδων 1-3 και έχει ενδιάμεση πρόγνωση (Murali, Delair et al. 2018, Yen, Wang et al. 2020).

Η TCGA ερευνητική ομάδα ταυτοποίησε δύο επιπλέον υποομάδες, με βάση τις παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων (Copy Number, CN). Η υποομάδα με χαμηλό αριθμό αντιγράφων, καλείται και μικροδορυφορικά σταθερή και περιλαμβάνει περισσότερους από τους μισούς ενδομητριοειδείς όγκους χαμηλού βαθμού κακοηθείας (βαθμού 1 και 2). Στην υποομάδα αυτή ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* γονίδια, καθώς και στα γονίδια *CTNNB1* και *KRAS*, τα οποία εμπλέκονται στην Wnt σηματοδότηση (Wingless-related integration site).

Όλα σχεδόν τα ορώδη καρκινώματα (97.7%), η πλειονότητα των καρκινωμάτων μικτού τύπου (75.0%) και ένα μικρό ποσοστό των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοηθείας (βαθμού 3) ανήκουν στην υποομάδα υψηλού αριθμού αντιγράφων. Στην ομάδα αυτή σημειώνονται κυρίως μεταλλάξεις στα *TP53* και *HER2* γονίδια (Chang, Talukdar et al. 2019, Yen, Wang et al. 2020). Όσον αφορά στην πρόγνωση στις δύο αυτές υποομάδες, η υποομάδα χαμηλού CN έχει ενδιάμεση πρόγνωση, ενώ η υποομάδα υψηλού CN έχει κακή πρόγνωση (Murali, Delair et al. 2018). Στον **Πίνακα 2** απεικονίζονται η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου και οι μοριακές παραλλαγές της κάθε ομάδας.

	Χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδή	Υψηλού βαθμού ενδομητριοειδή	Ορόδες	Διαγών κυττάρων
Προκαρκινικές αλλοιώσεις	Άτυπη υπερπλασία του ενδομητρίου	Άτυπη υπερπλασία του ενδομητρίου	Ορόδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του ενδομητρίου	Άγνωστο
Μεταλλαγμένα Γονίδια	<i>ARID1A, PTEN, KRAS, PIK3CA, CTNNB1</i>	<i>ARID1A, PTEN, KRAS, PIK3CA, CTNNB1, TP53</i>	<i>TP53, HER2</i>	<i>TP53, PTEN, ARID1A, PIK3CA</i>
Μοριακές παραλλαγές σηματοδοτικών οδών (TCGA δεδομένα)	POLE Υπερμεταλλαγμένη ομάδα, Μικροδορυφορική Αστάθεια με υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων, Χαμηλός Αριθμός Αντιγράφων	POLE Υπερμεταλλαγμένη ομάδα, Μικροδορυφορική Αστάθεια με υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων, Υψηλός Αριθμός Αντιγράφων	Υψηλός Αριθμός Αντιγράφων	Δεν εφαρμόζεται (Not Applicable)

Πίνακας 2. Απεικονίζονται οι προκαρκινικές αλλοιώσεις, τα μεταλλαγμένα γονίδια και οι οδοί που μεταβάλλονται στους κύριους ιστολογικούς υποτύπους του καρκίνου του ενδομητρίου. *ARID1A*: AT-Rich Interaction Domain 1A, *CTNNB1*: Catenin beta-1 (γονίδιο της β-κατενίνης), *HER2*: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, *KRAS*: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (γονίδιο που κωδικοποιεί την K-Ras GTPαση πρωτεΐνη), *PIK3CA*: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p110α, καταλυτική υπομονάδα της P13K κινάσης), *PTEN*: Phosphatase and Tensin Homolog (ογκο – κατασταλτική πρωτεΐνη), *TP53*: cellular tumor antigen 53 (γονίδιο της πρωτεΐνης p53) (Yen, Wang et al. 2020)

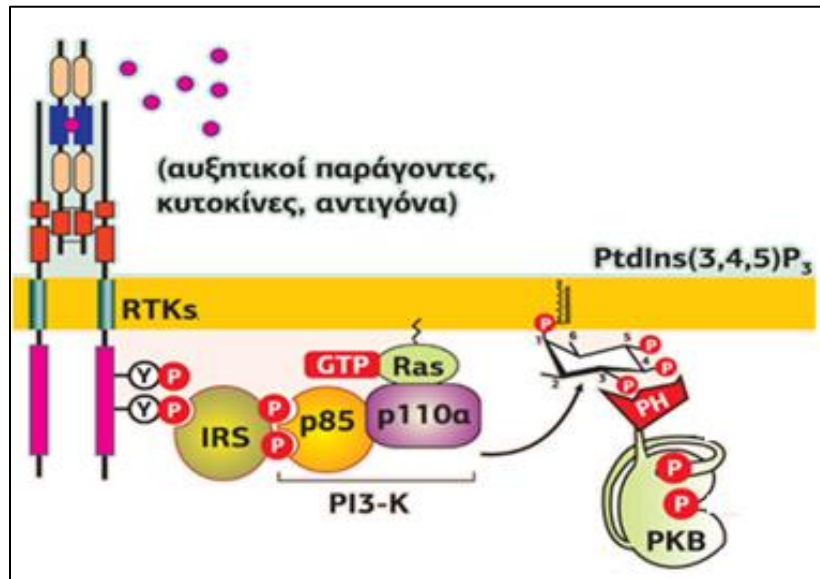
1.4.1.3 Μοριακές οδοί σηματοδότησης στον καρκίνο του ενδομητρίου

Η απώλεια της έκφρασης των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων ER/PR, οι μεταλλάξεις του *TP53* γονιδίου, οι διαταραχές του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR (Mammalian target of rapamycin) και οι αλλαγές στην Wnt σηματοδότηση, έχουν αναφερθεί σε πολλές μελέτες στον καρκίνο του ενδομητρίου (Chang, Talukdar et al. 2019). Στον ενδομητριοειδή τύπο, η σηματοδοτική οδός PI3K/AKT είναι η συχνότερα παραλλαγμένη και οι μεταλλάξεις σε γονίδια της οδού αυτής σημειώνονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% (Morice, Leary et al. 2016).

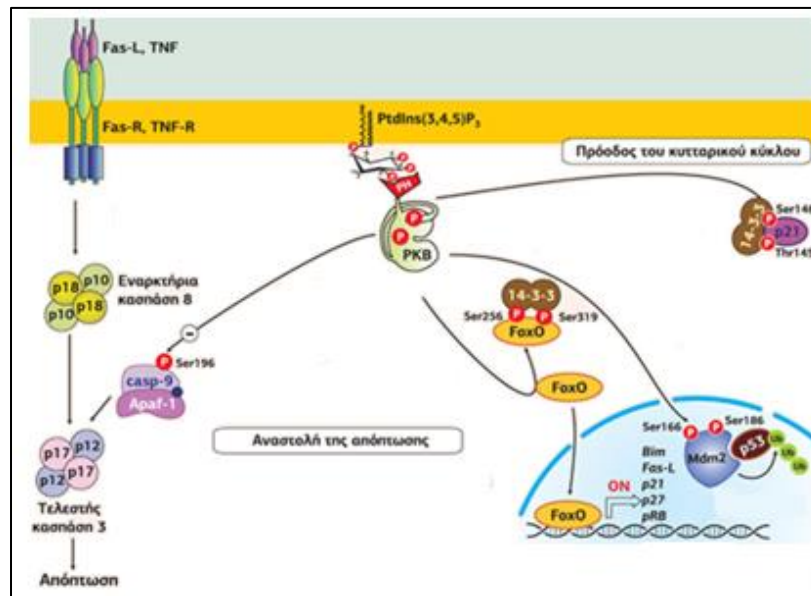
Ο ενδομητριοειδής τύπος είναι ορμονο-εξαρτώμενος και έχει καλή πρόγνωση. Ωστόσο, ενδομητριοειδής καρκίνος με κακή πρόγνωση μπορεί να προκύψει και μέσω της ενεργοποίησης της Wnt - β-κατενίνης οδού σηματοδότησης (Lu and Broaddus 2020). Ο Wnt συνδέτης παραμένει ενεργοποιημένος με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η β-κατενίνη από το σύμπλοκο που την αδρανοποιεί, να μεταφέρεται στον πυρήνα και να προσδένεται στο DNA. Η πρόσδεσή της στο DNA επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων, συμπεριλαμβανομένων ογκογονιδίων, όπως είναι το *MYC* γονίδιο (Bosse, ter Haar et al. 2013, Zhang and Wang 2020). Παράλληλα, οι μεταγραφικοί παράγοντες της οδού αυτής διατηρούνται συνεχώς ενεργοποιημένοι, καθώς το γονίδιο *CTNNB1*, που κωδικοποιεί την β-κατενίνη μεταλλάσσεται ενισχύοντας την κυτταρική αύξηση (Chang, Talukdar et al. 2019).

Η σηματοδοτική οδός PI3K/AKT λαμβάνει μέρος στην ανάπτυξη του όγκου επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, αναστέλλοντας την απόπτωση και προάγοντας την επιβίωση και την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Η μη-φυσιολογική παρατεταμένη ενεργοποίηση της συγκεκριμένης οδού προκαλείται από την απώλεια λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN, καθώς και μεταλλάξεων του γονιδίου *PIK3CA*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p110α, η οποία αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα της P13K κινάσης (Bosse, ter Haar et al. 2013, Ζίφα 2017). Η ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού P13K/AKT διατηρείται και από την παρουσία μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου (ποσοστό μεταλλάξεων 20%), που κωδικοποιεί την KRAS πρωτεΐνη με ενεργότητα GTPασης (Ζίφα 2017, Chang, Talukdar et al. 2019). Η KRAS πρωτεΐνη ευθύνεται για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP κινασών και της PI3K (Ζίφα 2017). Οι μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου διαταράσσουν τα επίπεδα της β-κατενίνης (Chang, Talukdar et al. 2019). Το αποτέλεσμα των διαταραχών αυτών είναι η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, ο

πολλαπλασιασμός και η αναστολή της απόπτωσης, διεργασίες που οδηγούν στον ενδομητριοειδή τύπο καρκίνου του ενδομητρίου (**Εικόνα 5 A, B**) (Ζίφα 2017).

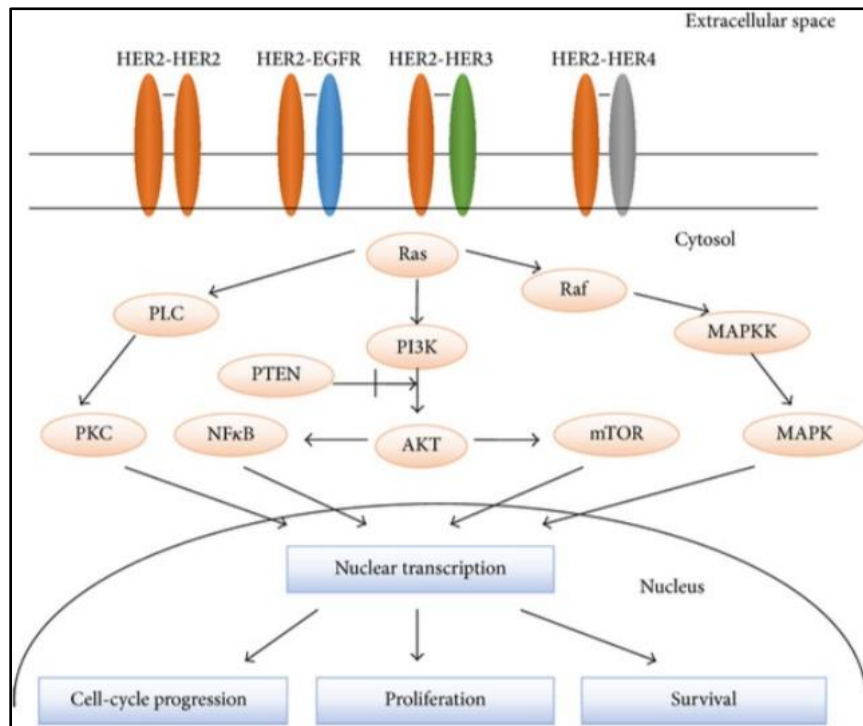


Εικόνα 5A. Η ενεργοποίηση της AKT γίνεται από την PI3K, μέσω της απόκρισης των συνδετών που συνδέονται στους RTK υποδοχείς (Ζίφα 2017).



Εικόνα 5B. Οι δράσεις της AKT κινάσης, συμπεριλαμβάνουν την αναστολή της απόπτωσης και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αναλυτικότερα, επάγεται η φωσφορυλίωση των κασπασών στον καταρράκτη της απόπτωσης, του μεταγραφικού παράγοντα FoxO, της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και της κινάσης του αναστολέα p21 (Ζίφα 2017).

Ο μη - ενδομητριοειδής τύπος (II) χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων των γονιδίων που κωδικοποιούν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και τον HER2 υποδοχέα (Bosse, ter Haar et al. 2013). Η υπερέκφραση των υποδοχέων HER ενεργοποιεί επίσης παρατεταμένα τις οδούς PI3K/AKT και MAPK (Εικόνα 6) (Iqbal and Iqbal 2014).



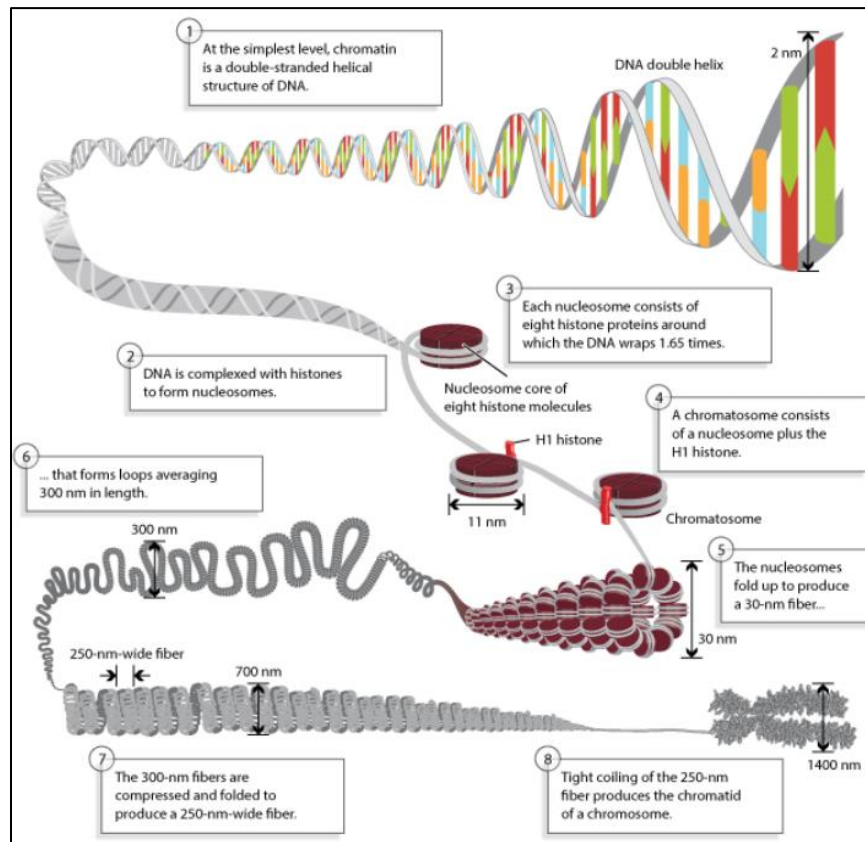
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών οδών που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση μέσω του ομο- ή ετεροδιμερισμού του υποδοχέα HER2. Η Ras πρωτεΐνη βρίσκεται στην κορυφή αυτών των οδών αυτών και λειτουργεί ως αυτοελεγχόμενος μετατροπέας σήματος. Οι σηματοδοτικές οδοί PI3K/AKT και Raf/MAPK είναι καλά μελετημένες και ενεργοποιούνται από τους HER υποδοχείς. Ενεργοποιείται επίσης και η κινάση PKC μέσω της PLC. Η ενεργοποίηση των προαναφερόμενων οδών σηματοδότησης, στρατολογεί ποικίλους πυρηνικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, PLC: Phospholipase C, PKC: Protein Kinase C, NFκB: Nuclear Factor κB, MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPKK: MAPK kinase (Iqbal and Iqbal 2014).

1.4.2 Επιγενετικές αλλαγές

Το DNA μέσα στον πυρήνα βρίσκεται πακεταρισμένο στη μορφή των νουκλεοσωμάτων, με τη βοήθεια πρωτεϊνών που καλούνται ιστόνες και προσδένονται στο DNA (**Εικόνα 7**) (Annunziato 2008). Η πρόσδεση των ενζύμων και των μεταγραφικών παραγόντων απαιτεί το DNA να είναι προσβάσιμο και "απελευθερωμένο" από τα νουκλεοσώματα, ώστε να επιτευχθούν οι διαδικασίες της αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής, της μεθυλίωσης και της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (Mao, Ardighieri et al. 2013).

Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής έχει μελετηθεί εκτενώς. Για να επιτευχθεί η μεταγραφή των γονιδίων χρειάζεται να γίνει αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Collins, Furukawa et al. 1999). Η διεργασία αυτή καθίσταται εφικτή με τη συμμετοχή συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τα οποία διευκολύνουν την απομάκρυνση των ιστονών από το DNA (Mao, Ardighieri et al. 2013).

Η έκφραση των γονιδίων ρυθμίζεται από τους υποκινητές, τους ενισχυτές, τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται, αλλά και από τις επιγενετικές τροποποιήσεις (Mao and Shih 2013). Οι επιγενετικές αλλαγές συμβάλλουν σημαντικά στη διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών, τη δράση μικρών, μη κωδικοποιητικών RNA μορίων και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης μεταβάλλουν τη θέση των νουκλεοσωμάτων, μια διαδικασία που εξαρτάται από το ATP, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την πρόσβαση στο DNA. Τέτοιου είδους γονίδια προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στο ζυμομύκητα, όπου φάνηκε να ρυθμίζουν την εναλλαγή ζευγαρώματος (SWItch-SWI) και θρεπτικών συστατικών (Sucrose NonFermenting - SNF). Τα γονίδια αυτά ταυτοποιήθηκαν ως υπομονάδες ενός συμπλόκου μεταγραφικής ενεργοποίησης, το οποίο ονομάστηκε SWI/SNF και παρουσιάζει ομολογία τόσο στη *Drosophila* όσο και στα θηλαστικά (Pulice and Kadoch 2016).

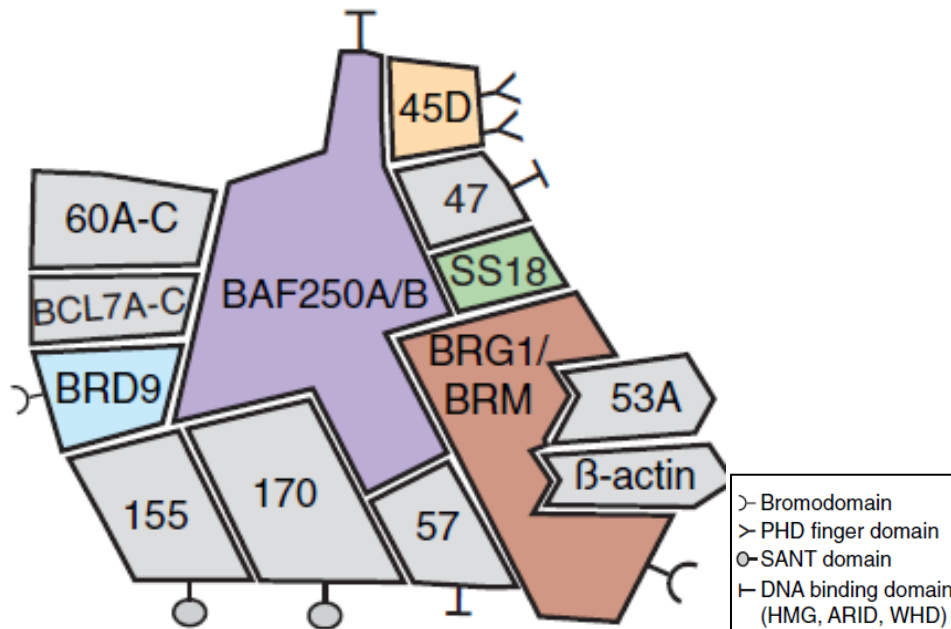


Εικόνα 7. Τα χρωμοσώματα αποτελούνται από DNA σφιχτά πακεταρισμένο γύρω από τις ιστόνες, σχηματίζοντας νουκλεοσώματα (Annunziato 2008).

1.4.2.1 Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF (switching/sucrose non-fermenting) αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης μεταβάλλοντας τις επαφές μεταξύ του DNA και των ιστονών εντός του νουκλεοσώματος με τρόπο εξαρτώμενο από το ATP (Martens and Winston 2003). Πρόκειται για μεγαλομοριακά συμπλέγματα 12-15 υπομονάδων που συναρμολογούνται συνδυαστικά από τα πρωτεϊνικά προϊόντα 29 γονιδίων. Συγκροτούνται από τις καταλυτικές υπομονάδες BRM ή BRG1 και επτά ή περισσότερες μη καταλυτικές υπομονάδες που αναφέρονται ως BAF (Brg1/Brm-associated factor) (**Εικόνα 8**). Οι καταλυτικές υπομονάδες έχουν δραστικότητα ATPασης εξαρτώμενης από το DNA. Οι ATPασες, ευθύνονται για τη μετακίνηση των νουκλεοσωμάτων που περιβάλλουν τις επιθυμητές χρωμοσωμικές περιοχές, όπως είναι οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής (Guan, Wang et al. 2011) (Reisman, Glaros et al. 2009) (Wang, Xue et al. 1996). Οι μη καταλυτικές υπομονάδες του συμπλέγματος SWI/SNF, όπως είναι η

πρωτεΐνη BAF250, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ARID1A*, ευθύνονται για τη διαμόρφωση του ειδικού στόχου και τη δραστηριότητα της ΑΤΡασης (Nagl, Patsialou et al. 2005, Guan, Mao et al. 2011) (Nagl, Wang et al. 2007).



Εικόνα 8. Το σύμπλοκο SWI/SNF. Παρουσιάζονται οι BRM /BRG1 και οι BAF υπομονάδες του συμπλόκου. Διακρίνονται επίσης οι επιμέρους περιοχές, που διαθέτει η κάθε υπομονάδα του συμπλόκου (Pulice and Kadoch 2016).

Αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν αναφερθεί στον μηχανισμό αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων μέσω του συμπλόκου SWI/SNF, αποκλείοντας τη δράση του συμπλόκου ως ελικάση. Στις επιπτώσεις της αναδιαμόρφωσης συγκαταλέγονται η ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων, η μεταφορά των οκταμερών των ιστονών σε άλλο μόριο DNA, η αλλαγή της δομής των νουκλεοσωμάτων και η συστροφή (twisting) του DNA. Το σύμπλοκο SWI2/SNF2, αποτελεί μέλος της οικογένειας των SF2 ελικασών του DNA. Οι πρωτεΐνες SWI2/SNF2 αν και δεν έχουν δραστηριότητα ελικάσης, είναι ικανές να δημιουργήσουν υπερελικωμένη (superhelical) συστροφή. Ωστόσο, μία μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η συστροφή του DNA δεν αποτελεί τον μοναδικό μηχανισμό αναδιαμόρφωσης που διεξάγει το σύμπλοκο SWI/SNF. Οι κλώνοι και οι εγκοπές του DNA, που εμποδίζουν τη συστροφή του DNA, δεν είναι σε θέση να αναστείλουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης από το ανθρώπινο σύμπλοκο SWI/SNF. Δεν είναι σαφές εάν η αναδιαμόρφωση επιτυγχάνεται από έναν μόνο ή από

πολλαπλούς μηχανισμούς. Πιστεύεται ότι και άλλες πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση του συμπλόκου SWI/SNF, συνδεόμενες πιθανώς σε μία συγκεκριμένη θέση στο DNA, όταν αυτό γίνει προσβάσιμο κατά την αναδιαμόρφωση (Martens and Winston 2003).

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως το SWI/SNF, αποτελούν κύριους ρυθμιστές της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων. Επιτρέπουν τη μεταγραφή ή την αποσιώπηση των γονιδίων διευκολύνοντας ή αναστέλλοντας την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε υποκινητές και ενισχυτές (Bosse, ter Haar et al. 2013). Συμμετέχουν κυρίως στον μεταγραφικό έλεγχο, αν και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι παίρνουν μέρος στην αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA, αποτελώντας σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα σύμπλοκα SWI/SNF στρατολογούνται σε υποκινητές μέσω ενεργοποιητών ή καταστολέων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ συγκεκριμένων υπομονάδων του συμπλόκου και των ενεργοποιητών ή καταστολέων, που είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA είναι άμεση (Inoue, Furukawa et al. 2002) (Martens and Winston 2003) (Peterson and Workman 2000, Reisman, Glaros et al. 2009). Πολλά γονίδια απαιτούν τη δράση ακετυλοτρανσφερασών ιστόνης (HAT-Histone acetyltransferase) και συμπλεγμάτων αναδιαμόρφωσης εξαρτώμενων από το ATP για την πλήρη έκφρασή τους. Η ακετυλίωση των ιστονών είναι σε θέση να διατηρήσει το σύμπλοκο SWI/SNF στον υποκινητή μόλις αποδεσμευτεί ο ενεργοποιητής, γεγονός που συνδέει τις λειτουργίες των ακετυλοτρανσφερασών και του SWI/SNF συμπλόκου (Neely, Hassan et al. 2002).

1.4.2.2 Η δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF

Τα σύμπλοκα SWI/SNF μετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όταν παραδείγματος χάριν το κύτταρο έχει υποστεί βλάβη στο DNA του, γεγονός που οδηγεί στην ακινητοποίηση του κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι το σύμπλοκο επιδρά άμεσα στον υποκινητή του p21 (Trouche, Le Chalony et al. 1997). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης συνεργάζονται με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και μπορούν να επικοινωνήσουν ταυτόχρονα τόσο με τον E2F μεταγραφικό παράγοντα όσο και με την υπομονάδα BRM (Trouche, Le Chalony et al. 1997).

Το σύμπλοκο SWI/SNF στρατολογείται και από την PHB (prohibitin). Η PHB πρωτεΐνη έχει κατασταλτική δράση και μέσω του SWI/SNF συμπλόκου επιτυγχάνεται η καταστολή των

γονιδίων, στους υποκινητές των οποίων προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F (Martens and Winston 2003).

Σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται ότι τα σύμπλοκα SWI/SNF συνεργάζονται περισσότερο με ενεργοποιητές έναντι καταστολέων (Nagl, Wang et al. 2007). Το SWI/SNF μπορεί να διεγείρει τη μεταγραφή των γονιδίων μέσω πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, όπως αποδείχθηκε σε πειράματα *in vitro*. Αναλυτικότερα, η μεταγραφική ενεργοποίηση των υποδοχέων στεροειδών, τόσο του φύλου όσο και των κορτικοστεροειδών, συνδέεται με το σύμπλεγμα SWI/SNF (Yoshinaga, Peterson et al. 1992) (Reisman, Glaros et al. 2009) (Belandia, Orford et al. 2002) (Martens and Winston 2003).

Η δραστηριότητα του συμπλόκου SWI/SNF είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή έκφραση, ανάπτυξη και ανταπόκριση των ορμονών σε συγκεκριμένους ιστούς (Nagl, Patsialou et al. 2005). Η μεταγραφή των γονιδίων μέσω της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων απαιτεί τη δράση τόσο των υπομονάδων TAF (TBP-associated factors) του μεταγραφικού παράγοντα TFIID, όσο και τις υπομονάδες BAF του συμπλόκου SWI/SNF. Η εξήγηση είναι ότι οι TAF δρουν σε «γυμνό» DNA, απαλλαγμένο από νουκλεοσώματα, ενώ οι υπομονάδες BAF δρουν σε επίπεδο χρωματίνης (Lemon, Inouye et al. 2001). Καθώς οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, η απώλεια του συμπλέγματος SWI/SNF θα μπλοκάρει τις οδούς που ανταποκρίνονται στην πρόσδεση των ορμονών και θα οδηγήσει σε κακοήθεια (Reisman, Glaros et al. 2009).

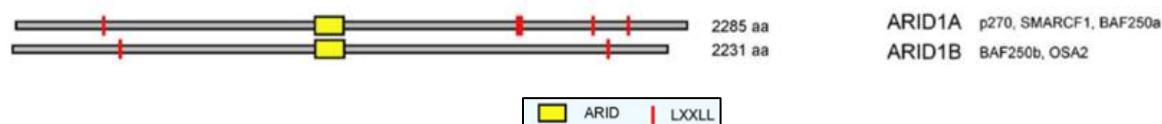
Οι διαταραχές στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης έχουν αναγνωριστεί ως χαρακτηριστικό του καρκίνου (Wu and Roberts 2013). Τα σύμπλοκα SWI/SNF των θηλαστικών δεν είναι λειτουργικά στον καρκίνο, καθώς πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι πολλά συστατικά τους έχουν κατασταλτική δράση (Reisman, Glaros et al. 2009). Οι σωματικές μεταλλάξεις αδρανοποιούν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω του συμπλόκου SWI/SNF (Mao, Ardighieri et al. 2013). Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες του συμπλόκου SWI/SNF προκαλούν μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), οδηγώντας σε μικρότερου μήκους πρωτεΐνη (truncating), καθώς και απώλεια του γονιδίου.

Τα σύμπλοκα SWI/SNF διαταράσσονται με δύο διαφορετικούς, αλλά αλληλεπικαλυπτόμενους τρόπους. Η απουσία κάποιας υπομονάδας έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δομικής ακεραιότητας του συμπλόκου SWI/SNF και τη μη σωστή συναρμολόγησή του. Επιπλέον, όταν απουσιάζει μία υπομονάδα, το σύμπλοκο είναι σε θέση να συναρμολογηθεί

πλήρως, αλλά η λειτουργία του συμπλόκου χάνεται, δηλαδή δεν μπορούν να στοχεύσουν σωστά τη χρωματίνη ή να ρυθμίσουν σωστά τα γονίδια - στόχους, οδηγώντας σε αλλαγή της στόχευσης (Pulice and Kadoch 2016). Οι υπομονάδες, τα γονίδια των οποίων μεταλλάσσονται συχνότερα στον καρκίνο, είναι οι πρωτεΐνες BAF250A και BAF180, οι οποίες σε *in vitro* μελέτες θεωρούνται αναντικατάστατες για την ανακατασκευή της χρωματίνης (Pulice and Kadoch 2016).

1.4.2.3 Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF και το γονίδιο *ARID1A*

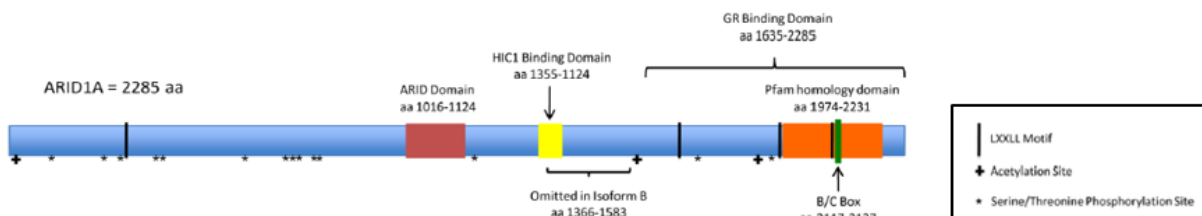
Τα σύμπλοκα BAF περιέχουν μεταξύ άλλων, τις υπομονάδες BAF250, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της οικογένειας ARID. Δύο διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες BAF250. Η BAF250A (γνωστή ως ανθρώπινη OSA1, p270, SMARCF1) κωδικοποιείται από το γονίδιο *ARID1A* (AT-rich interactive domain 1A), ενώ η BAF250B (γνωστή ως ανθρώπινη OSA2) κωδικοποιείται από το *ARID1B* γονίδιο. Η BAF250B πρωτεΐνη, αν και είναι προϊόν διαφορετικού γονιδίου παρουσιάζει 50% ομολογία με την BAF250A σε όλο το μήκος της. Αναλυτικότερα, τα γονίδια *ARID1A* και *ARID1B* είναι κατά 60% περίπου πανομοιότυπα στην καρβοξυτελική περιοχή, ενώ μικρότερος βαθμός ομολογίας καταγράφεται στην αμινοτελική περιοχή (**Εικόνα 9**) (Nagl, Wang et al. 2007) (Nagl, Patsialou et al. 2005) (Reisman, Glaros et al. 2009). Τα γονίδια *ARID1A* και *ARID1B* φαίνεται να λειτουργούν ανταγωνιστικά κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το *ARID1A* γονίδιο καταστέλλει, ενώ το *ARID1B* γονίδιο επάγει τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Οι αλληλουχίες εκτός της περιοχής ARID καθορίζουν την εξειδίκευση της λειτουργίας του κάθε γονιδίου (Nagl, Patsialou et al. 2005).



Εικόνα 9. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων *ARID1A* και *ARID1B* απεικονίζονται ως γκριζες ράβδοι. Με κίτρινο χρώμα είναι η θέση ARID, η περιοχή η οποία προσδένεται στο DNA. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα μοτίβα LXXLL, τα οποία συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης (Wilsker, Probst et al. 2005).

Το γονίδιο *ARID1A* χαρτογραφείται στην χρωμοσωμική θέση 1p36 (Guan, Mao et al. 2011). Η BAF250A αποτελεί τη μεγαλύτερη υπομονάδα του ανθρώπινου συμπλόκου SWI/SNF, με μήκος 250 kDa και περιέχει την περιοχή ARID, μήκους 100 αμινοξέων (AT-rich interacting domain) η οποία αλληλοεπιδρά με το DNA (Wu and Roberts 2013) (Inoue, Furukawa et al. 2002). Οι περιοχές ARID συνδέονται σε αλληλουχίες του DNA πλούσιες σε AT. Ωστόσο, η *ARID1A* δεν δείχνει προτίμηση κάποιας αλληλουχίας στην πρόσδεση του DNA (Wu and Roberts 2013).

Η πρωτεΐνη BAF250A αποτελείται από την περιοχή δέσμησης HIC1 (Hypermethylated-in-Cancer 1) και τρεις συστάδες μοτίβων LXXLL, που μεσολαβούν στη δέσμευση των πρωτεϊνών. Οι καρβοξυτελικές περιοχές περιλαμβάνουν τέτοια μοτίβα LXXLL, όπου L και X είναι τα αμινοξέα λευκίνη και οποιοδήποτε αμινοξύ, αντίστοιχα (**Εικόνα 10**) (Nie, Xue et al. 2000) (Wiegand, Shah et al. 2010) (Wang, Nagl et al. 2004) (Reisman, Glaros et al. 2009). Η BAF250A είναι μια πρωτεΐνη μήκους 2.285 αμινοξέων. Εκτός από την περιοχή ARID, περιέχει και περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Οι τελευταίες περιοχές είναι ίσως πιο σημαντικές για τη λειτουργία της BAF250A (Nagl, Patsialou et al. 2005). Η πρωτεΐνη του γονιδίου *ARID1A* τροποποιείται μεταμεταφραστικά. Συγκεκριμένα, υφίσταται ακετυλίωση της N-16-λυσίνης και φωσφορυλίωση της σερίνης/θρεονίνης, τροποποιήσεις οι οποίες ρυθμίζουν ενδεχομένως την έκφραση της πρωτεΐνης ή τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης στις οποίες συμμετέχει το μόριο (Wu and Roberts 2013).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του *ARID1A* γονιδίου. Απεικονίζονται η περιοχή ARID, οι περιοχές σύνδεσης των πρωτεϊνών, οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που υπόκειται και η διαφορά των δύο ισομορφών (Wu and Roberts 2013).

Η απώλεια του *ARID1A* ενδέχεται να οδηγήσει σε μεταγραφική δυσλειτουργία, όπως διαταραχή της ολίσθησης των νουκλεοσωμάτων, συναρμολόγηση παραλλαγών των συμπλεγμάτων SWI/SNF, δυσλειτουργία ως προς τη στόχευση συγκεκριμένων γενετικών τόπων ή/και στρατολόγηση των αλληλεπιδρώντων μορίων, ενεργοποιητών/καταστολέων, εμποδίζοντας τη δράση της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Toumpeki, Liberis et al. 2019) (Wu and Roberts

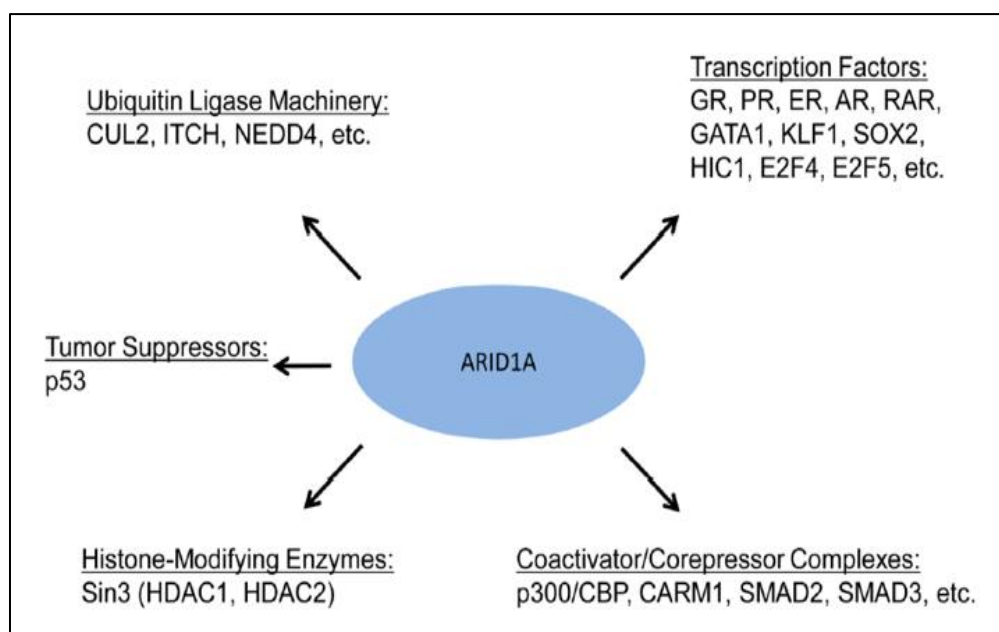
2013). Επιπρόσθετα, η απώλεια του *ARID1A* γονιδίου ενδέχεται να επηρεάσει την έκφραση ή τη σταθερότητα κι άλλων υπομονάδων του συμπλόκου SWI/SNF. Μία μελέτη με knockout του *ARID1A* σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Embryonic stem cells) ποντικού έδειξε μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Snf5, Baf155, Baf170 και Baf57. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι μεταλλάξεις του γονιδίου *ARID1A* ενδέχεται να επηρεάσουν τα σύμπλοκα SWI/SNF, τόσο ως προς την συμμετοχή των υπομονάδων, όσο και ως προς τη συγκρότησή τους. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά δεν υποστηρίζονται σε άλλη μελέτη, στην οποία αρκετά συστατικά του SWI/SNF συμπλόκου, συμπεριλαμβανομένων των Baf155, Baf170, Snf5 και Brg πρωτεϊνών, συνεχίζουν να εκφράζονται και να συγκροτούν το εν λόγω σύμπλοκο απουσία του *ARID1A* γονιδίου (Wu and Roberts 2013).

1.4.2.4 Ο ρόλος του *ARID1A* γονιδίου

Το *ARID1A* χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, καθώς αποκαθιστώντας την έκφραση της παραγόμενης *arid1a* πρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, που έφεραν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, καταστέλλονταν ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη όγκου στους ποντικούς. Επιπλέον, knockdown πειράματα του *ARID1A* γονιδίου σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με κακοήθεια, είχαν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και σε καρκινικές σειρές του οισοφάγου και του μαστού (Streppel, Lata et al. 2014, Toumpeki, Liberis et al. 2019). Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι σε κύτταρα που δεν διέθεταν την BAF250A πρωτεΐνη, η σύνθεση του DNA ήταν συνεχής, καθώς ο ρυθμός ενσωμάτωσης της [³H] θυμιδίνης ήταν αυξημένος σε σύγκριση με την ενσωμάτωσή της σε γονικά κύτταρα. Επομένως, τα κύτταρα που δεν διέθεταν την BAF250A δεν κατάφεραν να αναστείλουν τον κυτταρικό κύκλο (Nagl, Patsialou et al. 2005).

Η BAF250A πρωτεΐνη μετέχει σε ποικίλες οδούς, όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος και οι οδοί σηματοδότησης σε κύτταρα με οιστρογονικούς υποδοχείς (**Εικόνα 11**) (Wu and Roberts 2013). Η BAF250A συμβάλλει στη φυσιολογική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, μέσω της οδού στην οποία συμμετέχει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) και ρυθμίζει τη μείωση των προϊόντων που ανταποκρίνονται στον μεταγραφικό παράγοντα E2F (**Εικόνα 12A**). Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζεται ανοδικά από την BAF250A (Nagl, Patsialou et al. 2005). Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο *arid1a*/BRG1 SWI/SNF και η p53 πρωτεΐνη καταλαμβάνουν τις ίδιες περιοχές των

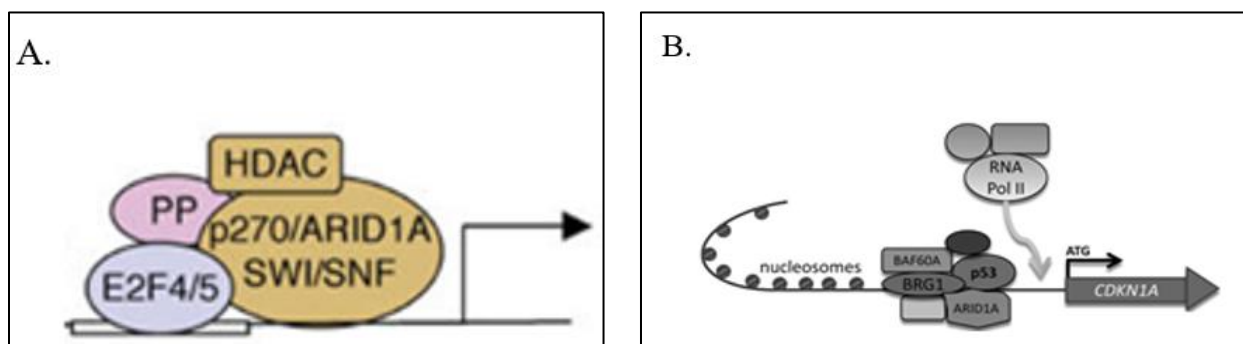
υποκινητών του γονιδίου *CDKN1A*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21, καθώς η καρβοξυτελική περιοχή της arid1a πρωτεΐνης συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη p53 (**Εικόνα 12B**) (Guan, Wang et al. 2011) (Wu and Roberts 2013). Η πρωτεΐνη BAF250A απαιτείται για τη ρύθμιση του υποκινητή της p21 και για τους υποκινητές που ανταποκρίνονται στον E2F μεταγραφικό παράγοντα. Τα επίπεδα έκφρασης των Cdk1 και κυκλίνης A παρέμεναν υψηλά σε κύτταρα που δε διέθεταν την BAF250A παρά την εξωγενή έκφραση της p21. Όσον αφορά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ARID1A*, αλληλοεπιδρά με την τοποϊσομεράση IIα, η οποία συμμετέχει στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την διάρκεια της μίτωσης (Reisman, Glaros et al. 2009).



Εικόνα 11. Το γονίδιο *ARID1A* εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης. Το γονίδιο συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες, με τον μηχανισμό της ουβικουτίνης, με ογκοκατασταλτικά γονίδια, με ένζυμα τροποποίησης των ιστονών και με συμπλέγματα ενεργοποιητών ή/και καταστολέων (Wu and Roberts 2013).

Η BAF250 πρωτεΐνη χρησιμεύει ως μεταγραφικός ρυθμιστής που προάγει τη δράση των πυρηνικών υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GR - Glucocorticoid Receptor) και των οιστρογόνων (ER - Estrogen Receptor) (Inoue, Furukawa et al. 2002). Έχει συνδεθεί με τη μεταγραφική ενεργοποίηση των υποδοχέων στεροειδών, καθώς τα μοτίβα LXXLL στην καρβοξυτελική περιοχή αποτελούν θέσεις δέσμευσης των πυρηνικών υποδοχέων των ορμονών.

Με τον τρόπο αυτό, οι υποδοχείς μπορούν να στρατολογήσουν το σύμπλοκο SWI/SNF (Wiegand, Shah et al. 2010) (Wang, Nagl et al. 2004) (Reisman, Glaros et al. 2009). Η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων μειώνεται απότομα όταν διαγραφεί η καρβοξυτελική περιοχή της BAF250. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η BAF250 πρωτεΐνη εξασφαλίζει ειδικότητα στο ανθρώπινο σύμπλεγμα BAF, στρατολογώντας το σύμπλεγμα στους στόχους του, μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων της υπομονάδας με τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (Nie, Xue et al. 2000).



