



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Ανάλυση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* στον καρκίνο του  
μαστού**

**ΣΟΦΙΑ ΦΑΡΚΩΝΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011**



# **Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού**

**ΣΟΦΙΑ ΦΑΡΚΩΝΑ**

**A.M.: 72921**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.**

**Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α.**

**Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 25/11/2010**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K, *PIK3CA*, έχουν πρόσφατα περιγραφεί σε πολλούς τύπους καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε σε πρώτη φάση η μεθοδολογία Υψηλής διακριτικότητας Ανάλυση καμπυλών Τήξης, (High Resolution Melting Analysis, HRMA), η οποία αναπτύχθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο μας στα πλαίσια της Διατριβής Ειδίκευσης του Π. Βορκά, για την ανίχνευση των δύο πιο συχνά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* σε ομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού. Εφαρμόζοντας HRMA αναλύθηκαν: α) 106 δείγματα γενωμικού DNA από ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού οι οποίοι είχαν λάβει θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab εκ των οποίων το 12% (13/106) βρέθηκαν θετικά είτε στη μετάλλαξη 1624 G>A είτε στην μετάλλαξη 1633 A>G β) δείγματα γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας, ασθενών με διάγνωση μετάστασης και υγιών αιμοδοτών (57, 34, 26 αντίστοιχα) γ) δείγματα cDNA από CTCs ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας, ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση και υγιών αιμοδοτών (57, 9, 21 αντίστοιχα) και δ) δείγματα cell free DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη επικουρικής θεραπείας, ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση και υγιών αιμοδοτών (25, 45, 12 αντίστοιχα). Ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο 4.4% (2/45) των δειγμάτων cfDNA ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού όπως επίσης και στο 4% (1/25) των δειγμάτων cfDNA ασθενών μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη επικουρικής θεραπείας. Αντίθετα δεν ανιχνεύσαμε μεταλλάξεις στα δείγματα DNA που προέρχονταν από τα CTCs.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου βασιζόμενης στο συνδυασμό της HRMA και της ARMS PCR (ARMS-HRMA). Μετά τις απαραίτητες βελτιστοποιήσεις καταλήξαμε σε πρωτόκολλο με ευαισθησία 0.25%. Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου αυτού σε πρότυπα δείγματα DNA από ιστούς έδειξε ότι η ειδικότητα της μεθόδου δεν ήταν αρκετά καλή έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της μετάλλαξης σε κλινικά δείγματα.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Ανάλυση μεταλλάξεων

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** *PIK3CA*, High Resolution Melting Analysis (HRMA), ARMS-PCR, Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, cell free DNA, εξόνιο 9

## ABSTRACT

Mutations in the *PIK3CA* gene have recently been described in a number of cancers.

In the present study we used High Resolution Melting Analysis (HRMA), method that was previously developed in our laboratory<sup>1</sup>, for the detection of two hot spot mutations in exon 9 of the *PIK3CA* gene, in breast cancer patients with.

The HRMA was applied in: a) 106 samples of genomic DNA (gDNA) isolated from FFPEs of patients with breast cancer who had received Trastuzumab treatment. This method detected *PIK3CA* mutations in exon 9 in 12% (13/106) of these samples. b) samples of gDNA isolated from circulating tumor cells (CTCs) of patients with operable breast cancer, patients with metastatic breast cancer and healthy donors (57, 34, 26 respectively) c) samples of cDNA of patients of operable breast cancer, patients with metastatic breast cancer and healthy donors (57, 9, 21 respectively) and d) samples of cfDNA isolated from peripheral blood of patients with operable breast cancer, patients with metastatic breast cancer and healthy donors (25, 45, 12 respectively). This method detected *PIK3CA* mutations in exon 9 in 4.4 % (2/45) of cfDNA samples of patients with metastatic breast cancer as well as in 4 % (1/25) of cfDNA samples of patients with operable breast cancer. No mutation was detected in all samples of gDNA and cDNA.

We then made an attempt to develop a new methodology based on the combination of ARMS-PCR with HRMA. After the optimization of all steps the final protocol had a sensitivity of 0.25 %. However, the application of this protocol in DNA isolated from FFPE samples, which was previously analysed by DNA Sequencing, indicated that the specificity of this methodology was not satisfying enough in order to be applied in clinical samples.

**SUBJECT AREA:** Mutation analysis

**KEY WORDS:** *PIK3CA*, High Resolution Melting Analysis (HRMA), ARMS-PCR, Circulating Tumor Cells (CTC), cell free DNA, exon 9

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	1
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>PIK3CA</i> .....	1
1.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι των PI3Ks .....	1
1.1.1 Εισαγωγή .....	1
1.1.2 Η ενεργοποίηση της τάξης IA των PI3Ks .....	4
1.1.3 Η βιοχημεία του μονοπατιού των PI3Ks.....	6
1.1.4 Η βιοχημεία του μονοπατιού των PI3K-PTEN.....	8
1.2 PI3K και καρκίνος .....	9
1.2.1 Σύνδεσμοι μεταξύ του μονοπατιού των PI3Ks και του καρκίνου .....	9
1.2.2 Ογκογόνες μεταλλάξεις στο <i>PIK3CA</i> .....	10
1.2.3 Η γενετική των ογκογόνων μεταλλάξεων του <i>PIK3CA</i> .....	13
1.2.4 Το <i>PIK3CA</i> είναι μεταλλαγμένο σε μια ποικιλία τύπων καρκίνου.....	15
1.2.5 Οι μεταλλάξεις του <i>PIK3CA</i> στον καρκίνο του μαστού .....	16
1.3 PI3K και ο ρόλος της στη στοχευμένη θεραπεία.....	19
1.3.1 Ο ρόλος του μονοπατιού της PI3K στις στοχευμένες θεραπείες έναντι του HER2.....	19
1.3.1.1 Εμπλοκή του μονοπατιού της PI3K στην αντίσταση στο φάρμακο Trastuzumab (Herceptin).....	19
1.3.1.2 Εμπλοκή του μονοπατιού της PI3K στην αντίσταση στο φάρμακο lapatinib .....	23
1.3.2 Οι μεταλλάξεις στο <i>PIK3CA</i> ως νέος θεραπευτικός στόχος.....	23
1.3.2.1 PI3K αναστολείς.....	24
1.3.2.2 Αναστολείς της AKT .....	25
1.3.2.3 Αναστολείς της mTOR .....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	29
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (CTCs).....	29
2.1 Εισαγωγή.....	29
2.2 Τα CTCs και η μικρομεταστατική διάδοση.....	29
2.3 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση των CTCs, την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό .....	34
2.3.1 Απομόνωση των CTCs και εμπλουτισμός .....	34
2.3.1.1 Διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρωση .....	35
2.3.1.2 Ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός .....	36
2.3.1.3 Συσκευές μικροροής και διήθησης για την επιλογή και την απαρίθμηση των CTCs .....	37
2.3.2 Συστήματα ανίχνευσης των CTCs .....	38
2.3.2.1 Κυτταρομετρικές μέθοδοι .....	43
2.3.2.2 Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs .	44

2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στα CTCs .....	47
2.4 Τα CTCs σαν νέοι βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού .....	51
2.4.1 Πρώιμος καρκίνος του μαστού.....	52
2.4.2 Μεταστατικός καρκίνος του μαστού .....	53
2.4.3 Τα CTCs σαν προβλεπτικοί δείκτες της ανταπόκρισης στη θεραπεία .....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	57
AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM.....	57
3.1 Εισαγωγή.....	57
3.2 Οι βασικές αρχές της ARMS PCR .....	58
3.3 Σχεδιασμός μιας τυπικής ARMS μεθόδου .....	59
3.4 Τροποποιημένα πρωτόκολλα της ARMS-PCR.....	61
3.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο <i>PIK3CA</i> με την ARMS PCR.....	66
Σκοπός της Εργασίας .....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	73
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	73
4.1. Πρότυπα υλικά.....	73
4.2 Δείγματα Ελέγχου .....	73
4.3 Κλινικά Δείγματα.....	73
4.3.1 Κλινικά δείγματα ιστών παραφίνης (FFPEs) .....	73
4.3.1.1 Απομόνωση DNA από ιστούς .....	74
4.3.1.2 Πειραματική πορεία.....	74
4.3.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC) .....	75
4.3.2.1 Απομόνωση CTCs από περιφερικό αίμα. Απομόνωση DNA, RNA και σύνθεση cDNA από τα CTCs .....	76
4.3.3 Cell free DNA (cfDNA).....	77
4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA .....	77
4.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης.....	79
4.6 Real-time PCR- Οργανολογία .....	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	83
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ 1624 A>G ΚΑΙ 1633 G>A ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 9 ΤΟΥ <i>PIK3CA</i> ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΗΣ.....	83
5.1 Εισαγωγή.....	83
5.2 Αρχή της μεθόδου.....	83
5.3 Οργανολογία.....	85
5.4 Παράμετροι που επηρεάζουν την διακριτικότητα.....	86
5.5 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων .....	87
5.6 Χρήση χρωστικών.....	88



5.7 Ανίχνευση των μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A στο εξόνιο 9 του <i>PIK3CA</i> .....	91
5.7.1 <i>In silico</i> σχεδιασμός εκκινητών <sup>1</sup> .....	91
5.7.2 Συνθήκες Real-time PCR για το εξόνιο 9 του γονιδίου <i>PIK3CA</i> .....	92
Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο. ....	92
5.8 Εφαρμογή μεθοδολογίας για ανάλυση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου <i>PIK3CA</i> σε κλινικά δείγματα .....	95
5.8.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και μεταλλάξεων G>A σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs .....	96
5.8.2 Ανίχνευση των μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs .....	100
5.8.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα cell free DNA .....	103
5.8.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα γενωμικού DNA από FFPEs ασθενών με καρκίνο του μαστού. ....	109
5.9 Συμπεράσματα .....	116
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....	119
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 1633 G>A ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 9 ΤΟΥ <i>PIK3CA</i> ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	119
6.1 Εισαγωγή.....	119
6.2 Σχεδιασμός εκκινητών για ARMS PCR .....	119
6.3 ARMS PCR για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A .....	121
6.4 Συστατικά και συνθήκες της ARMS PCR για την μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του <i>PIK3CA</i> .....	123
6.5 Βελτιστοποίηση της μεθόδου .....	125
6.5.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων .....	125
6.5.2 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών της ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του <i>PIK3CA</i> . ....	126
6.5.3 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών της ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του <i>PIK3CA</i> . ....	129
6.6 Συμπεράσματα .....	130
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 .....	131
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS- HRMA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 1633 G>A ΣΤΟ <i>PIK3CA</i> .....	131
7.1 Εισαγωγή.....	131
7.2 Συνδυασμός εκκινητών HRMA με ARMS εκκινητή .....	131
7.3 Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης με το ARMS ζεύγος εκκινητών στο οποίο έχουν ενσωματωθεί οι πλούσιες σε GC αλληλουχίες. ....	140
7.4 Αποτελέσματα της αντίδρασης με το ARMS ζεύγος εκκινητών στο οποίο έχουν ενσωματωθεί οι πλούσιες σε GC αλληλουχίες. ....	142
7.5 Συστατικά και συνθήκες της ARMS-HRMA .....	143

7.6 Βελτιστοποιήσεις της ARMS-PCR σε συνδυασμό με την HRMA .....	146
7.6.1 Βελτιστοποιήσεις συγκέντρωσης εκκινητών.....	146
7.6.2 Βελτιστοποιήσεις της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών, και σταδίων ενίσχυσης της αντίδρασης. ....	147
7.7 Εφαρμογή του πρωτόκολλου της ARMS-HRMA σε δείγματα ελέγχου.....	152
7.7 Μελέτη της ευαισθησίας της ARMS-HRMA .....	153
7.8 Συμπεράσματα .....	155
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 .....	157
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	157
Παράρτημα.....	161
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....	167

