



**IN VITRO ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΟΕΙΔΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
(EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR – EGFR)**

ΜΑΡΙΑ ΤΟΚΗ

ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ Γ΄ΠΠΚ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ MASTER:

**ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΘΩΡΑΚΟΣ: “ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ & ΕΡΕΥΝΑ”**

ΕΤΟΣ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Κωνσταντίνος Ν. Συρίγος - Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας,
Διευθυντής, Γ' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ,
ΓΝΝΘΑ «Η Σωτηρία»

ΕΚΠΑ ΜΕΛΟΣ: Παρασκευή Ρούσσου - Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας
Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΝΘΑ
«Η Σωτηρία»

ΜΕΛΟΣ: Ανδριανή Χαρτίδου – Πνευμονολόγος, Επιστημονικός Συνεργάτης
Ογκολογικής Μονάδας, Γ' Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, ΓΝΝΘΑ
«Η Σωτηρία»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Καθηγητή Παθολογίας - Ογκολογίας κ. Κωνσταντίνο Ν. Συρίγο, Διευθυντή της Γ΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής και Ογκολογικής μονάδας και επιστημονικό υπεύθυνο του ΠΜΣ «Ογκολογία θώρακος», τους συνεργάτες του κ. Παρασκευή Ρούσσου και κ. Ανδριανή Χαρπίδου καθώς και όλη την επιστημονική ομάδα του ΠΜΣ.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΙΤΛΟΣ	1
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
Εισαγωγή	11
1. Επιδημιολογικά στοιχεία	11
2. Παράγοντες κινδύνου.....	15
2.1 Κάπνισμα	15
2.2 Παθητικό κάπνισμα	15
2.3 Διατροφή	16
2.4 Αλκοόλ.....	16
2.5 Άσκηση.....	16
2.6 Περιβαλλοντική μόλυνση.....	17
2.7 Επαγγελματική έκθεση.....	17
2.8 Γενετικοί παράγοντες.....	17
3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR.....	19

4. Μεταλλάξεις του EGFR	21
5. Αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR	24
Τεχνικές και Μέθοδοι.....	31
1. Tissue Microarray (TMA).....	31
2. Μέθοδος ποσοτικοποίησης σήματος ανοσοφθορισμού AQUA [Automated Quantitative Immunofluorescence (QIF)]	34
3. Proximity Ligation Assay (PLA)	37
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
Υλικά, ασθενείς και μέθοδοι.....	42
1. Κυτταρικές σειρές και Western Blot.....	42
2. Proximity Ligation Assay (PLA)	45
3. Ποσοτική μέτρηση του φθορίζοντος σήματος με τη μέθοδο AQUA	49
4. Tissue Microarray (TMA).....	50
5. Στατιστική ανάλυση.....	51
Αποτελέσματα	52
Συζήτηση.....	65
ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΣΥΝΟΨΗ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR) αποτελεί θεραπευτικό στόχο στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (ΜΜΚΠ), ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με αδеноκαρκίνωμα που φέρουν μεταλλάξεις του EGFR. Αυτή η ομάδα ασθενών με παρουσία μεταλλάξεων που προκαλούν ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει βρεθεί ότι έχουν καλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη, ανεξάρτητα από το στάδιο νόσου ή τη θεραπεία. Ωστόσο, τα δεδομένα για τον προγνωστικό ρόλο της ολικής έκφρασης του EGFR στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, όπως μετράται με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας είναι αντικρουόμενα, με τις περισσότερες μελέτες να μην έχουν δείξει προγνωστική σημασία. Η εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου του EGFR με τη χρήση φθορίζοντος in situ υβριδισμού (fluorescent in situ hybridization - FISH) δεν έχει δείξει επίσης με συνέπεια συσχέτισμό με την πρόγνωση. Η τεχνική PLA (Proximity ligation assay) είναι μία μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σχετιζόμενων με λειτουργική σηματοδότηση. Το PLA έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του EGFR και του GRB2 (Growth factor receptor bound protein 2). Το GRB2 είναι μία πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται στο φωσφορυλιωμένο ενεργοποιημένο

υποδοχέα και η αλληλεπίδραση τους σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK.

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική PLA χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ EGFR και GRB2, η οποία μετρήθηκε ποσοτικά με τη χρήση της τεχνολογίας AQUA® [Automated Quantitative Immunofluorescence (QIF)]. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ποσοτική μέτρηση του σήματος του ανοσοφθορισμού. Το EGFR:GRB2 PLA βρέθηκε ότι σχετίζεται με την παρουσία ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) του ενδοκυττάριου τμήματος (τυροσινικής κινάσης) του EGFR σε 6 κυτταρικές σειρές, όπως μετρήθηκε με Western Blot. Το PLA ποσοτικοποιημένο με τη χρήση της AQUA, πέτυχε την αντικειμενική και αναπαραγώγιμη μέτρηση της αλληλεπίδρασης του EGFR και του GRB2 σε συνεχόμενες τομές της ίδιας αλλά και διαφορετικών περιοχών του όγκου.

ABSTRACT

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a therapeutic target in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) for first-line treatment in EGFR mutant adenocarcinoma patients. The presence of activating mutations is associated with better overall survival compared to patients with wild type receptor, irrespective of stage and treatment. However, the data about the prognostic role of overall EGFR expression measured by immunohistochemistry (IHC) in NSCLC are conflicting with most studies showing no prognostic effect. EGFR gene copy number assessment by fluorescent in situ hybridization (FISH) has also failed to show a consistent association between increased EGFR gene copy number and prognosis. Proximity ligation assay (PLA) is a method to detect functional signaling associated protein complexes. In previous studies, PLA has been used to detect the interaction between EGFR and growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2). GRB2 is an adaptor protein which binds to the phosphorylated residues of active receptor. The interaction between EGFR and GRB2 correlates with active EGFR signaling and leads to activation of MAPK/ERK pathway.

A PLA developed to detect EGFR:GRB2 interaction was measured by quantitative immunofluorescence (QIF) using AQUA® (Automated Quantitative Immunofluorescence) technology. EGFR pathway activation was assessed in 6 cell lines with different mutation status and overall EGFR expression. PLA

measured by AQUA was found to be correlated to p-EGFR as measured by Western Blot in the 6 cell lines. Additionally, PLA measured by AQUA subjectively and reproducibly assessed EGFR:GRB2 interaction in serial cuts and different patient tumor blocks.

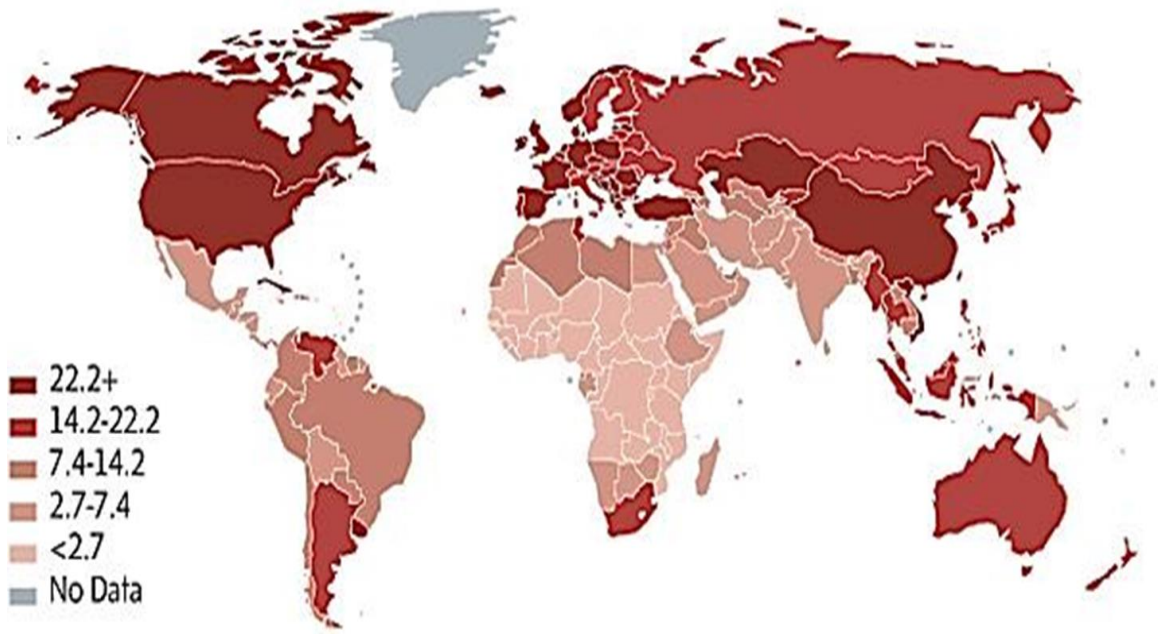
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

1. Επιδημιολογικά στοιχεία

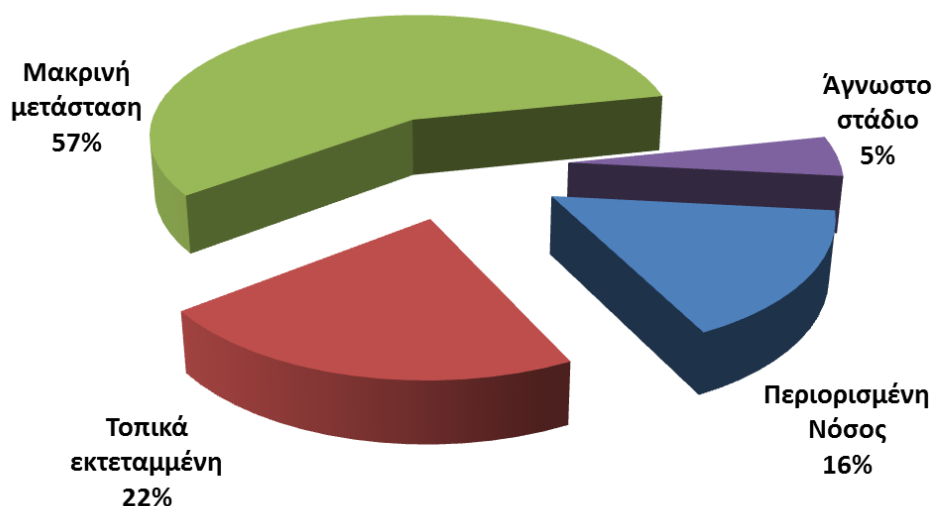
Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί έναν από τους συχνότερους και πιο θανατηφόρους τύπους κακοήθειας τόσο στον ανεπτυγμένο όσο και στον αναπτυσσόμενο κόσμο (εικόνα 1), αποτελώντας το 13,3% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες. Παρόλο που η επίπτωση και η θνησιμότητα έχουν μειωθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πάνω από 200.000 ασθενείς διαγνώστηκαν με καρκίνο πνεύμονα το 2015 και πάνω από 100.000 απεβίωσαν σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία από τις Ηνωμένες Πολιτείες, αποτελώντας την πιο συχνή αιτία θανάτου σε ασθενείς με κακοήθεια [1, 2]. Συγκεκριμένα, το ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης για όλα τα στάδια της νόσου δεν ξεπερνά το 17,4%. Κατά τη διάγνωση, περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς (57%) βρίσκονται ήδη σε προχωρημένο στάδιο νόσου με απομακρυσμένες μεταστάσεις (γράφημα 1). Το αντίκτυπο που έχει στην επιβίωση είναι ανάλογο, με μόνο 4,2% ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης. Αντίθετα, στις περιπτώσεις που η διάγνωση έγινε όσο η νόσος ήταν σε περιορισμένο στάδιο, το ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης φτάνει το 54,8% το οποίο όμως παραμένει εξαιρετικά χαμηλό. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 70 έτη με αυξημένη συχνότητα στις ηλικιακές ομάδες από 55-84 έτη, χωρίς να υπάρχει φυλετική διαφορά στην επίπτωση της νόσου. Παρομοίως η μέση ηλικία θανάτου είναι τα 72 έτη με αυξημένη πιθανότητα θανάτου στις ηλικιακές ομάδες από 65-84 έτη [3].

Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να διακριθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τον ιστολογικό τους τύπο, στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) και τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΠ). Ο ΜΜΚΠ αποτελεί το 85% των περιπτώσεων [4, 5] και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων δύο βασικούς υποτύπους: το αδenoκαρκίνωμα και το πλακώδες καρκίνωμα. Αυτοί οι δύο υπότυποι διαφέρουν τόσο ιστολογικά όσο και κλινικά με διαφορετική συμπτωματολογία και εντόπιση.

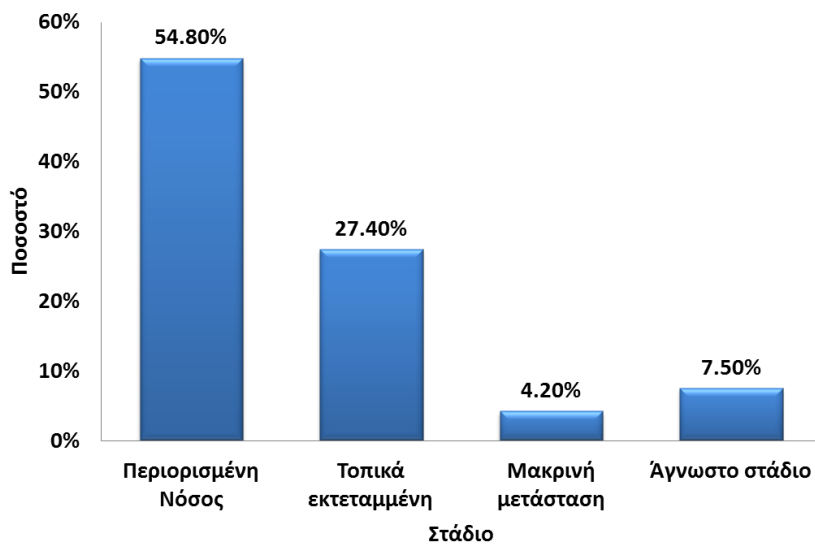


Εικόνα 1: Θνησιμότητα από καρκίνο πνεύμονα ανά 100,000 κατοίκους στον κόσμο

Ποσοστό περιπτώσεων ανά στάδιο κατά τη διάγνωση



5-ετής επιβίωση ανά στάδιο κατά τη διάγνωση



Γράφημα 1: Ποσοστό περιπτώσεων ανά στάδιο κατά τη διάγνωση και 5-ετής επιβίωση ανάλογα με το στάδιο κατά τη διάγνωση

2. Παράγοντες κινδύνου

2.1 Κάπνισμα

Το κάπνισμα αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Η μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του πνεύμονα που έχει παρατηρηθεί τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες όσο και στο Ηνωμένο Βασίλειο (γράφημα 2) πιθανόν αντανακλά τη σταδιακή μείωση του αριθμού των καπνιστών, η οποία έχει παρατηρηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Δυστυχώς όμως παρά τη φαινομενική μείωση, ο καρκίνος του πνεύμονα θα συνεχίσει να αποτελεί την πιο θανατηφόρο κακοήθεια εκτός και αν ληφθούν σοβαρά μέτρα για τη διακοπή του καπνίσματος [6]. Περισσότερες από 20 καρκινογόνες ουσίες υπάρχουν στον καπνό, οι οποίες σχετίζονται με επίκτητες μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό [7].

2.2 Παθητικό κάπνισμα

Η συσχέτιση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να δικαιολογήσει έως και 1,6% των νέων περιπτώσεων [8]. Τα αποτελέσματα μετα-αναλύσεων [9, 10] έχουν αναφέρει αύξηση του σχετικού κινδύνου από 1,14 έως και 5,20 σε ασθενείς που ενώ δεν ήταν καπνιστές, συγκατοικούσαν με καπνιστή. Ειδικά το παθητικό κάπνισμα της παιδικής ηλικίας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου έως και 3,6 φορές [11].

2.3 Διατροφή

Η διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά έχει σχετισθεί με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα και άλλων κακοηθειών καθώς είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά και καροτενοειδή [12-15]. Επίσης, διατροφή πλούσια σε βιταμίνες C και E έχει βρεθεί να έχει προστατευτικό ρόλο. Αντίθετα, ενώ η πρόσληψη συγκεκριμένου τύπου λιπαρών δεν έχει φανεί να έχει καμία επίδραση στην επίπτωση της νόσου, η κατανάλωση παστών κρεάτων και τηγανητών αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα [12-15].