Εικόνα 12. Α. Απεικονίζεται ένας υποκινητής που ρυθμίζεται στην φάση G1 μέσω της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Καταστέλλεται η έκφραση, καθώς οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F αλληλοεπιδρούν με μια οικογένεια πρωτεϊνών (PP - rocket proteins), που αποτελούνται από τις Rb, p107 και p130 και δρουν κατασταλτικά. Για την καταστολή της έκφρασης απαιτείται επίσης η δράση των HDAC (Histone DeAcetylase) και η υπομονάδα p270 του συμπλόκου SWI/SNF. Η καταστολή συνδέεται με τους κατασταλτικούς E2Fs, E2F4/5 (Nagl, Wang et al. 2007). **Β.** Η πρωτεΐνη arid1a στρατολογεί την p53 πρωτεΐνη στο σύμπλεγμα BAF για τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου CDKN1A (p21). Κατά τη δέσμευση του SWI/SNF συμπλόκου, αλλάζει η δομή της χρωματίνης, ώστε να δημιουργηθούν γυμνές θέσεις DNA, οι οποίες θα καταληφθούν από την μεταγραφική μηχανή, συμπεριλαμβανομένης της RNA πολυμεράσης II (Guan, Wang et al. 2011).

Η απώλεια του ARID1A γονιδίου αναφέρεται σε πολλές κακοήθειες στον άνθρωπο, όπως στα ενδομητριοειδή καρκινώματα της μήτρας και των ωοθηκών, στον καρκίνο του στομάχου, στο αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου, στον καρκίνο του παγκρέατος και στον ορθοκολικό καρκίνο. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων στο σύμπλεγμα SWI/SNF, αφορά στο γονίδιο ARID1A (Bosse, ter Haar et al. 2013). Οι μεταλλάξεις κατανέμονται τυχαία στα 20 εξόνια του γονιδίου (Τουμπρεκί, Liberis et al. 2019). Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο είναι μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frame-shift), μη-νοηματικές μεταλλάξεις

(nonsense), ενώ σε μικρότερο βαθμό καταγράφονται οι σιωπηλές (silent) και οι παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις οδηγούν κυρίως σε μικρότερου μήκους πρωτεΐνες (truncated proteins), επιρρεπείς στην αποικοδόμηση, μη λειτουργικές (Bosse, ter Haar et al. 2013). Μεταλλάξεις του *ARIDIA* γονιδίου έχουν καταγραφεί σε νεοπλάσματα ορμονο-εξαρτώμενων ιστών.

1.4.2.5 Το γονίδιο *ARIDIA* και ο καρκίνος του ενδομητρίου

Στον καρκίνο του ενδομητρίου αναφέρονται και επιγενετικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί η απώλεια της πρωτεΐνης BAF250, που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τόσο στα χαμηλού όσο και στα υψηλού βαθμού ενδομητριοειδή καρκινώματα, σε ποσοστά 25% και 44% αντίστοιχα. Αντιθέτως, δεν έχουν αναφερθεί ποσοστά μεταλλάξεων του *ARIDIA* γονιδίου στα υψηλού βαθμού μη - ενδομητριοειδή καρκινώματα (Bosse, ter Haar et al. 2013). Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, το σηματοδοτικό μονοπάτι P13K/AKT διατηρείται ενεργοποιημένο στον καρκίνο του ενδομητρίου. Οι αλλαγές σε γονίδια της οδού PI3K/AKT είναι συχνότερες, απουσία του γονιδίου *ARIDIA*. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ARIDIA*, συνυπάρχουν συχνά με μεταλλάξεις του *PTEN* (Mao and Shih 2013) (Wu and Roberts 2013) (Bosse, ter Haar et al. 2013). Σε *in vitro* μελέτες, σε κυτταρικές σειρές με καρκίνο του ενδομητρίου, παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση της κίνησης AKT, όταν το γονίδιο *ARIDIA* υπέστη knockdown, υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο γονίδιο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, δρα ως ρυθμιστής της σηματοδοτικής οδού PI3K/AKT με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN (Bosse, ter Haar et al. 2013).

Η απώλεια του γονιδίου *ARIDIA* προκαλεί, επίσης, μείωση της κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν οι υποδοχείς και οι συνδέτες FAS και μέσω αυτής της σηματοδοτικής οδού ενεργοποιείται και δρα ο καταρράκτης των κασπασών, οδηγώντας το κύτταρο στον θάνατο. Η απώλεια του γονιδίου *ARIDIA* αναστέλλει την απόπτωση (**Εικόνα 5B**) (Reisman, Glaros et al. 2009).

Στον καρκίνο του ενδομητρίου έχει αναφερθεί συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις του γονιδίου *ARIDIA* και την ενεργοποίηση των MAPK/ERK σηματοδοτικών οδών, μέσω της ενεργοποίησης της PIK3CB και της αναστολής του FOXO1 (Forkhead box O1) (Yang, Bao et al. 2018). Το μόριο FOXO αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος επάγει τη διακοπή του

κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA και την απόπτωση, καθώς μεταγράφονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες p21, Rb και τον συνδέτη Fas (Greer and Brunet 2005, Ζίφα 2017).

Στον καρκίνο των ωοθηκών οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*, συσχετίζονται με τις μεταλλάξεις του γονιδίου *ARID1A*. Αντιθέτως, στον καρκίνο του ενδομητρίου η έκφραση της πρωτεΐνης p53 δεν σχετίζεται με την απώλεια έκφρασης της *arid1a* πρωτεΐνης (Bosse, ter Haar et al. 2013). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μόρια *arid1a* και p53 λειτουργούν στην ίδια σηματοδοτική οδό. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη *arid1a* αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη p53 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου *CDKN1A* (Guan, Wang et al. 2011). Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα καρκινώματα του ενδομητρίου που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A* ή *TP53* οδηγούν σε φαινοτυπικά διαφορετικούς τύπους νεοπλασμάτων. Οι όγκοι με απώλεια της έκφρασης της *arid1a* πρωτεΐνης είναι ενδομητριοειδή καρκινώματα (τύπος I), ενώ τα νεοπλάσματα που φέρουν μεταλλάξεις του *TP53* γονιδίου είναι κυρίως μη ενδομητριοειδούς τύπου (τύπος II) (Bosse, ter Haar et al. 2013).

2 ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε την παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *ARID1A* και την κατανομή τους σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Το γονίδιο *ARID1A* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η πρωτεΐνη του οποίου, μέσω του συμπλόκου SWI/SNF, παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η συσχέτιση των πιθανών μεταλλάξεων με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου, θα συμβάλει ενδεχομένως στην κατανόηση του ρόλου του συγκεκριμένου γονιδίου στην καρκινογένεση του ενδομητρίου.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλέξαμε δείγματα 29 ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου από το αρχείο του εργαστηρίου. Για κάθε ασθενή έγινε επιλογή, μέσω παρατήρησης της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης, από παθολογοανατόμο του εργαστηρίου, προκειμένου το προς εξέταση υλικό να περιέχει υψηλό ποσοστό >70% νεοπλασματικών κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε η μικροτόμηση του υλικού και η λήψη 5-6 τομών FFPE ιστού, πάχους 10 μm, σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.

3.1 Αποπαραφίνωση του ιστού και απομόνωση DNA

Η αποπαραφίνωση του ιστού και η λύση των κυττάρων επιτρέπουν την πρόσβαση στο DNA. Οι διαδικασίες της αποπαραφίνωσης και απομόνωσης του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό εστία (HOOD) με κατάλληλα πρωτόκολλα που περιγράφονται παρακάτω. Η διαδικασία της αποπαραφίνωσης εξυπηρετεί τη διάλυση της παραφίνης, ώστε να αποκαλυφθεί αμιγώς ο ιστός. Ακολουθεί η λύση των κυττάρων του ιστού, με καταστροφή αρχικά των κυτταροπλασματικών και στη συνέχεια των πυρηνικών μεμβρανών τους, ώστε να φτάσουμε στο γενωμικό DNA. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics) και η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρία:

3.1.1 Αποπαραφίνωση των FFPE δειγμάτων

Πειραματική διαδικασία:

1. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ξυλόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf, ώστε να διαλυθεί η παραφίνη.
2. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
3. Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος απόλυτης αιθανόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf, ώστε να διαλυθεί η ξυλόλη.
5. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.

6. Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
8. Απόρριψη του εκλούόμενου υγρού χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
9. Προσθήκη 1 ml διαλύματος απόλυτης αιθανόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ξυλόλης.
10. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
11. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
12. Απόρριψη του εκλούόμενου υγρού χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
Σε περίπτωση που το ίζημα αιωρείται, τότε πραγματοποιούμε νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, προκειμένου να αφαιρέσουμε όλη την υπολειπόμενη αιθανόλη.
13. Αποξήρανση του ιζήματος στους 56°C σε μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας (heat block) έχοντας ανοικτό το καπάκι του σωληναρίου τύπου Eppendorf.

Απαιτείται πλήρης εξάτμιση της απόλυτης αιθανόλης, καθώς η παραμονή της αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την επιτυχία των μετέπειτα PCR πειραμάτων. Ο χρόνος της ξήρανσης εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος και τα υπολείμματα αιθανόλης. Για το λόγο αυτό ελέγχουμε το δείγμα τακτικά, καθώς πρέπει να είναι στεγνό.

3.1.2 Λύση των κυττάρων και απομόνωση του γενωμικού DNA

Μετά την αποπαραφίνωση του ιστού, ακολουθεί η λύση των κυττάρων και η απομόνωση του γενωμικού DNA σύμφωνα με παρακάτω:

Πειραματική Διαδικασία

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος του ιστού σε 180 μl διαλύματος λύσης του ιστού (Tissue Lysis Buffer, TLB) και προσθήκη 70 μl ανασυσταμένης πρωτεΐνης K, ώστε να διασπαστούν οι ιστόνες και να απελευθερωθεί το γενωμικό DNA.
2. Έντονη ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να ομογενοποιηθεί ο ιστός.
3. Επώαση του σωληναρίου τύπου Eppendorf για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 56°C στο heat block.
4. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
14. Επώαση του σωληναρίου τύπου Eppendorf για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 90°C στο heat block.

15. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
16. Ψύξη του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C και σύντομη φυγοκέντρηση (spin-down).
5. Προσθήκη 200 μl διαλύματος δέσμευσης της παραφίνης (Paraffin Binding Buffer, PBB) και καλή ανάμιξη, τουλάχιστον 3 φορές με την πιπέτα.
6. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος ισοπροπανόλης και καλή ανάμιξη με την πιπέτα.
8. Μεταφορά του προϊόντος σε στήλη με φίλτρο (FT) που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάριο συλλογής (CT).
9. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
10. Τοποθέτηση της στήλης FT σε νέο σωληνάριο συλλογής CT.
11. Προσθήκη στη στήλη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA (Wash Buffer I, WB I).
12. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
13. Απόρριψη του εκλούμενου υγρού του CT, διατηρώντας το ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
14. Προσθήκη στη στήλη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA (Wash Buffer II, WB II).
15. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
Πραγματοποιείται περισσότερες φορές, έως ότου περάσουμε όλο το δείγμα από τη στήλη.
16. Τοποθέτηση της στήλης FT σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα.
17. Τοποθέτηση της στήλης FT σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
18. Προσθήκη 35 μl διαλύματος έκλυσης του DNA (Elution Buffer, EB), στο κέντρο της στήλης FT.
19. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
20. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
21. Συλλογή του εκλούμενου διαλύματος που περιέχει το DNA και εκ νέου πέρασμα από τη στήλη FT.
22. Επανάληψη των βημάτων 19, 20.
23. Απόρριψη της στήλης FT και αποθήκευση του σωληναρίου τύπου Eppendorf που περιέχει το γενωμικό DNA.

3.1.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Μετά την απομόνωση ακολουθεί η εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA. Η ανάλυση του DNA αποτελεί ένα κρίσιμο πρώτο βήμα για την απόκτηση δεδομένων από τους FFPE ιστούς (Kokkat, Patel et al. 2013). Η ποιοτική εκτίμηση γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να ελεγχθεί η ακεραιότητα του DNA σε κάθε δείγμα. Η ποσοτικοποίηση και η καθαρότητα του DNA εκτιμώνται μέσω φασματοφωτομέτρου, μετρώντας την απορρόφηση στα 260 nm/280 nm.

3.1.3.1 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA των δειγμάτων

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA κρίνεται απαραίτητος και εξίσου σημαντικός με τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η φωτομέτρηση μέσω του NanoDrop εκτιμά την καθαρότητα του απομονωμένου DNA, ωστόσο δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με την ακεραιότητα και τον κατακερματισμό (fragmentation) του μορίου αυτού. Αυτό οφείλεται στο ότι το φάσμα απορρόφησης των ελεύθερων νουκλεοτιδίων είναι πανομοιότυπο με αυτό των νουκλεοτιδίων που ανήκουν σε αλληλουχία.

Ο κατακερματισμός του DNA, που προέρχεται από τα FFPE δείγματα, είναι πολύ συχνό και αναπόφευκτο φαινόμενο. Σε πολλές μελέτες προκύπτει ότι ο κατακερματισμός του DNA αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου αποθήκευσης των δειγμάτων, αλλά και όταν μειώνεται το pH της φορμόλης, που χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση των ιστικών δειγμάτων (Ludyga, Grunwald et al. 2012, Do and Dobrovic 2015). Μία τέτοια κατάσταση εκτεταμένου κατακερματισμού θα μπορούσε να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα στη μετέπειτα γενετική ανάλυση, μειώνοντας το κλάσμα του DNA που θα ενισχυθεί μέσω της PCR αντίδρασης. Στο πλαίσιο αυτό, η αξιολόγηση της ποιότητας του DNA αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα (Do and Dobrovic 2015, Zonta, Nizard et al. 2015).

Για να εκτιμηθεί η ακεραιότητα του DNA, μία από τις επιλογές είναι η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης και η οπτικοποίηση του DNA κάτω από ακτινοβολία υπεριώδους φωτός - UV χρησιμοποιώντας μια παρεμβαλλόμενη χρωστική (Lee, Costumbrado et al. 2012). Η διάκριση μεταξύ άθικτου και κατακερματισμένου μορίου DNA είναι εφικτή. Ένα άθικτο μόριο DNA εμφανίζεται ως μία συμπαγής ζώνωση υψηλού μοριακού βάρους, ενώ το

κατακερματισμένο μόριο DNA θα εμφανίζει ποικίλους μήκους ζώνες που σχηματίζουν την εικόνα *smear* (Zonta, Nizard et al. 2015).

Κατά τη διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης, τα πολυμερή μόρια της αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά σχηματίζοντας ένα πλέγμα, μέσα στο οποίο θα διαχωριστούν τα μόρια DNA βάσει της μοριακής τους μάζας. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει τη μετανάστευση των μορίων DNA. Αναλυτικότερα, όσο μειώνεται η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, το μέγεθος των πόρων αυξάνεται και τα μόρια DNA που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος διαχωρίζονται καλύτερα. Όταν η συγκέντρωση της αγαρόζης αυξάνεται, το μέγεθος των πόρων μειώνεται και τα μόρια DNA που είναι μικρότερα σε μέγεθος διαχωρίζονται καλύτερα, ενώ τα μεγαλύτερα κινούνται εξαιρετικά αργά (Lee, Costumbrado et al. 2012).

Στην ηλεκτροφόρηση, τα μόρια κινούνται αναλόγως του φορτίου και του μεγέθους τους. Τα μόρια DNA έχουν αρνητικό φορτίο λόγω της παρουσίας των φωσφορικών ομάδων. Επομένως, όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται προς τον θετικό πόλο (Tropp 2014). Τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα (Bio-rad , Helling, Goodman et al. 1974).

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης, εκτός από την αγαρόζη, προστίθεται και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris Boric EDTA, TBE). Αυτό προσφέρει την πηγή ιόντων που είναι απαραίτητα για τη διέλευση του ηλεκτρισμού που εξασφαλίζει την μετακίνηση του μορίου DNA κατά μήκος του πηκτώματος. Παράλληλα, διατηρεί το pH του διαλύματος σε μια σχετικά σταθερή τιμή (Lee, Costumbrado et al. 2012). Στο πήκτωμα αγαρόζης προστίθεται και η χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο. Πρόκειται για μία τοξική χρωστική η οποία παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA, ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να φθορίζει. Με τον τρόπο αυτό το DNA σημαίνεται και είναι ορατό. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας του δείγματος (Russell 2006).

Κατά το φόρτωμα των δειγμάτων DNA στις κατάλληλες θέσεις του πηκτώματος αγαρόζης, προστίθεται μαζί με το δείγμα κατάλληλη χρωστική ουσία, η οποία αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος και εμποδίζει τη διάχυσή του. Παράλληλα, ως χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση του δείγματος που ηλεκτροφορείται κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης.

Πειραματική Διαδικασία

▪ Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1.5%

1. Ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας την ποσότητα αγαρόζης που χρειαζόμαστε για να φτιάξουμε πηκτώμα αγαρόζης 1.5%.
2. Προσθήκη σε κωνική φιάλη, η οποία περιέχει την ζυγισμένη ποσότητα της αγαρόζης, ρυθμιστικού διαλύματος TBE σε κατάλληλο όγκο, αναλόγως της χωρητικότητας του εκμαγείου.
3. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να είναι διαυγές.

Κατά διαστήματα, διακόπτεται η θέρμανση, αναδεύεται με προσοχή η κωνική φιάλη και συνεχίζεται η θέρμανση.

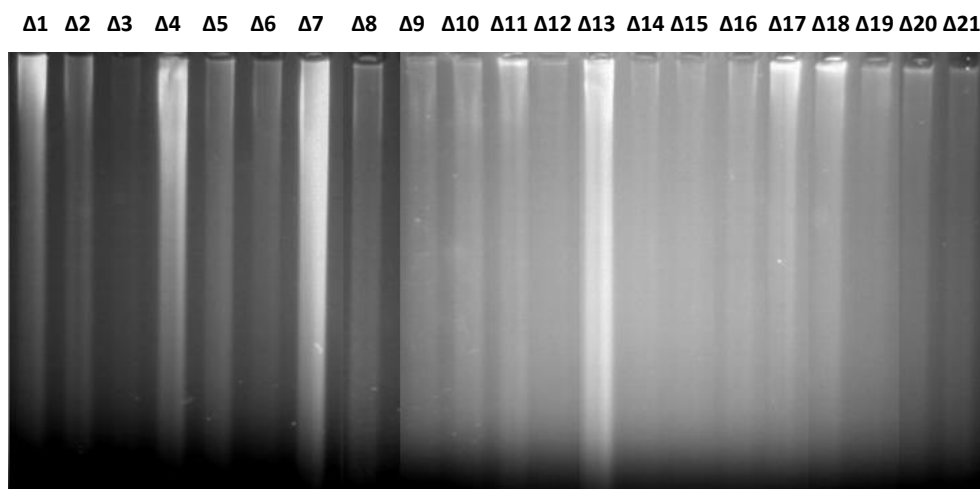
4. Στη συνέχεια, προσθέτουμε το βρωμιούχο αιθίδιο αναδεύοντας ήπια ώστε να διαλυθεί.
5. Αδειάζουμε προσεκτικά, ώστε να μην σχηματίζονται φυσαλίδες, τη ρευστή αγαρόζη σε κατάλληλο εκμαγείο στο οποίο έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει κατάλληλη χτένα, ώστε να δημιουργηθούν μικρά βοθρία-πηγαδάκια στα οποία θα φορτώσουμε τα δείγματα.
6. Αφήνουμε το πηκτώμα σε θερμοκρασία δωματίου για 40 περίπου λεπτά, ώστε να πολυμερισθεί και να ψυχθεί.
7. Αφαιρούμε τη χτένα μόλις πήξει και αποκαλύπτονται τα πηγαδάκια.
8. Μέρος του πηκτώματος, αναλόγως των δειγμάτων που έχουμε, τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE. Το υπόλοιπο πηκτώμα αγαρόζης, τυλίγεται σε μεμβράνη και αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο και αποθηκεύεται στο ψυγείο για μελλοντική χρήση.

Πήκτωμα Αγαρόζης 1.5 %	
Αγαρόζη σε μορφή σκόνης (Εταιρεία Canvax Biotech)	4,5 gr
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης TBE (1X, Εταιρεία GRiSP)	300 ml
Βρωμιούχο Αιθίδιο (1 %, Εταιρεία AppliChem)	21 μl

Πίνακας 3. Σύσταση για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης 1.5 %.

▪ *Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης*

1. Μέρος του πηκτώματος τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προετοιμάζουμε τα δείγματα DNA που θα φορτώσουμε με ανάμιξή τους με τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης.
3. Αναμιγνύουμε 5 μl DNA και 7 μl χρωστικής και όλο το μίγμα φορτώνεται σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος αγαρόζης.
4. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο περίπου 95 Volt για περίπου 30 - 40 λεπτά.
5. Ακολουθεί παρατήρηση σε τράπεζα με φως υπεριώδους ακτινοβολίας UV.
6. Η εικόνα αποθηκεύεται μέσω του προγράμματος GelCapture στον συνδεδεμένο υπολογιστή του συστήματος και εκτιμάται για κάθε δείγμα η ποιότητα του απομονωμένου γενωμικού DNA (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5 %.

3.1.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA των δειγμάτων

Η ποσοτικοποίηση του DNA διεξάγεται ώστε να εκτιμηθεί ακριβώς η συγκέντρωση του DNA που περιέχει το κάθε δείγμα. Παράλληλα, από τον λόγο των απορροφήσεων στα 260/280nm εκτιμάται η καθαρότητα του γενωμικού DNA. Ένα ακατάλληλο - μη καθαρό δείγμα ενδέχεται να περιέχει προσμίξεις που αναστέλλουν την ενίσχυσή του κατά την αλυσιδωτή αντίδραση

πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η πιο κοινή τεχνική για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του γενωμικού DNA είναι η μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 Spectrophotometer της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.

Πειραματική Διαδικασία

1. Ανοίγουμε το πρόγραμμα στον συνδεδεμένο με το φασματοφωτόμετρο υπολογιστή.
2. Επιλέγουμε τη ρύθμιση για νουκλεϊκά οξέα «Nucleic Acid».
3. Κάνουμε 3 πλύσεις με 5 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) σκουπίζοντας κάθε φορά το μηχανήμα με χαρτί.
4. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο χρησιμοποιώντας ως «τυφλό» το διάλυμα έκλουσης (EB) σε όγκο ίσο με την ποσότητα του δείγματος DNA (1,5 μl) DNA EB, για μηδενισμό του φωτομέτρου θεωρώντας το ως τυφλό δείγμα.
5. Καθαρίζουμε με χαρτί.
6. Προσθέτουμε 1,5 μl δείγματος και φωτομετρούμε.
7. Μετρούμε την απορρόφηση στα 260/280 nm και σημειώνουμε το λόγο που μας δείχνει την καθαρότητα του δείγματος.
8. Καθαρίζουμε με χαρτί και ξεπλένουμε με 1,5 μl DNA EB.
9. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του επόμενου δείγματος.
10. Όταν τελειώσει η φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων κάνουμε 3 πλύσεις με 5 μl δις απεσταγμένου νερού σκουπίζοντας κάθε φορά το μηχανήμα με χαρτί.