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Η PI3K είναι ένα διμερές ένζυμο.....	1
Σχήμα 1.2: Οι ρυθμιστικές και καταλυτικές υπομονάδες της τάξης IA των PI3Ks. ....	2
Σχήμα 1.3: Οι ρυθμιστικές και καταλυτικές υπομονάδες της τάξης IB των PI3Ks. ....	3
Σχήμα 1.4: Μηχανισμοί ενεργοποίησης της τάξης I των PI3Ks .....	4
Σχήμα 1.5: Η αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων RTKs που ενεργοποιούνται μέσω υποκαταστάτη προκαλεί την επάνδρωση των ανενεργών PI3Ks της τάξης IA μέσω της επίδρασης των φωσφοτυροσινικών κατάλοιπων στον υποδοχέα και στις επικράτειες SH2 στη ρυθμιστική υπομονάδα p85, ή των πρωτεϊνών μετασχηματιστών (adaptor proteins) IRS1 και IRS2.....	5
Σχήμα 1.6: Το φυσιολογικό σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K.....	7
Σχήμα 1.7: Το PTEN δρα ανταγωνίζοντας τη δράση της PI3K.....	8
Σχήμα 1.8: Το PIK3CA εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 στην θέση 3q26.3.....	10
Σχήμα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του <i>PIK3CA</i> και των συχνότερα εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στους ανθρώπινους καρκίνους .....	11
Σχήμα 1.10: Α) Η i-SH2 επικράτεια δεσμεύει την καταλυτική υπομονάδα p110α. Β) Τα κατάλοιπα Glu <sup>E542K</sup> και Glu <sup>E545K</sup> , που είναι συχνά μεταλλαγμένα στους καρκίνους, εντοπίζονται σε μια εκτεθειμένη περιοχή της ελικοειδούς επικράτειας. Γ) Οι μεταλλάξεις στην ελικοειδή επικράτεια εντοπίζονται στην μεσεπιφάνεια μεταξύ αυτής και της nSH2. Δ Οι μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης Met <sup>1043</sup> και His <sup>1047</sup> εντοπίζονται δίπλα στο C- τελικό άκρο της θηλιάς ενεργοποίησης και φαίνονται με ανοιχτό πράσινο.....	12
Σχήμα 1.11: Το IgG1 αντίσωμα Trastuzumab. Οι αγκύλες υποδεικνύουν τις Fab και Fc περιοχές του IgG1.....	20
Σχήμα 1.12: Α) Η λειτουργία του Trastuzumab μέσω της Fab περιοχής του προέρχεται από τη δέσμευση του στην επικράτεια IV του HER2. Β) Οι λειτουργίες του Trastuzumab που σχετίζονται με την Fc περιοχή τους ξεκινούν από την δέσμευση της Fc περιοχής τους σε άλλα κύτταρα που εκφράζουν Fc υποδοχείς, όπως ανοσοκύτταρα, ηπατοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα.....	21
Σχήμα 1.13: Γενικοί μηχανισμοί αντίστασης στο Trastuzumab.....	22

Σχήμα 2.1: Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να περάσουν από μια σειρά σταδίων πριν ξεκινήσει η μετάσταση. <sup>130</sup> .....	30
Σχήμα 2.2: Η αργή διασκόρπιση και το μοντέλο του καταρράκτη της μετάστασης (καρκίνος μαστού). .....	31
Σχήμα 2.3: Α) Πρόωρη διασκόρπιση και παράλληλη εξέλιξη. Β) Στο παράλληλο μοντέλο διάφορα κύματα από CTCs μπορεί να διασκορπιστούν πριν τη διάγνωση και μπορεί να προχωρήσουν παράλληλα σε διαφορετικούς με διαφορετικούς ρυθμούς σε διαφορετικά όργανα.....	32
Σχήμα 2.4: Η μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα αλλάζει τον κυτταρικό φαινότυπο για να επιτρέψει τη διήθηση στη συστηματική κυκλοφορία. Η μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα λαμβάνει χώρα στο σημείο της απομακρυσμένης μετάστασης. <sup>139</sup> .....	33
Σχήμα 2.5: Εμπλουτισμός CTCs με τη μέθοδο της διαβαθμισμένης πυκνότητας με χρήση φικόλης.....	36
Σχήμα 2.6: Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός .....	37
Σχήμα 2.7: Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων των CTCs: 1) κλασσική RT-PCR, 2) πολλαπλή RT-PCR, Adna Test για τον καρκίνο του μαστού 3) Πολλαπλή qRT-PCR 4) Υγρή μικροσυστοιχία σφαιριδίων. <sup>141</sup> .....	45
Σχήμα 3.1: Γενικευμένο διάγραμμα της ARMS PCR. <sup>215</sup> .....	59
Σχήμα 3.2: Μία μη συμπληρωματική βάση κοντά στην 3΄τελικό άκρο του εκκινητή αποσταθεροποιεί περισσότερο το σύμπλεγμα εκκινητή και εκμαγείου. ....	60
Σχήμα 3.3: Η μέθοδος ARMS PCR για την ανίχνευση της 2343 G>T στο γενωμικό DNA. <sup>227</sup> .....	63
Σχήμα 3.4: Όταν ένας ARMS εκκινητής δεσμεύεται στο μεταλλαγμένο DNA στόχο, πραγματοποιείται επέκταση και ενίσχυση. ....	64
Σχήμα 3.5: Οι καμπύλες πρώτης παραγωγού αποκτήθηκαν μετά την PCR παρουσία ενός μη επισημασμένου παρεμποδιστικού ανιχνευτή ο οποίος ανιχνεύει την μετάλλαξη c. 1799T>A.....	66
Σχήμα 3.6: Οι ευαισθησίες των ARMS δοκιμασιών σε σχέση με το Sequencing. <sup>246</sup> .....	68
Σχήμα 4.1: Απομόνωση DNA και RNA από τα CTCs και μετέπειτα αναλυτική πορεία..	76

Σχήμα 4.2: Πειραματική πορεία για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του <i>PIK3CA</i> στο cell free DNA .....	77
Σχήμα 4.3: Χειρισμός του Nanodrop: α) τοποθέτηση με πιπέτα 0,5-2,5 μL στην οπή β) Θέση βραχίονα κατά την μέτρηση της απορρόφησης γ) Καθαρισμός της θέσης μετά την μέτρηση. ....	78
Σχήμα 4.4: Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop .....	78
Σχήμα 4.5: Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler της Roche και β) της οργανολογίας του. <sup>250</sup> ....	81
Σχήμα 5.1: Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRM.....	84
Σχήμα 5.2: Το όργανο HR-1. (Idaho Technology, USA) .....	86
Σχήμα 5.3: Φάσμα φθορισμού των LC Green Plus και SYBR Green I .....	90
Σχήμα 5.4: Ανακατανομή των χρωστικών ουσιών παρεμβολής στο DNA κατά τη διάρκεια της.....	90
αποδιάταξης του DNA. <sup>254</sup> .....	90
Σχήμα 5.5: Η αλληλουχία του εξονίου 9 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. ...	92
Σχήμα 5.6: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως Α. δειγμάτων υγιών αιμοδοτών Β. δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού με επιβεβαιωμένη μετάσταση.....	99
Σχήμα 5.7: Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού. ....	99
Σχήμα 5.8: Καταγράφημα καμπυλών τήξεως στο οποίο φαίνεται ότι κανένα δείγμα από τις παραπάνω κατηγορίες των δειγμάτων (υγιών ατόμων, ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση μεταστατικοί και με χειρουργήσιμο καρκίνου του μαστού) δεν παρουσιάζουν μετάβαση μεταλλαγμένου <i>PIK3CA</i> . ....	103
Σχήμα 5.9: Καταγράφημα καμπυλών τήξεων cell free DNA υγιών αιμοδοτών. ....	107
Σχήμα 5.10: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεων cell free DNA ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού. ....	107
Σχήμα 5.11: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεων cell free DNA ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. ....	108

Σχήμα 5.12: Καταγράφημα καμπύλης διαφοράς φθορισμού ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. ....	108
Σχήμα 5.13: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. ....	111
Σχήμα 5.14: Καμπύλες διαφοράς φθορισμού. ....	112
Σχήμα 5.15: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. ....	113
Σχήμα 5.16: Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού. ....	114
Σχήμα 6.1: Ο αλληλοειδικός εκκινητής θα επεκταθεί από την πολυμεράση μόνο αν βάση στο 3' άκρο του είναι συμπληρωματικό με αυτό της αλληλουχίας στόχου. ....	120
Σχήμα 6.2: Όλες οι σωματικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου <i>PIK3CA</i> . ....	121
Σχήμα 6.3: Η περιοχή υβριδοποίησης του ARMS ζεύγους εκκινητών. ....	122
Σχήμα 6.4: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία εκκινητή (κόκκινο χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. ....	122
Σχήμα 6.6: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει $T_{an} = 55^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρείται η λήψη προϊόντος από τους θετικούς μάρτυρες ελέγχου (MCF7) αλλά και από τους αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου (WT).....	126
Σχήμα 6.7: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει $T_{an} = 60^{\circ}\text{C}$ . ....	127
Σχήμα 6.8: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει $T_{an} = 63^{\circ}\text{C}$ . ....	128
Σχήμα 6.9: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, επαναληπτικού πειράματος στο οποίο έχουμε θέσει $T_{an} = 63^{\circ}\text{C}$ . ....	128
Σχήμα 6.10: Καμπύλη ενίσχυσης PCR πειράματος κατά το οποίο ελέγξαμε την επίδραση της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών. ....	129
Σχήμα 7.1: Η αλληλουχία του εξονίου 9 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων..	132
Σχήμα 7.2: Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν των εκκινητών για την HRMA.. ...	133
Σχήμα 7.3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ARMS-PCR. ....	133
Σχήμα 7.4: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν που παράγεται από την HRMA PCR (προϊόν A) με το ζεύγος εκκινητών που είναι κοινό για την φυσιολογική και την μεταλλαγμένη αλληλουχία. ....	134

Σχήμα 7.5: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν 104bp (προϊόν Α), με ζεύγος νουκλεοτιδίων χωρίς συμπληρωματικότητα στη θέση 44.....	135
Σχήμα 7.6: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν από την PCR με το ARMS ζεύγος εκκινητών μήκους 99 bp (προϊόν Β).....	135
Σχήμα 7.7: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία ARMS εκκινητή (κόκκινο χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. ....	136
Σχήμα 7.8: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία ARMS εκκινητή (κόκκινο χρώμα) και του HRMA εκκινητή (πράσινο ανοιχτό χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. ....	137
Σχήμα 7.9: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία εκκινητή της ARMS PCR (κόκκινο χρώμα) και της HRMA (πράσινο ανοιχτό χρώμα) στις φυσιολογικές και στις μεταλλαγμένες αλληλουχίες ετερόζυγου δείγματος. ....	138
Σχήμα 7.10: ARMS-HRMA, <i>PIK3CA</i> εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και Tm από φυσιολογικό δείγμα. ....	139
Σχήμα 7.11: ARMS-HRMA, <i>PIK3CA</i> , εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και Tm από ομόζυγο μεταλλαγμένο δείγμα. ....	139
Σχήμα 7.12: ARMS-HRMA, <i>PIK3CA</i> , εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και Tm από μεταλλαγμένο ετερόζυγο δείγμα.....	140
Σχήμα 7.13. Α) Καμπύλη ενίσχυσης της PCR σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 65 °C. ....	143
Σχήμα 7.14: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για αναλογία των ζευγών εκκινητών HRMA και ARMS Α) 0.3 - 0.3 μΜ, Β) 0.2- 0.3 μΜ, Γ) 0.1- 0.3 μΜ .....	147
Σχήμα 7.15: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για Tan= 63 °C.. ....	148
Σχήμα 7.16: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για Tan= 65 °C.. ....	149
Σχήμα 7.17: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων. ....	150
Σχήμα 7.18: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για Tan= 65 °C στους πρώτους 20 κύκλους και Tan= 68 οC στους υπόλοιπους 40 κύκλους. ....	150

Σχήμα 7.19: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για $T_{an}= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ στους πρώτους 20 κύκλους και $T_{an}= 68\text{ }^{\circ}\text{C}$ στους επόμενους 40 κύκλους με χρόνο υβριδισμού εκκινήτων μειωμένο στα 16 sec. ....	151
Σχήμα 7.20: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των προτύπων για $T_{an}= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ στους πρώτους 20 κύκλους και $T_{an}= 68\text{ }^{\circ}\text{C}$ στους επόμενους 50 κύκλους με χρόνο υβριδισμού εκκινήτων μειωμένο στα 16 sec. ....	152
Σχήμα 7.21: Καμπύλες πρώτης παραγωγής των δειγμάτων ελέγχου. Παρατηρείται η παρουσία έντονης ARMS κορυφής στην καμπύλη ενός εκ των τεσσάρων φυσιολογικών δειγμάτων. ....	153
Σχήμα 7.22: Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA.....	154
Σχήμα 7.23: Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA. Παρατηρείται η παρουσία ευδιάκριτης κορυφής ARMS στο ποσοστιαίο πρότυπο που περιέχει το μεταλλαγμένο αλληλίο σε ποσοστό 0.25%. ....	154