2.4 Αλκοόλ

Μία συγκεντρωτική ανάλυση με περίπου 400.000 ασθενείς και πάνω από 3.000 περιστατικά καρκίνου πνεύμονα από 7 διαφορετικές προοπτικές μελέτες, έδειξε μικρή αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου πνεύμονα με την κατανάλωση πάνω από 30 g/d αλκοόλ ημερησίως [16].

2.5 Άσκηση

Η φυσική άσκηση έχει σχετιστεί με 13-30% μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου πνεύμονα στο γενικό πληθυσμό αλλά και συγκεκριμένα σε βαρείς καπνιστές, έχοντας ευνοϊκή επίδραση ακόμα και στη θνησιμότητα [17-20].

2.6 Περιβαλλοντική μόλυνση

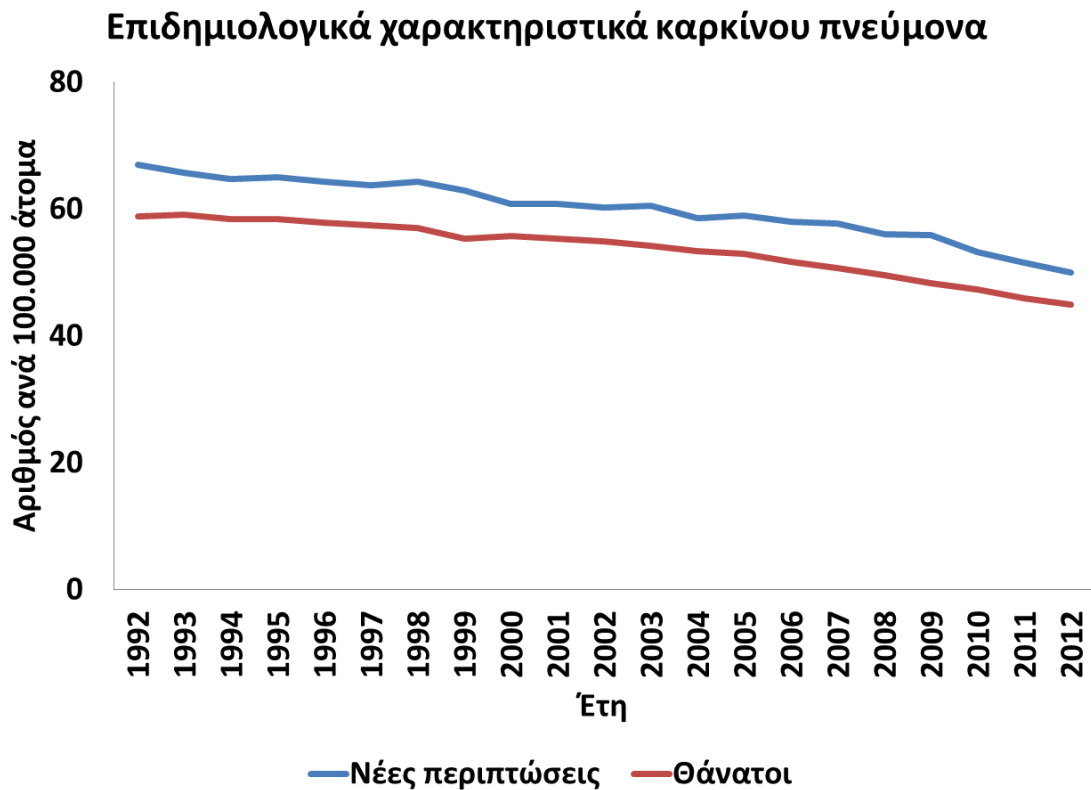
Η περιβαλλοντική μόλυνση και η μακροχρόνια έκθεση σε εκπεμπόμενους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα. Συγκεκριμένα περίπου 11% των περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα σε αστικές περιοχές της Ευρώπης μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικούς ρίπους [21].

2.7 Επαγγελματική έκθεση

Το πυρίτιο και ο άσβεστος έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα ειδικά σε ομάδες που εκτίθενται σε αυτά τα υλικά στο εργασιακό τους περιβάλλον. Επίσης η εξόρυξη ουρανίου καθώς και η επαφή με αυτό από ομάδες που δουλεύουν σε πυρηνικά εργοστάσια αυξάνει κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα [21].

2.8 Γενετικοί παράγοντες

Πολλοί γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες έχουν σχετισθεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου πνεύμονα. Οι γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, με ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο μεταξύ των καπνιστών [22]. Παρόμοια, μεταλλάξεις σε πρωτείνες σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του υποδοχέα του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR) και της πρωτεΐνης KRAS, έχουν ανιχνευτεί σε πολλές περιπτώσεις ΜΜΚΠ [23].



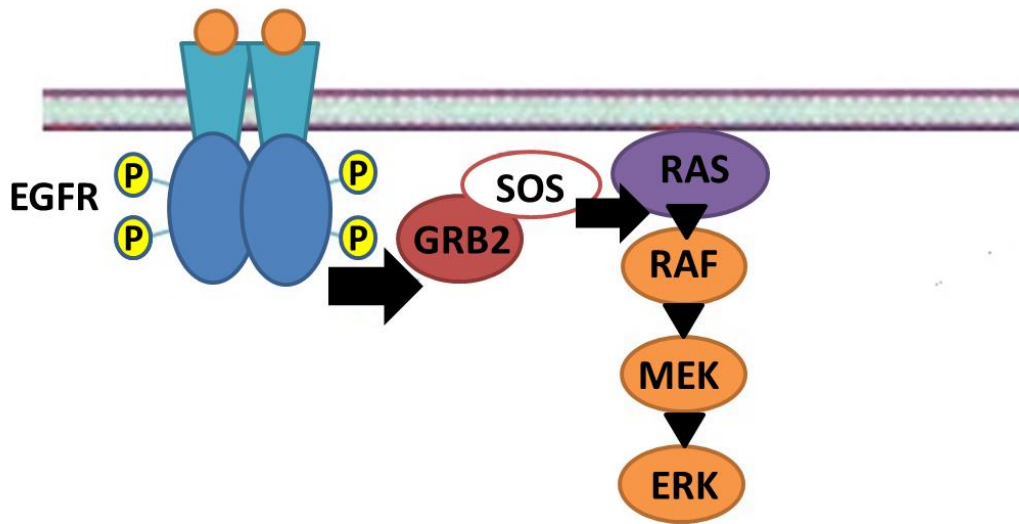
Γράφημα 2: Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά καρκίνου του πνεύμονα.

Αριθμός νέων περιπτώσεων και θανάτων ανά 100.000 πληθυσμό

3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR

Το μονοπάτι του EGFR είναι ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια που ρυθμίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων των θηλαστικών. Ο υποδοχέας EGFR (ErbB1/HER1) είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων τυροσινικής κινάσης ErbB, στην οποία ανήκουν επίσης οι υποδοχείς ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) και ErbB4 (HER4). Διάφοροι συνδέτες (ligands) μπορούν να προσδεθούν στον EGFR και να δράσουν ως αγωνιστές, μεταξύ των οποίων και ο επιδερμοειδής αυξητικός παράγοντας (EGF), ο οποίος έχει πολύ ισχυρή συγγένεια με τον υποδοχέα. Διαταραχή της φυσιολογικής σηματοδότησης έχει σχετισθεί με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του ΜΜΚΠ που αποτελεί το 85% όλων των τύπων καρκίνου πνεύμονα [4, 5].

Ο υποδοχέας EGFR είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 170 kDa, η οποία εκφράζεται σε διαφορετικό βαθμό σε 50 - 90% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ [24]. Με την πρόσδεση του αγωνιστή στον υποδοχέα, σχηματίζονται ομο- και ετερο- διμερή με άλλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς και στη συνέχεια ο υποδοχέας αυτοφωσφορυλιώνεται. Με τη φωσφορυλίωση της περιοχής τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα, η πρωτεΐνη GRB2 (Growth factor receptor bound protein 2) προσδένεται στον υποδοχέα μέσω της περιοχής SH2 [25], με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS. Έτσι ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι MEK/ERK που παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και επιβίωση του όγκου [26] (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR και η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών MEK/ERK

4. Μεταλλάξεις του EGFR

Μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR [27] ανευρίσκονται σε περίπου 10% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα του δυτικού πολιτισμού και σχεδόν 50% σε Ασιάτες ασθενείς. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται στα εξόνια 18 έως 21 [28] (εικόνα 3), τα οποία κωδικοποιούν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής τυροσινικής κινάσης όπου γίνεται η πρόσδεση των πρωτεϊνών σηματοδότησης. Οι πιο κοινές και περισσότερο μελετημένες μεταλλάξεις, που αποτελούν το 80 - 90% όλων των μεταλλάξεων του EGFR στο MMKP [29, 30], είναι διαγραφές στο εξόνιο 19 και αντικαταστάσεις του αμινοξέος λευκίνη με αργινίνη στη θέση 858 (L858R) στο εξόνιο 21 [31]. Περίπου 10% των ασθενών έχουν σπανιότερες μεταλλάξεις του EGFR, σε τύπο και θέση, όπως αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 18 με συχνότερη τη G719A (~5%), στο εξόνιο 20 (4-10%) καθώς επίσης και εισαγωγές νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 19 [30, 32-37].

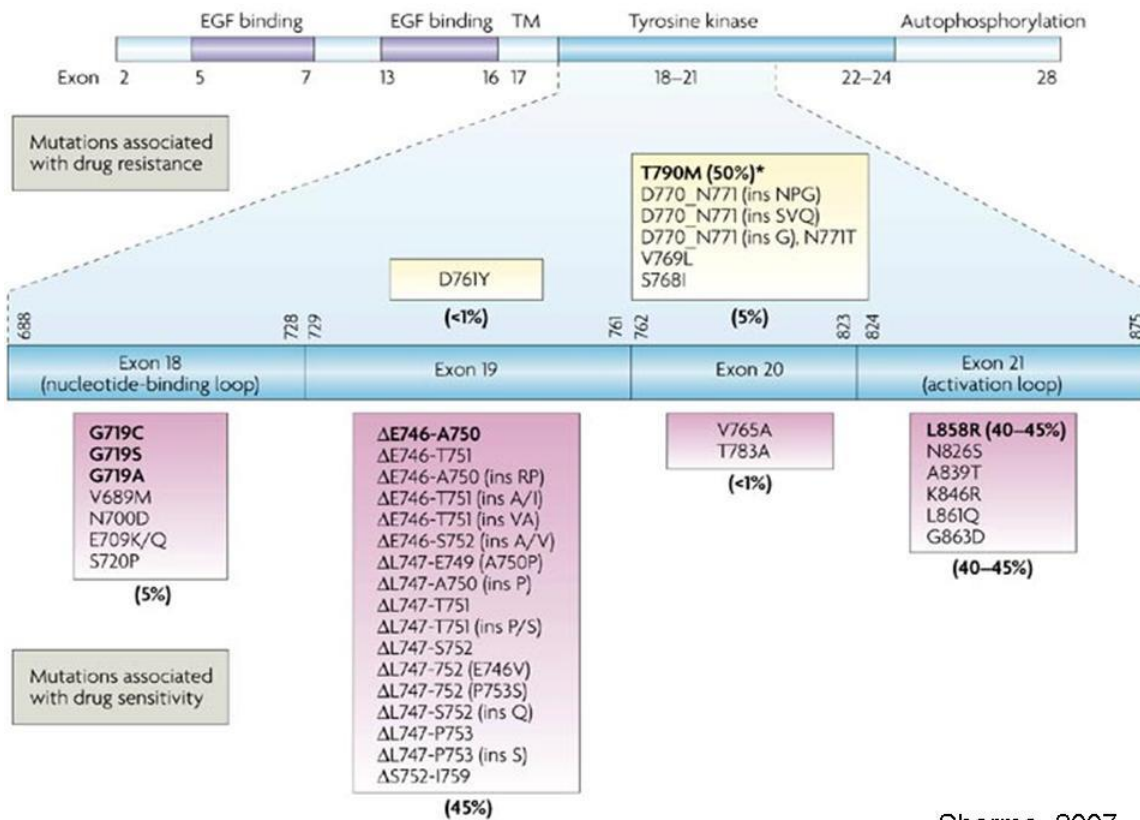
Οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 έχουν σχετισθεί με καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR συγκριτικά με τις μεταλλάξεις L858R στο εξόνιο 21, η οποία μεταφράζεται τόσο σε αυξημένη συνολική επιβίωση [overall survival (OS)] όσο και σε μακρότερη περίοδο χωρίς επιδείνωση νόσου [progression free survival (PFS)] σε αρκετές κλινικές μελέτες φάσης III [38-40]. Η συσχέτιση αυτή όμως δεν είχε επιβεβαιωθεί από κάποιες άλλες μελέτες [41, 42]. Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση όμως, επιβεβαίωσε

οριστικά την αυξημένη επιβίωση και τον μειωμένο κίνδυνο προόδου νόσου [43-45].

Τα υπάρχοντα δεδομένα για τις λεγόμενες σπάνιες μεταλλάξεις του EGFR είναι αντικρουόμενα. Αποτελέσματα από τη μελέτη LUX-Lung για το θεραπευτικό παράγοντα Afatinib, δείχνουν ότι οι αντικαταστάσεις αμινοξέων G719A (εξόνιο 18) και L861Q (εξόνιο 21) έχουν καλή ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης [46], ενώ οι ασθενείς με μεταλλάξεις T790M (αντικατάσταση θρεονίνης με μεθειονίνη στη θέση 790, εξόνιο 20) ή εισαγωγές στο εξόνιο 20 είχαν γενικά χειρότερη συνολική ανταπόκριση με μικρότερη περίοδο ελεύθερης νόσου και συνολική επιβίωση.

Εκτός από τη χειρότερη ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης, λίγα είναι γνωστά για τους ασθενείς με μεταλλάξεις του εξονίου 20, που αποτελεί το 4-10% όλων των μεταλλάξεων του EGFR [32-36]. Πρόσφατα, ο θεραπευτικός παράγοντας Luminespib (AUY922; Vernalis, Wonnepet, United Kingdom) ένας αναστολέας του Hsp90, έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μία μελέτη φάσης II σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR μετά από τουλάχιστον δύο γραμμές με χημειοθεραπεία. Ο ένας από τους δύο ασθενείς αυτής της μελέτης που ανταποκρίθηκε είχε μετάλλαξη στο εξόνιο 20 [47]. Με βάση αυτή την παρατήρηση, ο θεραπευτικός παράγοντας αυτός χορηγήθηκε σε 21 ασθενείς με τον συγκεκριμένο τύπο μετάλλαξης και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να έχει αποτελεσματικότητα σε αυτή την ομάδα των ασθενών με MMKP [48]. Σε μία άλλη μελέτη όπου δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με πρώτης γενιάς αναστολείς της τυροσινικής κινάσης, η διάρκεια θεραπείας

ήταν μικρή λόγω της αυξημένης τοξικότητας [49]. Περεταίρω μελέτες θα ρίξουν περισσότερο φως στο μηχανισμό ευαισθησίας αυτών των ασθενών στη στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR.



Εικόνα 3: Οι μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR στα εξόνια 18 – 21. Εικόνα από Sharma et al, Nature Reviews 2007 [50].

5. Αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR

Την τελευταία δεκαετία σημειώθηκαν πολύ σημαντικές ανακαλύψεις ως προς την παθοφυσιολογία του ΜΜΚΠ και ο τομέας της θεραπείας άλλαξε άρδην με νέες θεραπευτικές επιλογές βασιζόμενες κυρίως σε φάρμακα τα οποία δρουν στοχευμένα σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Η αποτελεσματικότητά τους έχει αποδειχθεί σε πολλές κλινικές μελέτες και σε διαφορετικές ομάδες ασθενών.

Οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια για τη θεραπεία του ΜΜΚΠ σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR, ως πρώτης γραμμής θεραπεία. Αυτή η κατηγορία φαρμάκων μάλιστα έχει εξελιχθεί τόσο ώστε πλέον χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη τρίτης γενιάς αναστολείς οι οποίοι είναι πιο εκλεκτικοί από τους παλαιότερης γενιάς και επιπρόσθετα στοχεύουν μεταλλάξεις του υποδοχέα που προσδίδουν αντοχή σε αυτή τη θεραπεία.