Η φωτομέτρηση του κάθε δείγματος διεξάγεται τρεις φορές, ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στην εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA. Από τις τρεις μετρήσεις υπολογίζεται ο μέσος όρος της συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση και η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος εκτιμάται σύμφωνα με την τροποποιημένη εξίσωση Beer – Lambert. Η εξίσωση βασίζεται στην απορρόφηση στα 260 nm, όπου το DNA και το RNA απορροφούν πιο έντονα το φως σε αυτό το μήκος κύματος. Έπειτα, η τιμή της απορρόφησης κανονικοποιείται σε 1.0 cm (10.0 mm) της οπτικής διαδρομής. Επομένως, η απορρόφηση υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$A = -\log \frac{\text{Ένταση Ακτινοβολίας που διαπερνά από το υπο εξέταση δείγμα}}{\text{Ένταση Ακτινοβολίας που διαπερνά από το τυφλό δείγμα (blank)}}$$

Επιπρόσθετα, η τροποποιημένη εξίσωση Beer-Lambert βασίζεται στον συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ο οποίος είναι συγκεκριμένος για τα νουκλεϊκά οξέα. Οι κοινώς αποδεκτοί συντελεστές μοριακής απορρόφησης για τα νουκλεϊκά οξέα θεωρούνται:

- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο δίκλωνο DNA = 50 ng-cm/μl
- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο μονόκλωνο DNA = 33 ng-cm/μl
- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο RNA = 40 ng-cm/μl

3.1.3.3 Εκτίμηση της καθαρότητας του DNA

Η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA είναι σημαντική, καθώς η σχέση της συγκέντρωσης και της απορρόφησης στα 260 nm βασίζεται μόνο σε καθαρά δείγματα. Η παρουσία άλλων μακρομορίων, όπως των πρωτεϊνών και του RNA ή ακόμη και άλλων προσμίξεων, ενδέχεται να οδηγήσουν σε λανθασμένη εκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA επηρεάζοντας ενδεχομένως επακόλουθες πειραματικές διαδικασίες (Lebuhn, Derenko et al. 2016). Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται υπολογίζοντας την απορρόφηση στα 280 nm και 230 nm, συμπεριλαμβανομένου και του λόγου 260/280 nm. Στα 260 nm εκτός από το DNA απορροφά και το RNA και στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες. Ένα καλής ποιότητας DNA θα έχει λόγο ~ 1.8 (1.7 – 1.9), ενώ ένα καλής ποιότητας RNA θα έχει λόγο ~ 2.0 (1.8 – 2.0). Εάν ο λόγος είναι αισθητά μικρότερος, υποδηλώνει την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων επιμολύνσεων που απορροφούν έντονα κοντά στα 280 nm.

Παράλληλα, εκτός από τον υπολογισμό του λόγου 260/280 nm, υπολογίζεται και ο λόγος στα 260 nm και 230 nm. Πρόκειται για ένα δευτερεύον μέτρο καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων, που δηλώνει την παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών. Όταν ένα δείγμα DNA είναι καθαρό, ο λόγος αυτός κυμαίνεται μεταξύ 1.8 – 2.2. Τιμές χαμηλότερες υποδηλώνουν την παρουσία προσμίξεων ή υπολειμματικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση του DNA, όπως είναι το EDTA, Triton X-100 και η υδροχλωρική γουανιδίνη (ThermoScientific 2009, Zonta, Nizard et al. 2015).

3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μια μέθοδος που πραγματοποιεί ενζυμικό πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης γνωστής αλληλουχίας DNA in vitro χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το DNA (Russell 2006). Η συγκεκριμένη αλληλουχία ενδέχεται να «ενισχυθεί» πολλές χιλιάδες έως εκατομμύρια φορές χρησιμοποιώντας ελεύθερα 3' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs - dATP, dTTP, dCTP, dGTP), MgCl₂, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και κατάλληλους πρόσθιους και ανάδρομους εκκινητές (primers). Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε θερμικό κυκλοποιητή που έχει τη δυνατότητα να εκτελεί επαναλαμβανόμενους κύκλους με αυξομειώσεις της θερμοκρασίας (**Εικόνα 14**). Με την ολοκλήρωση των επιθυμητών κύκλων, παράγεται εκθετικά ένας υψηλός αριθμός αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας από μία μικρή αρχική ποσότητα δείγματος.

Ο θερμικός κυκλοποιητής πραγματοποιεί περίπου 35-40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει κατά κανόνα τρία επιμέρους στάδια:

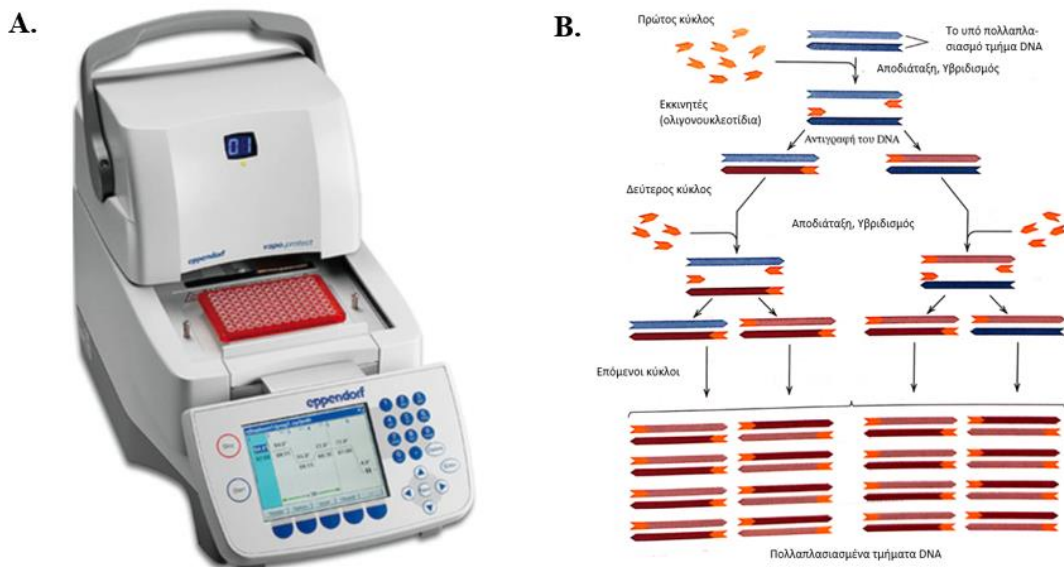
- **Αποδιάταξη:** υπό την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας 94-95°C, γίνεται μετουσίωση της διπλής έλικας του DNA και χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής της μονής έλικας του DNA.
- **Υβριδισμός:** επιτυγχάνεται η σύνδεση των εκκινητών, με βάση τη συμπληρωματικότητά τους με το εκμαγείο της μονής έλικας DNA, παρέχοντας το εναρκτήριο βήμα για τη σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας. Η θερμοκρασία του υβριδισμού κυμαίνεται μεταξύ 48-60°C και καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών.
- **Επιμήκυνση:** Η επέκταση των εκκινητών και η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA πραγματοποιείται από το ένζυμο DNA πολυμεράση σε θερμοκρασία περίπου 70-72°C που είναι βέλτιστη για τη δράση του ενζύμου.

Μετά την ολοκλήρωση των επαναλαμβανόμενων κύκλων, ακολουθεί η τελική επιμήκυνση, στάδιο κατά το οποίο παρέχεται χρόνος στο ένζυμο, ώστε να συμπληρώσει την επέκταση των ημιτελών PCR προϊόντων, σε θερμοκρασίες 72-78°C. Τελευταίο βήμα είναι η αναστολή του ενζύμου, ώστε να λάβει τέλος η αντίδραση, σε θερμοκρασία 4°C. Οι χρόνοι του κάθε σταδίου διαφέρουν ανάλογα με την προς ενίσχυση νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός, ο ένας με τη μία άκρη της αλληλουχίας -

στόχου στην μία αλυσίδα του DNA και ο άλλος με την άλλη άκρη της αλληλουχίας-στόχου στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται στην αλληλουχία - στόχο και λειτουργούν ως υπόστρωμα της DNA πολυμεράσης (Nussbaum, McInnes et al. 2011). Ο σχεδιασμός τους είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της PCR και η επιλογή τους καθορίζεται με βάση το μήκος τους, το οποίο κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 18-24 δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Υβριδοποιούνται ειδικά στην αλληλουχία - στόχο. Επιπλέον, πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από εσωτερική δευτεροταγή δομή και να μην περιέχουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα, διότι αυτά μπορούν να υβριδοποιηθούν μη ειδικά. Χρειάζεται να επιλεγούν προσεκτικά, ώστε να αποφευχθεί η συμπληρωματικότητα στα 3' άκρα και ο μεταξύ τους υβριδισμός (διμερή εκκινητών). Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να έχουν συμβατές θερμοκρασίες τήξης και το ποσοστό περιεκτικότητας σε GC να είναι ~50%. Η επιλογή των εκκινητών της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία. Στη συνέχεια μέσω BLAST στη βάση δεδομένων Primer - Blast ελέγχθηκαν οι παράμετροι που προαναφέρθηκαν και επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που πληρούσαν την πλειοψηφία των ανωτέρω κριτηρίων.

Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο με δράση 5' → 3' εξωνουκλεάσης, ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος κατά την αντίδραση PCR κρίνεται απαραίτητη, καθώς διατηρεί σταθερό το pH και καθορίζει την ιοντική ισχύ που θα δράσει το ένζυμο. Το ένζυμο DNA πολυμεράση στηρίζεται στην παρουσία μεταλλικών ιόντων, όπως είναι τα ιόντα Mg²⁺. Οι εκκινητές μπορεί να υβριδοποιηθούν μη ειδικά στο DNA ή να υβριδοποιηθούν μεταξύ τους κατά την έναρξη της αντίδρασης και με τον τρόπο αυτό, ενδέχεται η πολυμεράση να συνθέσει μη ειδικό προϊόν ή να προκύψουν διμερή εκκινητών. Το πρόβλημα αυτό ελαχιστοποιείται με τη χρήση ενζύμου «θερμικής εκκίνησης - hot-start». Το hot-start ένζυμο είναι ανενεργό σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Η αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται μετά από μία αρχική επώαση στους 95°C για περίπου 15 λεπτά.



Εικόνα 14. (Α). Απεικονίζεται ο θερμικός κυκλοποιητής τύπου Eppendorf (Β). Η ενίσχυση της DNA αλληλουχίας-στόχου κατά την πάροδο των κύκλων της PCR αντίδρασης (Tropp 2014).

Πειραματική Διαδικασία

Η PCR αντίδραση διεξάγεται για κάθε δείγμα σε τελικό όγκο 50 μ l. Χρησιμοποιούμε σωληνάρια για PCR όγκου 0.2 ml στα οποία προσθέτουμε το μίγμα των αντιδραστηρίων (Master Mix) και το αρχικό δείγμα γενωμικού DNA που θα αποτελέσει το εκμαγείο. Για τις PCR αντιδράσεις μας χρησιμοποιήσαμε την Hot Fire Pol πολυμεράση (Εταιρεία Solis BioDyne) και η συσκευασία της περιέχει τα συνοδά αντιδραστήρια που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της PCR. Το Master Mix περιέχει το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (10x Buffer B1) για τη δράση του ενζύμου (Hot Fire Pol), το ζεύγος των εκκινητών (πρόσθιος-ανάστροφος), διάλυμα 25 mM $MgCl_2$, πολυμεράση Hot Fire, μίγμα των τεσσάρων dNTPs και δις απεσταγμένο νερό.

Κατά τη δημιουργία του συνολικού μίγματος αντιδραστηρίων Master Mix, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων υπολογίζονται σύμφωνα με τον αριθμό δειγμάτων, λαμβάνοντας υπόψιν και την προσθήκη ενός θετικού κι ενός αρνητικού μάρτυρα για την αντίδραση. Υπολογίζεται επιπλέον ένα ποσοστό της τάξης του 10%, καθώς μέρος των αντιδραστηρίων χάνεται κατά το μοίρασμα με το πιπετάρισμα. Η προσθήκη του θετικού μάρτυρα κατά την PCR αντίδραση επιβεβαιώνει την παραγωγή του επιθυμητού PCR προϊόντος. Η προσθήκη του αρνητικού μάρτυρα, που δεν περιέχει γενωμικό DNA, αλλά μόνο το μίγμα των αντιδραστηρίων και δις απεσταγμένο νερό, εκτιμά μία πιθανή επιμόλυνση.

Οι ποσότητες του γενωμικού DNA και των αντιδραστηρίων του μίγματος, τροποποιούνται σύμφωνα με τη συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος (**Πίνακας 4**). Τα σωληνάρια PCR εισάγονται στον θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf Master Cycler. Οι συνθήκες διεξαγωγής των PCR αντιδράσεων απεικονίζονται στον **Πίνακα 7**.

Μίγμα αντιδραστηρίων (Master Mix) για κάθε εξόνιο του ARIDIA γονιδίου				
	Εξόνιο 4	Εξόνιο 6	Εξόνιο 18	Εξόνιο 19
Σύσταση του Master Mix	Ποσότητα ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x B1	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
25 mM MgCl ₂	5 μl	5 μl	5 μl	4 μl
dNTPs	3 μl	3 μl	3 μl	2,5 μl
Πρόσθιος Εκκινητής*	3 μl	2 μl	2 μl	3 μl
Ανάστροφος Εκκινητής*	1 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Ένζυμο Hot Fire πολυμεράση	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
ddH ₂ O	Αναλόγως της αρχικής ποσότητας γενωμικού DNA που προστέθηκε	Αναλόγως της αρχικής ποσότητας γενωμικού DNA που προστέθηκε	Αναλόγως της αρχικής ποσότητας γενωμικού DNA που προστέθηκε	Αναλόγως της αρχικής ποσότητας γενωμικού DNA που προστέθηκε
T.V.	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Πίνακας 4. Σύσταση του μίγματος αντιδραστηρίων για κάθε εξόνιο του ARIDIA γονιδίου που μελετήσαμε.

*Για κάθε εξόνιο που μελετήσαμε χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών, η αλληλουχία των οποίων απεικονίζονται στον **Πίνακα 5**.

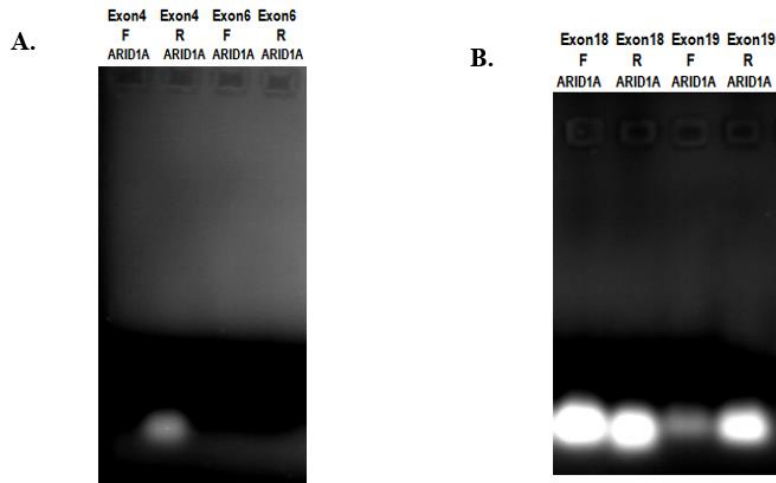
Εξόνιο	Πρόσθιος εκκινητής 5' → 3'	Ανάστροφος εκκινητής 5' → 3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
ARID1Aexon4	CAGTCCCATAACCCTTTCACAG	CTGGGCAGGGAGACAGAAC	375
ARID1Aexon6	TTGGCTGGATCTCTTTGTGTG	TTCATGGTCAAACAGCTCTCC	319
ARID1Aexon18	GCTATGTGCGAGGCAGGTA CT	GCTCAGCAAGGCACCATGT	404
ARID1Aexon19	TGGCTAAAGATGAGACATTCCC	AGACAGAAACTGCCTTCCACC	332

Πίνακας 5. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα τέσσερα εξόνια του ARID1A γονιδίου που μελετήθηκαν.

Όλα τα ζεύγη των εκκινητών παρελήφθησαν σε λυοφιλοποιημένη μορφή (ίζημα). Έγινε διαλυτοποίηση και φωτομέτρηση μέσω του NanoDrop, ώστε να εκτιμηθούν η συγκέντρωση και η καθαρότητά τους. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 4% (**Πίνακας 6**) και εκτιμήθηκαν συγκριτικά οι εντάσεις φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου (**Εικόνα 15**). Οι διαφορετικές εντάσεις επιβεβαιώθηκαν από τις μετρήσεις του NanoDrop και καθορίστηκαν οι επιθυμητές αναλογίες των ζευγών των εκκινητών για τις PCR αντιδράσεις.

Πήκτωμα Αγαρόζης 4 %	
Αγαρόζη σε μορφή σκόνης (Εταιρεία Canvax Biotech)	12 gr
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης TBE (1X, Εταιρεία GRiSP)	300 ml
Βρωμιούχο Αιθίδιο (1 %, Εταιρεία AppliChem)	21 μl

Πίνακας 6. Σύσταση για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης 4 %.



Εικόνα 15. (A) Ηλεκτροφορήσεις των εκκινητών τόσο των εξονίων 4 και 6 (B) Ηλεκτροφορήσεις των εκκινητών των εξονίων 18 και 19 του ARID1A γονιδίου. (F: Πρόσθιος εκκινητής, R: Ανάστροφος εκκινητής)

Συνθήκες διεξαγωγής της PCR		
Στάδια	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος
1 – Αρχική Αποδιάταξη	95	12 λεπτά
2 – Αποδιάταξη	95	1 λεπτό
3 – Υβριδισμός	60	1 λεπτό
4 – Επιμήκυνση	72	1 λεπτό
5 – Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά
6 – Συντήρηση	4	∞

} 35 κύκλοι

Πίνακας 7. Συνθήκες διεξαγωγής των PCR αντιδράσεων στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler.

3.2.1 Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ολοκλήρωση των PCR αντιδράσεων ακολουθείται από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να δούμε αν ενισχύθηκαν επιτυχώς οι επιθυμητές αλληλουχίες των εξονίων του γονιδίου *ARID1A* που μελετάμε. Για την εκτίμηση του επιθυμητού μεγέθους του PCR προϊόντος, χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Εμείς χρησιμοποιήσαμε τον μάρτυρα 100 bp ladder της εταιρείας Invitrogen.

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων των εξονίων 4, 6, 18 και 19 που εξετάσαμε, παρασκευάσαμε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 3% (**Πίνακας 8**).

Πήκτωμα Αγαρόζης 3%	
Αγαρόζη σε μορφή σκόνης (Εταιρεία Canvax Biotech)	9 gr
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης TBE (1X, Εταιρεία GRiSP)	300 ml
Βρωμιούχο Αιθίδιο (1 %, Εταιρεία AppliChem)	21 μl

Πίνακας 8. Συστατικά για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 3%.

3.3 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Η αντίδραση της PCR παράγει σε μεγάλες ποσότητες την επιθυμητή αλληλουχία του DNA. Ωστόσο, ενδέχεται να υπάρχουν επιπλέον στην αντίδραση χαμηλής απόδοσης μη επιθυμητές αλληλουχίες που τείνουν να εμφανίζουν δευτεροταγή δομή και θερμική σταθερότητα. Επιπρόσθετα, παραμένει στο PCR προϊόν περίσσεια αντιδραστηρίων όπως διμερή εκκινητών, dNTPs, ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα, τα οποία παρεμβαίνουν στην απόδοση διαδικασιών όπως είναι η αλληλούχιση (Werle, Schneider et al. 1994). Οι προσμίξεις αυτές θα πρέπει να απομακρυνθούν προκειμένου να προχωρήσουμε στην αλληλούχιση των προϊόντων. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι καθαρισμού. Μερικές από αυτές είναι η χρήση οργανικών μεθόδων εκχύλισης, ο καθαρισμός με τη χρήση του πηκτώματος αγαρόζης ή η χρήση στηλών με φίλτρο.

3.3.1 Καθαρισμός των ενισχυμένων PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων διεξήχθη σε απαγωγό εστία (HOOD) για την αποφυγή επιμολύνσεων. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε το PureLink PCR Purification kit της εταιρείας Invitrogen, το οποίο καθαρίζει προϊόντα με εύρος μεγέθους από 100 bp μέχρι 12 kb της διπλής έλικας του DNA (dsDNA). Στο συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης (Binding Buffer-B2), ώστε να διευκολυνθεί η δέσμηση του PCR προϊόντος στη μεμβράνη των φίλτρων των στηλών που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer-W1) που χρησιμοποιείται, συμβάλλει στην διατήρηση στην μεμβράνη του δεσμευμένου επιθυμητού PCR προϊόντος και στην απομάκρυνση των υπολοίπων υπολειμμάτων της αντίδρασης. Η αποδέσμηση του PCR προϊόντος από τη μεμβράνη επιτυγχάνεται με την έκλουσή του έπειτα από την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού. Η διαδικασία που ακολουθείται αναλυτικά παρατίθεται στη συνέχεια:

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου (4X) του PCR προϊόντος με το ανασυσταμένο ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης B2, στο σωληνάριο της PCR.
2. Αναρρόφηση με πιπέτα και μεταφορά του διαλύματος στη μονάδα στήλης/σωληναρίου συλλογής FT/CT.
3. Φυγοκέντρηση της στήλης FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
4. Αφαίρεση του εκλούμενου υγρού και τοποθέτηση της στήλης FT στο ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
5. Προσθήκη 650 μl του ανασυσταμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης W1 στη στήλη FT/CT.
6. Φυγοκέντρηση της στήλης FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
7. Αφαίρεση του εκλούμενου υγρού και τοποθέτηση της στήλης FT στο ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
8. Επανάληψη του βήματος 6.
9. Τοποθέτηση της στήλης FT σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5 ml.
10. Προσθήκη 25 μl ddH₂O στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης FT.

11. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
12. Φυγοκέντρηση της στήλης FT/σωληναρίου Eppendorf στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
13. Συλλογή του εκλούμενου υγρού και πέρασμα ξανά από το φίλτρο της στήλης, προκειμένου να αυξήσουμε την απόδοση.
14. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
15. Φυγοκέντρηση της στήλης FT/σωληναρίου Eppendorf στις 14.000 στροφές (rpm) για 4 λεπτά.
16. Απόρριψη της στήλης FT.
17. Το σωληνάριο τύπου Eppendorf φέρει το καθαρισμένο PCR προϊόν.

Τα καθαρισμένα PCR προϊόντα, ηλεκτροφορούνται επίσης σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 3%, ώστε να ελέγξουμε αν ήταν επιτυχής ο καθαρισμός. Χρησιμοποιείται και εδώ ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100 bp ladder της εταιρείας Invitrogen, ώστε να εκτιμηθεί εάν πήραμε με τον καθαρισμό το επιθυμητό PCR προϊόν.