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Οι αλληλεπιδράσεις με την p85 και με την RAS καθορίζουν δύο ξεχωριστούς μοριακούς μηχανισμούς για την αύξηση της ενεργότητας που παρατηρείται στις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στην p110α. <sup>75</sup> .....	14
Πίνακας 1.2: Νουκλεοτιδικές αλλαγές εντός των εξονίων του <i>PIK3CA</i> σε σωματικούς καρκίνους. <sup>62</sup> .....	17
Πίνακας 2.1: Σύνοψη των αναλυτικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs. <sup>141</sup> .....	40
Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά εκκινητών real-time HRMA-PCR. Τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στο παράρτημα. ....	92
Πίνακας 5.2: Συστατικά της αντίδρασης real-time HRMA PCR για το εξόνιο 9 του γονιδίου <i>PIK3CA</i> .....	93
Πίνακας 5.3: Συνθήκες PCR για το εξόνιο 9 του <i>PIK3CA</i> .....	94
Πίνακας 5.4: Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως.....	94
Πίνακας 5.5: HRMA αποτελέσματα από την ανάλυση καμπύλων τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων .....	96
Πίνακας 5.6: Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης .....	97
Πίνακας 5.7: HRMA ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας.....	98
Πίνακας 5.8: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs υγιών αιμοδοτών .....	100
Πίνακας 5.9: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση .....	101
Πίνακας 5.10: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο .....	102
Πίνακας 5.11: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα υγιών αιμοδοτών .....	104
Πίνακας 5.12: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού .....	105

Πίνακας 5.13: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού .....	106
Πίνακας 5.15: HRMA ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού (2008) .....	115
Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά εκκινητών της αντίδρασης ARMS PCR .....	124
Πίνακας 6.2: Συστατικά της αντίδρασης real-time ARMS PCR για το προϊόν 68bp.....	124
Πίνακας 6.3: Συνθήκες της αντίδρασης real-time ARMS PCR για το προϊόν 68bp του εξονίου 9 του γονιδίου PIK3CA.....	125
Πίνακας 7.1: Χαρακτηριστικά εκκινητών της αντίδρασης ARMS PCR που παράγει το προϊόν μήκους 99bp.....	140
Πίνακας 7.2: Συνθήκες της αντίδρασης real-time ARMS PCR που παράγει το προϊόν (A) μήκους 99bp του εξονίου 9 του γονιδίου PIK3CA .....	141
Πίνακας 7.3: Πρόγραμμα ανάκτησης καμπυλών τήξεως <i>PIK3CA</i> .....	142
Πίνακας 7.4: Χαρακτηριστικά εκκινητών της αντίδρασης HRMA-ARMS PCR. ....	143
Πίνακας 7.5. Συστατικά της αντίδρασης real-time PCR για το προϊόν 104bp και 99 bp του εξονίου 9 (η αντίδραση στο ίδιο σωληνάριο) του γονιδίου PIK3CA. ....	144
Πίνακας 7.6: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το προϊόν 104bp και 99 bp του εξονίου 9 του γονιδίου PIK3CA .....	145
Πίνακας 7.7: Συνθήκες ανάκτησης καμπύλων τήξης για την ARMS PCR και την ARMS-HRM PCR του εξονίου 9 του γονιδίου PIK3CA για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A .....	145
Πίνακας 7.8: Βελτιστοποιήσεις συγκεντρώσεων εκκινητών για ARMS-HRMA .....	146
Πίνακας 7.9: Βελτιστοποιήσεις θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών και αριθμού κύκλων .....	147

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Κλινικής Χημείας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Κας Ε. Λιανίδου, τη οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση αυτού του θέματος, για τη διαρκή υποστήριξη και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε, και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεχίσω τις σπουδές μου και να εξελιχθώ στο συγκεκριμένο επιστημονικό τομέα. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κα Κ. Γαλανοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Κ.Χ. Κρούπη για τις χρήσιμες πληροφορίες και επισημάνσεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ Αρετή Στρατή, η οποία ήταν πάντα κοντά μου και πρόθυμη να λύσει κάθε απορία μου καθώς και γιατί συνέβαλε στην απομόνωση των δειγμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ Μάρκου Αθηνά και την υποψήφια Διδάκτορα Χειμωνίδου Μαρία για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον τους καθώς και για την ευχάριστη παρέα τους στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον Λ. Δημητρακόπουλο, καθώς ήταν αυτός ο οποίος φρόντισε από την πρώτη μέρα που μπήκα στο εργαστήριο να με κατατοπίσει με τις τεχνικές που θα αποτελούσαν το αντικείμενο της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την «παρέα του δωματίου» τις υποψήφιες Διδάκτορες Παρίση Κλειώ και Σουρβίνου Ιωάννα, για την υπέροχη παρέα τους, την πολύτιμη βοήθειά τους και την ψυχολογική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της χρονιάς και ιδιαίτερα τις τελευταίες κρίσιμες μέρες. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στη Χριστίνα Σχίζα διότι υπήρξε εξαιρετική συνεργάτης και φίλη σε όλη τη διάρκεια της χρονιάς.

Επίσης ευχαριστώ τις υπέροχες Ρίζου Μυρτώ και Τζίκα Κωνσταντίνα, για τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε αυτά τα δύο χρόνια.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το απευθύνω στην οικογένειά μου για την υπομονή τους, τη διαρκή πολύτιμη υποστήριξή τους, ψυχολογική και οικονομική, όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει.



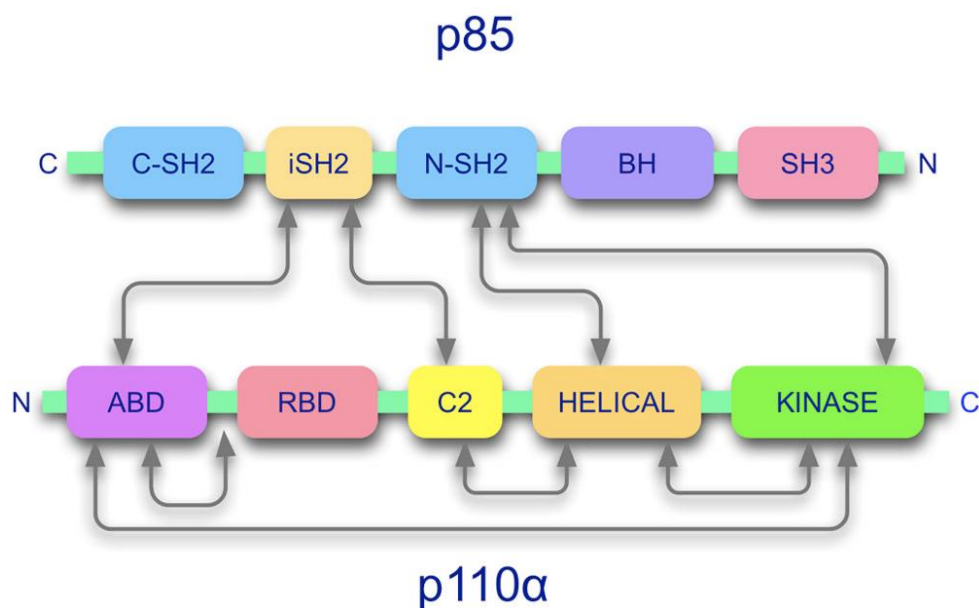
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *PIK3CA*

#### 1.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι των PI3Ks

##### 1.1.1 Εισαγωγή

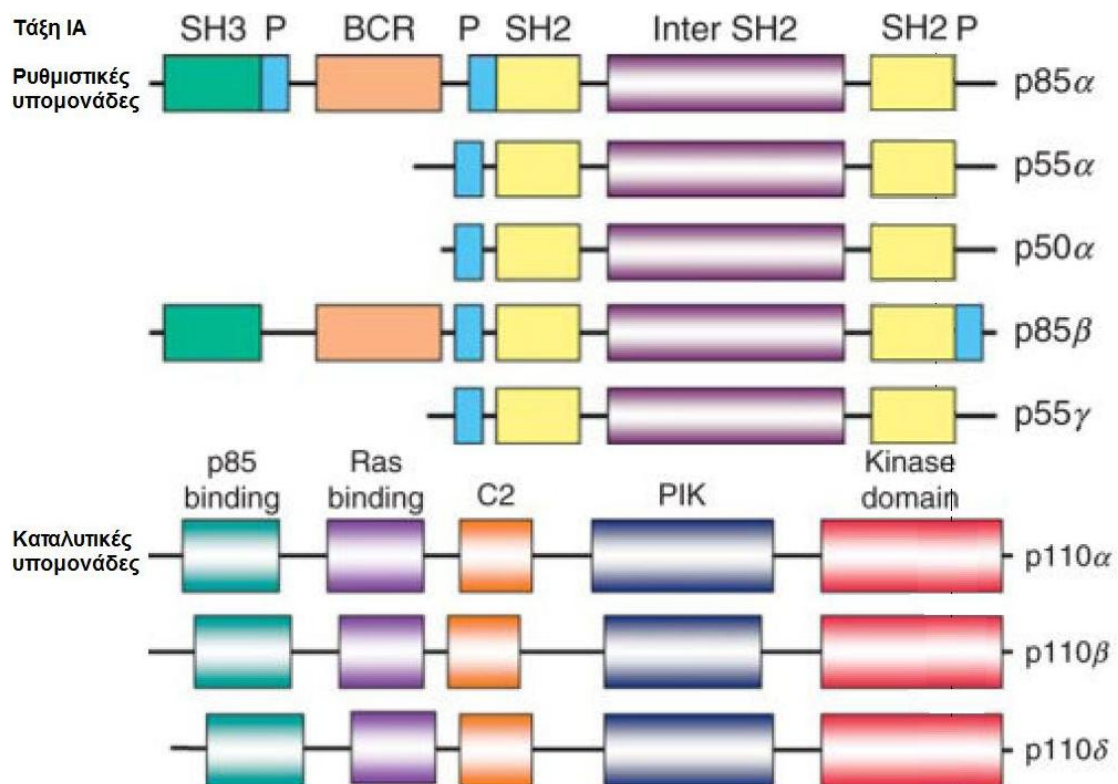
Οι κινάσες του φωσφοϊνοσιτιδίου (**phosphoinositide kinases, PIKs**) είναι λιπιδικές κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν το δακτύλιο της ινοσιτόλης των φωσφοϊνοσιτιδίων, δρώντας έτσι σε σηματοδοτικοί μετατροπείς. Ανάλογα με τη θέση φωσφορυλίωσης στον υδατάνθρακα, οι PIKs κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες: στις **κινάσες του 3-φωσφοϊνοσιτιδίου (phosphoinositide 3-kinases, PI3Ks)**, στις **κινάσες του 4-φωσφοϊνοσιτιδίου (phosphoinositide 4-kinases, PIP4Ks)**, και στις **κινάσες του 5-φωσφοϊνοσιτιδίου (phosphoinositide 5-kinases, PIP5Ks)**. Οι PI3Ks οργανώνονται περαιτέρω στις τάξεις I, II, ή III με βάση την πρωτοταγή δομή τους, την εξειδίκευση υποστρώματος και τη ρυθμιστική τους ικανότητα.<sup>2</sup>



Σχήμα 1.1: Η PI3K είναι ένα διμερές ένζυμο. Το σχήμα αναπαριστά τη δομή των δύο υπομονάδων του καθώς και το χάρτη των περιοχών αλληλεπίδρασης της σταθερής ρυθμιστικής υπομονάδας, p85 και της καταλυτικής υπομονάδας, p110.<sup>3-5</sup>

Οι PI3Ks της τάξης I είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια καταλυτική υπομονάδα και μια ρυθμιστική υπομονάδα, η οποία αναφέρεται επίσης και σαν προσαρμογέας (Adaptor, **σχήμα 1.1**). Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές της καταλυτικής υπομονάδας: p110α, p110β, p110δ και p110γ οι οποίες μοιράζονται την

ίδια συγκρότηση των υπομονάδων: μια αμινοτελική **περιοχή που δεσμεύεται στον προσαρμογέα (Adaptor Binding Domain, ABD)**, η οποία παρέχει την κύρια επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τη ρυθμιστική υπομονάδα, μια **περιοχή σύνδεσης με τη Ras (Ras Binding Domain, RBD)** που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ της p110 και της Ras-GTP και συνεισφέρει στην ενεργοποίηση των PI3Ks και στο σηματοδοτικό μονοπάτι που καθοδηγείται από την Ras, μια περιοχή πρόσδεσης  $Ca^{2+}$  (ομόλογη της πρωτεϊνικής-κινάσης-C) με συγγένεια για λιπιδικές μεμβράνες, μια ελικοειδή επικράτεια που λειτουργεί σα σκαλωσιά για τις άλλες επικράτειες της p110, και μια καρβοξυ-τελική περιοχή κινάσης.<sup>5</sup> Η τάξη I των PI3Ks υποδιαιρείται σε δύο υποομάδες, την IA και την IB, ανάλογα με τις ρυθμιστικές τους υπομονάδες.<sup>6</sup> Η τάξη IA που περικλείει τις p110α, p110β, και p110δ σχετίζεται με τις ρυθμιστικές υπομονάδες p85α, p85β, p55α, p55γ και p50α (**σχήμα 1.2**).