Η πρώτης γενιάς αναστολείς τυροσινικής κινάσης, Gefitinib (ZD1839; AstraZeneca, London, United Kingdom) και Erlotinib (OSI-774; Roche, Basel, Switzerland) είναι μικρά μόρια τα οποία στοχεύουν τη θέση πρόσδεσης του ATP (Adenosine Triphosphate), ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα ως φορέας ενέργειας, και αντιστρεπτά παρακωλύουν τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα και την περαιτέρω σηματοδοτική του δραστηριότητα. Η συγκεκριμένη ομάδα φαρμάκων έχει συγγένεια τόσο για τον υποδοχέα που φέρει μετάλλαξη όσο και για αυτόν που δεν φέρει [51]. Οι

πρώτες μελέτες για τη χρήση των πρώτης γενιάς αναστολέων τυροσινικής κινάσης του EGFR έγιναν σε μη επιλεγμένους ασθενείς. Μετά την ανακάλυψη των μεταλλάξεων του υποδοχέα οι κλινικές μελέτες άρχισαν να ενσωματώνουν ασθενείς μόνο μετά από γενετικό έλεγχο για μεταλλάξεις, η οποία ομάδα ασθενών όπως φάνηκε ανταποκρίνονταν εντυπωσιακά στη στοχευμένη αυτή θεραπεία. Πολλές μελέτες φάσης III επιβεβαίωσαν την ανωτερότητα των αναστολέων τυροσινικής κινάσης στους ασθενείς με MMΚΠ που έφεραν μεταλλάξεις ως 1^{ης} γραμμής θεραπεία έναντι της χημειοθεραπείας που μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν (πίνακας 1). Μέχρι όμως και πρόσφατα το όφελος που πρόσφεραν στην επιβίωση δεν είχε αποδειχθεί κυρίως λόγω της μεταπήδησης ομάδας των ασθενών μετά από την επιδείνωση της νόσου στις κλινικές μελέτες. Όμως αυτό αποδείχθηκε πρόσφατα με τη συγκεντρωτική ανάλυση των περιστατικών από δύο μεγάλες μελέτες (LUX-Lung 3 και LUX-Lung 6) [38]. Οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης έχουν επίσης αποδειχθεί χρήσιμοι σε ασθενείς που έχουν εγκεφαλικές μεταστάσεις σε μικρές μελέτες φάσης II [52-54]. Παρόλο που οι παρούσες μελέτες δεν έχουν αποδείξει ανωτερότητα ενός φαρμάκου έναντι του άλλου, το Erlotinib φαίνεται να επιτυγχάνει υψηλότερα επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό απ' ότι το Gefitinib [55-57]. Τέλος, ο πρώτης γενιάς αναστολέας τυροσινικής κινάσης Erlotinib, χρησιμοποιείται σε ασθενείς ως 2^η ή 3^η γραμμή θεραπείας ανεξάρτητα από το προφίλ μεταλλάξεών τους [58].

Το Afatinib (BIBW 2992; Boehringer Ingelheim; Ingelheim, Germany) ανήκει στις δεύτερης γενιάς αναστολείς τυροσινικής κινάσης και εκτός από το EGFR

αναστέλλει επίσης την φωσφορυλίωση και του HER2 και HER4. Το βασικό του πλεονέκτημα, όπως όλων των αναστολέων τυροσινικής κινάσης 2^{ης} γενιάς, είναι ο μη αναστρέψιμος αποκλεισμός της ενεργοποίησης του EGFR αλλά και η ιδιότητα που έχει να αναστέλλει τη δραστηριότητα και άλλων μελών της οικογένειας ErbB με αποτέλεσμα να παρακωλύουν το σχηματισμό όχι μόνο ομοδιμερών του EGFR αλλά και ετεροδιμερών με τους άλλους υποδοχείς, κυρίως όμως με τον υποδοχέα HER2. Παρόλο που προκλινικά δεδομένα είχαν δείξει ότι το Afatinib μπορεί επίσης να στοχεύσει τη μετάλλαξη T790M του EGFR που προκαλεί αντοχή στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης [59-61], εντέλει αυτό δεν αποδείχθηκε στην κλινική πράξη, με πιθανότερο αίτιο την αδυναμία αύξησης της δόσης του φαρμάκου σε τέτοια επίπεδα ώστε να επιτευχθεί, λόγω της αυξημένης τοξικότητας που παρατηρήθηκε.

Δυστυχώς, παρόλη την αρχική ανταπόκριση αυτών των ασθενών στη στοχευμένη θεραπεία κατά του EGFR, εντέλει η πλειοψηφία αποκτά αντοχή με διάφορους μηχανισμούς όπως η απόκτηση μία μετάλλαξης στο εξόνιο 20 (T790M) στο 50-60% των περιπτώσεων ή η υπερέκφραση του υποδοχέα c-MET. Ο ρόλος της ετερογένειας του όγκου έχει ενοχοποιηθεί στην απόκτηση αντοχής στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης, με τους ανθεκτικούς κλώνους να πολλαπλασιάζονται ανεπηρέαστοι από τη στοχευμένη θεραπεία [62-66]. Μετά την ανάπτυξη αντοχής από τον όγκο, η συνέχιση χορήγησης 1^{ης} ή 2^{ης} γενιάς αναστολέα τυροσινικής κινάσης σε συνδυασμό με 2^{ης} γραμμής χημειοθεραπεία δεν ενδείκνυται με βάση τα παρόντα δεδομένα [67, 68]. Αντίθετα, ένα υψηλό ποσοστό του 50-60% φαίνεται να ωφελούνται με τη

θεραπεία με 3^{ης} γενιάς αναστολέων τυροσινικής κινάσης που στοχεύουν εκλεκτικά την T790M μετάλλαξη που προσδίδει την αντοχή.

Πολλοί καινούριοι 3^{ης} γενιάς αναστολείς τυροσινικής κινάσης δοκιμάζονται για την αποτελεσματικότητά τους σε κλινικές μελέτες με ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη T790M [69-71]. Οι αναστολείς της ομάδας αυτής στοχεύουν εκλεκτικά όχι μόνο τις μεταλλάξεις ενεργοποίησης του υποδοχέα αλλά και τη μετάλλαξη T790M που προσδίδει αντοχή. Η συγγένεια τους προς το μεταλλαγμένο υποδοχέα είναι έως και 100 φορές ισχυρότερη από τον υποδοχέα που δεν φέρει καμία μετάλλαξη [72-74], έχοντας ως αποτέλεσμα λιγότερη τοξικότητα συγκριτικά με τις προηγούμενες γενιές αναστολέων τυροσινικής κινάσης. Δύο παράγοντες της ομάδας αυτής των φαρμάκων είναι το Rociletinib (CO-1686; Clovis Oncology, Boulder, Colorado) και το Osimertinib (AZD9291; AstraZeneca, London, United Kingdom), με το τελευταίο μάλιστα να έχει πάρει έγκριση για ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη T790M του EGFR.

Μελέτη	Πληθυσμός	Ομάδες ασθενών	n	RR (%)	PFS (μήνες)	HR για PFS (p)	OS (μήνες)	HR για OS (p)	Βιβλιογραφία
IPASS	Ασιάτες, ελαφρείς/μη καπνιστές	Gefitinib	132	71.20%	9.5	0.48 (<0.001)	21.6	1 (0.99)	[39, 75]
		Carboplatin/ Paclitaxel	129	47.30%	6.3		21.9		
First-SIGNAL	Κορεάτες, μη καπνιστές	Gefitinib	26	84.60%	8	0.54 (0.086)	27.2	1.043 (0.98)	[76]
		Cisplatin/ Gemsitabine	16	37.50%	6.3		25.6		
WJTOG 3405	Ιάπωνες, EGFR μεταλλάξεις	Gefitinib	86	62.10%	9.6	0.56 (<0.001)	34.8	1.25 (0.2)	[77]
		Cisplatin/ Docetaxel	86	32.10%	6.6		37.3		
NEJ 002	Ιάπωνες, EGFR μεταλλάξεις	Gefitinib	114	73.70%	10.8	0.32 (<0.001)	27.7	0.88 (0.48)	[78]

		Carboplatin/ Paclitaxel	114	30.70%	5.4		26.6		
OPTIMAL	Κινέζοι, EGFR μεταλλάξεις	Erlotinib	82	83%	13.1	0.16 (<0.001)	22.8	1.19 (0.26)	[79, 80]
		Carboplatin/ Gemcitabine	72	36%	4.6		27.2		
EURTAC	Ευρωπαίοι, EGFR μεταλλάξεις	Erlotinib	86	58%	9.7	0.37 (<0.001)	22.9	0.92 (0.68)	[81], [82]
		Platinum agend/ Gemcitabine or Docetaxel	87	15%	5.2		19.6		
Lux-Lung 3	Ευρωπαίοι/Ασ ιάτες, EGFR μεταλλάξεις	Afatinib	230	56.10%	11.1	0.58 (0.001)	28.2	0.88 (0.39)	[38]

		Cislatin/ Pemetrexed	115	22.60%	6.9		28.2		
Lux-Lung 6	Ασιάτες, EGFR μεταλλάξεις	Afatinib	242	66.90%	11	0.28 (<0.001)	23.1	0.93 (0.61)	[38, 83]
		Cislatin/ Gemcitabine	122	23%	5.6		23.5		

Πίνακας 1: Κλινικές μελέτες φάσης III που αποδεικνύουν την υπεροχή των αναστολέων τυροσινικής κινάσης έναντι της χημειοθεραπείας ως 1^η γραμμή σε ασθενείς με EGFR μεταλλάξεις. n= αριθμός ασθενών, RR (Response Rate) = Ποσοστό ανταπόκρισης, OS (Overall Survival) = Συνολική επιβίωση, PFS (Progression Free Survival) = Περίοδος χωρίς επιδείνωση νόσου, HR (Hazard Ratio) = Σχετικός Κίνδυνος, p= επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

Τεχνικές και Μέθοδοι

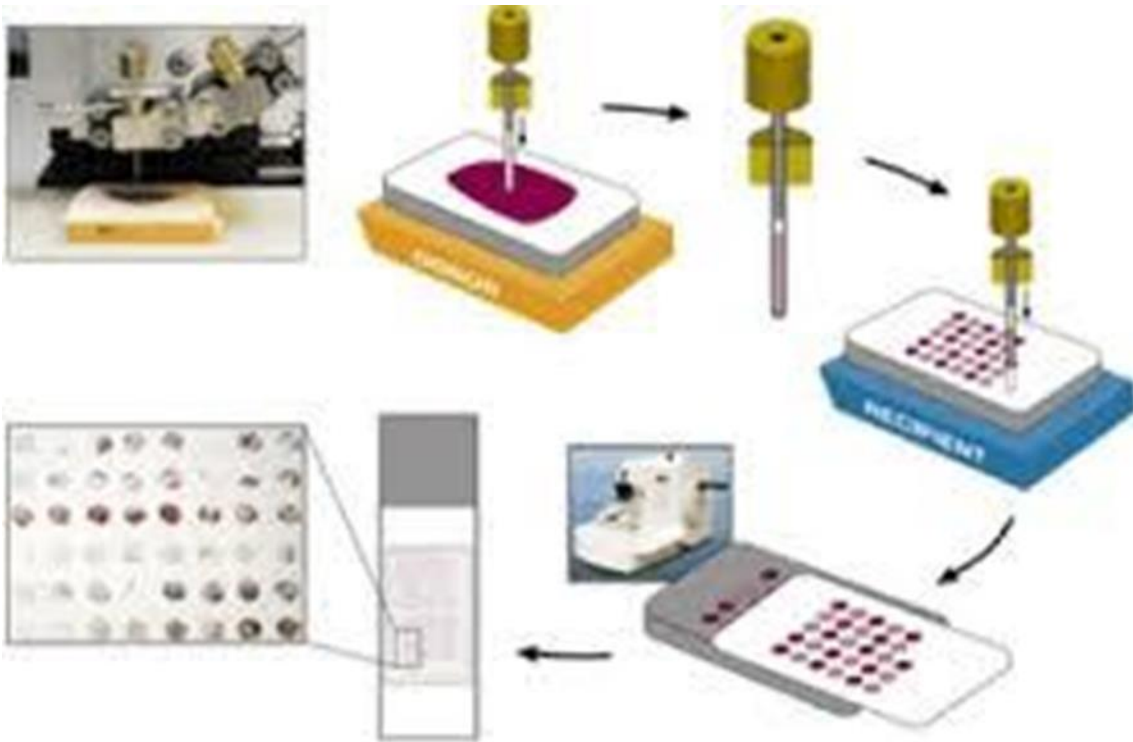
1. Tissue Microarray (TMA)

Η μέθοδος κατασκευής Tissue Microarray (TMA) [84] δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης στο ίδιο γυάλινο πλακάκι, ιστού από διαφορετικές περιοχές του όγκου ενός ασθενούς ή από περισσότερους από έναν ασθενείς. Η μέθοδος αυτή στοχεύει στην ελαχιστοποίηση κατανάλωσης του χρησιμοποιούμενου ιστού από τους ασθενείς, με την πραγματοποίηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε μικρότερο αλλά αντιπροσωπευτικό δείγμα ιστού από έναν ασθενή αλλά και σε ιστούς από διαφορετικούς ασθενείς ταυτόχρονα, περιορίζοντας το κόστος των υλικών και τη σπατάλη των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται.

Παραδοσιακά για τη ανάλυση και χρώση ανοσοϊστοχημικών δεικτών στον ιστό ενός ασθενούς, το μπλοκ παραφίνης που περιέχει τον ιστό τέμνεται εγκάρσια και τοποθετείται σε γυάλινο πλακάκι, το οποίο τελικά περιέχει μία μεγάλη επιφάνεια ιστού. Η τεχνική δημιουργίας TMA βασίζεται στην αρχή εξοικονόμησης του ιστού ώστε να είναι διαθέσιμος για όσο το δυνατόν περισσότερες διαγνωστικές εξετάσεις. Αρχικά, σε ένα γυάλινο πλακάκι που περιέχει μία εγκάρσια τομή του ιστού πραγματοποιείται χρώση αιματοξυλλίνης και ηωσίνης. Με αυτό τον τρόπο επιδεικνύεται η περιοχή του μπλοκ, η οποία περιέχει καρκινικό ιστό και επισημαίνεται. Στη συνέχεια η σημασμένη περιοχή του όγκου διαπερνάται κάθετα από μία κυλινδρική οπή με διάμετρο 6 χιλιοστών η οποία αφαιρεί έναν κύλινδρο καρκινικού

ιστού από το μπλοκ παραφίνης. Ο κύλινδρος αυτός τοποθετείται σε νέο μπλοκ μαζί με άλλους κυλίνδρους ιστού είτε από διαφορετικές περιοχές του όγκου του ίδιου ασθενούς είτε από άλλους ασθενείς (εικόνα 4). Το τελικό αποτέλεσμα με κάθε εγκάρσια τομή του καινούριου μπλοκ είναι να συνυπάρχουν στο ίδιο γυάλινο πλακάκι κυκλικές περιοχές ιστού τοποθετημένες η μία δίπλα στην άλλη.

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η χρήση ιστού διαμέτρου μόλις 0,6 χιλιοστών είναι αντιπροσωπευτική του προφίλ ενός όγκου ακόμα και για ετερογενείς δείκτες [85]. Με αυτό τον τρόπο, ο ιστός ενός ασθενούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές πριν εξαντληθεί από λίγες μόνο εγκάρσιες τομές.