3.4 Ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας – Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση έφερε επανάσταση στη μοριακή βιολογία και την ιατρική. Η ολοκλήρωση της ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2001 με ακρίβεια 99.99% αποτέλεσε ορόσημο. Ο Frederick Sanger ήταν αυτός που επινόησε την αλληλούχιση του DNA, και έκτοτε έχουν υπάρξει σημαντικές εξελίξεις στις μεθόδους αλληλούχισης, οι οποίες οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων πλατφορμών αλληλούχισης του DNA.

Η αλληλούχιση αποτελεί ένα ισχυρό ερευνητικό εργαλείο και η αλληλούχιση γονιδιωμάτων έχει εξελιχθεί σε τέτοιο επίπεδο που είναι δυνατό να εφαρμοστεί ακόμη και σε μικρά εργαστήρια. Στη γονιδιωματική του καρκίνου, μέσω της αλληλούχισης, επιτυγχάνεται η ταχεία ταυτοποίηση γενετικών παραλλαγών μικρής ή μεγαλύτερης έκτασης, οι οποίες ενοχοποιούνται για την έναρξη της καρκινογένεσης. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος επιτρέπει την αποκωδικοποίηση ολόκληρων γονιδιωμάτων από ελάχιστη ποσότητα αρχικού δείγματος DNA.

3.4.1 Αλληλούχιση κατά Sanger

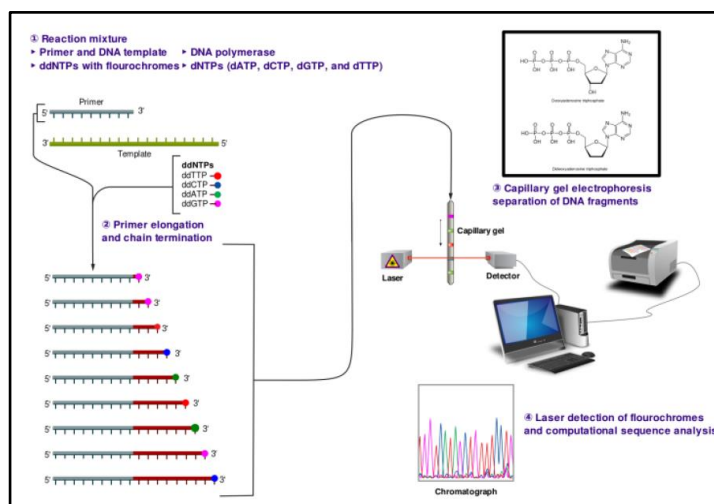
Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι επίσης γνωστή ως αλληλούχιση αλυσίδας τερματισμού ή «διδεοξυ αλληλούχιση». Αναπτύχθηκε το 1975 από τον Frederick Sanger και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ακόμη και σήμερα, αν και έχουν εισαχθεί νέες μέθοδοι αλληλούχισης, παραμένει το gold standard και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως. Η αυτοματοποίηση της Sanger αλληλούχισης συνέβαλλε στην κυριαρχία της μεθόδου για περισσότερα από 20 χρόνια (Verma, Kulshrestha et al. 2017).

Η αλληλούχιση κατά Sanger βασίζεται στην αρχή της αντιγραφής του DNA και επιτυγχάνεται με την προσθήκη τριφωσφορικών διδεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων που στερούνται την 3' υδροξυλομάδα (3'OH). Για την αλληλούχιση απαιτούνται η μονόκλωνη αλυσίδα του DNA (ssDNA) που πρόκειται να αλληλουχηθεί και χρησιμεύει ως εκμαγείο, το ζεύγος των εκκινητών, το ένζυμο της πολυμεράσης, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs, σημασμένα ddNTPs και DMSO. Το ενσωματωμένο ddNTP στερείται την 3' υδροξυλομάδα, επομένως ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ της υδροξυλομάδας του C3 του προηγούμενου σακχάρου και του C5 του επόμενου δεν μπορεί να σχηματιστεί. Συνεπώς, τερματίζεται η ενίσχυση από την πολυμεράση στη συγκεκριμένη θέση (Verma, Kulshrestha et al. 2017).

Η αλληλούχιση κατά Sanger σήμερα έχει εξελιχθεί και βελτιστοποιηθεί. Παλαιότερα, πραγματοποιούνταν τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις λόγω των τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων. Σε κάθε αντίδραση συμμετείχε και ένα κλάσμα ddNTP (είτε ddCTP, ddGTP, ddATP ή ddTTP), αλλά και τα τέσσερα φυσιολογικά νουκλεοτίδια. Αποτέλεσμα της κάθε αντίδρασης ήταν η παραγωγή θραυσμάτων διαφορετικού μήκους, καθένα από τα οποία κατέληγε στο συγκεκριμένο και γνωστό ddNTP. Στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί η αλληλουχία των θραυσμάτων, αυτά ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ώστε να προσδιορισθεί το μήκος τους. Το κλάσμα των διδεόξυ-νουκλεοτιδίων ήταν σημασμένο κυρίως με ραδιενεργό φώσφορο (α - ^{32}P -ddNTPs) και πραγματοποιούνταν αυτοραδιογραφία. Ο προσδιορισμός των θέσεων των άλλων τριών νουκλεοτιδίων, πραγματοποιούνταν με την παράλληλη διεξαγωγή των τεσσάρων αντιδράσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες, καθώς κάθε ραδιενεργό νουκλεοτίδιο έδινε το ίδιο σήμα, δηλαδή την ίδια αμάρωση στο φιλμ.

Σήμερα, με την εξέλιξη του φθορισμού τα ddNTPs σημαίνονται με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και το σήμα ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός λέιζερ. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε

μία μόνο αντίδραση και εφαρμόζεται η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης σε κατάλληλο γενετικό αναλυτή (**Εικόνα 16**) (Karger and Guttman 2009).



Εικόνα 16. Παρουσιάζεται Sanger αλληλούχιση με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Τα καθαρισμένα PCR προϊόντα για τα εξόνια 4, 6, 18 και 19 του γονιδίου *ARID1A* που μελετήσαμε, αλληλουχήθηκαν σε γενετικό αναλυτή ABI 3500, της εταιρείας Applied Biosystems, ABI). Η ανάλυση των αλληλουχιών μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης έγινε με το πρόγραμμα Chromas. Η ανάλυση έγινε συγκρίνοντας την αλληλουχία του κάθε δείγματος με την αλληλουχία του φυσιολογικού αλληλομόρφου γονιδίου *ARID1A* (NM_006015.6), ώστε να προσδιορισθούν τυχόν παραλλαγές στα εξεταζόμενα εξόνια του γονιδίου *ARID1A* στους ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, που συμπεριλάβαμε στη μελέτη.

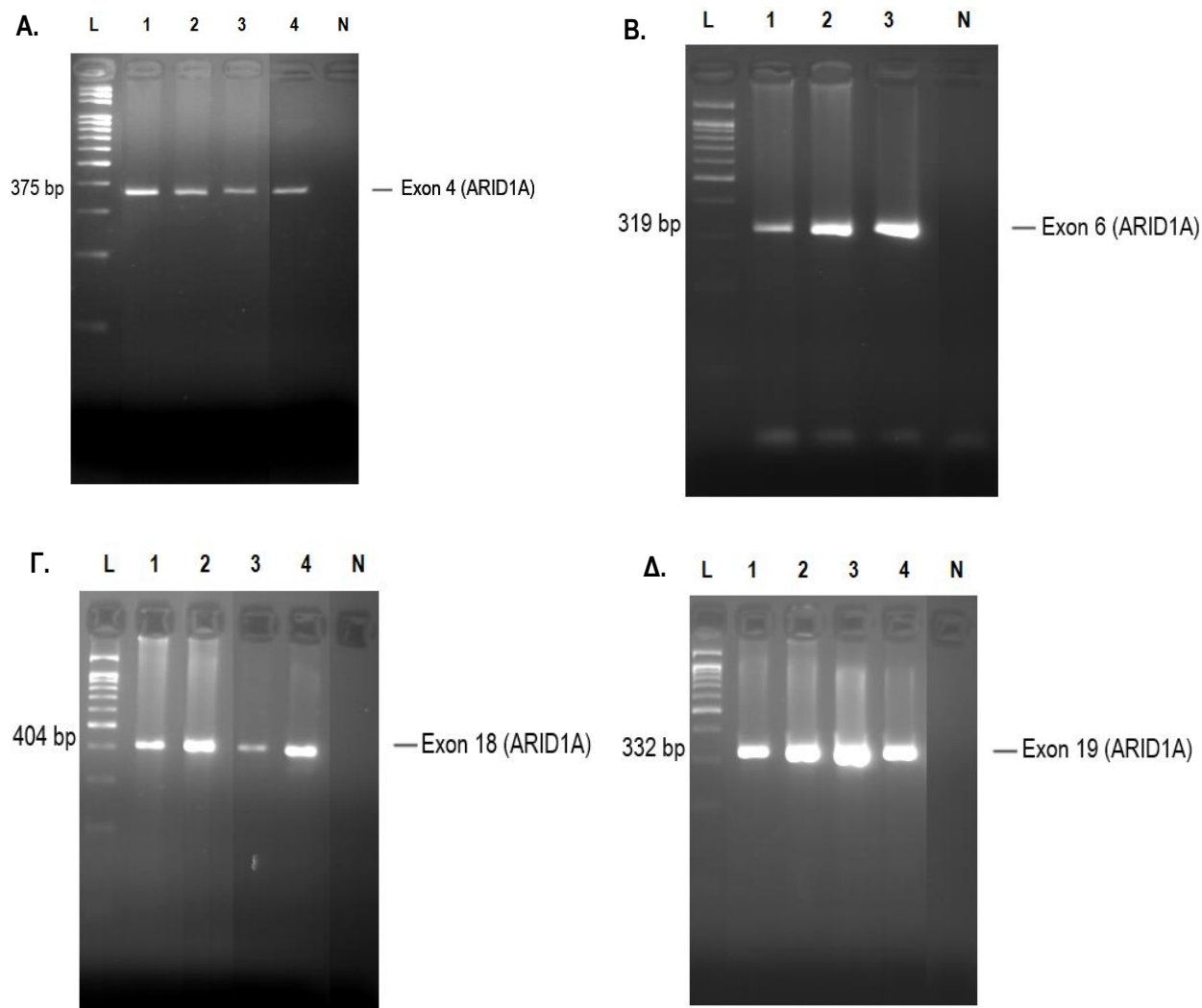
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε 29 δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου που χειρουργήθηκαν στη γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου. Οι ηλικίες των ασθενών κυμαίνονταν από 46 έως 80 ετών με μέση τιμή ηλικίας τα 62.8 ± 9 έτη. Παρατίθενται οι κλινικοϊστολογικές παράμετροι των ασθενών της μελέτης (Πίνακας 9).

<i>Παράμετρος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό %</i>
<i>Ηλικία</i>		62.8 ± 9
<i>Τύπος καρκινώματος</i>		
• <i>Ενδομητριοειδές</i>	20	69
• <i>Ορώδες</i>	2	6,9
• <i>Μικτό</i>	6	20,7
• <i>Πλακώδες πολύστιβο</i>	1	3,4
<i>Βαθμός κακοήθειας</i>		
• <i>Grade I</i>	8	27,6
• <i>Grade II</i>	13	44,8
• <i>Grade III</i>	6	20,6
<i>Αγγειακή διήθηση</i>		
• <i>Απουσία</i>	1	3,4
• <i>Παρουσία</i>	28	96,6
<i>Βαθμός διήθησης ενδομητρίου</i>		
• <i><50%</i>	16	57,1
• <i>>50%</i>	12	42,9
<i>Μετάσταση</i>		
• <i>Απουσία μετάστασης</i>	22	75,9
• <i>Παρουσία μετάστασης</i>	7	24,1

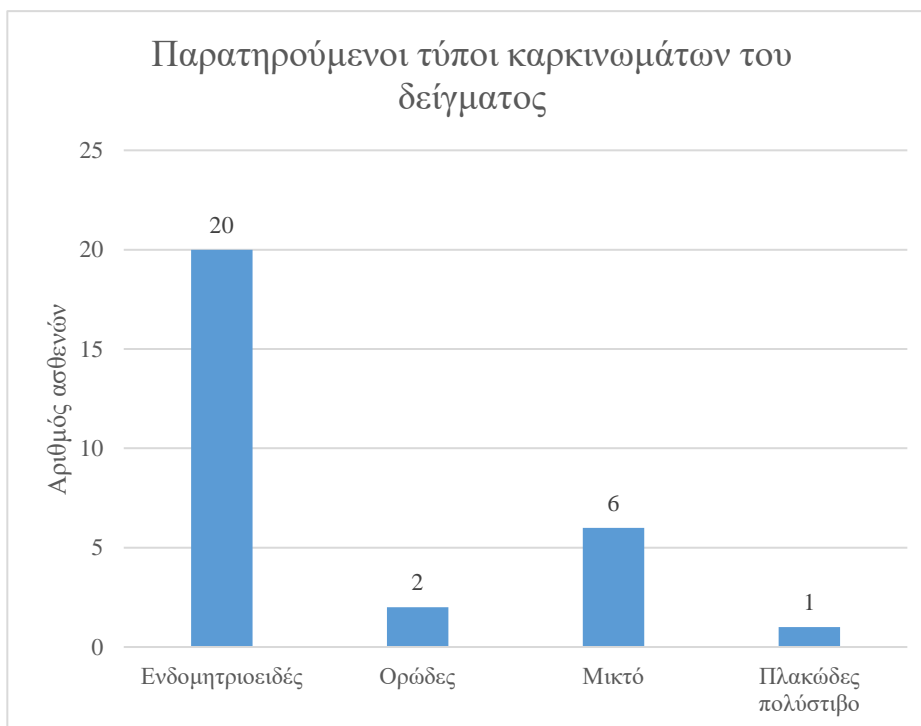
Πίνακας 9. Κλινικοϊστολογικές παράμετροι των ασθενών της μελέτης.

Μελετήσαμε τα εξόνια 4, 6, 18 και 19 του γονιδίου *ARID1A* στους 29 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου που συμπεριλάβαμε στην παρούσα μελέτη. Τα μεγέθη των PCR προϊόντων για τα εξόνια 4, 6, 18 και 19 έχουν μέγεθος 375 bp, 319 bp, 404 bp και 332 bp, αντίστοιχα. Οι ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων απεικονίζονται στην **Εικόνα 17**.



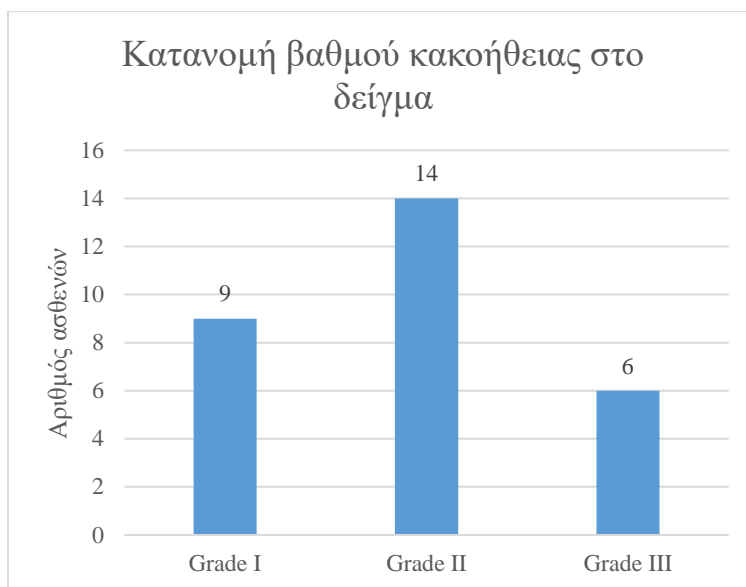
Εικόνα 17. Ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων του *ARID1A* γονιδίου, (A) εξόνιο 4, (B) εξόνιο 6, (Γ) εξόνιο 18, (Δ) εξόνιο 19 σε δείγματα FFPE. Όπου L (ladder) είναι ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100 bp, οι αριθμοί 1-4 αντιστοιχούν σε τέσσερα δείγματα ασθενών, N είναι non template control.

Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν ηλικίας 46 έως 80 ετών, με διάμεση ηλικία $62,8 \pm 9$. Η πλειοψηφία των ασθενών, 20/29 γυναίκες (69.0%), είχε ενδομητριοειδή τύπο καρκίνου του ενδομητρίου. Επιπλέον, διαγνώστηκαν 6 γυναίκες με μικτό τύπο καρκινώματος (20.7%), 2 γυναίκες με ορώδες καρκίνωμα (6.9%) και μία γυναίκα με καρκίνωμα πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου (3.4%).



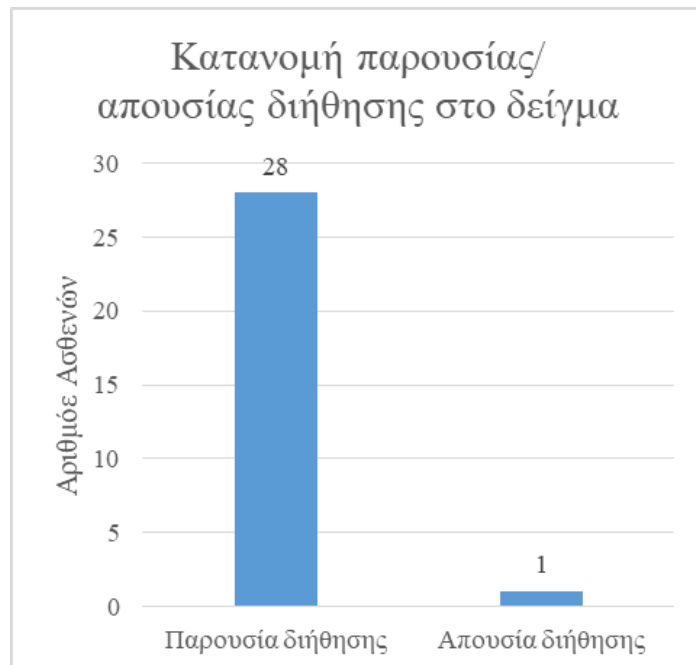
Γράφημα 1. Κατανομή των τύπων του καρκίνου του ενδομητρίου των ασθενών.

Συνολικά, 9/29 γυναίκες (31%) είχαν καρκίνο βαθμού κακοηθείας I, 14/29 γυναίκες (48.3%) βαθμού κακοηθείας II, 6/29 γυναίκες (20.7%) είχαν καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας III.



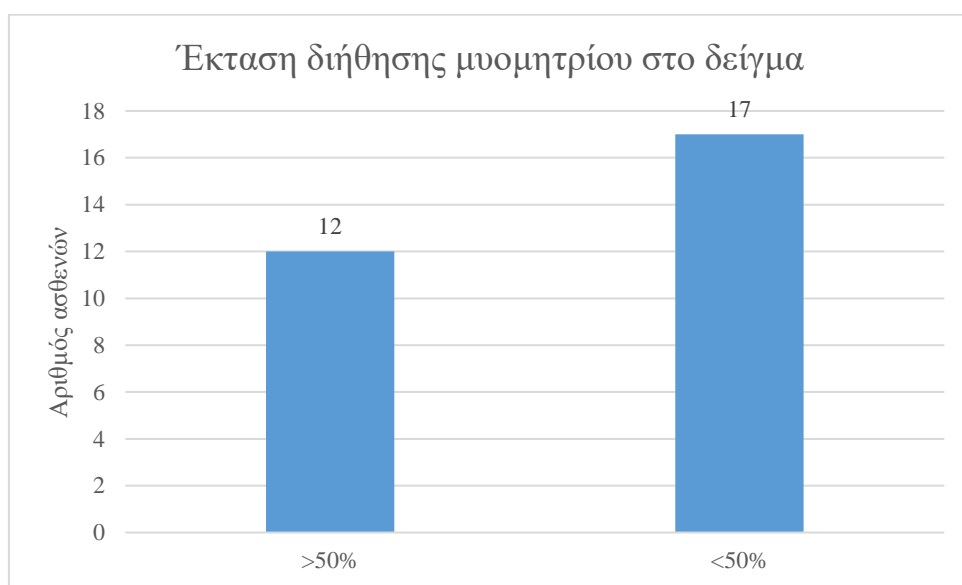
Γράφημα 2. Κατανομή βαθμού κακοήθειας των καρκίνων του ενδομητρίου των ασθενών.

Επιπλέον, 28/29 γυναίκες (96.6%) παρουσίασαν αγγειακή διήθηση, ενώ μόνο 1/29 (3.4%) δεν εμφάνισε αγγειακή διήθηση.



Γράφημα 3. Κατανομή παρουσίας/απουσίας αγγειακής διήθησης.

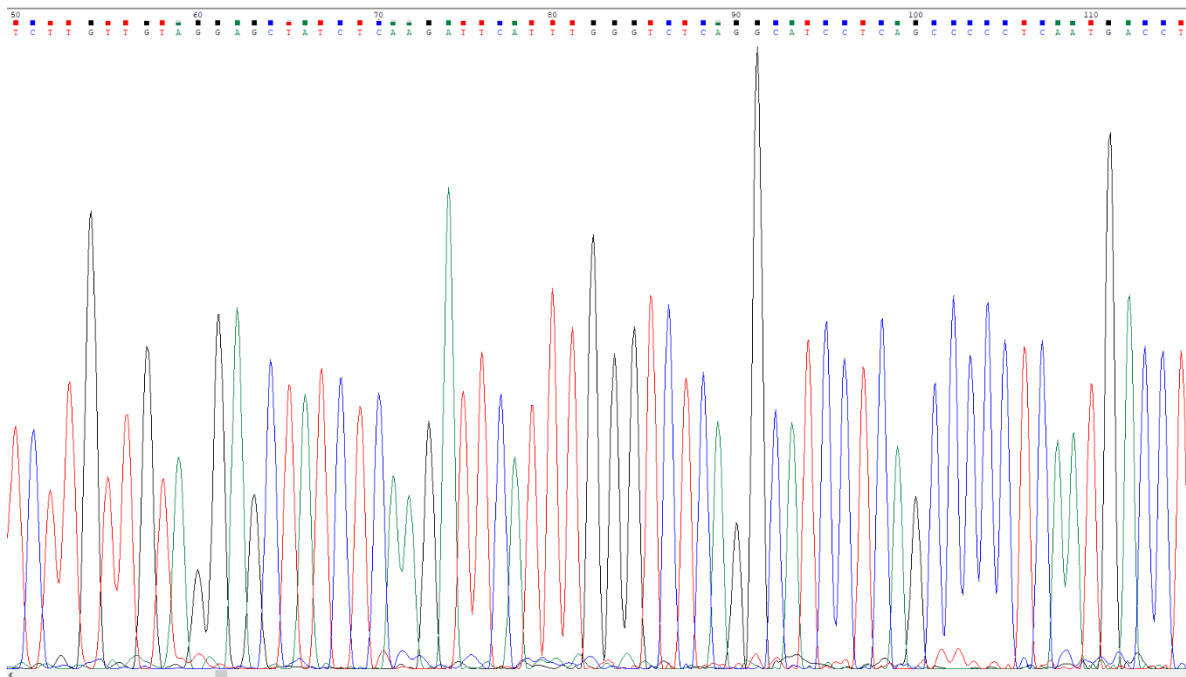
Οι ασθενείς που παρουσίασαν αγγειακή διήθηση με συνολικό αριθμό 29, εξετάστηκαν ως προς το βαθμό διήθησης του όγκου και κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, με βαθμό διήθησης <50% και με βαθμό διήθησης >50%. Παρατηρείται ότι 17/29 γυναίκες (58.6%) παρουσιάζουν βαθμό διήθησης του ενδομητρίου <50% και 12/29 (41.4%) γυναίκες εμφανίζουν βαθμό διήθησης του ενδομητρίου >50%.