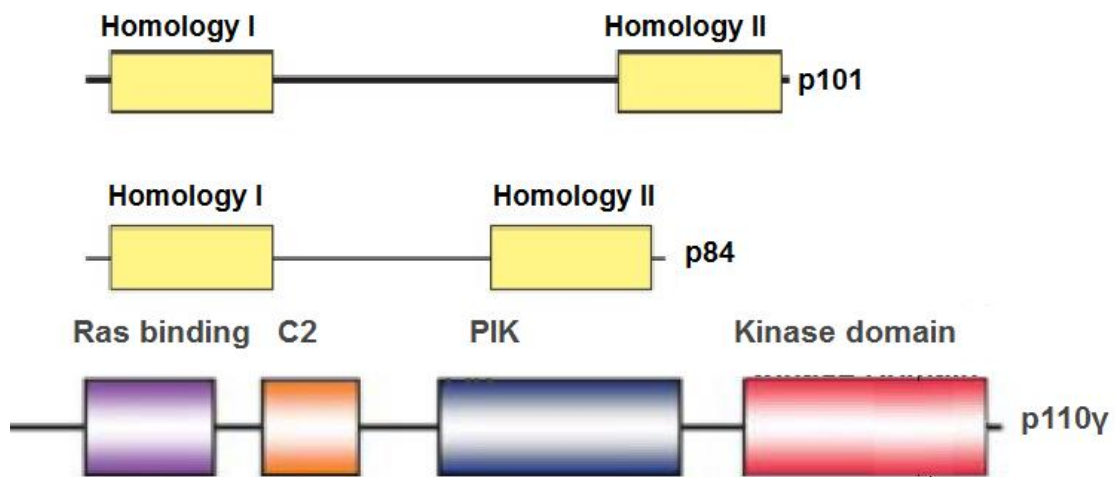


**Σχήμα 1.2:** Οι ρυθμιστικές και καταλυτικές υπομονάδες της τάξης IA των PI3Ks.<sup>7</sup>

Η τάξη IB, που αποτελείται μόνο από την p110γ, σχετίζεται με τις ρυθμιστικές υπομονάδες p101, p84 (**σχήμα 1.3**).

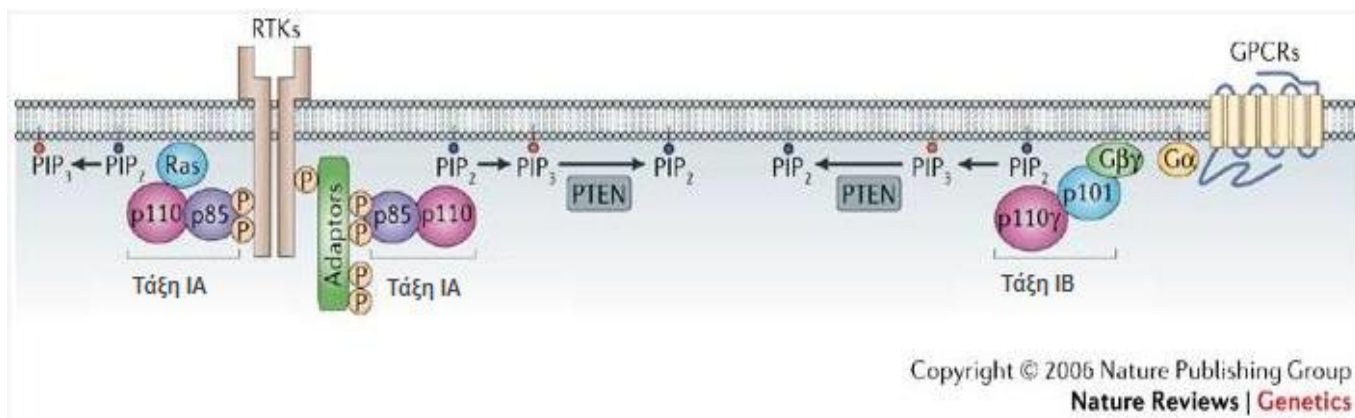
Η αντιπροσωπευτική ρυθμιστική υπομονάδα είναι η p85α και περιέχει διάφορες περιοχές αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες: μια περιοχή ομολογίας 3 με την Src (SH3), μια περιοχή που ονομάζεται BH (Breakpoint clustered Homology domain) ή GAP (GTPase Σοφία Φάρκωνα

activating protein domain) ή BCR, δύο περιοχές ομολογίας 2 με την Src (SH2), και μια περιοχή μεταξύ των SH2 (i-SH2). Η i-SH2 είναι η κύρια περιοχή σύνδεσης με την p110.<sup>8, 9</sup> Οι ρυθμιστικές υπομονάδες συνδέουν την p110 με ανοδικά σήματα, αλληλεπιδρώντας με **υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Receptors Tyrosine Kinases, RTKs)** για τις PI3Ks της υποομάδας IA ή με **υποδοχείς συνδεδεμένους με την G πρωτεΐνη (G- Protein-Coupled Receptors, GPCRs)** για τις PI3Ks της υποομάδας IB (σχήμα 1.4).<sup>6, 10</sup> Σε περίπτωση απουσίας ανοδικών σημάτων, οι ρυθμιστικές υπομονάδες σταθεροποιούν την p110 και καταστέλλουν την καταλυτική της ενεργότητα.<sup>11, 12</sup>



Σχήμα 1.3: Οι ρυθμιστικές και καταλυτικές υπομονάδες της τάξης IB των PI3Ks.<sup>7</sup>

Οι PI3Ks της τάξης II περιλαμβάνουν τις PIK3C2α, PIK3C2β, PIK3C2γ και επίσης μπορούν να ενεργοποιηθούν από τις RTKs, από υποδοχείς κυτταροκινών και από ιντεγκρίνες.<sup>7</sup> Όμως δεν έχει εξακριβωθεί το πώς σχετίζονται οι ειδικές λειτουργίες της τάξης II των PI3Ks με αυτούς τους ενεργοποιητές. Οι PI3Ks της τάξης III αποτελούνται από ετεροδιμερή καταλυτικών υπομονάδων και υπομονάδων προσαρμογών.



Σχήμα 1.4: Μηχανισμοί ενεργοποίησης της τάξης I των PI3Ks<sup>10</sup>

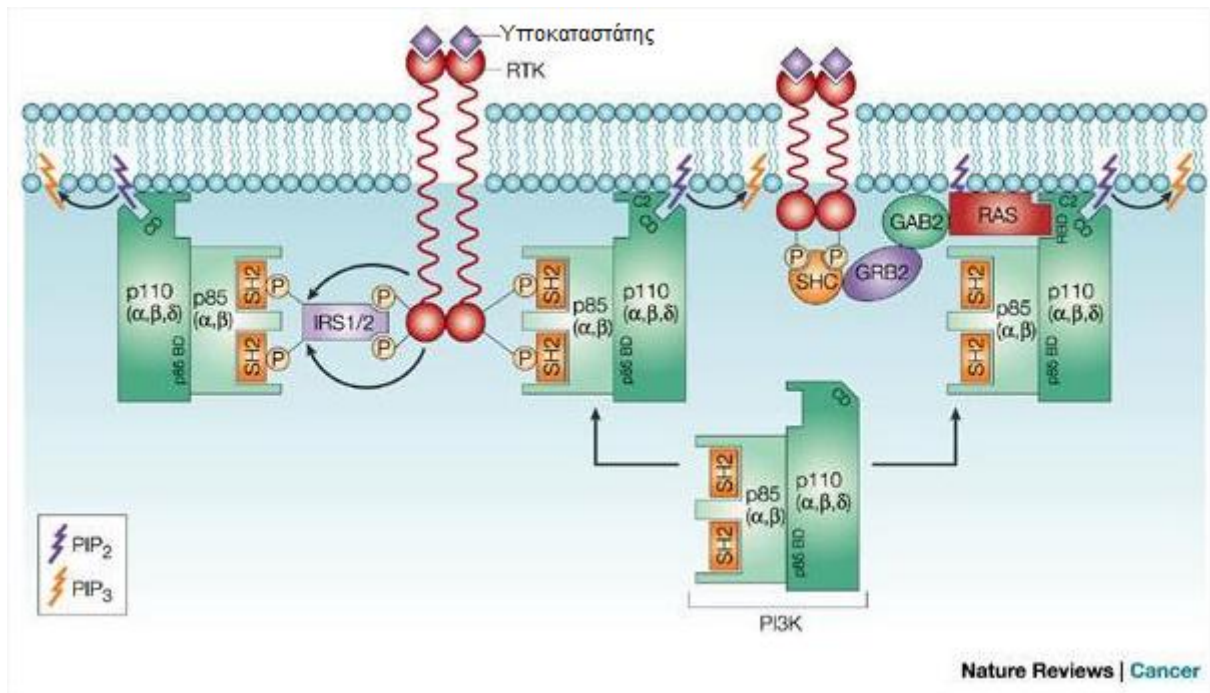
### 1.1.2 Η ενεργοποίηση της τάξης IA των PI3Ks

Οι δύο υποοικογένειες της τάξης I των PI3Ks, οι IA και IB, είναι αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο στα θηλαστικά. Η τάξη I, ιδιαίτερα η IA, είναι η εκτενέστερα μελετημένη όσον αφορά τη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη και η επιβίωση. Η τάξη I των PI3Ks καταλύει τη φωσφορυλίωση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (**phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>**) στη θέση D-3 σε **3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP<sub>3</sub>)** μέσω της σύνδεσης της ρυθμιστικής της υπομονάδας p85 σε ανοδικούς υποδοχείς οι οποίοι ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες ή ορμόνες (σχήμα 1.4).<sup>13-15</sup>

Οι RTKs, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (**Epithelial Growth Factor Receptor, EGFR**), ο υποδοχέας του αιμοπεταλικού αυξητικού παράγοντα (**Platelet Derived Growth Factor Receptor, PDGFR**), ο υποδοχέας του προερχόμενου από την ινοβλάστη αυξητικού παράγοντα (**Fibroblast Growth Factor Receptor, FGFR**), ο υποδοχέας 1 του αυξητικού παράγοντα που μοιάζει με την ινσουλίνη (**Insulin-like Growth Factor Receptor, IGF-1R**) και ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (**HER2**), μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την p85 ρυθμιστική υπομονάδα για να ενεργοποιήσουν την PI3K<sup>16-18</sup>, ενώ η πρωτεΐνη Ras αλληλεπιδρά ευθέως με την p110 καταλυτική υπομονάδα της PI3K κατά ένα τρόπο που εξαρτάται από την GTP<sup>19, 20</sup> (σχήμα 1.5) Η ενεργοποίηση της PI3K από RTKs όπως ο PDGFR έχει επίσης αναφερθεί ότι ενεργοποιείται από την Ras.<sup>21</sup> Έχει αποδειχθεί ότι η p85 περιέχει μια περιοχή ανταποκρινόμενη σε GTPάση και μια κατασταλτική περιοχή, οι οποίες μαζί σχηματίζουν ένα μοριακό διακόπτη που ρυθμίζει την PI3K.<sup>22</sup> Οι



ισομορφές της Ras, H-RAS και RAC 1, ενεργοποιούν την PI3K στοχεύοντας την περιοχή που ανταποκρίνεται στην GTPάση. Η διεγερτική επίδραση αυτών των μορίων όμως αναστέλλεται από την κατασταλτική περιοχή η οποία λειτουργεί δεσμεύοντας φωσφορυλιωμένα μόρια στην τυροσίνη και εξουδετερώνεται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης.<sup>22</sup> Οι συμπληρωματικές επιδράσεις των κινασών τυροσίνης και των μικρών GTPασών στο p85 μοριακό διακόπτη καταλήγουν σε μια συνέργια μεταξύ αυτών των τάξεων μορίων προς την ενεργοποίηση του PI3K/AKT μονοπατιού.