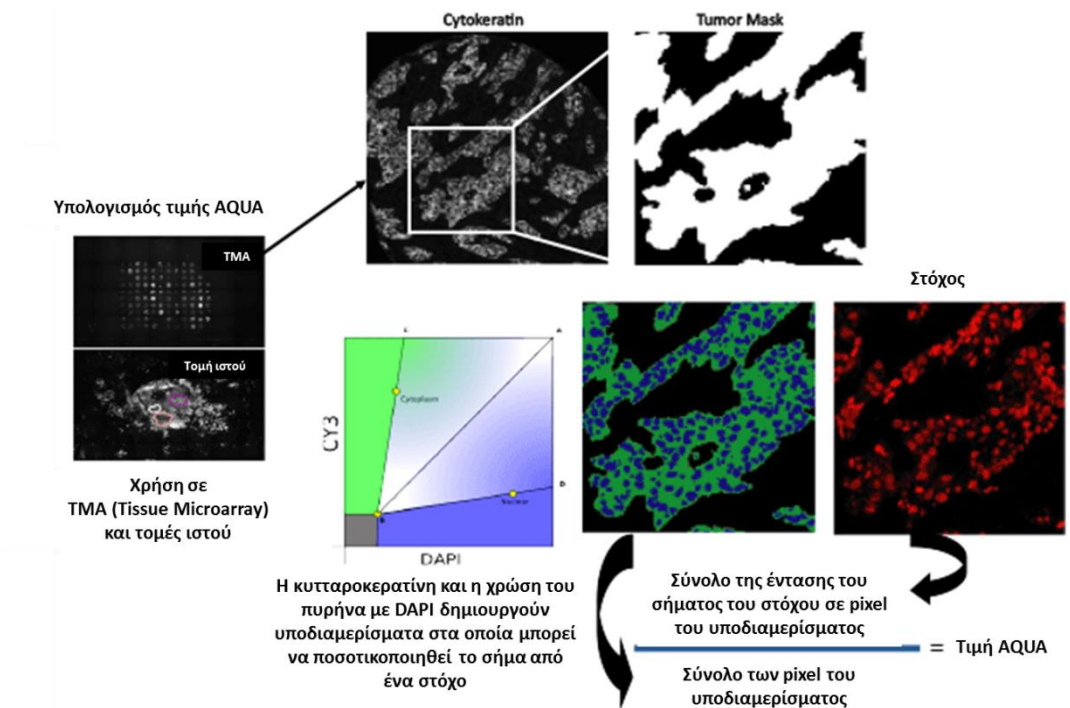
Εικόνα 4: Η τεχνική δημιουργίας Tissue Microarray (TMA) από ιστό ασθενών που βρίσκεται σε μπλοκ παραφίνης.

2. Μέθοδος ποσοτικοποίησης σήματος ανοσοφθορισμού AQUA [Automated Quantitative Immunofluorescence (QIF)]

Η ανάλυση και ανοσοϊστοχημική χρώση ιστού που έχει μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και έχει παρασκευαστεί σε παραφίνη αποτελεί ρουτίνα στην κλινική πρακτική για την ανίχνευση βιοδεικτών. Παρόλη την ευρεία χρήση της, η ανοσοϊστοχημεία υπόκειται σε πολλούς παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την ευαισθησία, την ειδικότητα και την επαναληψιμότητα της [86, 87]. Ακόμα πιο μεταβλητή είναι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μιας και βασίζεται στην υποκειμενική εκτίμηση της έκτασης και έντασης του σήματος, η οποία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η εμπειρία. Στην καλύτερη περίπτωση, το αποτέλεσμα μπορεί να ημιποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας την τιμή H (0 - 300), η οποία βασίζεται και πάλι στην υποκειμενική εκτίμηση του εκάστοτε παθολογοανατόμου. Αυτή η πρακτική δημιουργεί προβλήματα στην έγκυρη εκτίμηση του ανοσοϊστοχημικού αποτελέσματος και στην έκδοση μιας παθολογοανατομικής έκθεσης η οποία μπορεί να ήταν διαφορετική στα χέρια ενός άλλου ειδικού. Αυτή η ασυνέπεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων γέννησε την ανάγκη για έναν αντικειμενικό τρόπο ερμηνείας του σήματος ο οποίος δεν θα υπόκειται σε υποκειμενικούς παράγοντες.

Η μέθοδος AQUA [Automated Quantitative Immunofluorescence (QIF)] [88] επιτρέπει την ποσοτική μέτρηση του σήματος ανοσοφθορισμού

σε έναν ιστό που έχει μονιμοποιηθεί με φορμόλη και βρίσκεται σε παραφίνη. Το λογισμικό αυτό μετράει την ένταση και την έκταση του σήματος ενός στόχου σε ένα συγκεκριμένο υποδιαμέρισμα που μπορεί να ορίσει ο χειριστής και με βάση αυτές τις παραμέτρους παράγει μία τιμή (σκορ) που αντιπροσωπεύει την αντικειμενική μέτρηση της πρωτεΐνης στόχου. Με τη χρήση του σήματος ανοσοφθορισμού από άλλους στόχους όπως της κυτταροκερατίνης ή των πυρήνων που βρίσκονται στο παρασκεύασμα μπορεί να δημιουργήσει υποδιαμερίσματα, π.χ. με το σήμα της κυτταροκερατίνης μπορεί να οριστεί το επιθηλιακό υποδιαμέρισμα σε συμπαγείς όγκους, εντός των οποίων θα ποσοτικοποιηθεί ο στόχος ενδιαφέροντος. Η τιμή που δημιουργείται αποτελεί το κλάσμα του συνόλου της έντασης του σήματος του στόχου σε εικονοκύτταρα (pixel) του υποδιαμερίσματος διά του συνόλου των εικονοκυττάρων (pixel) του επιθυμητού υποδιαμερίσματος (εικόνα 5). Τέλος, οι τιμές AQUA κανονικοποιούνται με βάση τις παραμέτρους του διαφορετικού χρόνου έκθεσης και του βάθους του ιστού από το οποίο οι εικόνες δημιουργήθηκαν. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης AQUA είναι επαναλήψιμη και η τιμή AQUA αποτελεί μία αντικειμενική μέτρηση της έκφρασης ενός βιοδείκτη. Επίσης με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η σύγκριση δύο ιστών ως προς την έκφραση μιας πρωτεΐνης στόχου με αντικειμενικά κριτήρια και λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους κανονικοποίησης.



Εικόνα 5: Μέθοδος AQUA και ποσοτική μέτρηση του σήματος ανοσοφθορισμού ενός στόχου. Τρόπος υπολογισμού της τιμής AQUA.

3. Proximity Ligation Assay (PLA)

Ο ρόλος της έκφρασης του EGFR σε ΜΜΚΠ ασθενείς στην πρόγνωση ή πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε στοχευμένες θεραπείες είναι ακόμα αβέβαιος. Τα δεδομένα που έχουν προκύψει από την μέτρηση του EGFR με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας στις περισσότερες μελέτες δεν έχουν δείξει συσχέτιση της έκφρασης του υποδοχέα με την πρόγνωση [89, 90]. Παρομοίως, η μέτρηση των αντιγράφων του γονιδίου του EGFR με φθορίζοντα υβριδισμό [fluorescent in situ hybridization (FISH)], παρόλο που μπορεί να μετρηθεί με περισσότερη συνέπεια από την ανοσοϊστοχημεία, δεν έχει δείξει συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων αντιγράφων του γονιδίου και της επιβίωσης [91]. Αυτή η έλλειψη κλινικής χρησιμότητας και μερικές φορές συνέπειας στα αποτελέσματα των μελετών μπορεί να αντανάκλα την αδυναμία αυτών των μεθόδων να ανιχνεύσουν και να μετρήσουν δυναμικά γεγονότα, όπως η λειτουργικότητα του υποδοχέα και η σηματοδοτική του δραστηριότητα.

Η μέθοδος Proximity Ligation Assay (PLA) χρησιμοποιεί αντισώματα που φέρουν στο άκρο τους ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία υβριδοποιούνται με μία συνδετική αλυσίδα νουκλεοτιδίων, μόνο όταν βρεθούν σε απόσταση μικρότερη των 40 νανόμετρων. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει την ανίχνευση συμπλεγμάτων πρωτεϊνών σε σηματοδοτικά μονοπάτια [92]. Ο μηχανισμός ανίχνευσης βασίζεται στη δημιουργία ενός Rolling Circle Amplification συστήματος.

Μετά την πρόσδεση των πρωτογενών αντισωμάτων που στοχεύουν τις πρωτεΐνες που μελετώνται, προστίθενται τα δευτερογενή αντισώματα τα οποία

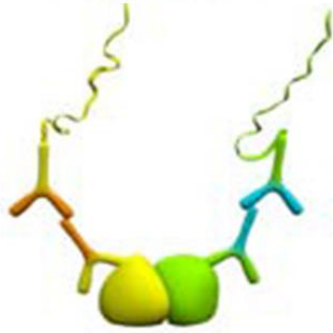
φέρουν στα άκρα τους αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Τα πρωτογενή αντισώματα πρέπει να είναι από διαφορετικά είδη ζώων ώστε η πρόσδεση των δευτερογενών αντισωμάτων σε αυτά να είναι ειδική. Στη συνέχεια και εφόσον οι πρωτεΐνες στόχοι είναι εντός 40 νανόμετρων, με την προσθήκη αλύσων συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων προς τα ολιγονουκλεοτίδια που είναι συζευγμένα στα δευτερογενή αντισώματα, δημιουργείται ένας κύκλος διπλής έλικας νουκλεοτιδίων ο οποίος συζευγνύεται με την προσθήκη του ενζύμου της λιγκάσης. Τέλος, η προσθήκη πολυμεράσης και ελεύθερων νουκλεοτιδίων οδηγεί στη συνεχόμενη αντιγραφή και δημιουργία μιας συμπληρωματικής αλύσου νουκλεοτιδίων, στην οποία υβριδοποιούνται άλλα ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν από μία φθορίζουσα χρωστική ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί το σήμα από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών (εικόνα 6).

Σε προηγούμενες μελέτες, η τεχνική PLA, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ομοδιμερών και ετεροδιμερών διαμεμβρανικών υποδοχέων και την ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων [93-96]. Αυτή η μέθοδος παρακάμπτει τη δυσκολία που υπάρχει στη χρήση αντισωμάτων που στοχεύουν την φωσφορυλιωμένη μορφή του υποδοχέα σε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμόλη σε παραφίνη, καθώς το φωσφορυλιωμένο επίτοπο που αποτελεί το σημείο πρόσδεσης του αντισώματος υπόκειται σε προαναλυτικές επιδράσεις [97]. Η μέθοδος PLA ανιχνεύει πρωτεϊνικά συμπλέγματα που εμπλέκονται στη σηματοδότηση διαφορετικών μονοπατιών. Η μέθοδος PLA, η οποία ανιχνεύει το σύμπλεγμα του EGFR με την πρωτεΐνη προσδέτη GRB2, έχει φανεί ότι είναι δείκτης της σηματοδοτικής δραστηριότητας του υποδοχέα [96].

1



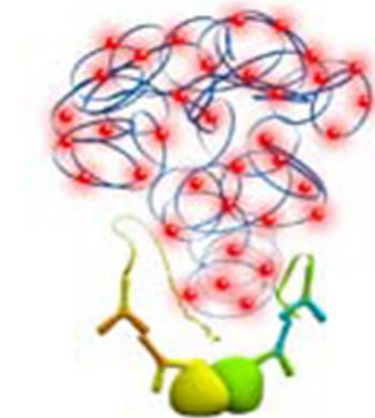
2



3



4



Εικόνα 6: Η μέθοδος PLA και η δημιουργία σήματος που προέρχεται από πρωτεϊνικά συμπλέγματα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά, ασθενείς και μέθοδοι

1. Κυτταρικές σειρές και Western Blot

Οι κυτταρικές σειρές MCF7, A431, H1975, H1650, HCC193 και H2882 είτε αγοράστηκαν από την εταιρεία American Type Culture Collection (Manassas, VA) είτε ήταν δωρεά από άλλα εργαστήρια. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο εύρος έκφρασης του EGFR καθώς και διαφορετικές μεταλλάξεις του υποδοχέα (πίνακας 2). Οι κυτταρικές σειρές A431 και MCF7 καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) που περιείχε 10% ορό νεογέννητου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) και 1% Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Οι κυτταρικές σειρές H2882, HCC193, H1650, H1975 καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο RPMI 1640 που περιείχε 10% ορό νεογέννητου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) και 1% Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).

Η τεχνική Western Blot, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μίας πρωτεΐνης, σε ένα διάλυμα που περιέχει τα προϊόντα λύσης κυτάρων. Ειδικά αντισώματα προς την πρωτεΐνη στόχο επιτρέπουν την ανίχνευση και στη συνέχεια ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης. Μετά τη λύση των κυτάρων κάθε κυτταρικής σειράς χωριστά, η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών μετρήθηκε με τη μέθοδο Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). Συνολικά 15 μικρογραμμάρια πρωτεΐνης από το διάλυμα λύσης κάθε κυτταρικής σειράς

χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνευθούν οι πρωτεΐνες EGFR, phospho-EGFR και GRB2.

Αρχικά το δείγμα αναμειγνύεται με SDS-PAGE και στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 8% Bis-Tris gel (NuPAGE Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης που βρίσκεται τοποθετημένο σε διάλυμα NuPAGE MOPS [3-(N-morpholino) propane sulfonic acid] σε ένταση 45 mA για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης σε ειδική μεμβράνη (PVDF) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου 50V για 2 ώρες. Οι πρωτεΐνες στόχοι ανιχνεύθηκαν με επώαση της εκάστοτε μεμβράνης με τα αντισώματα EGFR (κλώνος D38B1) μονοκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, σε διάλυση 1:1000 (Cell Signaling Technology, Inc.), anti-GRB2 (κλώνος 81) μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι σε διάλυση 1:1000 (BD Biosciences), phospho-EGFR (με στόχο την περιοχή τυροσινικής κινάσης Tyr1068, κλώνος D7A5) μονοκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, σε διάλυση 1:1000 (Cell Signaling Technology, Inc.) και β-τουμπουλίνη (Cell Signaling Technology, Inc.) σε διάλυση 1:1000 ως πρωτεΐνη αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο της φόρτωσης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Κάθε Western Blot πραγματοποιήθηκε δύο φορές ως ανεξάρτητα πειράματα. Η εικόνα ποσοτικοποιήθηκε με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ (National Institutes of Health, Washington, DC) και κάθε μέτρηση πρωτεΐνης στόχου κανονικοποιήθηκε ως προς την ποσότητα της β-τουμπουλίνης.

<u>Κυτταρική σειρά</u>	<u>Προέλευση ιστού</u>	<u>EGFR χαρακτηριστικά</u>
A431	Επιδερμοειδές καρκίνωμα	Υψηλή έκφραση
H2882	Καρκίνος πνεύμονα	
HCC193	Καρκίνος πνεύμονα	
MCF7	Καρκίνος μαστού	Χαμηλή έκφραση
H1975	Καρκίνος πνεύμονα	EGFR μετάλλαξη (εξόνιο 21)
H1650	Καρκίνος πνεύμονα	EGFR μετάλλαξη (εξόνιο 19)

Πίνακας 2: Τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για τη μελέτη του σήματος PLA EGFR:GRB2.