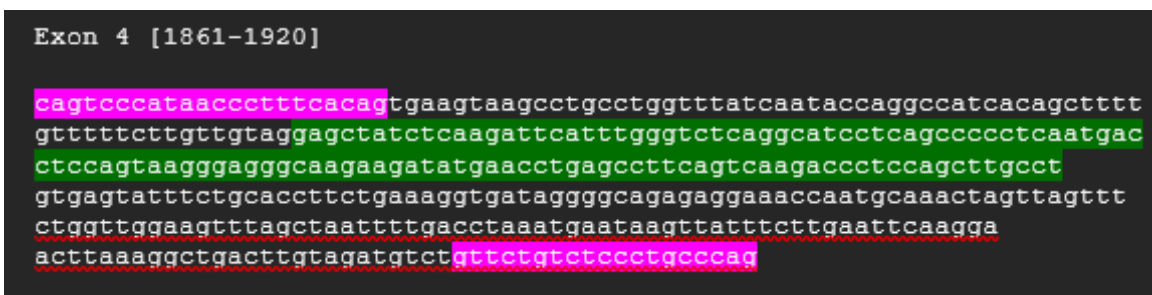
Γράφημα 4. Κατανομή ποσοστού διήθησης του μυομητρίου του δείγματος.

Εξετάσαμε επίσης την απουσία ή την παρουσία μεταστάσεων κατά τη βιοψία. 22/29 (75.9%) ασθενείς διαγνώστηκαν χωρίς μεταστάσεις, ενώ 7/29 (24.1%) ασθενείς είχαν μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης.

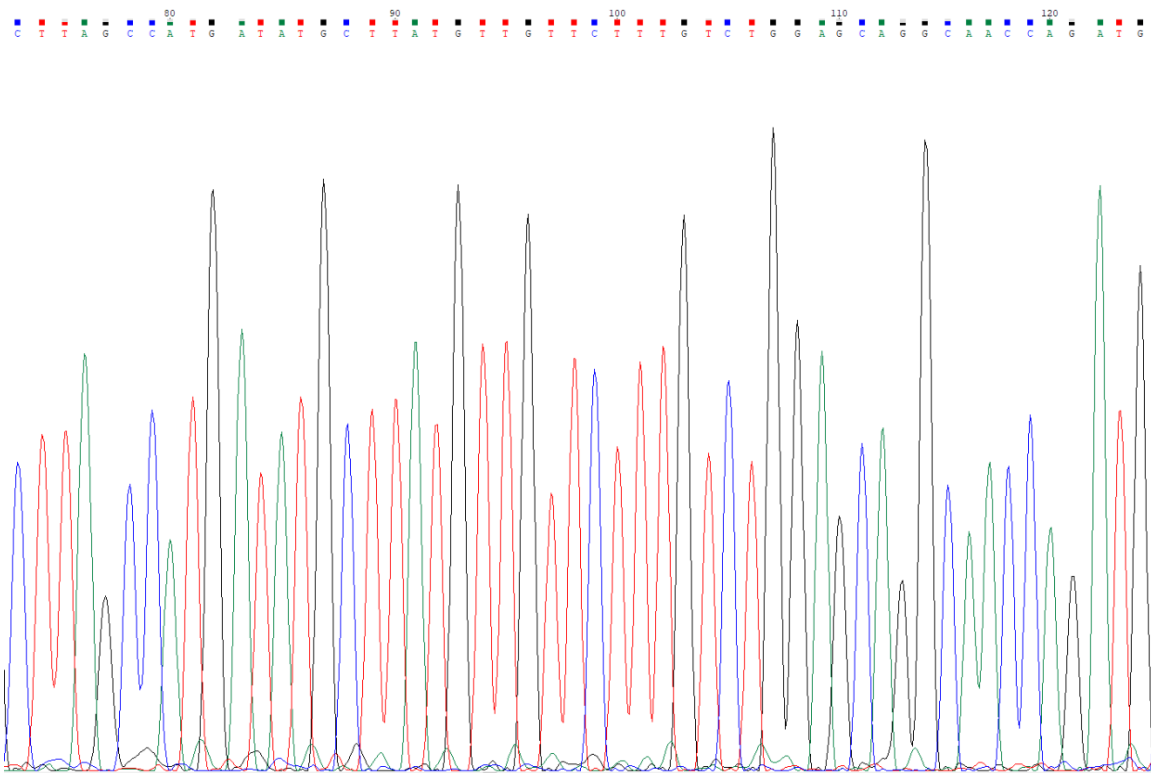
Στη συνέχεια αναλύσαμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αλληλούχιση των δειγμάτων μας για κάθε ένα από τα εξόνια 4, 6, 18 και 19 του γονιδίου *ARID1A* σε κάθε έναν από τους ασθενείς της μελέτης μας. Το γονίδιο *ARID1A* εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger σε γενετικό αναλυτή ABI 3500.



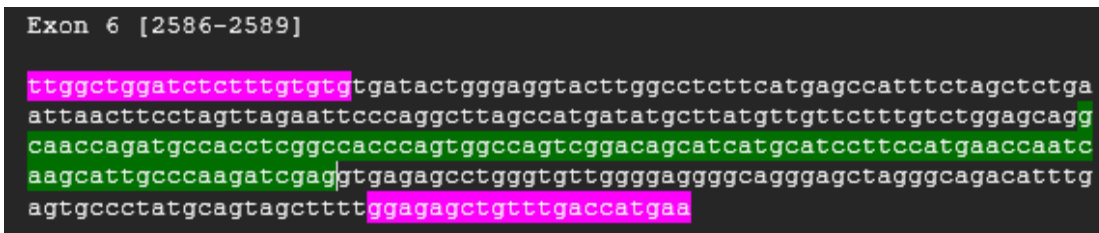
Εικόνα 18. Γράφημα αλληλούχισης για το εξόνιο 4 του ARID1A γονιδίου, στο οποίο απεικονίζεται η φυσιολογική αλληλουχία.



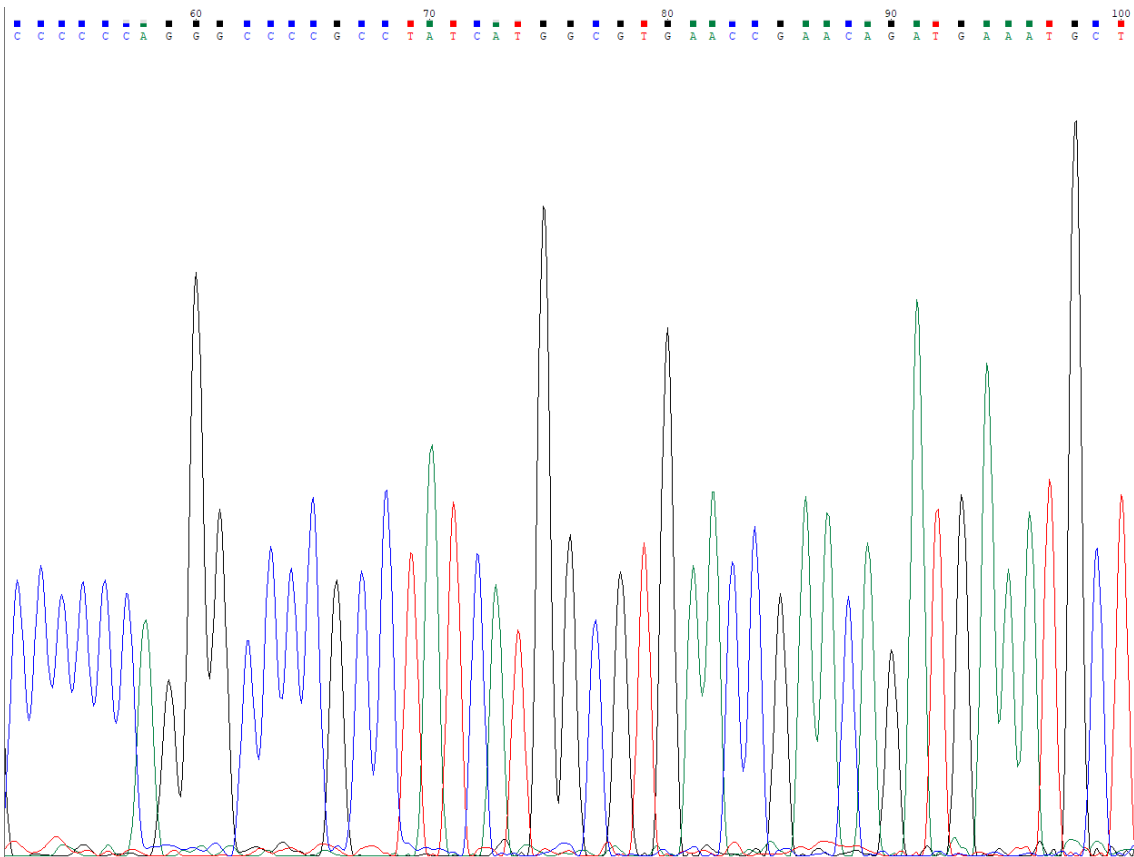
Εικόνα 19. Αλληλουχία της περιοχής του εξονίου 4 του ARID1A γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται με ροζ σήμανση και η κωδική αλληλουχία με πράσινη σήμανση.



Εικόνα 20. Γράφημα αλληλούχησης για το εξόνιο 6 του ARID1A γονιδίου, στο οποίο απεικονίζεται η φυσιολογική αλληλουχία.



Εικόνα 21. Αλληλουχία της περιοχής του εξονίου 6 του ARID1A γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται με ροζ σήμανση και η κωδική αλληλουχία με πράσινη σήμανση.



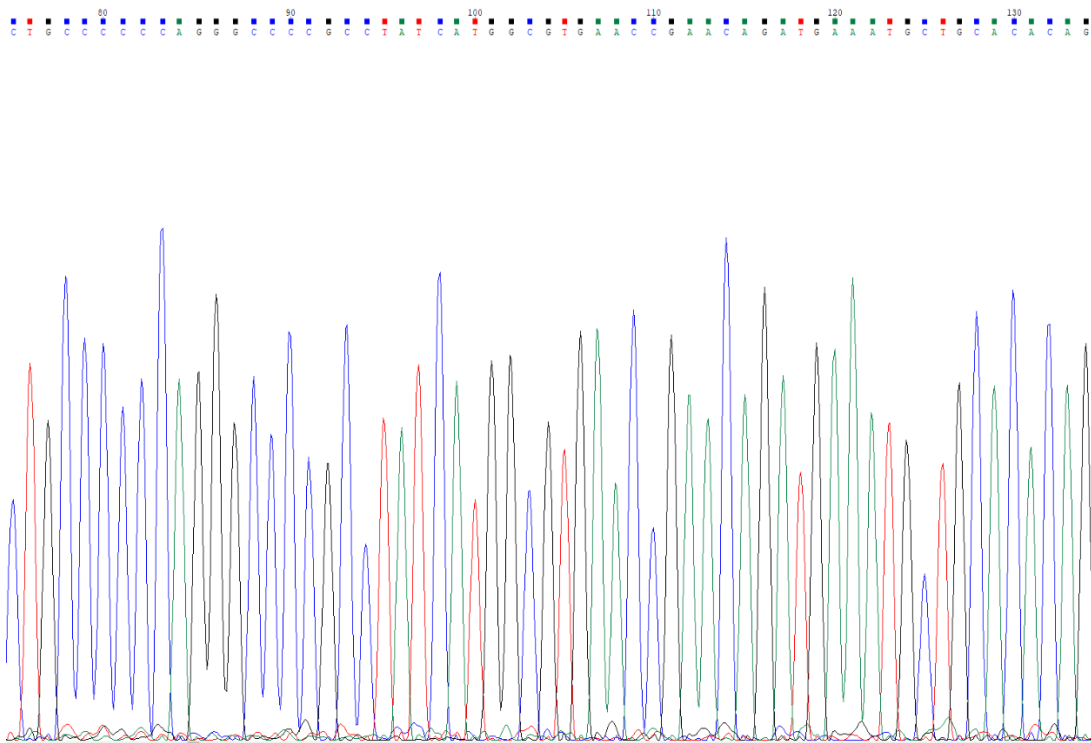
Εικόνα 22. Γράφημα αλληλούχησης για το εξόνιο 18 του ARID1A γονιδίου, στο οποίο απεικονίζεται η φυσιολογική αλληλουχία.

```

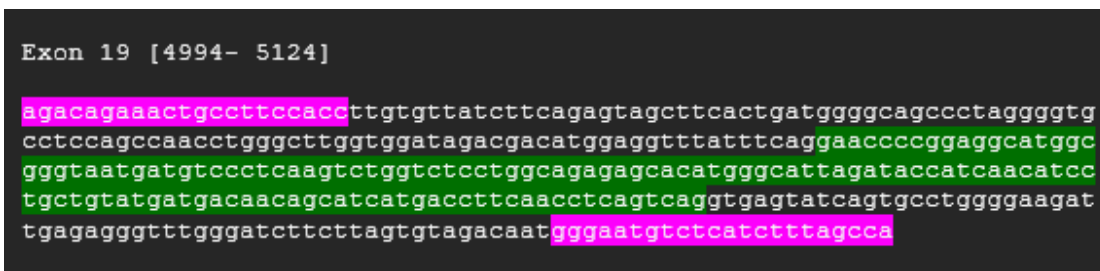
Exon 18 [4492- 4878]
aattacaagcggccaatggatggcacatatggcctcctgccaaagcggcaggaaggggagatgtacagc
gtgccatacagcactgggcaggggcagcctcagcagcagcagttgccccagcccagcccagcctgcc
agccagcaacaagctgccagccttcccctcagcaagatgtatacaaccagtatggcaatgcctatcct
gccactgccacagctgctactgagcgcgaccagcagggcggccccagaaccaatttccattccagttt
ggccgagaccgtgtctctgcaccccctggcaccaatgccagcaaaacatgccaccacaaatgatgggc
ggccccatacaggcatcagctgaggttgctcagcaaggcaccatgtggcagggggcgaatgacatgacc
tataaattatgccaacaggcagagcagggctctgccccccagggccccgcctatcatggcgtgaaccga
acagatgaaatgctgcacacagatcagagggccaaccacgaaggctcgtggccttcccatggcacagc
cagcccccatatggtcctctgcccctgtgcccccatgacaaggccccctccatctaactaccagccc
ccaccaagcatgcagaatcacattcctcaggtatccagccctgctcccctgccccggccaatgggagac
cgcacctctcctagcaagtctccattcctgcactctgggatgaaaatgcagaaggcaggtccccagta
cctgcctcgcacatagcacctgccctgtgcagcccccatgatteggcgggatatcaccttccacct
ggctctgttgaagccacacagcctgtgttgaagcagaggaggcggctcacaatgaaagacattg

```

Εικόνα 23. Αλληλουχία τμήματος του εξονίου 18 του ARID1A γονιδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται με ροζ σήμανση και η κωδική αλληλουχία με πράσινη σήμανση.



Εικόνα 24. Γράφημα αλληλούχησης για το εξόνιο 19 του ARID1A γονιδίου, στο οποίο απεικονίζεται η φυσιολογική αλληλουχία.



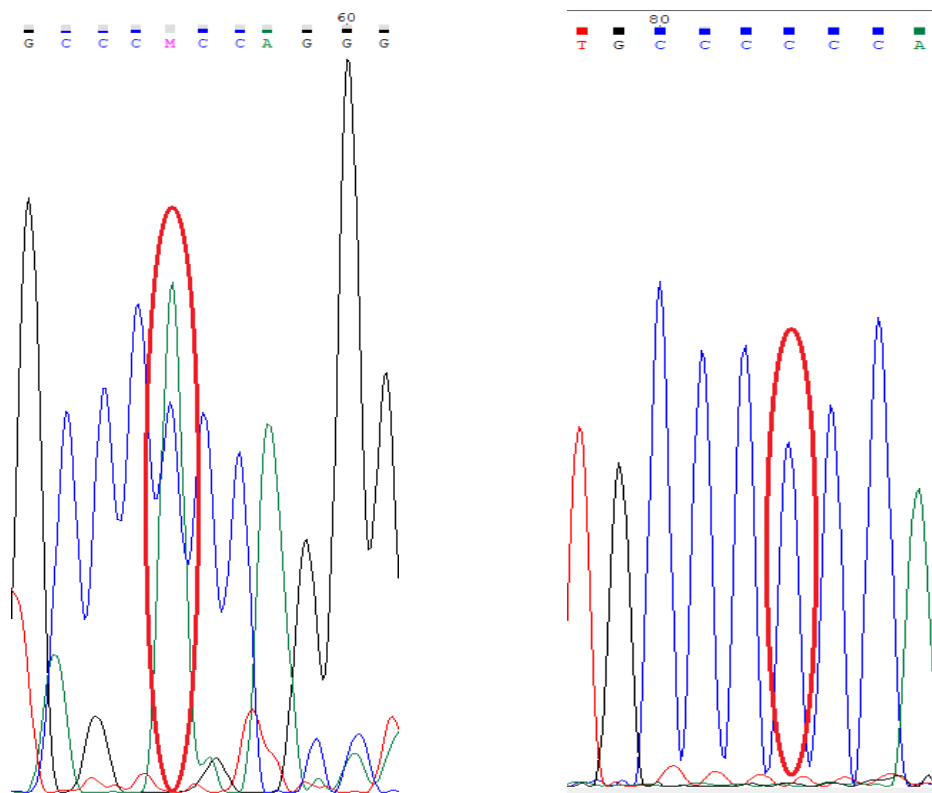
Εικόνα 25. Αλληλουχία της περιοχής του εξονίου 19 του του ARID1A γονιδίου. Οι εκκληνές που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται με ροζ σήμανση και η κωδική αλληλουχία με πράσινη σήμανση.

Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν για τα εξόνια 4 και 6 έφεραν τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου ARID1A.

Όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις στο εξόνιο 18 εκτός από τρία, έφεραν τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου ARID1A. Μία ασθενής εμφάνισε μία μη νοηματική μετάλλαξη στη θέση c.4554C>A (NM_006015.6, c.4554C>A), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1518P>H. Πρόκειται για μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης (C)

από την αδενίνη (A) στη θέση 4554, η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή της προλίνης (P) σε ιστιδίνη (H). Η μετάλλαξη είναι καταχωρημένη στη βάση COSMIC ως c.4554C>T, η οποία αποτελεί συνώνυμη μετάλλαξη.

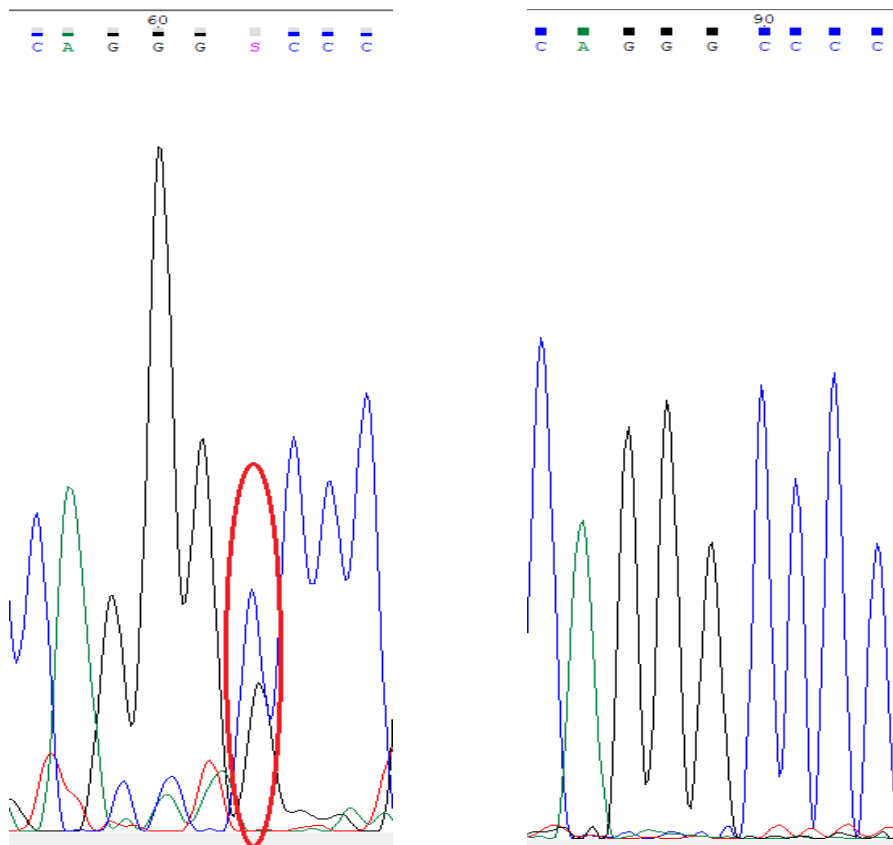
(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102754333>).



Εικόνα 26. Ανίχνευση της μη νοσηματικής μετάλλαξης c.4554C>A, που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.P1518H στο εξόνιο 18, σε ασθενή της μελέτης. Αριστερά η εντόπιση της θέσης της μετάλλαξης εντός του κύκλου και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η ίδια ασθενής εμφάνισε μία δεύτερη παραλλαγή στη θέση c.4560G>C (NM_006015.6, c.4560C>G), που δεν οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή (p.1520G=). Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης (C) από τη γουανίνη (G) στη θέση 4560, όπου το αμινοξύ γλυκίνη (G) που κωδικοποιείται, παραμένει το ίδιο. Η μετάλλαξη είναι καταχωρημένη στη βάση COSMIC ως c.4560C>T, αποτελεί επίσης σιωπηλή μετάλλαξη και δεν έχει κάποια επίδραση στην πρωτεΐνη.

(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102772575>).