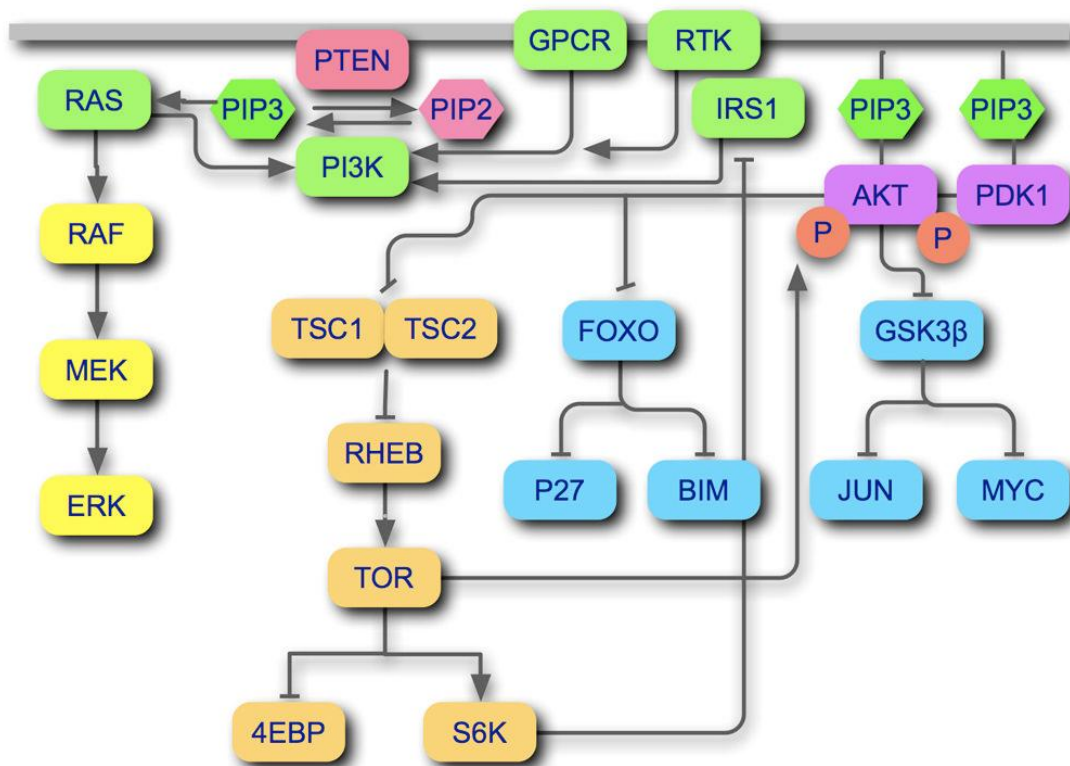
Σχήμα 1.5: Η αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων RTKs που ενεργοποιούνται μέσω υποκαταστάτη προκαλεί την επάνδρωση των ανενεργών PI3Ks της τάξης IA μέσω της επίδρασης των φωσφοτυροσινικών κατάλοιπων στον υποδοχέα και στις επικράτειες SH2 στη ρυθμιστική υπομονάδα p85, ή των πρωτεϊνών μετασχηματιστών (adaptor proteins) IRS1 και IRS2. Οι IRS1 και IRS2 φωσφορυλιώνονται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης για τις SH2 επικράτειες της p85 και προκαλώντας την κατάλληλη συναρμολόγηση του σηματοδοτικού συμπλέγματος. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των SH2 και των φωσφοτυροσινικών καταλοίπων φέρνουν την PI3K σε κοντινή απόσταση στο υπόστρωμά της στην πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνουν την p110α καταλυτική υπομονάδα από την παρεμποδιστική δράση της p85, η οποία είναι στη συνέχεια ελεύθερη να μετατρέψει τις PIP2 σε PIP3. Εναλλακτικά, η δέσμευση της PI3K στην ενεργοποιημένη Ras μπορεί επίσης να σταθεροποιήσει τον εντοπισμό της στην μεμβράνη και να ενεργοποιήσει την καταλυτική της περιοχή. Αυτό συμβαίνει μέσω της στρατολόγησης των πρωτεϊνών μετασχηματιστών SH2, GRB2 και GAB2 στις ενεργοποιημένες RTKs. C2: C2 περιοχή, p85 BD: p85 Binding Domain, CD: Catalytic Domain, RBD: RAS Binding Domain.<sup>23</sup>

### 1.1.3 Η βιοχημεία του μονοπατιού των PI3Ks

Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ενεργότητα της τάξης I των PI3Ks ελέγχεται αυστηρά. Αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους οι PI3Ks μετατοπίζονται προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη.<sup>24</sup> Η PIP3, προϊόν της τάξης I των PI3Ks, επιστρατεύει πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν μια **περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης (Pleckstrin Homology, PH)** στις κυτταρικές μεμβράνες.<sup>25</sup> Μεταξύ αυτών είναι η κινάση σερίνης θρεονίνης **AKT** ή **πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB)**, όπως και η **εξαρτώμενη από το φωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση-1 (3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1, PDK1)**. Η PDK1 φωσφορυλιώνει και κατά αυτό τον τρόπο ενεργοποιεί την AKT στη θρεονίνη 308.<sup>26</sup> Μόλις ενεργοποιηθεί, η AKT μετακινείται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει, ενεργοποιεί ή καταστέλλει διάφορους καθοδικούς στόχους ώστε να ρυθμίσει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ο κυτταρικός μεταβολισμός, η πρωτεϊνική σύνθεση, η κυτταρική επιβίωση, η καταστολή της απόπτωσης και η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Τα προερχόμενα από την AKT σήματα ελέγχουν το ξεκίνημα της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω ενός καταρράκτη αλληλεπιδράσεων που προχωρά, μέσω του **συμπλέγματος της κονδυλώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis complex, TSC)**, του **αυξημένου στον εγκέφαλο ομόλογου του Ras (Ras homolog enriched in brain, Rheb)**, και της **mTOR (target of rapamycin)**, σε δυο κρίσιμους καθοδικούς στόχους, την **p70 S6 κινάση (p70 S6 kinase, S6K)** και την **4EBP (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein)**.<sup>27-32</sup> Επίσης τα σήματα της AKT ρυθμίζουν τη μεταγραφή, προκαλώντας την εξαρτώμενη από τη φωσφορυλίωση αποδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα **FOXO1 (forkhead box O transcription factor)** και την απενεργοποίηση της **κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (Glycogen Synthase Kinase 3, GSK3)**.<sup>33</sup> Σημαντικοί στόχοι του FOXO1 είναι οι πρωτεΐνες παρακολούθησης της κυτταρικής ανάπτυξης p27(Kip1)<sup>34</sup> και p21(Cip1)<sup>35</sup>, και οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death).<sup>36, 37</sup> Η GSK3β ρυθμίζει τους πιθανούς ογκογόνους μεταγραφικούς παράγοντες Jun (κυτταρικό ομόλογο της ογκοπρωτεΐνης Jun του ρετροϊού ASV17 των πτηνών), και Myc (κυτταρικό ομόλογο του ρετροϊκού ογκογονιδίου του μυελοκυτώματος των πτηνών).<sup>38-40</sup> Σε μια διαδικασία θετικής ανάδρασης, η TOR, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη Rictor (Rapamycin-insensitive companion of TOR) φωσφορυλιώνει και έτσι επιπροσθέτως ενεργοποιεί την AKT στη σερίνη 473.<sup>41</sup> Η S6K μπορεί να ξεκινήσει την κατασταλτική φωσφορυλίωση στο Σοφία Φάρκωνα

**υπόστρωμα 1 του υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate 1, IRS1)**, με τη μεσολάβηση μιας θηλιάς αρνητικής ανάδρασης.<sup>42</sup> Όπως προαναφέρθηκε, η Ras επίσης εμπλέκεται στο PI3K μονοπάτι. Η ενεργοποιημένη Ras αυξάνει την ενεργότητα των PI3Ks: στη συνέχεια το προϊόν των PI3K, PIP3, υποκινεί την ενεργοποίηση της Ras<sup>22, 43, 44</sup> (σχήμα 1.6). Το συνολικό αποτέλεσμα των συνδυασμένων σημάτων των PI3Ks είναι η αύξηση της ενεργοποίησης της κυτταρικής αντιγραφής και επιβίωσης και η μείωση της καταστολής της ανάπτυξης και της απόπτωσης.

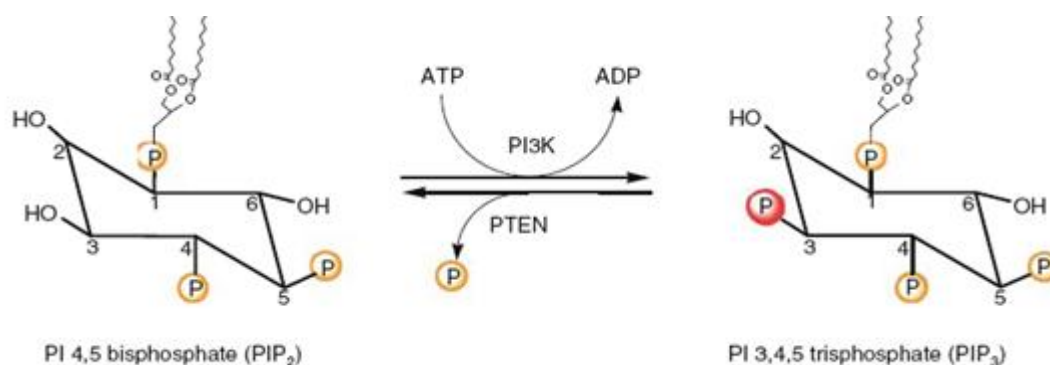


Σχήμα 1.6: Το φυσιολογικό σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K. Οι PI3Ks μπορούν να ενεργοποιηθούν από τις RTKs ή από τις GPCRs. Η RAS είναι μια επιπλέον πρωτεΐνη που ρυθμίζει θετικά την PI3K πιθανόν διευκολύνοντας την τοποθέτησή της στην μεμβράνη. Η φωσφατάση PTEN αποφωσφορυλιώνει το προϊόν της PI3K, την PIP3 και έτσι δρα ως ο απόλυτος ενζυμικός ανταγωνιστής της. Η PIP3 ξεκινά την σηματοδότηση μετά από αυτήν στρατολογώντας τις κινάσες σερίνης θρεονίνης AKT και PDK1. Η PDK1 φωσφορυλιώνει και κατά αυτόν τον τρόπο ενεργοποιεί την AKT. Τρεις κύριες σηματοδοτικές διακλαδώσεις ξεκινούν από την AKT. Η φωσφορυλίωση των GSK3β και FOXO με τη μεσολάβηση της AKT άμεσα και έμμεσα ελέγχουν μεταγραφικές δραστηριότητες και την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Το σήμα που προχωρά μέσω του TSC συμπλέγματος, της RHEB και της TOR επηρεάζει κυρίως την πρωτεϊνική σύνθεση. Μια θηλιά θετικής ανάδρασης εκτείνεται από το σύμπλεγμα TOR- RICTOR στην AKT, καταλήγοντας σε επιπλέον ενεργοποιούσα φωσφορυλίωση της. Μια θηλιά αρνητικής ανάδρασης αποτελείται από τη φωσφορυλίωση της IRS1 στην οποία παρεμβαίνει η S6K.<sup>33</sup>

### 1.1.4 Η βιοχημεία του μονοπατιού των PI3K-PTEN

Η ομόλογη της φωσφατάσης και τενσίνης πρωτεΐνη (**Phosphatase and Tensin homolog, PTEN**) ονομάστηκε έτσι λόγω της ομολογίας της αλληλουχίας της με τις φωσφατάσες και με την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη τενσίνη.<sup>45, 46</sup> Η PTEN είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη συχνά μεταλλαγμένη σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους.<sup>47</sup> Εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 10q23.3, και κωδικοποιεί μια φωσφατάση 403 κατάλοιπων με ενεργότητα πρωτεϊνικής φωσφατάσης και λιπιδικής φωσφατάσης, ανταγωνιζόμενη την ενεργότητα των PI3K κινασών.<sup>46</sup>

Η PIP3, το προϊόν της καταλυτικής υπομονάδας p110, λειτουργεί ως ένας δεύτερος κυτταρικός αγγελιοφόρος που ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό<sup>2, 7, 10, 13, 27</sup> οπότε η PTEN υδρολύοντας τη φωσφορική ομάδα στην 3 θέση του δακτυλίου της ινοσιτόλης της PIP3 για την παραγωγή PIP2 (σχήμα 1.7), ρυθμίζει αρνητικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία η PIP3 εμπλέκεται. Συνεπώς, η PTEN παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στην ομοιόσταση του φωσφοϊνοσιτιδίου.<sup>46</sup>