2. Proximity Ligation Assay (PLA)

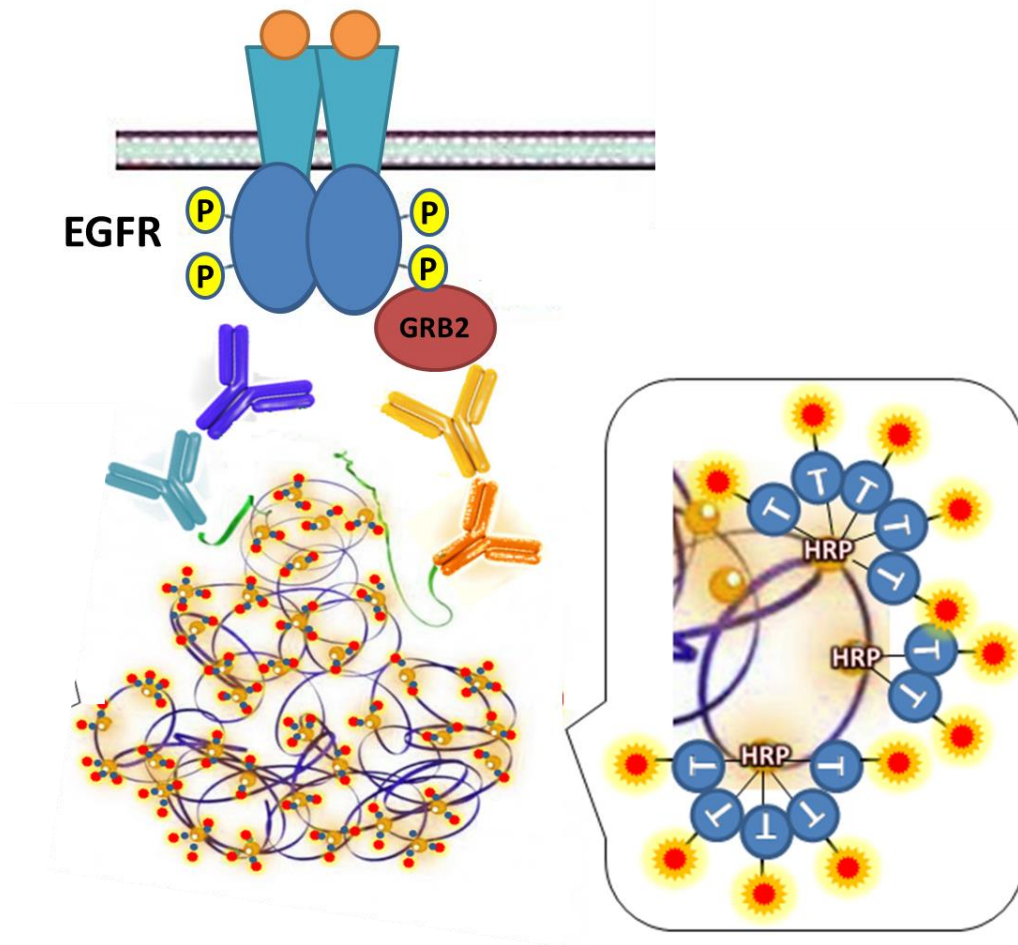
Πρόσφατες τομές πάχους 5 μικρόμετρων από μπλοκ τύπου Tissue Microarray (TMA), αποπαραφινώθηκαν στους 60°C για 30 λεπτά, τοποθετήθηκαν σε ξυλόλες (2 φορές από 20 λεπτά κάθε ξυλόλη) και επανα-ενυδατώθηκαν χρησιμοποιώντας 100% αιθανόλη (2 φορές) για 1 λεπτό, και στη συνέχεια 70% αιθανόλη για άλλο 1 λεπτό. Η παρουσίαση των αντιγόνων έγινε στη συσκευή PT module (LabVision, Fremont, CA) σε διάλυμα EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) με pH 8.0 για 20 λεπτά στους 97°C. Μετά από απενεργοποίηση της ενδογενούς περοξειδάσης με 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου διαλυμένο σε μεθανόλη, ο ιστός επώαστηκε σε διάλυμα 0.3% αλβουμίνης από ορό βοός και Tris με 0.05% Tween για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα πλακάκια με τους ιστούς στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση με ένα μείγμα πρωτογενών αντισωμάτων EGFR (κλώνος D38B1) μονοκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, σε διάλυση 1:100 (Cell Signaling Technology, Inc.) και anti-GRB2 (κλώνος 81) μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι σε διάλυση 1:10000 (BD Biosciences).

Στη συνέχεια, τα αντισώματα αυτά ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας δευτερογενή αντισώματα που ανιχνεύουν αντισώματα από κουνέλι και από ποντίκι και φέρουν στο άκρο τους ολιγονουκλεοτίδια (Anti-rabbit MINUS and anti-mouse PLUS PLA probes αντίστοιχα, Duolink, Sigma-Aldrich) σε διάλυση 1:5 και επώαση στους 37°C για 60 λεπτά. Μετά από 30 λεπτά επώαση με 5X Ligation Stock (1:5 διάλυση, Duolink, Sigma-Aldrich) and λιγκάση (1:40 διάλυση, Duolink, Sigma-Aldrich) στους 37°C, Amplification Stock 5X (1:5 διάλυση, Duolink, Sigma-Aldrich)

and πολυμεράση (1:80 διάλυση, Duolink, Sigma-Aldrich) προστέθηκαν για 120 λεπτά στους 37°C. Για την ενίσχυση του σήματος, οι τομές των ιστών επωάστηκαν για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με 5X Detection Stock (1:5 διάλυση, Duolink, Sigma-Aldrich), που περιέχει ολιγονουκλεοτίδια συζευγμένα με Horseradish Peroxidase (HRP), τα οποία είναι συμπληρωματικά της αλύσου ολιγονουκλεοτιδίων που δημιουργήθηκε από την πολυμεράση. Η φθορίζουσα χρωστική Cyanine 5 (Cy5) συζευγμένη με Tyramide (FP1117; Perkin-Elmer), σε διάλυση 1:50 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ανιχνεύσιμου σήματος. Ένα αντίσωμα που στοχεύει την κυτταροκερατίνη και είναι άμεσα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική eFluor 570 (κλώνος AE1/AE3, eBioscience) χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθεί το επιθηλιακό υποδιαμέρισμα. Τέλος, το καλυπτικό μέσο ProLong Gold (Molecular Probes) το οποίο περιέχει 4,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθεί ο πυρήνας των κυτάρων. Όλα τα αντισώματα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορικά διαθέσιμα. Για να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα, πλακάκια με ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές ημέρες με το ίδιο πρωτόκολλο αποτέλεσαν σημείο αναφοράς και σύγκρισης.

Το παρόν πρωτόκολλο περιέχει ένα επιπλέον βήμα ενίσχυσης του φθορίζοντος σήματος ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί με τη μέθοδο AQUA. Το βήμα αυτό είναι η προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίων συζευγμένων με HRP και στη συνέχεια η προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής Cyanine 5 (Cy5) συζευγμένης με Tyramide. Το HRP καταλύει την ενεργοποίηση του Tyramide και την τοποθέτηση της φθορίζουσας χρωστικής Cy5 στο σημείο της αντίδρασης. Αυτή

η παραλλαγή ενισχύει έως και 100 φορές το σήμα που ανιχνεύεται συγκριτικά με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων άμεσα συζευγμένων με μία φθορίζουσα χρωστική (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Το τροποποιημένο πρωτόκολλο PLA με HRP ώστε να πολλαπλασιαστεί η ένταση του φθορίζοντος σήματος.

3. Ποσοτική μέτρηση του σήματος ανοσοφθορισμού με τη μέθοδο AQUA

Η ποσοτική μέτρηση του σήματος ανοσοφθορισμού από το PLA EGFR:GRB2 έγινε με τη μέθοδο AQUA (Automated Quantitative Analysis) (Genoptix Medical Laboratory) [88]. Η μέθοδος αυτή ποσοτικοποιεί το σήμα ανοσοφθορισμού από την ανίχνευση ενός στόχου εντός ενός υποδιαμερίσματος του ιστού. Στο παρόν πείραμα η ποσοτικοποίηση του PLA EGFR:GRB2 σήματος έγινε εντός της επιφάνειας του όγκου, η οποία σχηματίστηκε από το λογισμικό της AQUA αφού το σήμα φθορισμού από την κυτταροκερατίνη έγινε δυαδικό με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός επιθηλιακού διαμερίσματος. Οι ποσοτικές τιμές (σκορ) AQUA υπολογίστηκαν από το λογισμικό με τη διαίρεση της τιμής έντασης των εικονοκυττάρων (pixel) του στόχου με την περιοχή εικονοκυττάρων (pixel) του υποδιαμερίσματος της κυτταροκερατίνης. Οι τιμές AQUA κανονικοποιούνται στις παραμέτρους της διαφορετικού χρόνου έκθεσης και του βάθους του ιστού από το οποίο δημιουργήθηκαν οι εικόνες. Όλα τα κυκλικά σημεία (spots) του καρκινικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση, αξιολογήθηκαν οπτικά ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητά τους και οι περιπτώσεις με κακή ποιότητα ιστού ή λιγότερο από 2% καρκινικού ιστού στο σημείο, εξαιρέθηκαν.

4. Tissue Microarray (TMA)

Η τεχνική Tissue Microarray έχει περιγραφεί και στο παρελθόν ως ένας τρόπος να τοποθετείται σε έναν κύβο παραφίνης ιστός από περισσότερους από έναν ασθενείς [98]. Αντιπροσωπευτικές περιοχές του εξαιρεθέντος όγκου των ασθενών, που τα παρασκευάσματά τους βρίσκονται ήδη σε κύβους παραφίνης, διαπερνώνται από μία οπή με διάμετρο 0.6 χιλιοστά με αποτέλεσμα να εξαιρείται ένα κυλινδρικό κομμάτι του όγκου. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στη σειρά σε έναν άλλο κύβο παραφίνης, ο οποίος όταν τέμνεται σε κατά μήκος κομμάτια περιέχει κυκλική περιοχή ιστού από όλους τους κυλινδρικούς ιστούς που έχουν τοποθετηθεί σε αυτόν. Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιείται και για να φτιαχτούν TMA από πελέτες κυτταρικών σειρών που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και έχουν παρασκευαστεί σε παραφίνη.

Μία σειρά ιστών από 139 ασθενείς με ΜΜΚΠ χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευαστεί ένα TMA με τη διαδικασία που περιγράφηκε πριν. Όλοι οι καρκινικοί ιστοί αυτών των ασθενών προέρχονταν από πλήρη εξαίρεση του όγκου μεταξύ των ετών 2011 και 2013. Στους όγκους είχε γίνει προηγουμένως μοριακός έλεγχος έτσι ώστε το παρόν TMA να περιέχει όγκους με τρεις διαφορετικές κατηγορίες προφίλ μεταλλάξεων: όγκοι με EGFR μεταλλάξεις, όγκοι με KRAS μεταλλάξεις και όγκοι χωρίς EGFR ή KRAS μεταλλάξεις. Το συγκεκριμένο TMA χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της τεχνικής και η ετερογένεια του δείκτη σε καρκινικό ιστό ασθενών.

5. Στατιστική ανάλυση

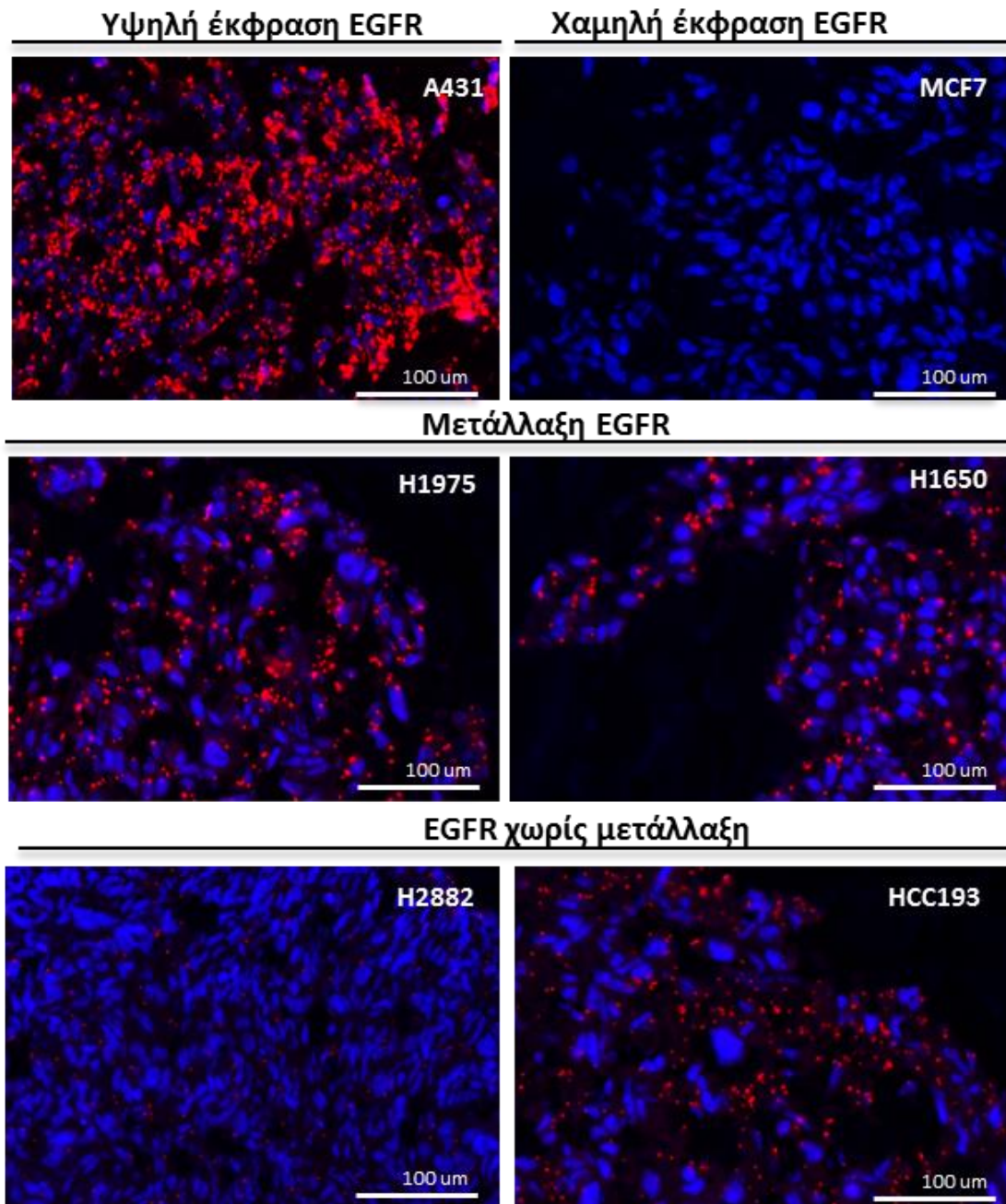
Η συσχέτιση μεταξύ των τιμών AQUA σε συνεχόμενες τομές του ΤΜΑ που αντιπροσωπεύουν την ίδια περιοχή των όγκων και σε ένα δεύτερο μπλοκ ΤΜΑ με ιστό από διαφορετικές περιοχές των ίδιων όγκων έγινε υπολογίζοντας την τιμή του Pearson's correlation coefficient (R).

Αποτελέσματα

Αρχικά, η μέτρηση του σήματος του EGFR:GRB2 PLA έγινε σε κυτταρικές σειρές που μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και παρασκευάστηκαν και τοποθετήθηκαν σε κύβο παραφίνης με την μέθοδο TMA. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (MCF7, A431, H1975, H1650, HCC193, H2882) έχουν ένα μεγάλο εύρος έκφρασης του EGFR. Συγκεκριμένα, η σειρά MCF7 δεν εκφράζει καθόλου τον υποδοχέα ενώ η σειρά A431 τον υπερεκφράζει. Εκτός από διαφορετική έκφραση του EGFR, οι κυτταρικές σειρές H1975 και H1650 φέρουν μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα. Η κυτταρική σειρά H1975 φέρει μετάλλαξη στο εξόνιο 21 (αντικατάσταση του αμινοξέος λευκίνης με αργινίνη στη θέση 858, L858R) ενώ η σειρά H1650 φέρει μετάλλαξη στο εξόνιο 19 (διαγραφή E746-A750). Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα, ακόμα και χωρίς την παρουσία προσδέτη και ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/ERK [26, 50].

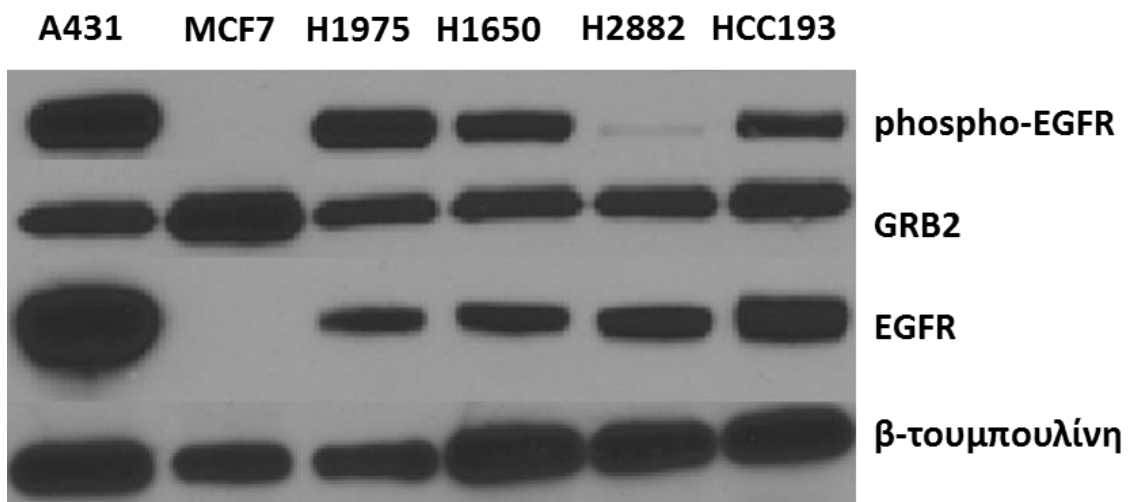
Η χρώση των κυτταρικών σειρών με τη μέθοδο PLA για την ανίχνευση του συμπλέγματος EGFR και GRB2 ανέδειξε την παρουσία πολυάριθμων συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 στις κυτταρικές σειρές που έφεραν μεταλλάξεις του υποδοχέα, επιβεβαιώνοντας τη συνεχή και ανεξάρτητη από προσδέτη ενεργοποίησή του και συνεχή σηματοδότησή του (εικόνα 8). Επιπροσθέτως, στη κυτταρική σειρά MCF7, που δεν εκφράζει τον υποδοχέα, δεν ανιχνεύτηκε σήμα PLA EGFR:GRB2 ενώ στη σειρά A431 το σήμα ήταν διάχυτο, υποδηλώνοντας την

παρουσία συμπλεγμάτων EGFR και GRB2. Μία πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι ενώ οι κυτταρικές σειρές HCC193 και H2882 είναι αρνητικές για μεταλλάξεις τόσο στον EGFR όσο και στην KRAS πρωτεΐνη, η έκφραση του PLA EGFR:GRB2 ήταν διαφορετική, με την κυτταρική σειρά HCC193 να έχει έντονη παρουσία συμπλεγμάτων EGFR:GRB2 ενώ το αντίθετο να συμβαίνει στη σειρά H2882. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του EGFR και η πρόσδεση του GRB2 στον ενεργοποιημένο υποδοχέα είναι ανεξάρτητη της παρουσίας ή μη μεταλλάξεων του υποδοχέα, καθώς επίσης είναι διαφορετική μεταξύ σειρών με το ίδιο προφίλ μεταλλάξεων.