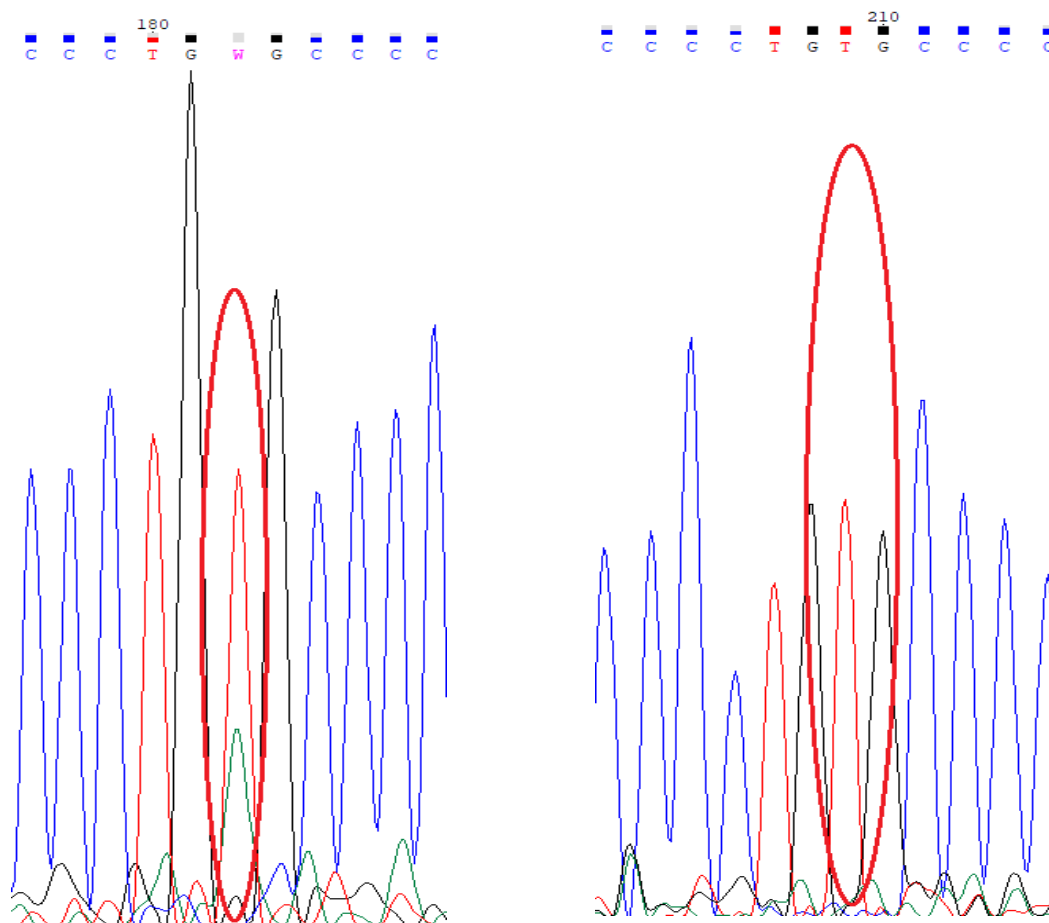
Εικόνα 27. Ανίχνευση της συνώνυμης μετάλλαξης c.4560C>G στο εξόνιο 18, σε ασθενή της μελέτης. Αριστερά η εντόπιση της θέσης της μετάλλαξης εντός του κύκλου και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωσθεί με ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, μέτριας διαφοροποίησης. Η ασθενής εμφανίζει διήθηση του μυομητρίου σε ποσοστό <50% και δεν έφερε μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης.

Η δεύτερη ασθενής, στην οποία καταγράφηκε μία παραλλαγή στο εξόνιο 18 του γονιδίου *ARID1A* ανιχνεύθηκε μία παραλλαγή στη θέση c.4682T>A (NM_006015.6, c.4682T>A), η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1561V>E. Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης θυμίνη (T) από την αδενίνη (A), η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της βαλίνης (V) από το γλουταμικό οξύ (E). Η μετάλλαξη είναι καταχωρημένη στη βάση COSMIC ως c.4682C>T, η οποία αφορά την ισομορφή της πρωτεΐνης ARID1A.

(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=125453503>).

Η συγκεκριμένη παραλλαγή δεν έχει καταγραφεί προηγουμένως και δεν είναι γνωστή η δράση της στην πρωτεΐνη.



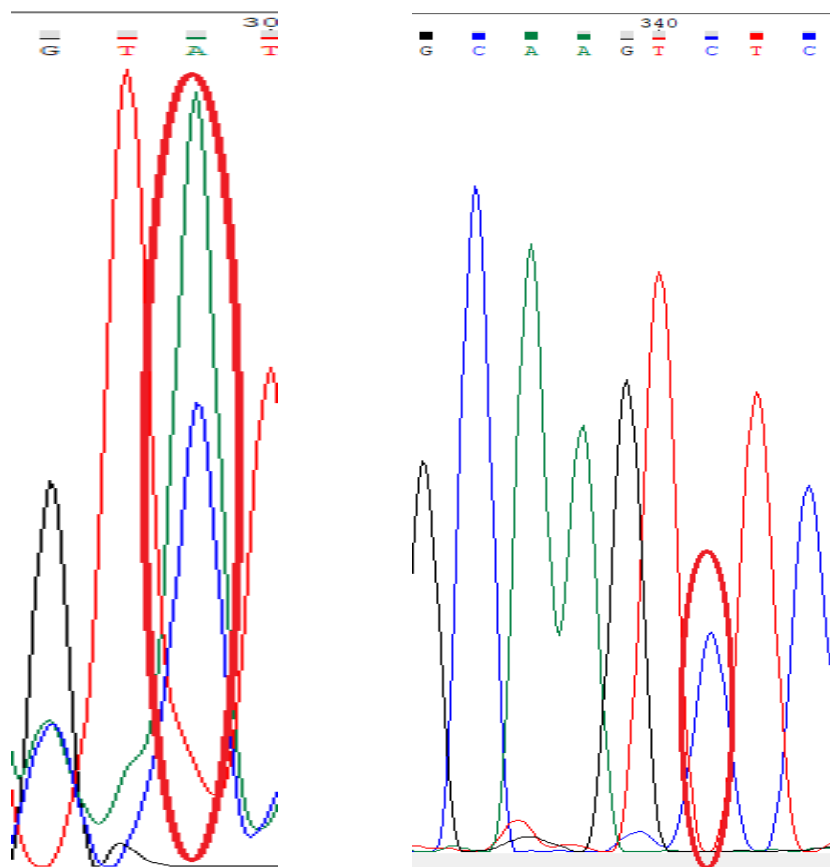
Εικόνα 28. Ανίχνευση της παραλλαγής *c.4682T>A*, στο εξόνιο 18, σε ασθενή της μελέτης, που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή *p.1561V>E*. Αριστερά η εντόπιση της θέσης της μετάλλαξης εντός του κύκλου και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωσθεί με ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, καλής διαφοροποίησης. Η ασθενής εμφανίζει διήθηση του μυομητρίου σε ποσοστό <50% και δεν έφερε μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης.

Η τρίτη ασθενής στην οποία εντοπίσαμε κάποια μετάλλαξη στο εξόνιο 18 του γονιδίου *ARID1A* έφερε μία παραλλαγή στη θέση *c.4811C>A* (NM_006015.6, *c.4811C>A*), η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή *p.1604S>Y*. Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνη (C) από την αδενίνη (A), η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της σερίνης (S) από την τυροσίνη (Y).

Η παραλλαγή είναι καταχωρημένη στη βάση COSMIC ως c.4811C>A και παρόλο που έχει καταγραφεί μόνο μία φορά, αλγοριθμικά (FATHMM = 0,97) χαρακτηρίζεται ως παθολόγος.

(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102769694>).

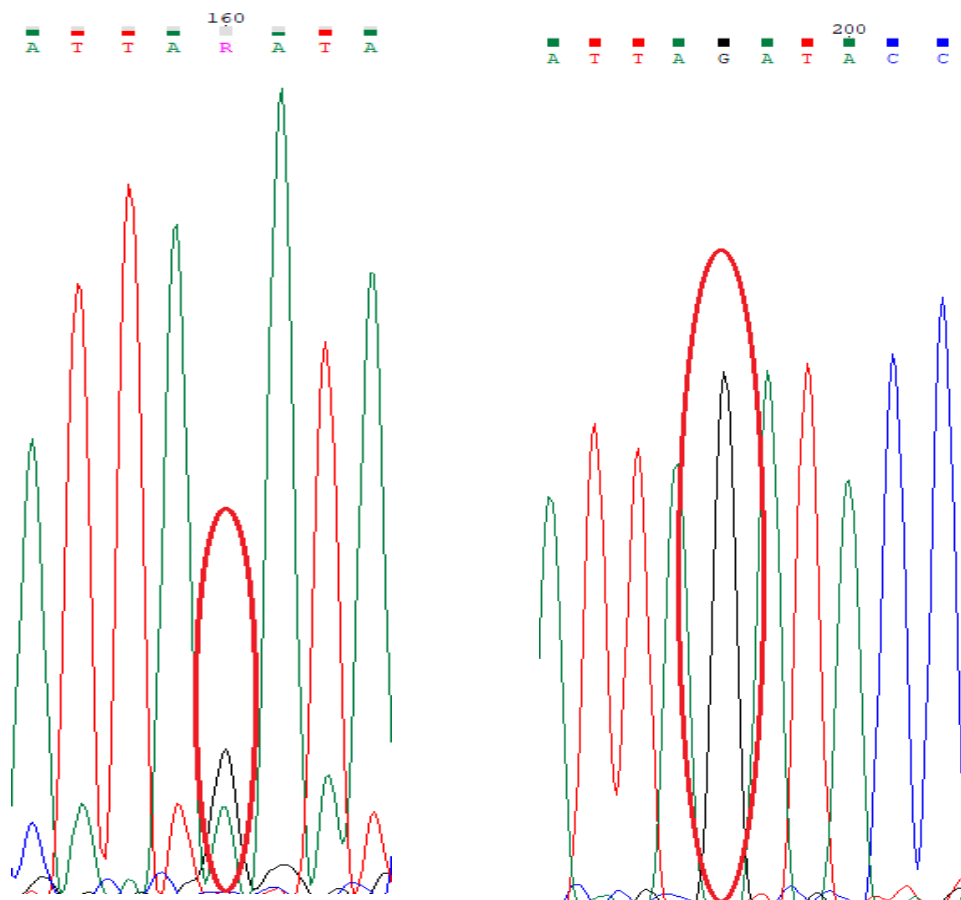


Εικόνα 29. Ανίχνευση της παραλλαγής c.4811C>A, στο εξόνιο 18, σε ασθενή της μελέτης, που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1604S>Y. Αριστερά η εντόπιση της θέσης της μετάλλαξης εντός του κύκλου και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωσθεί με μικτό τύπο καρκινώματος του ενδομητρίου, καλής διαφοροποίησης. Η ασθενής παρουσιάζει διήθηση του μυομητρίου σε ποσοστό >50% και έφερε μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης.

Όσον αφορά στην ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 19, όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 εκτός από ένα, έφεραν τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου *ARID1A*. Μία μόνο ασθενής εμφάνισε μία μη νοηματική μετάλλαξη στη θέση c.5065G>A (NM_006015.6, c.5065G>A), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1689D>N. Πρόκειται για μία

αντικατάσταση της βάσης γουανίνη (G) από την αδενίνη (A) στη θέση 5065, η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος (D) από την ασπαραγίνη (N). Η μετάλλαξη είναι καταχωρημένη στη βάση COSMIC ως c.5065G>A. Η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει καταγραφεί άλλη μία φορά στη βάση δεδομένων και η δράση της χαρακτηρίζεται ως παθολόγος. (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102763610>).



Εικόνα 30. Ανίχνευση της παραλλαγής c.5065G>A, στο εξόνιο 19, σε ασθενή της μελέτης, που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1689D>N. Αριστερά η εντόπιση της θέσης της μετάλλαξης εντός του κύκλου και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωσθεί με ενδομητριοειδές αδenoκαρκίνωμα, μέτριας διαφοροποίησης. Η ασθενής εμφανίζει διήθηση του μυομητρίου σε ποσοστό <50% και δεν εμφάνιζε μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο *ARID1A* χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, οι μεταλλάξεις του οποίου ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο εύρος κακοηθειών, ειδικά σε εκείνους που προέρχονται από το ενδομήτριο (Wu, Wang et al. 2014). Ως υπομονάδα του συμπλόκου αναδιοργάνωσης της χρωματίνης SWI/SNF, η πρωτεΐνη *ARID1A* επικουρεί στην πρόσδεση του συμπλόκου SWI/SNF στη χρωματίνη σε ειδικούς στόχους, τροποποιώντας την προσβασιμότητα της χρωματίνης σε ποικιλία πυρηνικών παραγόντων.

Στις ανθρώπινες κακοήθειες, το γονίδιο *ARID1A* έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της καρκινογένεσης, αποτελεί ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και προλαμβάνει τη γενωμική αστάθεια (Shain and Pollack 2013). Η *ARID1A* είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 242kDa, η οποία, όπως και άλλες υπομονάδες του συμπλόκου SWI/SNF, χρησιμοποιεί την ενέργεια που παρέχεται από την υδροξυλίωση του ATP ώστε να τοποθετηθούν σωστά στα νουκλεοσώματα, να αποκολληθούν από αυτά ή να αλλάξουν νουκλεόσωμα στόχο, επιτελώντας έτσι τις τροποποιητικές τους λειτουργίες (Clapier and Cairns 2009).

Η *ARID1A* ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν μία καλά συντηρημένη περιοχή 100 αμινοξέων με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA σε περιοχές πλούσιες σε μοτίβα AT, την περιοχή *ARID* (AT-Rich Interacting Domain). Οι περισσότερες πρωτεΐνες δείχνουν προτίμηση στις αλληλουχίες που είναι πλούσιες σε AT, ωστόσο, η *ARID1A* δεν εμφανίζει ειδικότητα για κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία (Jones, Wang et al. 2010, Guan, Wang et al. 2011). Η καρβοξυτελική της περιοχή, η οποία ευθύνεται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, διαθέτει το μοτίβο LXXLL, που φαίνεται ότι συμβάλλει στην αλληλεπίδραση διάφορων πρωτεϊνών με πυρηνικούς υποδοχείς, όπως ο ER (Wu, Wang et al. 2014).

Το *ARID1A* γονίδιο απαντάται στον άνθρωπο σε δύο ισομορφές και διαθέτει την ομόλογη αλληλουχία, *ARID1B*, η οποία συγκεκριμένα θεωρείται η παράλογη αλληλουχία του *ARID1A* γονιδίου, καθώς διαθέτει ξεχωριστή λειτουργία (Koonin 2005, Helming, Wang et al. 2014, Wang, Chen et al. 2020). Το *ARID1B* είναι το αμοιβαίο εναλλακτικό μόριο του *ARID1A* στην συναρμολόγηση του συμπλόκου SWI/SNF (Nagl, Patsialou et al. 2005). Η πλειομορφία χαρακτηρίζει όλα τα μέλη του συμπλόκου SWI/SNF, καθώς οι διαφορετικές παραλλαγές τους εκφράζονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου και δημιουργούν διαφορετικά σύμπλοκα SWI/SNF (Ho and Crabtree 2010). Συγκεκριμένα, η *ARID1A* συσσωρεύεται κατά τη

φάση G₀/G₁ και καταστέλλεται κατά τις φάσεις S και G₂/M (Flores-Alcantar, Gonzalez-Sandoval et al. 2011).

Η ARID1A απαντάται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η σταθερότητά της εξαρτάται από τον εντοπισμό της μέσα στο κύτταρο. Όταν εντοπίζεται στον πυρήνα, η ARID1A είναι λιγότερο σταθερή σε σχέση με το κυτταρόπλασμα, καθώς η πρωτεΐνη αποδομείται γρήγορα από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος που εδράζεται στον πυρήνα, του οποίου συστήματος ο πυρηνικός εντοπισμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου, τις συνθήκες ανάπτυξης αλλά και την σχετική αναλογία πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεασωμάτων (von Mikecz 2006, Guan, Gao et al. 2012, Mao and Shih Ie 2013). Απαλοιφή νουκλεοτιδίου της κωδικής περιοχής (In-frame deletions) του ARID1A γονιδίου που συμβαίνει φυσικά, μπορεί να επηρεάσει το σήμα εξαγωγής της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδα του mRNA. Αποτέλεσμα αυτού είναι η παρατεταμένη παραμονή της πρωτεΐνης στον πυρήνα και η επακόλουθη πρόωμη αποδόμησή της, μέσω του μονοπατιού ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την σταθερότητα της πρωτεΐνης (Guan, Gao et al. 2012, Mao and Shih Ie 2013).

Μέχρι σήμερα έχει καταγραφεί πλήθος μεταλλάξεων κατά μήκος του γονιδίου ARID1A. Ωστόσο, οι καλά μελετημένες μεταλλάξεις με επίδραση στην πρωτεΐνη είναι ελάχιστες. Συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί και ταυτοποιηθεί δύο μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA και δύο μεταλλάξεις που επηρεάζουν την εντόπιση της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η μετάλλαξη που οδηγεί στην αντικατάσταση της τρυπτοφάνης από την αλανίνη στην αμινοξική θέση 1073 (p.1073W>A). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA, ενώ όταν συνυπάρχει με τη μετάλλαξη p.1096Y>A, η πρωτεΐνη χάνει πλήρως τη δραστηριότητά της. Η δεύτερη μετάλλαξη που επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης εντοπίστηκε στο αμινοξύ 1096, όπου η τυροσίνη αντικαθίσταται από αλανίνη (p.1096Y>A). Αντίστοιχα, όταν η μετάλλαξη συμβαίνει μόνη της, τότε η πρωτεΐνη χάνει μερικώς την ικανότητα πρόσδεσής της στο DNA, ενώ όταν συνυπάρχει με την p.1073W>A, τότε η πρωτεΐνη χάνει εντελώς την ικανότητα πρόσδεσής της στο DNA (Dallas, Pacchione et al. 2000).

Στη δεύτερη κατηγορία, δηλαδή στις μεταλλάξεις που επηρεάζουν την εντόπιση της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, έχει ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη δύο αμινοξέων, 1370-1371, όπου η λυσίνη και η αργινίνη αντικαθίστανται από δύο θρεονίνες (p.1370-1371KR>TT) και η δράση τους

ενισχύεται όταν συνυπάρχουν με τη δεύτερη σε σειρά ταυτοποιημένη μετάλλαξη. Η δεύτερη μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση της αργινίνης από τη θρεονίνη στην αμινοξική θέση 1383 (p.1383R>T). Όταν συνυπάρχει με την προηγούμενη διπλή αντικατάσταση, διαταράσσεται η λειτουργία του σήματος πυρηνικής εντόπισης της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη σταθερότητά της στο κυτταρόπλασμα (Bateman, Shoji et al. 2016).

Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της πρωτεΐνης έχουν καταγραφεί σε διάφορες κακοήθειες, όπως ο καρκίνος του μαστού, το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, ο παγκρεατικός καρκίνος, ο ουροθηλιακός καρκίνος και καρκίνοι του ενδομητρίου και των ωθηκών (Lowery, Schildkraut et al. 2012). Μεταλλάξεις σε όλη την έκταση του *ARID1A* γονιδίου καταγράφονται συνεχώς από μελέτες μαζικής παράλληλης αλληλούχισης. Πολλές από αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, είναι προσθήκες ή απαλοιφές ή εντοπίζονται στις περιοχές ματίσματος της πρωτεΐνης. Έχουν χαρακτηριστεί ως μη νοηματικές, καθώς δεν υπάρχουν δομικές μελέτες που να τις χαρακτηρίζουν *in vivo*, συνεπώς η επίδρασή τους στην πρωτεΐνη δεν είναι ακόμη κατανοητή (Bateman, Shoji et al. 2016).

Στοιχεία για το ρόλο της πρωτεΐνης *ARID1A* στην καρκινογένεση προήλθαν από αναφορές για μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης στο 30% των νεφροκυτταρικών καρκίνων και στο 10% των καρκινωμάτων του μαστού (Wang, Nagl et al. 2004). Ο μεγαλύτερος όγκος δεδομένων προήλθε από μελέτες μαζικής παράλληλης αλληλούχισης, κατά τις οποίες ανιχνεύθηκαν σωματικές μεταλλάξεις που οδηγούσαν στην απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης σε ποσοστό της τάξης 46-57% των νεφροκυτταρικών καρκινωμάτων και 30% των καρκινωμάτων των ωθηκών προερχόμενων από ενδομητρίωση (Jones, Wang et al. 2010, Wiegand, Shah et al. 2010). Αντίστοιχες μελέτες έκφρασης σημειώνουν απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης *ARID1A* λόγω μεταλλάξεων, σε καρκίνους των ωθηκών σε ποσοστό της τάξης του 33% (Chandler, Brennan et al. 2013), σε διαυγοκυτταρικούς καρκίνους του ενδομητρίου σε ποσοστό 14% και αναπλαστικά καρκινώματα του θυροειδούς σε ποσοστό 14% (Wiegand, Lee et al. 2011).

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί το συχνότερο γυναικολογικό καρκίνο με την υψηλότερη θνητότητα. Κατηγοριοποιείται στο ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου (EEC), που είναι ο συχνότερος τύπος και εξαρτάται από τα επίπεδα των οιστρογόνων, καθώς και τους μη οιστρογονοεξαρτώμενους υπότυπους, ορώδες καρκίνωμα και διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του ενδομητρίου (Wang, Hoang et al. 2020).

Το μοριακό προφίλ των καρκινωμάτων του ενδομητρίου έχει μελετηθεί εκτενώς από την TCGA ομάδα. Έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις του *ARID1A* γονιδίου σε ποσοστά της τάξης του

30-50% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης, 40-60% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων υψηλής διαφοροποίησης και σε χαμηλότερα ποσοστά στους υπόλοιπους υποτύπους (McConechy, Ding et al. 2012, Cancer Genome Atlas Research, Kandath et al. 2013).

Στη δική μας μελέτη, εξετάσαμε 29 δείγματα ασθενών που χειρουργήθηκαν στη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με διάγνωση καρκίνου του ενδομητρίου. Διερευνήσαμε την πιθανή παρουσία μεταλλάξεων του *ARIDIA* γονιδίου. Η πλειοψηφία των ασθενών διαγνώστηκε με ενδομητριοειδές καρκίνωμα, ενώ ανιχνεύθηκαν και οι υπότυποι του ορώδους και του μικτού καρκινώματος του ενδομητρίου. Τα δείγματα ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων για τα εξόνια 4, 6, 18 και 19 του *ARIDIA* γονιδίου. Η ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των υπό εξέταση περιοχών του γονιδίου *ARIDIA* έγινε σε γενομικό αναλυτή ABI3500 και η αξιολόγηση έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα chromas (free distribution). Οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν εξετάστηκαν περαιτέρω για τον πιθανό τους ρόλο στην δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης μέσω της βάσης δεδομένων για σωματικές μεταλλάξεις COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Στη μελέτη μας εντοπίσαμε μεταλλάξεις στα εξόνια 18 και 19 του *ARIDIA* γονιδίου σε 4/29 ασθενείς (13.8%). Στο εξόνιο 18, δύο ασθενείς έφεραν τρεις μεταλλάξεις του γονιδίου. Η μία εκ των ασθενών έφερε μία συνώνυμη μετάλλαξη, η οποία δεν οδηγεί σε κάποια αμινοξική αλλαγή της πρωτεΐνης και μία μη νοηματική μετάλλαξη (NM_006015.6, c.4554C>A) που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1518P>H. Η δεύτερη ασθενής έφερε μία μη νοηματική μετάλλαξη (NM_006015.6, c.4682T>A) που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1561V>E. Και οι δύο ασθενείς διαγνώστηκαν με ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου καλής και μέτριας διαφοροποίησης, αντίστοιχα.