Σχήμα 1.7: Το PTEN δρα ανταγωνίζοντας τη δράση της PI3K.<sup>1</sup>

Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του *PTEN* μπορεί να αυξηθεί από τον **πρώιμο ρυθμισμένο μεταγραφικό παράγοντα 1 (Early Growth Regulated Transcription Factor 1, EGR1)** μέσω της άμεσης δέσμευσής του. Επιπροσθέτως, ο ενεργοποιούμενος από το υπεροξύσωμα πολλαπλασιαστικός υποδοχέας  $\gamma$  (**Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$** ), η P53 και ο ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας 2 (**Activating Transcription Factor 2, ATF2**) επίσης μπορούν να αυξήσουν μεταγραφικά την έκφραση του *PTEN*<sup>48-50</sup>, ενώ ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (**Transforming Growth Factor, TGF- $\beta$** ), ο

**πυρηνικός παράγοντας kappaB (Nuclear Factor kappaB, NF-kB)**, και η Jun ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του mRNA του *PTEN*.<sup>51-53</sup>

Πρόσφατα βρέθηκε ότι κάποια microRNAs όπως το miR-21, miR-19 και miR214 στοχεύοντας την 3'-αμετάφραστη περιοχή (Untranslated Region, UTR) του *PTEN*, οδηγούν στην αναστολή της μετάφρασής του.<sup>7</sup> Η ενεργότητα της PTEN μπορεί επίσης να ρυθμιστεί από μετα-μεταφραστικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση, και ακετυλίωσή της.<sup>7</sup>

## 1.2 PI3K και καρκίνος

Από ό,τι φαίνεται, μόνο οι PI3Ks της τάξης I εμπλέκονται στον καρκίνο αφού δεν υπάρχουν στοιχεία που να συνδέουν τις PI3Ks της τάξης II ή τις PI3Ks της τάξης III με την καρκινογένεση.<sup>33</sup> Αυτό το γεγονός πιθανότατα αντικατοπτρίζει τα διαφορετικά προϊόντα και την εξειδίκευση υποστρώματος των τριών τάξεων των PI3Ks. Μόνο η τάξη I των PI3Ks μπορεί να χρησιμοποιήσει σαν υπόστρωμα την PIP2 για να παράγει PIP3, το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό στον έλεγχο της ανάπτυξης του κυττάρου και της αντιγραφής, και η ικανότητα να παράγει αυτό το σημαντικό δεύτερο αγγελιοφόρο μόριο χορηγεί ογκογόνο δυναμική στη λιπιδική κινάση. Η τάξη I των PI3Ks έχει λοιπόν λιπιδικές και πρωτεϊνικές ενεργότητες κινάσης.<sup>8, 54, 55</sup> Πειράματα γενετικής έχουν δείξει ότι η λιπιδική κινάση είναι απαραίτητη για την ογκογόνο ενεργότητα: p110 κατασκευασμένη ώστε να φέρει μόνο ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης δεν είναι ογκογόνος.<sup>56</sup>

### 1.2.1 Σύνδεσμοι μεταξύ του μονοπατιού των PI3Ks και του καρκίνου

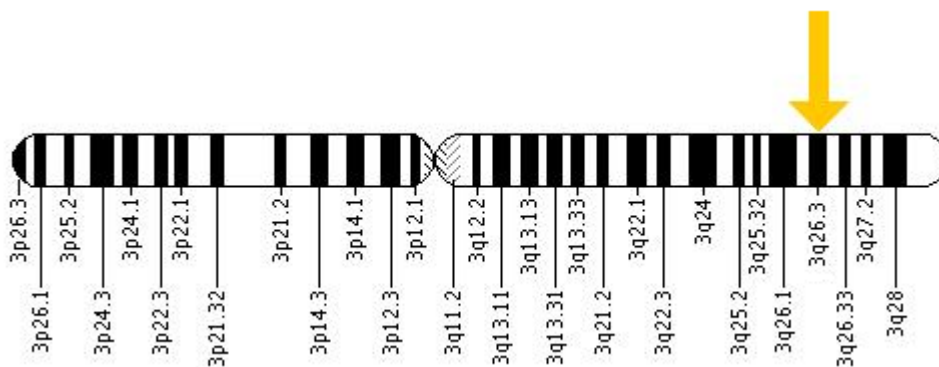
Ο ρόλος της PI3K και συγκεκριμένα της p110α στον καρκίνο υπαινίχθηκε όταν φάνηκε να συσχετίζεται η ενεργότητα κινάσης της με ιικές ογκο-πρωτεΐνες. Αυτό υποστηρίχθηκε παραπάνω από την ανακάλυψη ότι κάποιοι ρετροϊοί πτηνών και τρωκτικών κωδικοποιούν ογκογόνα παράγωγα των κυτταρικών γονιδίων *PIK3CA* και *AKT*, αντίστοιχα.<sup>57</sup>

Επιπλέον, το *PTEN*, βρέθηκε ότι είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο συχνά μεταλλαγμένο στους ανθρώπινους καρκίνους<sup>58, 59</sup> που οδηγεί στην αδιάκοπη ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι σε διάφορους καρκινικούς τύπους ενισχύονται οι γενωμικές περιοχές που περιέχουν τα γονίδια *PIK3CA* ή *AKT*.<sup>57</sup> Επιπλέον, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στην p85, την ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K<sup>60</sup>, ενώ το γεγονός ότι οι καθοδικοί στόχοι της AKT, όπως οι forkhead μεταγραφικοί παράγοντες FKHR και FKHL1 έχει βρεθεί να μετατοπίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου<sup>61</sup> παρέχει ισχυρή απόδειξη ότι αυτό το μονοπάτι παίζει σημαντικό ρόλο στη νεοπλασία.

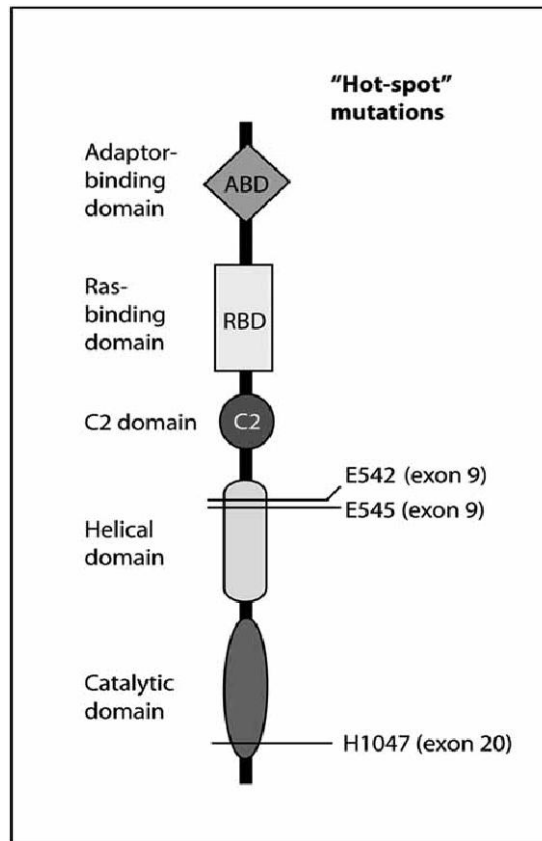
### 1.2.2 Ογκογόνες μεταλλάξεις στο *PIK3CA*

Το *PIK3CA*, το γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3K, είναι ένα γονίδιο 34 kb που τοποθετείται στο χρωμόσωμα 3q26.3 (σχήμα 1.8) αποτελείται από 20 εξόνια και κωδικοποιεί 1068 αμινοξέα αποδίδοντας μια πρωτεΐνη μεγέθους 124 kDa.<sup>62</sup>



Σχήμα 1.8: Το *PIK3CA* εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 στην θέση 3q26.3 (<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/PIK3CA.jpeg>)

Το *PIK3CA* είναι μεταλλαγμένο σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους.<sup>63, 64</sup> Οι μεταλλάξεις του είναι σωματικές, ογκογόνες, ετερόζυγες και ξεκινούν από υποκαταστάσεις μιας βάσης. Μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τέσσερις τάξεις οι οποίες ορίζονται από τις τέσσερις επικράτειες της καταλυτικής υπομονάδας στην οποία εντοπίζονται: στην ABD, στη C2, στην ελικοειδή και στην καταλυτική. Η ανάλυση του *PIK3CA* σε ανθρώπινα καρκινικά δείγματα έχει αναγνωρίσει σωματικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν ένα σύνολο 38 κατάλοιπων.<sup>62</sup>



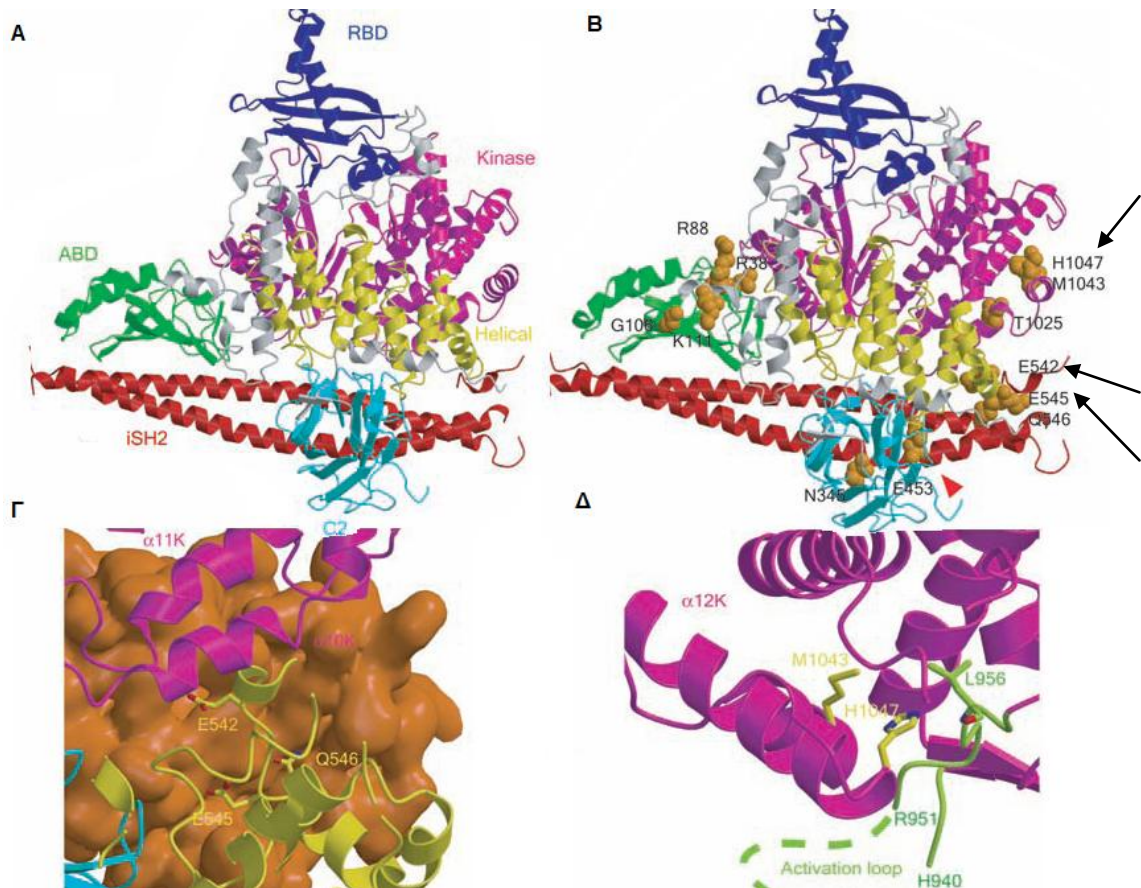
**Σχήμα 1.9:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του *PIK3CA* και των συχνότερα εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στους ανθρώπινους καρκίνους <sup>65</sup>

Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις, οι “hot spot” μεταλλάξεις, χαρτογραφούνται σε τρεις τύπους, οι E542K (1624 A>G) και E545K (1633 G>A) στην ελικοειδή περιοχή της p110α (εξόνιο 9), και η H1047R (3140 A>G) στην περιοχή της κινάσης (εξόνιο 20, **σχήμα 1.9** και **σχήμα 1.10**). Οι E542K και E545K συνήθως αλλάζουν προς λυσίνη, ενώ η H1047R συνήθως υποκαθίσταται από αργινίνη.<sup>62</sup>

Αυτές οι τρεις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις προκαλούν μια αύξηση στην λειτουργία της p110α οπότε η ενεργότητα λιπιδικής κινάσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης είναι σημαντικά αυξημένη.<sup>56, 64</sup> Τα κύτταρα που εκφράζονται κατά μεταλλαγμένο τρόπο επιδεικνύουν αδιάκοπη καθοδική σηματοδότηση η οποία μπορεί να ανιχνευτεί από την αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT, S6K, 4EBP και της GSK3β. Η p110α όταν φέρει μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις εμφανίζει ογκογόνο ενεργότητα: μπορεί να μετασχηματίσει πρώιμους ινοβλάστες σε καλλιέργεια σε καρκινικούς, να οδηγήσει κύτταρα σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και να προκαλέσει όγκους σε συστήματα μοντέλων ζώων.<sup>66-70</sup> Η ογκογόνος δυναμική της πιθανόν να συνεισφέρει στο νεοπλασματικό φαινότυπο των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων που



φέρουν μεταλλαγμένη p110α: για αυτό το λόγο αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να θεωρηθούν σα μεταλλάξεις «οδηγοί». Επιπλέον, η συνάθροιση των μεταλλάξεων της p110α σε συγκεκριμένα συχνά εμφανιζόμενα σημεία υποδηλώνει ότι αυτές παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης στο κύτταρο.