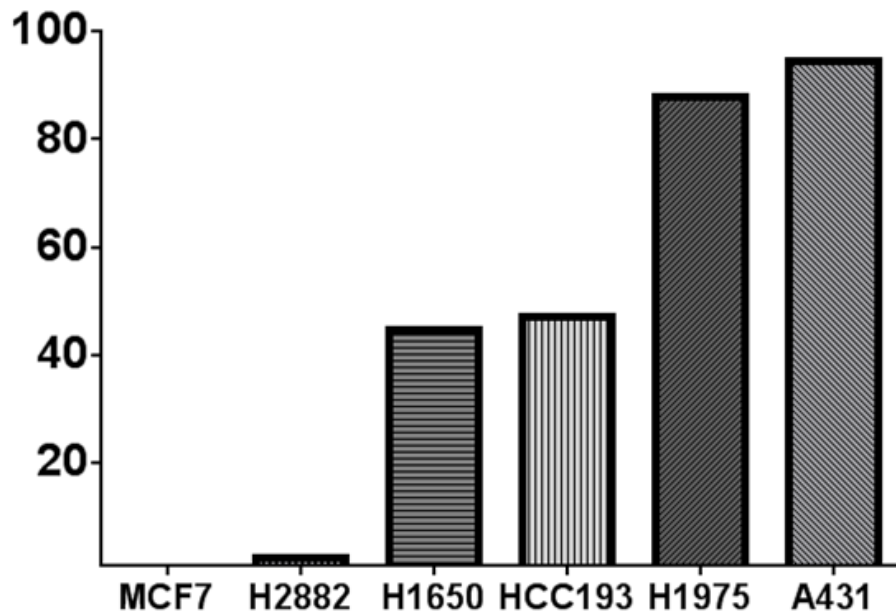
Εικόνα 8: Το σήμα ανοσοφθορισμού PLA από την ανίχνευση των συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 σε 6 κυτταρικές σειρές με διαφορετικά χαρακτηριστικά του EGFR. Κόκκινο: σήμα PLA EGFR:GRB2, Μπλε: Πυρήνες (DAPI)

Όλες οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από τη σειρά MCF7 που αποτελούσε το αρνητικό σημείο αναφοράς (control) του πειράματος, εκφράζουν και τις δύο συνιστώσες του PLA, δηλαδή τον υποδοχέα EGFR και την πρωτεΐνη προσδέτη GRB2, όπως φαίνεται με τη μέθοδο Western Blot (εικόνα 9). Αυτό σημαίνει ότι η απουσία EGFR:GRB2 PLA σήματος δεν αντανακλά απλώς απουσία του υποδοχέα αλλά την απουσία συμπλόκων EGFR και GRB2. Αντίστοιχα η υψηλή έκφραση EGFR δεν μεταφράζεται απαραίτητα σε ισχυρό EGFR:GRB2 PLA σήμα.

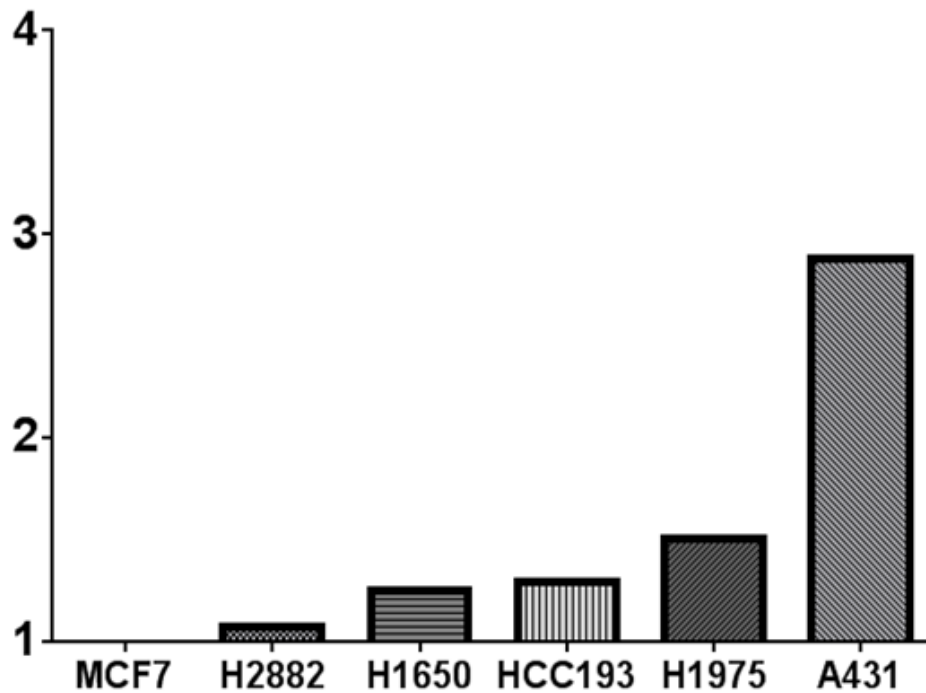


Εικόνα 9: Τεχνική Western Blot για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και την επιβεβαίωση της παρουσίας τους.

Με τη μέθοδο Western Blot ανιχνεύθηκε επίσης στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, η φωσφορυλιωμένη μορφή του υποδοχέα, η οποία είναι ειδική προς τον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Η τιμή AQUA από τη μέτρηση του EGFR:GRB2 PLA σήματος σχετιζόταν με την ποσότητα του ενεργοποιημένου υποδοχέα μετρημένου με Western Blot. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές σειρές με υψηλές τιμές PLA EGFR:GRB2 AQUA, δηλαδή ισχυρό σήμα παρουσίας EGFR:GRB2 είχαν αντίστοιχα μεγάλη ποσότητα φωσφορυλιωμένου, δηλαδή ενεργοποιημένου EGFR. Αυτό σημαίνει ότι το σήμα από το PLA EGFR:GRB2 είναι ευαίσθητος έμμεσος δείκτης ανίχνευσης του ενεργοποιημένου EGFR (γραφήματα 3 και 4).

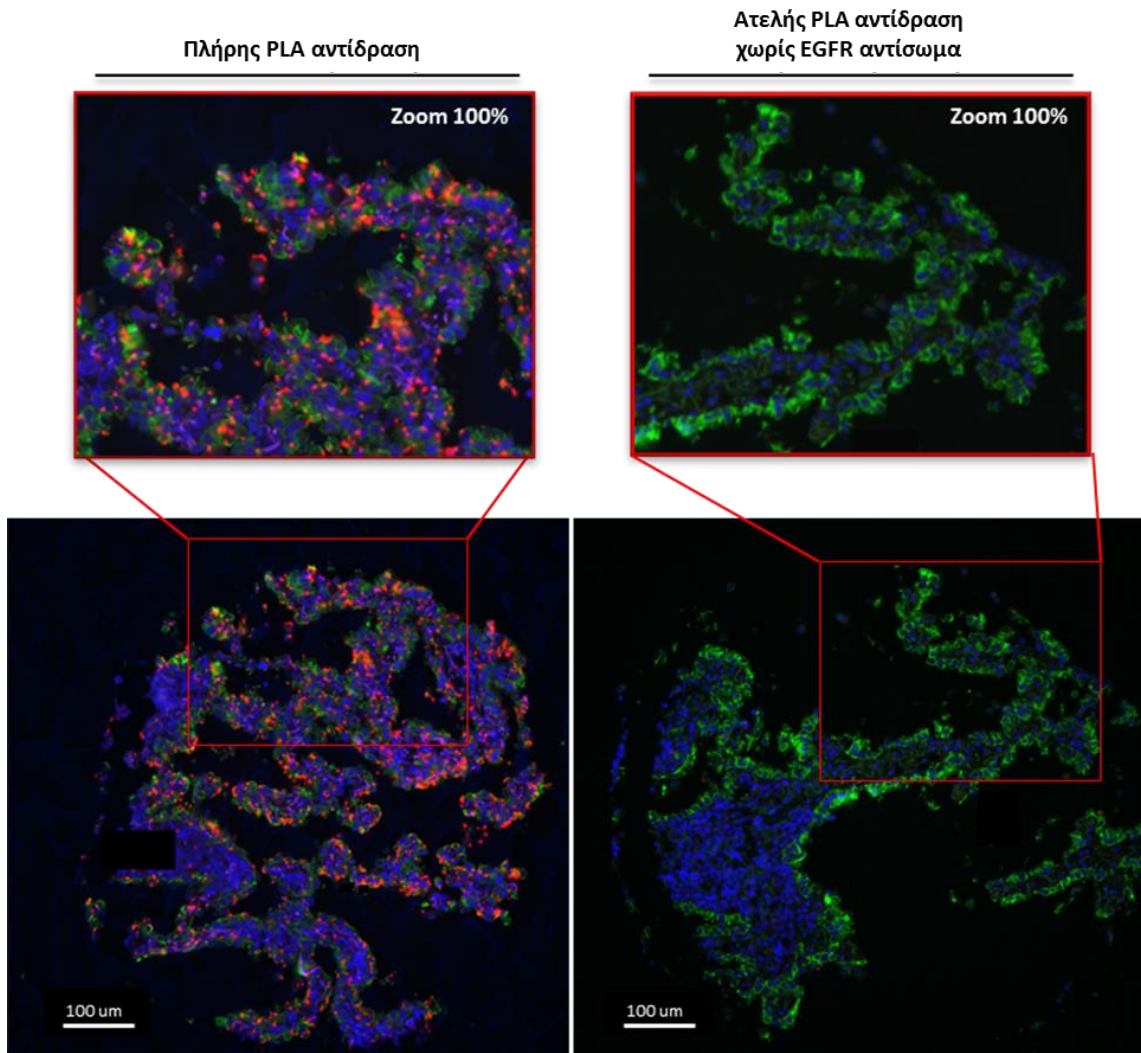


Γράφημα 3: Ποσοτική μέτρηση της φωσφορυλιωμένης μορφής του EGFR (phospho-EGFR) με την τεχνική Western Blot. Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα ως προς την ποσότητα β-τουμπουλίνης και το γράφημα δείχνει την αύξηση της ποσότητας phospho-EGFR σε σύγκριση με το αρνητικό σημείο αναφοράς, την κυτταρική σειρά MCF7.



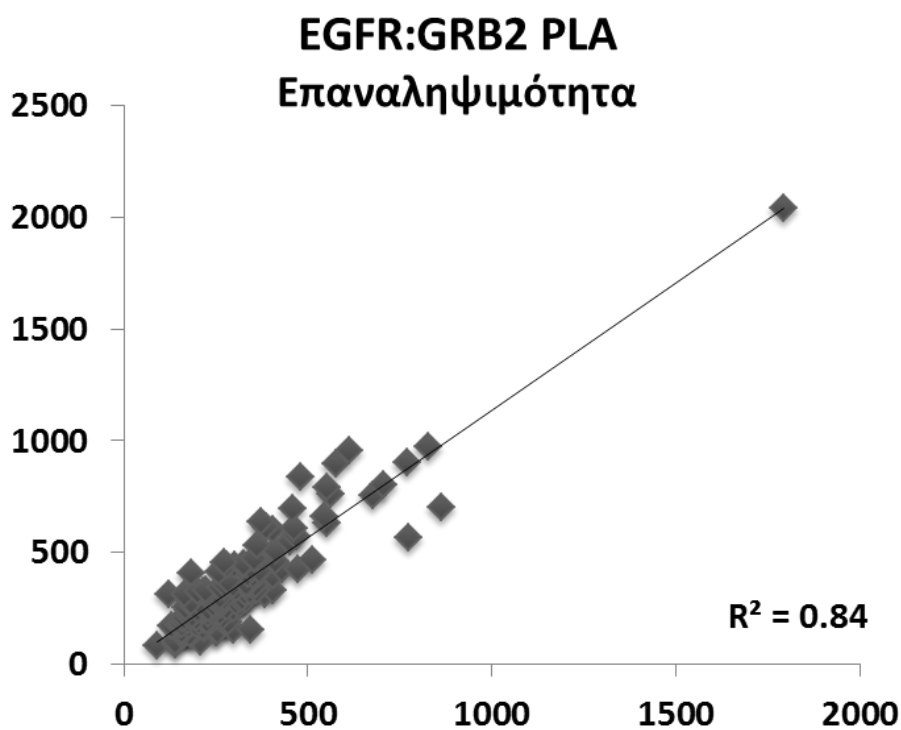
Γράφημα 4: Ποσοτική μέτρηση του PLA EGFR:GRB2 με τη μέθοδο AQUA. Το γράφημα δείχνει την αύξηση της τιμής AQUA σε σύγκριση με το αρνητικό σημείο αναφοράς, την κυτταρική σειρά MCF7.

Για να ελεγχθεί η ειδικότητα της μεθόδου PLA, συγκρίναμε το σήμα που ανιχνεύεται από μία πλήρη PLA αντίδραση, η οποία περιέχει και τα δύο πρωταρχικά αντισώματα (EGFR και GRB2) και μίας ατελούς PLA αντίδρασης η οποία περιείχε μόνο ένα από τα δύο πρωτογενή αντισώματα που απαιτούνται για την ανίχνευση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση περιείχε μόνο το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης GRB2 (εικόνα 10). Το αποτέλεσμα έδειξε ότι στη δεύτερη περίπτωση, το σήμα από το PLA ήταν απόν ενώ αντίθετα στον ιστό όπου πραγματοποιήθηκε μία πλήρης PLA αντίδραση το σήμα ήταν έντονο. Ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από ασθενή που έφερε μετάλλαξη του EGFR και το σήμα ανοσοφθορισμού PLA EGFR:GRB2 ήταν ισχυρό.