Η τρίτη ασθενής έφερε μία μη νοηματική μετάλλαξη (NM_006015.6, c.4811C>A), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1604S>Y με παθογόνο δράση. Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωστεί με μικτό καρκίνο του ενδομητρίου, με μεταστατικές εστίες.

Όσον αφορά στην ανάλυση του εξονίου 19, μία ασθενής έφερε μία μη νοηματική μετάλλαξη (NM_006015.6, c.5065G>A) που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.1689D>N. Η ασθενής διαγνώστηκε με ενδομητριοειδές καρκίνωμα του ενδομητρίου, μέτριας διαφοροποίησης, χωρίς μεταστάσεις.

Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς μεταλλάξεις του *ARIDIA* γονιδίου εμφανίζονται συχνότερα στον ενδομητριοειδή τύπο καρκινώματος του

ενδομητρίου (Guan, Mao et al. 2011). Στη μελέτη των Guan, Mao et al. 2011, όπου μελετήθηκε η κατανομή της έκφρασης της πρωτεΐνης ARID1A σε διαφορετικούς υποτύπους ενδομητρικών καρκινωμάτων διαπιστώθηκε ότι η έκφρασή της εμφανίζει εκτεταμένη ετερογένεια. Το εν λόγω εύρημα προτείνει ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου συμβαίνουν σε συγκεκριμένους κλώνους του όγκου, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αυξημένη κλωνικότητα, η οποία εμποδίζει τη σωστή ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου.

Σε διαφορετική μελέτη της ίδιας ομάδας, κατά την οποία μελετήθηκαν 995 όγκοι του ενδομητρίου, βρέθηκε πως το ποσοστό μεταλλάξεων του *ARID1A* γονιδίου ανέρχεται στο 40% των περιστατικών. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν, χαρακτηρίζονται ως μη νοηματικές ή προσθήκες απαλοιφές (Guan, Mao et al. 2011b). Στη δική μας μελέτη ανιχνεύθηκαν 4 μη-νοηματικές και μία συνώνυμη μετάλλαξη. Οι συνώνυμες μεταλλάξεις, παρόλο που δεν προκαλούν κάποια αμινοξική αλλαγή στην πρωτεΐνη, συχνά έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δευτεροταγούς δομής του mRNA μορίου. Κατά συνέπεια, το mRNA χάνει τη σταθερότητά του, αναδιπλώνεται ή αναδιοργανώνεται από τα ριβοσώματα με μικρότερη αποτελεσματικότητα στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οδηγώντας σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης (Faheem, Zhang et al. 2021).

Η σημασία της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης ARID1A ερευνάται στη μελέτη των Mao, Ardighieri et al. 2013, οι οποίοι μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε ενδομητριοειδή καρκινώματα διαφορετικών σταδίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, όσο πιο προχωρημένο είναι το στάδιο του καρκίνου, τόσο περισσότερα δείγματα εμφάνιζαν απώλεια της έκφρασης της ARID1A πρωτεΐνης. Η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης ARID1A εξασφαλίζει στο κύτταρο υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (Guan, Mao et al. 2011).

Η μελέτη της κατανομής των μεταλλάξεων του *ARID1A* γονιδίου, του συσχετισμού των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης και των κλινικών ευρημάτων αποτελεί μελλοντικό στόχο πολλών μελετών. Στη δική μας μελέτη παρέχονται ενδείξεις για την κατανομή μεταλλάξεων του *ARID1A* γονιδίου σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Περιοριστικοί παράγοντες της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός δειγμάτων, καθώς επίσης και ο περιορισμένος αριθμός των γονιδιακών περιοχών που αναλύθηκαν. Η ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων θα προσφέρει τη δυνατότητα πραγματοποίησης συσχετίσεων μεταξύ της κατανομής των μεταλλάξεων, των υπότυπων του καρκίνου του ενδομητρίου και των σταδίων της νόσου. Επιπρόσθετα, η χαρτογράφηση ολόκληρου του *ARID1A* γονιδίου θα συμβάλλει στην καλύτερη ταυτοποίηση των μεταλλάξεων και του πιθανού τους ρόλου στην εξέλιξη της νόσου.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (2015). "Practice Bulletin No. 149: Endometrial cancer." *Obstet Gynecol* **125**(4): 1006-1026.
- Amant, F., P. Moerman, P. Neven, D. Timmerman, E. Van Limbergen and I. Vergote (2005). "Endometrial cancer." *Lancet* **366**(9484): 491-505.
- Annunziato, A. (2008). "DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin." *Nature Education* **1**(1): 26.
- Bai, J., Q. R. Qi, Y. Li, R. Day, J. Makhoul, R. R. Magness and D. B. Chen (2020). "Estrogen Receptors and Estrogen-Induced Uterine Vasodilation in Pregnancy." *Int J Mol Sci* **21**(12).
- Bateman, N. W., Y. Shoji, K. A. Conrads, K. D. Stroop, C. A. Hamilton, K. M. Darcy, G. L. Maxwell, J. I. Risinger and T. P. Conrads (2016). "Identification and functional characterization of a novel bipartite nuclear localization sequence in ARID1A." *Biochem Biophys Res Commun* **469**(1): 114-119.
- Belandia, B., R. L. Orford, H. C. Hurst and M. G. Parker (2002). "Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes." *EMBO J* **21**(15): 4094-4103.
- Bio-rad. "A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection."
- Bokhman, J. V. (1983). "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma." *Gynecol Oncol* **15**(1): 10-17.
- Bosse, T., N. T. ter Haar, L. M. Seeber, P. J. v Diest, F. J. Hes, H. F. Vasen, R. A. Nout, C. L. Creutzberg, H. Morreau and V. T. Smit (2013). "Loss of ARID1A expression and its relationship with PI3K-Akt pathway alterations, TP53 and microsatellite instability in endometrial cancer." *Mod Pathol* **26**(11): 1525-1535.
- Braun, M. M., E. A. Overbeek-Wager and R. J. Grumbo (2016). "Diagnosis and Management of Endometrial Cancer." *Am Fam Physician* **93**(6): 468-474.
- Brinton, L. A., A. S. Felix, D. S. McMeekin, W. T. Creasman, M. E. Sherman, D. Mutch, D. E. Cohn, J. L. Walker, R. G. Moore, L. S. Downs, R. A. Soslow and R. Zaino (2013). "Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial." *Gynecol Oncol* **129**(2): 277-284.
- Cancer Genome Atlas Research, N., C. Kandoth, N. Schultz, A. D. Cherniack, R. Akbani, Y. Liu, H. Shen, A. G. Robertson, I. Pashtan, R. Shen, C. C. Benz, C. Yau, P. W. Laird, L. Ding, W. Zhang, G. B. Mills, R. Kucherlapati, E. R. Mardis and D. A. Levine (2013). "Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma." *Nature* **497**(7447): 67-73.
- Chandler, R. L., J. Brennan, J. C. Schisler, D. Serber, C. Patterson and T. Magnuson (2013). "ARID1a-DNA interactions are required for promoter occupancy by SWI/SNF." *Mol Cell Biol* **33**(2): 265-280.
- Chang, Z., S. Talukdar, S. A. Mullany and B. Winterhoff (2019). "Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications." *Curr Opin Obstet Gynecol* **31**(1): 24-30.
- Clapier, C. R. and B. R. Cairns (2009). "The biology of chromatin remodeling complexes." *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304.
- Collins, R. T., T. Furukawa, N. Tanese and J. E. Treisman (1999). "Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes." *EMBO J* **18**(24): 7029-7040.
- Dallas, P. B., S. Pacchione, D. Wilsker, V. Bowrin, R. Kobayashi and E. Moran (2000). "The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity." *Mol Cell Biol* **20**(9): 3137-3146.
- Do, H. and A. Dobrovic (2015). "Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization." *Clin Chem* **61**(1): 64-71.
- Faheem, M., C. J. Zhang, M. N. Morris, J. Pleiss and P. Oelschlaeger (2021). "Role of Synonymous Mutations in the Evolution of TEM beta-Lactamase Genes." *Antimicrob Agents Chemother* **65**(6).
- Flores-Alcantar, A., A. Gonzalez-Sandoval, D. Escalante-Alcalde and H. Lomeli (2011). "Dynamics of expression of ARID1A and ARID1B subunits in mouse embryos and in cells during the cell cycle." *Cell Tissue Res* **345**(1): 137-148.
- Gaunt, A. M. and E. Mayeaux (2007). *Diagnosis and management of dysfunctional uterine bleeding*, CME Bulletin, The American academy of family physicians.

Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." *Oncogene* **24**(50): 7410-7425.

Guan, B., M. Gao, C. H. Wu, T. L. Wang and M. Shih Ie (2012). "Functional analysis of in-frame indel ARID1A mutations reveals new regulatory mechanisms of its tumor suppressor functions." *Neoplasia* **14**(10): 986-993.

Guan, B., T. L. Mao, P. K. Panuganti, E. Kuhn, R. J. Kurman, D. Maeda, E. Chen, Y. M. Jeng, T. L. Wang and M. Shih Ie (2011). "Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma." *Am J Surg Pathol* **35**(5): 625-632.

Guan, B., T. L. Wang and M. Shih Ie (2011). "ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers." *Cancer Res* **71**(21): 6718-6727.

Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J. A. Gustafsson (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." *Physiol Rev* **87**(3): 905-931.

Helling, R. B., H. M. Goodman and H. W. Boyer (1974). "Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis." *J Virol* **14**(5): 1235-1244.

Helming, K. C., X. Wang, B. G. Wilson, F. Vazquez, J. R. Haswell, H. E. Manchester, Y. Kim, G. V. Kryukov, M. Ghandi, A. J. Aguirre, Z. Jagani, Z. Wang, L. A. Garraway, W. C. Hahn and C. W. Roberts (2014). "ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers." *Nat Med* **20**(3): 251-254.

Ho, L. and G. R. Crabtree (2010). "Chromatin remodelling during development." *Nature* **463**(7280): 474-484.

Inoue, H., T. Furukawa, S. Giannakopoulos, S. Zhou, D. S. King and N. Tanese (2002). "Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors." *J Biol Chem* **277**(44): 41674-41685.

Iqbal, N. and N. Iqbal (2014). "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications." *Mol Biol Int* **2014**: 852748.

Jones, S., T. L. Wang, M. Shih Ie, T. L. Mao, K. Nakayama, R. Roden, R. Glas, D. Slamon, L. A. Diaz, Jr., B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu and N. Papadopoulos (2010). "Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma." *Science* **330**(6001): 228-231.

Karger, B. L. and A. Guttman (2009). "DNA sequencing by CE." *Electrophoresis* **30 Suppl 1**: S196-202.

Kokkat, T. J., M. S. Patel, D. McGarvey, V. A. LiVolsi and Z. W. Baloch (2013). "Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein." *Biopreserv Biobank* **11**(2): 101-106.

Koonin, E. V. (2005). "Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics." *Annual Reviews* **39**: 309-338.

Lebuhn, M., J. Derenko, A. Rademacher, S. Helbig, B. Munk, A. Pechtl, Y. Stolze, S. Prowe, W. H. Schwarz, A. Schluter, W. Liebl and M. Klocke (2016). "DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison." *Bioengineering (Basel)* **3**(1).

Lee, P. Y., J. Costumbrado, C. Y. Hsu and Y. H. Kim (2012). "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments." *J Vis Exp*(62).

Lemon, B., C. Inouye, D. S. King and R. Tjian (2001). "Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription." *Nature* **414**(6866): 924-928.

Lipsick, J. (2020). "A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **12**(2).

Lowery, W. J., J. M. Schildkraut, L. Akushevich, R. Bentley, J. R. Marks, D. Huntsman and A. Berchuck (2012). "Loss of ARID1A-associated protein expression is a frequent event in clear cell and endometrioid ovarian cancers." *Int J Gynecol Cancer* **22**(1): 9-14.

Lu, K. H. and R. R. Broaddus (2020). "Endometrial Cancer." *N Engl J Med* **383**(21): 2053-2064.

Ludyga, N., B. Grunwald, O. Azimzadeh, S. Englert, H. Hofler, S. Tapio and M. Aubele (2012). "Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses." Virchows Arch **460**(2): 131-140.

Mao, T. L., L. Ardighieri, A. Ayhan, K. T. Kuo, C. H. Wu, T. L. Wang and M. Shih le (2013). "Loss of ARID1A expression correlates with stages of tumor progression in uterine endometrioid carcinoma." Am J Surg Pathol **37**(9): 1342-1348.

Mao, T. L. and M. Shih le (2013). "The roles of ARID1A in gynecologic cancer." J Gynecol Oncol **24**(4): 376-381.

Martens, J. A. and F. Winston (2003). "Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes." Curr Opin Genet Dev **13**(2): 136-142.

McConechy, M. K., J. Ding, M. C. Cheang, K. Wiegand, J. Senz, A. Tone, W. Yang, L. Prentice, K. Tse, T. Zeng, H. McDonald, A. P. Schmidt, D. G. Mutch, J. N. McAlpine, M. Hirst, S. P. Shah, C. H. Lee, P. J. Goodfellow, C. B. Gilks and D. G. Huntsman (2012). "Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas." J Pathol **228**(1): 20-30.

Menczer, J. (2015). "Review of Recommended Treatment of Uterine Carcinosarcoma." Curr Treat Options Oncol **16**(11): 53.

Morice, P., A. Leary, C. Creutzberg, N. Abu-Rustum and E. Darai (2016). "Endometrial cancer." Lancet **387**(10023): 1094-1108.

Murali, R., D. F. Delair, S. M. Bean, N. R. Abu-Rustum and R. A. Soslow (2018). "Evolving Roles of Histologic Evaluation and Molecular/Genomic Profiling in the Management of Endometrial Cancer." J Natl Compr Canc Netw **16**(2): 201-209.

Nagl, N. G., Jr., A. Patsialou, D. S. Haines, P. B. Dallas, G. R. Beck, Jr. and E. Moran (2005). "The p270 (ARID1A/SMARCF1) subunit of mammalian SWI/SNF-related complexes is essential for normal cell cycle arrest." Cancer Res **65**(20): 9236-9244.

Nagl, N. G., Jr., X. Wang, A. Patsialou, M. Van Scoy and E. Moran (2007). "Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control." EMBO J **26**(3): 752-763.

NCCN. (2017). "Uterine Neoplasms." Version 2.2017.

Neely, K. E., A. H. Hassan, C. E. Brown, L. Howe and J. L. Workman (2002). "Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits." Mol Cell Biol **22**(6): 1615-1625.

Nie, Z., Y. Xue, D. Yang, S. Zhou, B. J. Deroo, T. K. Archer and W. Wang (2000). "A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex." Mol Cell Biol **20**(23): 8879-8888.

Nussbaum, R. L., R. R. McInnes and H. F. Willard (2011). Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Philadelphia, Broken Hill Publishers LTD.

Peterson, C. L. and J. L. Workman (2000). "Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex." Curr Opin Genet Dev **10**(2): 187-192.

Pulice, J. L. and C. Kadoch (2016). "Composition and Function of Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Human Disease." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **81**: 53-60.

Reisman, D., S. Glaros and E. A. Thompson (2009). "The SWI/SNF complex and cancer." Oncogene **28**(14): 1653-1668.

Robertshaw, I., F. Bian and S. K. Das (2016). "Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update." J Mol Endocrinol **56**(3): R127-138.

Russell, P. J. (2006). iGenetics: A Mendelian Approach, Benjamin Cummings.

Russell, P. J. (2006). iGenetics: A Mendelian Approach, Pearson Education, Inc. - Benjamin Cummings.

Sant, M., M. D. Chirlaque Lopez, R. Agresti, M. J. Sanchez Perez, B. Holleccek, M. Bielska-Lasota, N. Dimitrova, K. Innos, A. Katalinic, H. Langseth, N. Larranaga, S. Rossi, S. Siesling, P. Minicozzi and E.-W. Group (2015). "Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: Results of the EURO CARE-5 study." Eur J Cancer **51**(15): 2191-2205.

Shain, A. H. and J. R. Pollack (2013). "The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers." *PLoS One* **8**(1): e55119.

Sherwood, L. (2013). *Introduction to Human Physiology*, Yolanda Cossio.

Sorosky, J. I. (2012). "Endometrial cancer." *Obstet Gynecol* **120**(2 Pt 1): 383-397.

Streppel, M. M., S. Lata, M. DelaBastide, E. A. Montgomery, J. S. Wang, M. I. Canto, A. M. Macgregor-Das, S. Pai, F. H. Morsink, G. J. Offerhaus, E. Antoniou, A. Maitra and W. R. McCombie (2014). "Next-generation sequencing of endoscopic biopsies identifies ARID1A as a tumor-suppressor gene in Barrett's esophagus." *Oncogene* **33**(3): 347-357.

ThermoScientific. (2009). "User Manual NanoDrop 2000/2000c, Spectrophotometer V1.0."

Toumpeki, C., A. Liberis, I. Tsirkas, T. Tsirka, S. Kalagasidou, L. Inagamova, X. Anthoulaki, G. Tsatsaris and E. N. Kontomanolis (2019). "The Role of ARID1A in Endometrial Cancer and the Molecular Pathways Associated With Pathogenesis and Cancer Progression." *In Vivo* **33**(3): 659-667.

Travaglino, A., A. Raffone, G. Saccone, A. Mollo, G. De Placido, L. Insabato and F. Zullo (2019). "Endometrial hyperplasia and the risk of coexistent cancer: WHO versus EIN criteria." *Histopathology* **74**(5): 676-687.

Trojano, G., C. Olivieri, R. Tinelli, G. R. Damiani, A. Pellegrino and E. Cicinelli (2019). "Conservative treatment in early stage endometrial cancer: a review." *Acta Biomed* **90**(4): 405-410.

Tropp, B. E. (2014). *Principles of Molecular Biology*. Burlington, Kevin Sullivan.

Trouche, D., C. Le Chalony, C. Muchardt, M. Yaniv and T. Kouzarides (1997). "RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11268-11273.

Verma, M., S. Kulshrestha and A. Puri (2017). "Genome Sequencing." *Methods Mol Biol* **1525**: 3-33.

von Mikecz, A. (2006). "The nuclear ubiquitin-proteasome system." *J Cell Sci* **119**(Pt 10): 1977-1984.

Wang, W., Y. Xue, S. Zhou, A. Kuo, B. R. Cairns and G. R. Crabtree (1996). "Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes." *Genes Dev* **10**(17): 2117-2130.

Wang, X., N. G. Nagl, Jr., S. Flowers, D. Zweitzig, P. B. Dallas and E. Moran (2004). "Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors." *Int J Cancer* **112**(4): 636.

Wang, Y., L. Hoang, J. X. Ji and D. G. Huntsman (2020). "SWI/SNF Complex Mutations in Gynecologic Cancers: Molecular Mechanisms and Models." *Annu Rev Pathol* **15**: 467-492.

Wang, Z., K. Chen, Y. Jia, J. C. Chuang, X. Sun, Y. H. Lin, C. Celen, L. Li, F. Huang, X. Liu, D. H. Castrillon, T. Wang and H. Zhu (2020). "Dual ARID1A/ARID1B loss leads to rapid carcinogenesis and disruptive redistribution of BAF complexes." *Nat Cancer* **1**(9): 909-922.

Waugh, A. and A. Grant (2009). *Ross and Wilson: Anatomy and Physiology in Health and Illness*, Churchill Livingstone.

Werle, E., C. Schneider, M. Renner, M. Volker and W. Fiehn (1994). "Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing." *Nucleic Acids Res* **22**(20): 4354-4355.

Wiegand, K. C., A. F. Lee, O. M. Al-Agha, C. Chow, S. E. Kalloger, D. W. Scott, C. Steidl, S. M. Wiseman, R. D. Gascoyne, B. Gilks and D. G. Huntsman (2011). "Loss of BAF250a (ARID1A) is frequent in high-grade endometrial carcinomas." *J Pathol* **224**(3): 328-333.

Wiegand, K. C., S. P. Shah, O. M. Al-Agha, Y. Zhao, K. Tse, T. Zeng, J. Senz, M. K. McConechy, M. S. Anglesio, S. E. Kalloger, W. Yang, A. Heravi-Moussavi, R. Giuliany, C. Chow, J. Fee, A. Zayed, L. Prentice, N. Melnyk, G. Turashvili, A. D. Delaney, J. Madore, S. Yip, A. W. McPherson, G. Ha, L. Bell, S. Fereday, A. Tam, L. Galletta, P. N. Tonin, D. Provencher, D. Miller, S. J. Jones, R. A. Moore, G. B. Morin, A. Oloumi, N. Boyd, S. A. Aparicio, M. Shih le, A. M. Mes-Masson, D. D. Bowtell, M. Hirst, B. Gilks, M. A. Marra and D. G. Huntsman (2010). "ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas." *N Engl J Med* **363**(16): 1532-1543.

Wilsker, D., L. Probst, H. M. Wain, L. Maltais, P. W. Tucker and E. Moran (2005). "Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins." *Genomics* **86**(2): 242-251.

Wu, J. N. and C. W. Roberts (2013). "ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor?" *Cancer Discov* **3**(1): 35-43.

- Wu, R. C., T. L. Wang and M. Shih le (2014). "The emerging roles of ARID1A in tumor suppression." Cancer Biol Ther **15**(6): 655-664.
- Yang, Y., W. Bao, Z. Sang, Y. Yang, M. Lu and X. Xi (2018). "Microarray pathway analysis indicated that mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase and insulin growth factor 1 signaling pathways were inhibited by small interfering RNA against AT-rich interactive domain 1A in endometrial cancer." Oncol Lett **15**(2): 1829-1838.
- Yen, T. T., T. L. Wang, A. N. Fader, I. M. Shih and S. Gaillard (2020). "Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer." Int J Gynecol Pathol **39**(1): 26-35.
- Yoshinaga, S. K., C. L. Peterson, I. Herskowitz and K. R. Yamamoto (1992). "Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors." Science **258**(5088): 1598-1604.
- Zhang, Y. and X. Wang (2020). "Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer." J Hematol Oncol **13**(1): 165.
- Zonta, E., P. Nizard and V. Taly (2015). "Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research." Adv Clin Chem **70**: 197-246.
- Ζίφα, Α. (2017). Διακυτταρική Επικοινωνία Μεταγωγή Σήματος. Βόλος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Μεσσήνης, Ι. Ε. (2005). Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία, Mdcommunications.