Σχήμα 1.10: Α) Η *i*-SH2 επικράτεια δεσμεύει την καταλυτική υπομονάδα p110α. Β) Τα κατάλοιπα  $\text{Glu}^{\text{E542K}}$  και  $\text{Glu}^{\text{E545K}}$ , που είναι συχνά μεταλλαγμένα στους καρκίνους, εντοπίζονται σε μια εκτεθειμένη περιοχή της ελικοειδούς επικράτειας. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτά μετατρέπονται σε *Lys*, προκαλώντας μια μετατόπιση φορτίου. Βιοχημικές μελέτες προτείνουν ότι αυτά τα κατάλοιπα αλληλεπιδρούν με τις  $\text{Lys}^{379}$   $\text{Arg}^{340}$  της *n*SH2 επικράτειας της p85α και ότι αυτή η αλληλεπίδραση παρεμποδίζει την ενεργότητα της καταλυτικής υπομονάδας.<sup>71, 72</sup> Γ) Οι μεταλλάξεις στην ελικοειδή επικράτεια εντοπίζονται στην μεσεπιφάνεια μεταξύ αυτής και της *n*SH2. Δ) Οι μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης  $\text{Met}^{1043}$  και  $\text{His}^{1047}$  εντοπίζονται δίπλα στο C-τελικό άκρο της θηλιάς ενεργοποίησης και φαίνονται με ανοιχτό πράσινο. Η  $\text{His}^{1047}$  επίσης αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στους σωματικούς καρκίνους. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το σημείο είναι πιθανό να έχουν μια άμεση επίδραση στη διαμόρφωση της θηλιάς ενεργοποίησης αλλάζοντας την αλληλεπίδραση της με τα υποστρώματα των φωσφατιδυλοϊνοσιτολών.<sup>73</sup>



Εκτός από τις τρεις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις που αποτελούν τα 4/5 των μεταλλάξεων στην p110α, πολυάριθμες διαφορετικές και σπάνιες μεταλλάξεις που οδηγούν στον καρκίνο έχουν αναγνωρισθεί. Διανέμονται ευρέως σε όλη την κωδική αλληλουχία και υπάρχουν σε όλες τις περιοχές της p110α εκτός από την RBD. Οι περισσότερες από αυτές επίσης επιδεικνύουν μια αύξηση της λειτουργικότητας.<sup>67, 74</sup>

Όμως ποσοτικές μετρήσεις της ογκογόνου τους δράσης φανέρωσαν ότι οι σπάνιες αυτές μεταλλάξεις είναι πολύ πιο αδύναμες από τις hot spot μεταλλάξεις. Η ασθενέστερη αυτή ογκογόνος δράση πιθανόν να μεταφράζεται ως ένα ασθενέστερο πλεονέκτημα επιλογής για το φέρον την μετάλλαξη κύτταρο και έτσι να εξηγεί τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης των «περιθωριακών» αυτών ογκογόνων μεταλλάξεων.

Ένα επαναλαμβανόμενο θέμα σχετικά με τις μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση λειτουργικότητας είναι η υποκατάσταση ενός όξινου ή ουδέτερου καταλοίπου με ένα βασικό κατάλοιπο και η τοποθέτηση του υποκατεστημένου καταλοίπου στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Πράγματι κάποιες από τις μηχανοποιημένες μεταλλάξεις της p110α που πληρούν αυτά τα κριτήρια οδηγούν σε αύξηση της λειτουργικότητας.<sup>74</sup>

### 1.2.3 Η γενετική των ογκογόνων μεταλλάξεων του *PIK3CA*

Πειράματα γενετικής παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που κρύβονται πίσω από την αυξημένη λειτουργία της p110α η οποία προκαλείται από μετάλλαξη.<sup>69, 70, 75</sup> Ο εντοπισμός των πιο συχνά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων σε δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης, οι E542K και E545K στην ελικοειδή, και η H1047R στην καταλυτική περιοχή, υποδηλώνει ότι λειτουργούν με διαφορετικούς μηχανισμούς. Αυτή η πρόταση υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι ο συνδυασμός των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στην περιοχή της έλικας και της κινάσης στο ίδιο μόριο έχει μια ισχυρή συνεργατική επίδραση στην καθοδική σηματοδότηση και μια ογκογόνο δυναμική. Η διπλή μετάλλαξη E545K/ H1047R έχει επίσης βρεθεί σε ανθρώπινο καρκίνο.<sup>76</sup> Η υπόθεση των μηχανιστικών διαφορών μεταξύ των μεταλλάξεων στην περιοχή της έλικας και της κινάσης ενδυναμώνεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των p85 και Ras.<sup>75</sup> Μια περικοπή της επικράτειας που δεσμεύει την p85, η οποία θα περιορίσει την αλληλεπίδραση με την p85, δεν αποσιωπά τις ογκογόνες και σηματοδοτικές δραστηριότητες των μορίων που φέρουν μετάλλαξη στην ελικοειδή περιοχή, αλλά καταργεί εντελώς την ογκογένεση/καρκινογένεση που προκαλείται από τη μεταλλαγμένη περιοχή της κινάσης. Κατά κύριο λόγο, η κατά αυτόν

τον τρόπο αχρηστευμένη μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης εξακολουθεί να σηματοδοτεί μέσω της AKT και της TOR, εντούτοις σε χαμηλότερα επίπεδα.

**Πίνακας 1.1:** Οι αλληλεπιδράσεις με την p85 και με την RAS καθορίζουν δύο ξεχωριστούς μοριακούς μηχανισμούς για την αύξηση της ενεργότητας που παρατηρείται στις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στην p110α.<sup>75</sup>

Μη δυνατή αλληλεπίδραση μεταξύ τους	Ογκογόνος δράση και σηματοδότηση	
	Μεταλλάξεις στην ελικοειδή περιοχή 1624 A>G και 1633 G>A	Μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης H1047R
p85	+	-
Ras	-	+

Η ανέφικτη αλληλεπίδραση μεταξύ της Ras και της p110α λόγω της K227E μετάλλαξης στην RBD έχει την αντίθετη επίδραση στις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις της p110α. Η αλληλεπίδραση της δεσμευμένης στην GTP Ras με την αγρίου τύπου καταλυτική υπομονάδα είναι γνωστό ότι αυξάνει την ενεργότητα της p110α<sup>22</sup>, πιθανόν προκαλώντας μια αλλαγή στη διαμόρφωση της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος.<sup>4</sup> Η PI3K, με τη σειρά της, επηρεάζει ουσιαστικά τη Ras μεσολαβώντας έτσι στις λειτουργίες πολλαπλασιασμού και επιβίωσης.<sup>43, 44</sup> Η εισαγωγή της μετάλλαξης K227E στην περιοχή δέσμευσης της Ras, στα μόρια που φέρουν τουλάχιστον μία από τις συχνές μεταλλάξεις, οδηγεί σε μια ολοκληρωτική απώλεια της ογκογόνου δυναμικής των μεταλλάξεων της ελικοειδούς περιοχής μαζί με μια παύση της σηματοδότησης, ενώ η μεταλλαγμένη περιοχή της κινάσης είναι ανεπηρέαστη από την απώλεια της δεσμεύουσας Ras. Η μεταλλαγμένη περιοχή της κινάσης είναι ικανή ως και να διασώσει τις ελικοειδείς μεταλλαγμένες περιοχές, οι οποίες αχρηστεύθηκαν λόγω της απώλειας της δεσμευμένης Ras, αποκαθιστώντας τις ογκογόνες και σηματοδοτικές ενεργότητες στα συνεργατικά επίπεδα που υπήρχαν στα διπλά μεταλλαγμένα μόρια στην ελικοειδή κινάση.

Η μετάλλαξη της περιοχής της κινάσης χαρτογραφείται κοντά στη θηλιά ενεργοποίησης και πιθανόν να επηρεάζει τη διαμόρφωση της θηλιάς, αλλάζοντας την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (**σχήμα 1.10**).<sup>3, 77</sup> Προηγούμενες μελέτες της δομής του p110γ- Ras συμπλέγματος έχουν αποδείξει μια αλλαγή στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τη Ras.<sup>4</sup> Η μετάλλαξη H1047R στην περιοχή της κινάσης μπορεί να προκαλέσει μια παρόμοια αλλαγή στη διαμόρφωση κατά την απουσία της Ras και έτσι να προσδώσει ανεξαρτησία από τη Ras. Τα στοιχεία που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της p85 με τη Ras υποστηρίζουν ότι, πίσω από την αύξηση της λειτουργίας της p110α, η οποία υποκινείται από τη μετάλλαξη, υπάρχουν δυο ξεχωριστοί μοριακοί μηχανισμοί. Τα στοιχεία συμφωνούν με την ένδειξη ότι οι μεταλλάξεις στην ελικοειδή περιοχή αυξάνουν την κατασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ της N-SH2 της p85 και της ελικοειδούς περιοχής των hot spot μεταλλαγμάτων της p110α και ότι η μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης μιμείται την αλλαγή της διαμόρφωσης που υποκινείται από την αλληλεπίδραση με τη Ras.<sup>75</sup> Αυτές οι ερμηνείες αποδίδουν την επίδραση των μεταλλάξεων στις περιοχές που αλληλεπιδρούν με την p85 και Ras στην ειδική εξάλειψη της p85 και στη δέσμευση της Ras αντίστοιχα. Όμως, η πιθανότητα αυτές οι επιδράσεις των μεταλλαγμένων να αιτιολογούνται από κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση ανεξάρτητη από τις στοχευόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών δεν έχει αποκλεισθεί. Για παράδειγμα, η συγκρουστική δομή της p110α και της p85 επίσης αποκαλύπτει μια απροσδόκητη αλληλεπίδραση μεταξύ της επικράτειας που δεσμεύει την p85 και της περιοχής της κινάσης, η οποία θα μπορούσε να επηρεαστεί από την περικοπή της περιοχής που δεσμεύει την p85.<sup>3</sup> Η απόλυτη δοκιμασία αυτών των υποθέσεων θα είναι η συγκρουστική δομή της μεταλλαγμένης p110α δεσμευμένη στην ολόκληρου μεγέθους p85 ρυθμιστική υπομονάδα.

#### **1.2.4 Το *PIK3CA* είναι μεταλλαγμένο σε μια ποικιλία τύπων καρκίνου**

Το πρώτο άρθρο που αναφέρθηκε στη μετάλλαξη του γονιδίου *PIK3CA* σε ανθρώπινους καρκίνους δημοσιεύτηκε από τους Samuels et al.<sup>64</sup> Οι συγγραφείς αρχικά ανέλυσαν την αλληλουχία οκτώ γονιδίων της PI3K και οκτώ γονιδίων με μεγάλη ομολογία με αυτά της PI3K σε πρώιμους καρκίνους του παχέος εντέρου και διαπίστωσαν ότι το *PIK3CA* ήταν το μόνο γονίδιο από αυτά της PI3K που έκρυβε σωματικές μεταλλάξεις. Στη συνέχεια αναφέρθηκαν σωματικές μεταλλάξεις στο *PIK3CA* σε αρκετούς τύπους καρκίνου περιλαμβάνοντας καρκίνους του παχέος εντέρου, των Σοφία Φάρκωνα

ωοθηκών, του μαστού, του εγκεφάλου, του ήπατος, του στομάχου και του πνεύμονα (πίνακας 1.2).<sup>62</sup> Στο ερευνητικό Ινστιτούτο Sanger, στο Cambridge, στα πλαίσια του Cancer Genome Project έχει αλληλουχηθεί το *PIK3CA* σε έναν μεγάλο αριθμό επιπλέον δειγμάτων. Αυτά τα στοιχεία ανανεώνονται συνέχεια και είναι διαθέσιμα στο ερευνητικό κοινό μέσω της ιστοσελίδας: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.