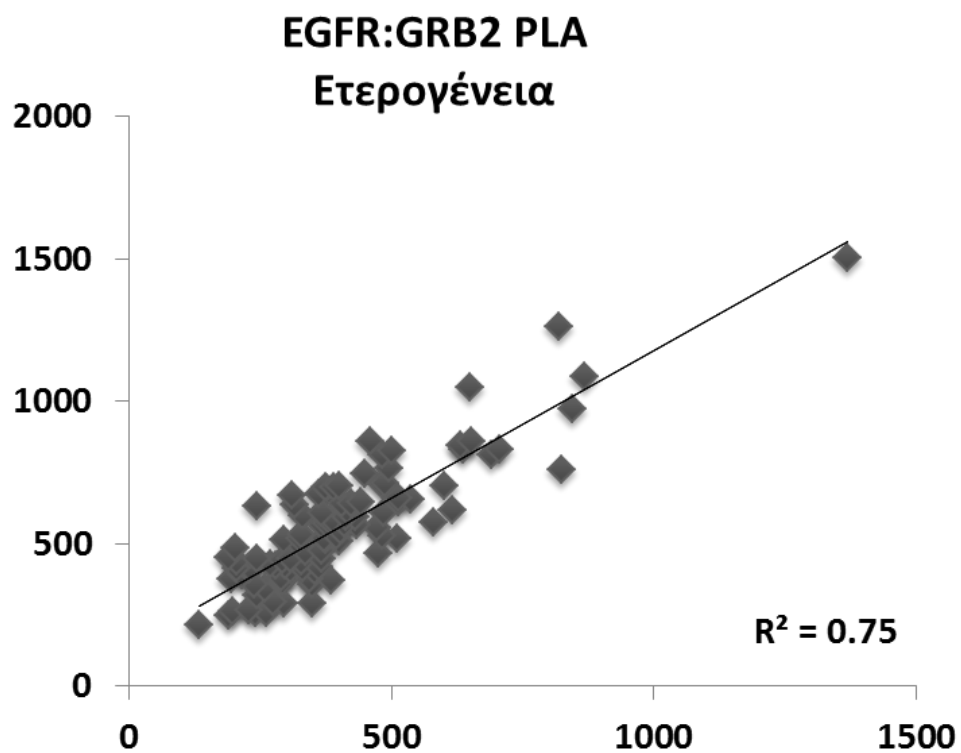


Εικόνα 10: Τεχνικός έλεγχος ειδικότητας του τροποποιημένου PLA πρωτοκόλλου με μία πλήρη και μία ατελή PLA αντίδραση. Για να ανιχνευθεί σήμα ανοσοφθορισμού απαιτείται η παρουσία και των δύο πρωταρχικών αντισωμάτων. Κόκκινο: σήμα PLA EGFR:GRB2, Μπλε: Πυρήνες (DAPI), Πράσινο: Κυτταροκερατίνη.

Τέλος, τα αποτελέσματα από τη μέθοδο PLA ποσοτικοποιημένα από την AQUA είναι επαναλήψιμα καθώς οι τιμές AQUA δύο διαφορετικών EGFR:GRB2 PLA πειραμάτων σε διαδοχικές τομές του ίδιου TMA ($R^2 = 0.84$) έχουν πολύ υψηλή συσχέτιση (γράφημα 5). Επιπλέον, όταν συγκρίνονται διαφορετικές περιοχές του όγκου ως προς την παρουσία συμπλόκων EGFR και GRB2, η ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών περιοχών είναι μικρή και οι τιμές AQUA είναι συγκρίσιμες ($R^2 = 0.75$), υποδεικνύοντας ότι ο ιστός διαμέτρου 0,6 χιλιοστών που περιέχεται στο TMA είναι αντιπροσωπευτικός του συνολικού καρκινικού όγκου (γράφημα 6).



Γράφημα 5: Η επαναληψιμότητα της μεθόδου PLA για την ανίχνευση των συμπλεγμάτων EGFR:GRB2 είναι επαναλήψιμη σε συνεχόμενες τομές του ίδιου ιστού από TMA όταν το πείραμα πραγματοποιείται διαφορετικές ημέρες ως ανεξάρτητο πείραμα.



Γράφημα 6: Η ετερογένεια του σήματος PLA από την ανίχνευση των συμπλεγμάτων EGFR:GRB2 σε διαφορετικές περιοχές του όγκου είναι μικρή. Ιστός από διαφορετικές περιοχές του όγκου παρουσιάζει συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Συζήτηση

Σε αυτό το πείραμα, το κλασσικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, η μέθοδος PLA, τροποποιήθηκε ώστε να ενισχυθεί το σήμα ανοσοφθορισμού τόσο ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί με τη μέθοδο AQUA. Αυτό κατέστη δυνατό με τη χρήση μορίων HRP και της φθορίζουσας χρωστικής CY5 - Tyramide που πολλαπλασιάζουν την ένταση του σήματος έως και 100 φορές. Στόχος του πειράματος ήταν να καταστεί εφικτή η αντικειμενική μέτρηση του εκπεμπόμενου σήματος και να εξαλειφθεί οποιαδήποτε υποκειμενική ερμηνεία του αποτελέσματος. Με αυτό τον τρόπο η μέτρηση είναι αναπαραγώγιμη, αντικειμενική και ανεπηρέαστη από παράγοντες που αφορούν τον εκτιμητή του αποτελέσματος.

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 ήταν συμβατά με την παρούσα γνώση πάνω στη σηματοδοτική δραστηριότητα των κυτταρικών αυτών σειρών. Οι κυτταρικές σειρές που έφεραν μεταλλάξεις του υποδοχέα είχαν ισχυρό σήμα PLA ποσοτικοποιημένο με τη μέθοδο AQUA, ενώ για τις κυτταρικές σειρές που δεν έφεραν μεταλλάξεις η τιμή σήματος AQUA διέφερε, υποδεικνύοντας ότι ακόμα και χωρίς μεταλλάξεις του EGFR, ο υποδοχέας μπορεί να είναι ενεργοποιημένος και να συντελεί σε λειτουργική σηματοδότηση. Η ενεργοποίηση αυτή ήταν ανεξάρτητη από τη συνολική έκφραση του υποδοχέα μιας και τόσο η σειρά H2882 όσο και η HCC193 εκφράζουν τόσο την πρωτεΐνη EGFR όσο και την πρωτεΐνη GRB2, όμως η ποσότητα και η ένταση του σήματος ήταν

διαφορετική. Μάλιστα η σειρά HCC193 είχε αντίστοιχα υψηλές τιμές AQUA με τις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του AQUA είναι ανεξάρτητη του προφίλ μεταλλάξεων της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.

Είναι γνωστό από μελέτες, ότι το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών που δε φέρουν μεταλλάξεις του EGFR στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης είναι περίπου 10% [58, 99]. Παρόλο που δεν είναι τόσο υψηλό όσο το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών με μεταλλαγμένο υποδοχέα, περίπου 75% [34], υπάρχουν ασθενείς που ωφελούνται από τη χρήση αυτής της κατηγορίας φαρμάκων. Σε μία προηγούμενη μελέτη [96], ένα πρωτόκολλο PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων EGFR και GRB2 χρησιμοποιήθηκε ώστε να προβλεφθεί η ανταπόκριση πειραματόζων που έφεραν όγκους από ασθενείς με ΜΜΚΠ, στο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του EGFR, Cetuximab . Η παρουσία συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 δεν κατάφερε να προβλέψει την ανταπόκριση των όγκων σε αυτή την στοχευμένη θεραπεία. Αυτό θα μπορούσε μεταξύ άλλων όμως να αποδοθεί στην έλλειψη αντικειμενικής μεθόδου μέτρησης του σήματος PLA, μιας και στην παρούσα μελέτη ο τρόπος μέτρησης του σήματος ήταν ημι-ποσοτικός.

Με την παραλλαγή του πρωτόκολλου PLA και την προσθήκη ενός ακόμα βήματος για την ενίσχυση του σήματος, έγινε εφικτή η ποσοτικοποίηση του σήματος με την αυτοματοποιημένη μέθοδο AQUA. Το σήμα από την ανίχνευση των συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 φάνηκε με τη μέθοδο Western Blot να είναι ενδεικτικό της ενεργοποίησης και φωσφορυλίωσης του υποδοχέα ενώ η μέθοδος

AQUA και ο συνεχής χαρακτήρας που έχουν οι τιμές της έντασης του σήματος, επιτρέπει τη διαβάθμιση των δειγμάτων με βάση την ένταση τους σήματος.

Περαιτέρω μελέτες σε δείγματα που προέρχονται από ιστό ασθενών θα καθορίσει κατά πόσο η παρουσία συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 ποσοτικοποιημένη με τη μέθοδο AQUA έχει προγνωστική αξία ή μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση των ασθενών αυτών σε στοχευμένες θεραπείες με αναστολείς τυροσινικής κινάσης ή μονοκλωνικά αντισώματα κατά του EGFR όπως το Cetuximab.

ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΣΥΝΟΨΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί έναν από τους συχνότερους και πιο θανατηφόρους τύπους κακοήθειας τόσο στον ανεπτυγμένο όσο και στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Παρόλο που η επίπτωση και η θνησιμότητα έχουν μειωθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες, συνεχίζει να αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου σε ασθενείς με κακοήθεια. Η παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα είναι περίπλοκη και πολλοί παράγοντες έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, όπως το κάπνισμα (ενεργητικό και παθητικό), η διατροφή, το αλκοόλ, η φυσική άσκηση, η περιβαλλοντική έκθεση, η επαγγελματική έκθεση και γενετικοί παράγοντες. Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να διακριθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τον ιστολογικό τους τύπο, στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) και τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΠ).

Ο ΜΜΚΠ αποτελεί το 85% των περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων δύο βασικούς υποτύπους: το αδenoκαρκίνωμα και το πλακώδες καρκίνωμα. Αυτοί οι δύο υπότυποι διαφέρουν τόσο ιστολογικά όσο και κλινικά με διαφορετική συμπτωματολογία και εντόπιση. Μία ακόμα βασική διαφορά των δύο αυτών υποτύπων είναι η διαφορετικού βαθμού εξάρτησή τους από συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια και πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Στην περίπτωση του αδenoκαρκινώματος, σημαντικό ρόλο παίζει ο υποδοχέας του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR). Το μονοπάτι του EGFR είναι ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια που

ρυθμίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων των θηλαστικών. Ο υποδοχέας EGFR (ErbB1/HER1) είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων τυροσινικής κινάσης ErbB, στην οποία ανήκουν επίσης οι υποδοχείς ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) και ErbB4 (HER4). Διάφοροι συνδέτες (ligands) μπορούν να προσδεθούν στον EGFR και να δράσουν ως αγωνιστές, μεταξύ των οποίων και ο επιδερμοειδής αυξητικός παράγοντας (EGF), ο οποίος έχει πολύ ισχυρή συγγένεια με τον υποδοχέα. Ο υποδοχέας EGFR είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 170 kDa, η οποία εκφράζεται σε διαφορετικό βαθμό σε 50 - 90% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ. Με την πρόσδεση του αγωνιστή στον υποδοχέα, σχηματίζονται όμο- και έτερο- διμερή με άλλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς και στη συνέχεια ο υποδοχέας αυτοφωσφορυλιώνεται. Με τη φωσφορυλίωση της περιοχής τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα, η πρωτεΐνη GRB2 (Growth factor receptor bound protein 2) προσδένεται στον υποδοχέα μέσω της περιοχής SH2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS. Έτσι ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι MEK/ERK που παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και επιβίωση του όγκου.

Ο υποδοχέας EGFR αποτελεί θεραπευτικό στόχο, ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που φέρουν μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα. Μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR ανευρίσκονται σε περίπου 10% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα του δυτικού πολιτισμού και σχεδόν 50% σε Ασιάτες ασθενείς. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται στα εξόνια 18 έως 21, τα οποία

κωδικοποιούν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής τυροσινικής κινάσης όπου γίνεται η πρόσδεση των πρωτεϊνών σηματοδότησης. Οι πιο κοινές και περισσότερο μελετημένες μεταλλάξεις, που αποτελούν το 80 - 90% όλων των μεταλλάξεων του EGFR στο MMKP είναι διαγραφές στο εξόνιο 19 και αντικαταστάσεις του αμινοξέος λευκίνη με αργινίνη στη θέση 858 (L858R) στο εξόνιο 21. Περίπου 10% των ασθενών έχουν σπανιότερες μεταλλάξεις του EGFR, σε τύπο και θέση, όπως αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 18 με συχνότερη τη G719A (~5%), στο εξόνιο 20 (4-10%) καθώς επίσης και εισαγωγές νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 19.

Οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 έχουν σχετισθεί με καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR συγκριτικά με τις μεταλλάξεις L858R στο εξόνιο 21, η οποία μεταφράζεται τόσο σε αυξημένη επιβίωση [overall survival (OS)] όσο και σε μακρότερη περίοδο ελεύθερης νόσου [progression free survival (PFS)] σε αρκετές κλινικές μελέτες φάσης III. Τα υπάρχοντα δεδομένα για τις λεγόμενες σπάνιες μεταλλάξεις του EGFR είναι αντικρουόμενα. Αποτελέσματα από τη μελέτη LUX-Lung για το θεραπευτικό παράγοντα Afatinib, δείχνουν ότι οι αντικαταστάσεις αμινοξέων G719A (εξόνιο 18) και L861Q (εξόνιο 21) έχουν καλή ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης ενώ οι ασθενείς με μεταλλάξεις T790M (αντικατάσταση θρεονίνης με μεθειονίνη στη θέση 790, εξόνιο 20) ή εισαγωγές στο εξόνιο 20 είχαν γενικά χειρότερη συνολική ανταπόκριση με μικρότερη περίοδο ελεύθερης νόσου και συνολική επιβίωση. Εκτός από τη χειρότερη ανταπόκριση στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης, λίγα είναι γνωστά για τους ασθενείς με μεταλλάξεις του

εξονίου 20, που αποτελεί το 4-10% όλων των μεταλλάξεων του EGFR. Πρόσφατα, ο θεραπευτικός παράγοντας Luminespib (AUY922; Vernalis, Winnersh, United Kingdom) ένας αναστολέας του Hsp90, έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μία μελέτη φάσης II σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR μετά από τουλάχιστον δύο γραμμές με χημειοθεραπεία.

Η ομάδα ασθενών με παρουσία μεταλλάξεων που προκαλούν ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει βρεθεί ότι έχουν καλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη, ανεξάρτητα από το στάδιο νόσου ή τη θεραπεία. Ωστόσο, τα δεδομένα για τον προγνωστικό ρόλο της ολικής έκφρασης του EGFR στο ΜΜΚΠ, όπως μετράται με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας είναι αντικρουόμενα, με τις περισσότερες μελέτες να μην έχουν δείξει προγνωστική σημασία. Η εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου του EGFR με τη χρήση φθορίζοντος in situ υβριδισμού (fluorescent in situ hybridization - FISH) δεν έχει δείξει επίσης με συνέπεια συσχέτισμό με την πρόγνωση. Η τεχνική PLA (Proximity ligation assay) είναι μία μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σχετιζόμενων με λειτουργική σηματοδότηση. Η μέθοδος PLA χρησιμοποιεί αντισώματα που φέρουν στο άκρο τους ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία υβριδοποιούνται με μία συνδετική αλυσίδα νουκλεοτιδίων, μόνο όταν βρεθούν σε απόσταση μικρότερη των 40 νανόμετρων. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει την ανίχνευση συμπλεγμάτων πρωτεϊνών σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο μηχανισμός ανίχνευσης βασίζεται στη δημιουργία ενός Rolling Circle Amplification συστήματος. Το PLA έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του EGFR και του GRB2, της πρωτεΐνης που προσδένεται

στο φωσφορυλιωμένο ενεργοποιημένο υποδοχέα και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK.

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική PLA χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ EGFR και GRB2, η οποία μετρήθηκε ποσοτικά με τη χρήση της τεχνολογίας AQUA® [Automated Quantitative Immunofluorescence (QIF)]. Η μέθοδος AQUA επιτρέπει την ποσοτική μέτρηση του σήματος του ανοσοφθορισμού σε έναν ιστό που έχει μονιμοποιηθεί με φορμόλη και βρίσκεται σε παραφίνη. Το λογισμικό αυτό μετράει την ένταση και την έκταση του σήματος ενός στόχου σε ένα συγκεκριμένο υποδιαμέρισμα που μπορεί να ορίσει ο χειριστής και με βάση αυτές τις παραμέτρους παράγει μία τιμή (σκορ) που αντιπροσωπεύει την αντικειμενική μέτρηση της πρωτεΐνης στόχου. Με τη χρήση του σήματος ανοσοφθορισμού από άλλους στόχους όπως της κυτταροκερατίνης ή των πυρήνων που βρίσκονται στο παρασκεύασμα μπορεί να δημιουργήσει υποδιαμερίσματα, π.χ. με το σήμα της κυτταροκερατίνης μπορεί να οριστεί το επιθηλιακό υποδιαμέρισμα σε συμπαγείς όγκους, εντός των οποίων θα ποσοτικοποιηθεί ο στόχος ενδιαφέροντος. Η τιμή που δημιουργείται αποτελεί το κλάσμα του συνόλου της έντασης του σήματος του στόχου σε εικονοκύτταρα (pixel) του υποδιαμερίσματος διά του συνόλου των εικονοκυττάρων (pixel) του επιθυμητού υποδιαμερίσματος. Τέλος, οι τιμές AQUA κανονικοποιούνται με βάση τις παραμέτρους του διαφορετικού χρόνου έκθεσης και του βάθους του ιστού από το οποίο οι εικόνες δημιουργήθηκαν. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης AQUA είναι επαναλήψιμη και η τιμή AQUA αποτελεί μία αντικειμενική μέτρηση της έκφρασης ενός βιοδείκτη. Επίσης με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η σύγκριση δύο ιστών ως

προς την έκφραση μιας πρωτεΐνης στόχου με αντικειμενικά κριτήρια και λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους κανονικοποίησης.

Σε αυτό το πείραμα, το κλασικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με τη μέθοδο PLA, τροποποιήθηκε ώστε να ενισχυθεί το σήμα ανοσοφθορισμού τόσο ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί με τη μέθοδο AQUA. Αυτό κατέστη δυνατό με τη χρήση μορίων HRP (Horseradish Peroxidase) και της φθορίζουσας χρωστικής CY5 - Tyramide που πολλαπλασιάζουν την ένταση του σήματος έως και 100 φορές. Στόχος του πειράματος ήταν να καταστεί εφικτή η αντικειμενική μέτρηση του εκπεμπόμενου σήματος και να εξαιρεθεί οποιαδήποτε υποκειμενική ερμηνεία του αποτελέσματος. Με αυτό τον τρόπο η μέτρηση είναι αναπαραγώγιμη, αντικειμενική και ανεπηρέαστη από παράγοντες που αφορούν τον εκτιμητή του αποτελέσματος.

Το EGFR:GRB2 PLA βρέθηκε ότι σχετίζεται με την παρουσία ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) του ενδοκυττάριου τμήματος (τυροσινικής κινάσης) του EGFR σε 6 κυτταρικές σειρές, όπως μετρήθηκε με Western Blot. Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 ήταν συμβατά με την παρούσα γνώση πάνω στη σηματοδοτική δραστηριότητα των κυτταρικών αυτών σειρών. Οι κυτταρικές σειρές που έφεραν μεταλλάξεις του υποδοχέα είχαν ισχυρό σήμα PLA ποσοτικοποιημένο με τη μέθοδο AQUA, ενώ για τις κυτταρικές σειρές που δεν έφεραν μεταλλάξεις η τιμή σήματος AQUA διέφερε, υποδεικνύοντας ότι ακόμα και χωρίς μεταλλάξεις του EGFR, ο υποδοχέας μπορεί να είναι ενεργοποιημένος και να συντελεί σε λειτουργική σηματοδότηση. Η

ενεργοποίηση αυτή ήταν ανεξάρτητη από τη συνολική έκφραση του υποδοχέα μιας και τόσο η σειρά H2882 όσο και η HCC193 εκφράζουν τόσο την πρωτεΐνη EGFR όσο και την πρωτεΐνη GRB2, όμως η ποσότητα και η ένταση του σήματος ήταν διαφορετική. Μάλιστα η σειρά HCC193 είχε αντίστοιχα υψηλές τιμές AQUA με τις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του AQUA είναι ανεξάρτητη του προφίλ μεταλλάξεων της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.

Η τροποποιημένη μέθοδος PLA για την ανίχνευση των συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 βρέθηκε επίσης να είναι ειδική καθώς το σήμα ανιχνεύεται μόνο αν προέρχεται από μία πλήρη PLA αντίδραση, η οποία περιέχει και τα δύο πρωταρχικά αντισώματα (EGFR και GRB2) και όχι από μία ατελή PLA αντίδραση η οποία περιέχει μόνο ένα από τα δύο πρωτογενή αντισώματα που απαιτούνται για την ανίχνευση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση μόνο το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης GRB2.

Τέλος, τα αποτελέσματα από τη μέθοδο PLA ποσοτικοποιημένα από την AQUA είναι επαναλήψιμα καθώς οι τιμές AQUA δύο διαφορετικών EGFR:GRB2 PLA πειραμάτων σε διαδοχικές τομές του ίδιου TMA (Tissue Microarray) έχουν πολύ υψηλή συσχέτιση. Επιπλέον, όταν συγκρίνονται διαφορετικές περιοχές του όγκου ως προς την παρουσία συμπλόκων EGFR και GRB2, η ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών περιοχών είναι μικρή και οι τιμές AQUA είναι συγκρίσιμες, υποδεικνύοντας ότι ο ιστός διαμέτρου 0,6 χιλιοστών που περιέχεται στο TMA είναι αντιπροσωπευτικός του συνολικού καρκινικού όγκου.

Περαιτέρω μελέτες σε δείγματα που προέρχονται από ιστό ασθενών θα καθορίσει κατά πόσο η παρουσία συμπλεγμάτων EGFR και GRB2 ποσοτικοποιημένη με τη μέθοδο AQUA έχει προγνωστική αξία ή μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση των ασθενών αυτών σε στοχευμένες θεραπείες με αναστολείς τυροσινικής κινάσης ή μονοκλωνικά αντισώματα κατά του EGFR όπως το Cetuximab.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2007*. CA Cancer J Clin, 2007. **57**(1): p. 43-66.
2. Howlader, N., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015*. 2015.
3. Ettinger, D.S., et al., *Non-small cell lung cancer, version 2.2013*. J Natl Compr Canc Netw, 2013. **11**(6): p. 645-53; quiz 653.
4. Yarden, Y. and G. Pines, *The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(8): p. 553-563.
5. Roskoski, R., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. Pharmacological Research, 2014. **79**: p. 34-74.
6. Alberg, A.J., M.V. Brock, and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer: looking to the future*. J Clin Oncol, 2005. **23**(14): p. 3175-85.
7. Hecht, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(14): p. 1194-210.
8. Boffetta, P., *Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence*. Mutat Res, 2006. **608**(2): p. 157-62.
9. Hackshaw, A.K., M.R. Law, and N.J. Wald, *The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke*. BMJ, 1997. **315**(7114): p. 980-8.

10. Whitrow, M.J., et al., *Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature*. *Respirology*, 2003. **8**(4): p. 513-21.
11. Vineis, P., et al., *Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study*. *BMJ*, 2005. **330**(7486): p. 277.
12. Krinsky, N.I. and E.J. Johnson, *Carotenoid actions and their relation to health and disease*. *Mol Aspects Med*, 2005. **26**(6): p. 459-516.
13. Ruano-Ravina, A., et al., *Antioxidant vitamins and risk of lung cancer*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(5): p. 599-613.
14. Lam, W.K., *Lung cancer in Asian women-the environment and genes*. *Respirology*, 2005. **10**(4): p. 408-17.
15. Siems, W., et al., *Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions--potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation*. *J Nutr Biochem*, 2005. **16**(7): p. 385-97.
16. Freudenheim, J.L., et al., *Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(3): p. 657-67.
17. Lee, I.M., *Physical activity and cancer prevention--data from epidemiologic studies*. *Med Sci Sports Exerc*, 2003. **35**(11): p. 1823-7.
18. Tardon, A., et al., *Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis*. *Cancer Causes Control*, 2005. **16**(4): p. 389-97.

19. Friedenreich, C.M. and M.R. Orenstein, *Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms*. J Nutr, 2002. **132**(11 Suppl): p. 3456S-3464S.
20. Alfano, C.M., et al., *Physical activity in relation to all-site and lung cancer incidence and mortality in current and former smokers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(12): p. 2233-41.
21. Boffetta, P., *Epidemiology of environmental and occupational cancer*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6392-403.
22. Hwang, S.J., et al., *Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk*. Hum Genet, 2003. **113**(3): p. 238-43.
23. Li, X. and K. Hemminki, *Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type*. Int J Cancer, 2004. **112**(3): p. 451-7.
24. Giaccone, G., *HER1/EGFR-targeted agents: predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy*. Ann Oncol, 2005. **16**(4): p. 538-48.
25. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
26. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-310.

27. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
28. Hirsch, F.R. and P.A. Bunn, Jr., *EGFR testing in lung cancer is ready for prime time*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 432-3.
29. Sakurada, A., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: Impact of primary or secondary mutations*. Clinical Lung Cancer, 2006. **7**: p. S138-S144.
30. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(3): p. 169-81.
31. Eberhard, D.A., et al., *Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(25): p. 5900-5909.
32. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(12): p. 1817-24.
33. Choi, Y.L., et al., *EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1734-9.
34. Pao, W. and J. Chmielecki, *Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(11): p. 760-74.

35. Oxnard, G.R., et al., *Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(2): p. 179-84.
36. Arcila, M.E., et al., *EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(2): p. 220-9.
37. Cheng, L., et al., *Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine*. Mod Pathol, 2012. **25**(3): p. 347-69.
38. Yang, J.C.H., et al., *Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials*. Lancet Oncology, 2015. **16**(2): p. 141-151.
39. Fukuoka, M., et al., *Biomarker Analyses and Final Overall Survival Results From a Phase III, Randomized, Open-Label, First-Line Study of Gefitinib Versus Carboplatin/Paclitaxel in Clinically Selected Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer in Asia (IPASS)*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(21): p. 2866-2874.
40. Mitsudomi, T., et al., *Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncology, 2010. **11**(2): p. 121-128.

41. Sequist, L.V., et al., *First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15): p. 2442-2449.
42. Cappuzzo, F., et al., *Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: The ONCOBELL trial*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(16): p. 2248-2255.
43. Zhang, Y.X., et al., *Patients with Exon 19 Deletion Were Associated with Longer Progression-Free Survival Compared to Those with L858R Mutation after First-Line EGFR-TKIs for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis*. Plos One, 2014. **9**(9).
44. Wang, H., et al., *Different efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors and prognosis in patients with subtypes of EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2014. **140**(11): p. 1901-1909.
45. Lee, C.K., et al., *Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(17): p. 1958-U142.
46. Wu, J.Y., et al., *Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3812-21.

47. Garon, E.B., et al., *Phase II study of the HSP90 inhibitor AUY922 in patients with previously treated, advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. **30**(15).
48. Liao, W., *Activity of AUY922 in NSCLC Patients With EGFR Exon 20 Insertions*. International Association for the Study of Lung Cancer, 2015.
49. Johnson, M.L., et al., *Phase I/II Study of HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib for EGFR-Mutant Lung Cancer With Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(15): p. 1666-+.
50. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(3): p. 169-81.
51. Riely, G.J., et al., *Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2006. **12**(24): p. 7232-7241.
52. Zimmermann, S., R. Dziadziuszko, and S. Peters, *Indications and limitations of chemotherapy and targeted agents in non-small cell lung cancer brain metastases*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(6): p. 716-22.
53. Franceschi, E., et al., *The role of systemic and targeted therapies in brain metastases*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014. **14**(1): p. 93-103.
54. Iuchi, T., et al., *Phase II trial of gefitinib alone without radiation therapy for Japanese patients with brain metastases from EGFR-mutant lung adenocarcinoma*. *Lung Cancer*, 2013. **82**(2): p. 282-287.

55. Togashi, Y., et al., *Cerebrospinal fluid concentration of gefitinib and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2012. **70**(3): p. 399-405.
56. Wang, M., Z. Jing, and C. Minjiang, *Cerebral penetration of gefitinib in patients with lung adenocarcinoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. **29**(15).
57. Lee, E., et al., *Erlotinib Versus Gefitinib for Control of Leptomeningeal Carcinomatosis in Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2013. **8**(8): p. 1069-1074.
58. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(2): p. 123-32.
59. Kwak, E.L., et al., *Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(21): p. 7665-7670.
60. Engelman, J.A., et al., *PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib*. *Cancer Research*, 2007. **67**(24): p. 11924-11932.
61. Li, D., et al., *BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models*. *Oncogene*, 2008. **27**(34): p. 4702-4711.
62. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(75): p. 75ra26.

63. Yu, H.A., et al., *Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(8): p. 2240-7.
64. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
65. Suda, K., et al., *Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(22): p. 5489-98.
66. Piotrowska, Z., et al., *Variation in mechanisms of acquired resistance (AR) among EGFR-mutant NSCLC patients with more than one post-resistant biopsy*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(5s).
67. Halmos, B., et al., *Randomized Phase II Trial of Erlotinib Beyond Progression in Advanced Erlotinib-Responsive Non-Small Cell Lung Cancer*. Oncologist, 2015. **20**(11): p. 1298-303.
68. Soria, J.C., et al., *Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(8): p. 990-8.
69. Tan, D.S.W., et al., *First-in-human phase I study of EGF816, a third generation, mutant-selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring T790M*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(15).

70. Goto, Y., et al., *ASP8273, a mutant-selective irreversible EGFR inhibitor in patients (pts) with NSCLC harboring EGFR activating mutations: Preliminary results of first-in-human phase I study in Japan*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(15).
71. Park, K., et al., *Updated safety and efficacy results from phase I/II study of HM61713 in patients (pts) with EGFR mutation positive non-small cell lung cancer (NSCLC) who failed previous EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(15).
72. Walter, A.O., et al., *Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(12): p. 1404-15.
73. Hirano, T., et al., *In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(36): p. 38789-803.
74. Zhou, W.J., et al., *Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M*. *Nature*, 2009. **462**(7276): p. 1070-1074.
75. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **361**(10): p. 947-957.
76. Han, J.Y., et al., *First-SIGNAL: First-Line Single-Agent Iressa Versus Gemcitabine and Cisplatin Trial in Never-Smokers With Adenocarcinoma of the Lung*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. **30**(10): p. 1122-1128.

77. Yoshioka, H., et al., *Final overall survival results of WJTOG 3405, a randomized phase 3 trial comparing gefitinib (G) with cisplatin plus docetaxel (CD) as the first-line treatment for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR)*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(15).
78. Inoue, A., et al., *Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002)*. Annals of Oncology, 2013. **24**(1): p. 54-59.
79. Zhou, C.C., et al., *Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncology, 2011. **12**(8): p. 735-742.
80. Zhou, C., et al., *Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802)*. Annals of Oncology, 2015. **26**(9): p. 1877-1883.
81. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncology, 2012. **13**(3): p. 239-246.

82. Leon, L.F., et al., *Overall survival analyses of first-line erlotinib versus chemotherapy in the EURTAC study population controlling for the use of post-study therapy*. *Annals of Oncology*, 2014. **25**(Supplement 4).
83. Wu, Y.L., et al., *Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncology*, 2014. **15**(2): p. 213-222.
84. Rimm, D.L., et al., *Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources*. *Cancer J*, 2001. **7**(1): p. 24-31.
85. McLaughlin, J., et al., *Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer*. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(1): p. 46-54.
86. Hsi, E.D., *A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory*. *Arch Pathol Lab Med*, 2001. **125**(2): p. 289-94.
87. Allred, D.C., et al., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. *Mod Pathol*, 1998. **11**(2): p. 155-68.
88. Camp, R.L., G.G. Chung, and D.L. Rimm, *Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1323-7.
89. Berghmans, T., et al., *Prognostic role of epidermal growth factor receptor in stage III nonsmall cell lung cancer*. *Eur Respir J*, 2005. **25**(2): p. 329-35.

90. Meert, A.P., et al., *The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis*. Eur Respir J, 2002. **20**(4): p. 975-81.
91. Peled, N., et al., *Predictive and prognostic markers for epidermal growth factor receptor inhibitor therapy in non-small cell lung cancer*. Ther Adv Med Oncol, 2009. **1**(3): p. 137-44.
92. Soderberg, O., et al., *Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 995-1000.
93. Gajadhar, A.S., et al., *In situ analysis of mutant EGFRs prevalent in glioblastoma multiforme reveals aberrant dimerization, activation, and differential response to anti-EGFR targeted therapy*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(3): p. 428-40.
94. Halle, C., et al., *Phosphorylation of EGFR measured with in situ proximity ligation assay: relationship to EGFR protein level and gene dosage in cervical cancer*. Radiother Oncol, 2011. **101**(1): p. 152-7.
95. Chen, T.C., et al., *Protein phosphorylation profiling using an in situ proximity ligation assay: phosphorylation of AURKA-elicited EGFR-Thr654 and EGFR-Ser1046 in lung cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e55657.
96. Smith, M.A., et al., *Annotation of human cancers with EGFR signaling-associated protein complexes using proximity ligation assays*. Sci Signal, 2015. **8**(359): p. ra4.

97. Bai, Y.L., et al., *Quantitative assessment shows loss of antigenic epitopes as a function of pre-analytic variables*. *Laboratory Investigation*, 2011. **91**(8): p. 1253-1261.
98. McCabe, A., et al., *Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(24): p. 1808-15.
99. Kim, E.S., et al., *Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial*. *Lancet*, 2008. **372**(9652): p. 1809-18.