### 1.2.5 Οι μεταλλάξεις του *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού

Στο ίδιο άρθρο που περιέγραφε την αρχική ανακάλυψη των *PIK3CA* μεταλλάξεων στον καρκίνο, αναφέρθηκε επίσης ότι ανιχνεύθηκαν και στο 1/12 των καρκίνων του μαστού.<sup>64</sup>

Όμως, εξαιτίας του σχετικά μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν και του γεγονότος ότι, παρά τις προσπάθειες χρόνων, ένα κοινά μεταλλαγμένο ογκογονίδιο δεν είχε ακόμα εντοπισθεί, περισσότερες ομάδες ξεκίνησαν άμεσα πιο περιεκτικές αναλύσεις του *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού.<sup>57</sup>

Αυτές οι προσπάθειες επιβραβεύθηκαν άμεσα με την ανίχνευση ενός πολύ μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων, ξεκαθαρίζοντας άμεσα ότι το *PIK3CA* ήταν το πιο κοινά μεταλλαγμένο ογκογονίδιο που είχε ποτέ ανιχνευτεί στον καρκίνο του μαστού. Εκτιμάται ότι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* υπάρχουν στο 25- 40% όλων των καρκίνων του μαστού στον άνθρωπο. Αυτή η ανακάλυψη ήταν ιδιαίτερα διαφωτιστική αφού ήταν από καιρό γνωστό, μέσω της φωσφορυλίωσης της AKT, ότι το μονοπάτι της PI3K είναι συχνά ενεργοποιημένο στον καρκίνο του μαστού<sup>78</sup>, εντούτοις λόγω της απουσία συχνών μεταλλάξεων στο *PTEN*, ο μηχανισμός ενεργοποίησης της AKT παρέμενε άγνωστος.

Πίνακας 1.2: Νουκλεοτιδικές αλλαγές εντός των εξονίων του *PIK3CA* σε σωματικούς καρκίνους.<sup>62</sup>

Τύπος καρκίνου (αρ. δειγμάτων που εξετάστηκαν)	Νουκλεοτιδική θέση	% όγκων με μεταλλάξεις
Παχέος εντέρου (234)	G1633A (21), A3140G (15), G1624A (9), C112T (1), G113A (2), G263A (1), C311G (1), G317T (1) G323C (1), del332-334 (1), G353A (1), G365A (1), C370A (1), T1035A (1), T1258C (2), G1357C (1), C1616G (1), A1625G (1), A1634G (1), G1635T (1), C1636A (5), A1637C (1), C1981A (1), G2702T (1), T2725C (1), T3022C (1), A3073G (1), C3074A (1), G3129T (2), C3139T (2), A3140T (1)	32
Γλοιοβλαστώματα (15)	T1132C (1), G1048C (1), A2102C (1), G3145A (1)	27
Γαστρικού (12)	G2702T(1), A3140G (2)	25
Μαστός (12)	A3140G (1)	8
Πνεύμονας (24)	G1633A (1)	4
Πάγκρεας	0	0
Μεδουλοβλάστωμα (12)	0	0
Μαστός (70)	C1241T (1), T1258C (2), del1352-1366 (1), G1624A (5), G1633A (9), C1636G (1), A3140G (5), A3140T (4) G1624A (2), G1633A (1), C1636A (1), A3140G (7)	40
Παχύ έντερο (32)	G1633A (2), A1634G (1), C1636A (1), A2198G (1), A3140G (1)	32
Ωοθήκες (198)	G1633A (1), A1634C (21), C3075T (3), A3127G (1), A3140G (1), T3147G (1)	12
Μαστός (18)	G1624A (4), G1633A (4), A1634G (1), C3075T (3), A3140T (2), A3140G (2)	18
Ενδομήτριο (66)	G1624A (1), G1624C (1), G1633A (1), A1634G (1), G3019C (1), T3061C (1), A3062C (1), C3104T(1), G3129T (1), C3139T (5), A3140G (6), G3149A (1), C3155A (1), A3194T (1), A3207G (1)	36
Κεφάλι/Καρκίνωμα Πλακώδη κύτταρα λαιμού	G1624A (1), G1633A (1), A1028G (1), C1143G (1), A1173G (6)	33

(30)		
Καρκίνωμα στα πλάκωδη κύτταρα του στόματος (108)	G1624A (2), G1633A (1), A1637T (1), A3127G (1), A3140G (1), G3145A (1), G3145C (1)	7
Καρκίνωμα του παγκρέατος (38)	C3044T (1), A3140G (1), T1654G (1), C0971T (1)	11
Αναπλαστικό Ολιγοδενδρογλίωμα (21)	G1624A (1), G1633A (1), A3140G (1)	14
Αναπλαστικό αστροκύττωμα (31)	A1637C (1)	3
Χαμηλού βαθμού αστροκύττωμα	0	0

Για το λόγο αυτό, η παρουσία των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* παρείχε μια μοριακή εξήγηση σε αυτό το μακράς διάρκειας αίνιγμα.

Την αρχική ανακάλυψη των *PIK3CA* μεταλλάξεων στον καρκίνο του μαστού, ακολούθησε μια ουσιώδης προσπάθεια με στόχο τη συσχέτιση των μεταλλάξεων αυτών στον καρκίνο του μαστού με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως η έκφραση των **υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptor, ER)** και **προγεστερόνης (Progesterone Receptor, PR)**, η παρουσία μετάστασης στους λεμφαδένες και η ανταπόκριση στη θεραπεία. Αυτοί οι συσχετισμοί συνοψίζονται παρακάτω, όμως αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αμφιλεγόμενα στοιχεία σε αρκετούς από τους προτεινόμενους συσχετισμούς.

Οι Saal et al. ήταν η πρώτη ομάδα που πρότεινε οριστικές συσχετίσεις μεταξύ των *PIK3CA* μεταλλάξεων και του καρκίνου του μαστού.<sup>79</sup> Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους οι *PIK3CA* μεταλλάξεις παρουσιάζονταν συχνότερα σε όγκους με ακέραια, εκφραζόμενα *PTEN* γονίδια, σε όγκους οι οποίοι παρουσίασαν μετάσταση στους λεμφαδένες, και σε όγκους με έκφραση των ER, PR και των ERBB2. Τα στοιχεία από τους Stemke-Hale et al. επίσης απέδειξαν τη συχνότερη εμφάνιση των *PIK3CA* μεταλλάξεων σε καρκίνους του μαστού θετικούς στους υποδοχείς ορμονών αλλά και στο HER2.<sup>80</sup> Οι Li et al. επιβεβαίωσαν και επέκτειναν αρκετούς από αυτούς τους συσχετισμούς, αποδεικνύοντας ότι η παρουσία μετάλλαξης στο *PIK3CA* συνδέεται με χειρότερη επιβίωση και ότι αυτές υπήρχαν πιο συχνά σε μεγαλύτερους όγκους με έκφραση των ER και PR.<sup>81</sup> Οι Lerma et al. και Lai et al. επίσης επιβεβαίωσαν τη

σύνδεση μεταξύ μετάλλαξης στο *PIK3CA* και χειρότερης επιβίωσης.<sup>82, 83</sup> Όμως τα τελευταία αυτά στοιχεία είναι αμφιλεγόμενα, αφού οι Barbareschi et al. δήλωσαν ότι ενώ οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 σχετίζονται με κακή πρόγνωση, αυτές στο εξόνιο 20 συνδέονται με καλύτερη πρόγνωση.<sup>84</sup> Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τους Maugyama et al., Perez- Tenorio et al. και Kalinsky et al. οι *PIK3CA* μεταλλάξεις ουσιαστικά συνδέονται με καλύτερη επιβίωση.<sup>85-87</sup>

Οι Buttita et al. παρείχαν έναν άλλο, πιθανόν, σημαντικό κλινικοπαθολογικό συσχετισμό, ότι οι *PIK3CA* μεταλλάξεις παρουσιάζονται πιο συχνά σε λοβιακούς (lobular) παρά σε πορώδεις (ductal) καρκίνους του μαστού.<sup>88</sup> Οι Barbareschi et al. βρήκαν έναν παρόμοιο συσχετισμό, αλλά πρότειναν ότι αφορά μόνο τα δείγματα αυτά με μεταλλάξεις στο εξόνιο 9.<sup>84</sup>

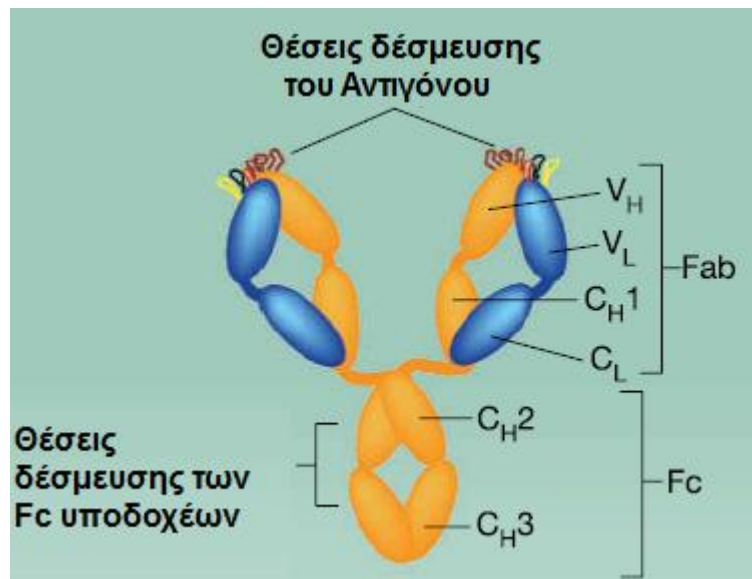
Όπως θα δούμε παρακάτω το προφίλ των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* έχει επίσης συνδεθεί με την ανταπόκριση στη θεραπεία στον καρκίνο του μαστού.

### **1.3 PI3K και ο ρόλος της στη στοχευμένη θεραπεία**

#### **1.3.1 Ο ρόλος του μονοπατιού της PI3K στις στοχευμένες θεραπείες έναντι του HER2**

##### **1.3.1.1 Εμπλοκή του μονοπατιού της PI3K στην αντίσταση στο φάρμακο Trastuzumab (Herceptin)**

Το Trastuzumab (Herceptin) είναι ένα IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα<sup>89</sup> που έχει εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού, που υπερεκφράζουν τον HER2.<sup>90, 91</sup> Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός από αυτή την ομάδα ασθενών εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία με το Trastuzumab.<sup>90, 92</sup>

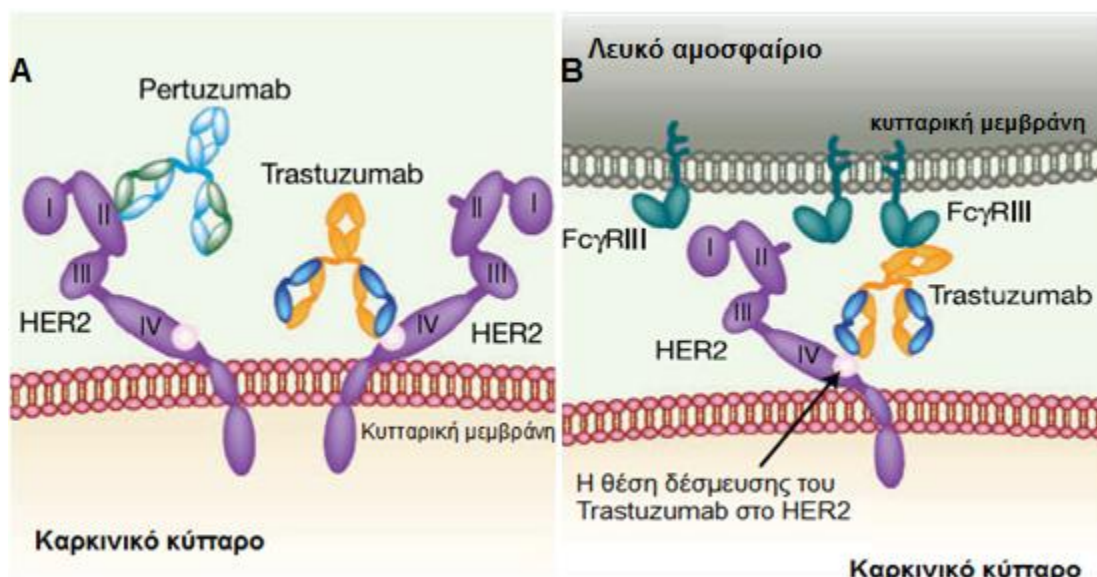


Σχήμα 1.11: Το IgG1 αντίσωμα Trastuzumab. Οι αγκύλες υποδεικνύουν τις Fab και Fc περιοχές του IgG1.<sup>93</sup>

Ως ένα IgG1, οι προτεινόμενες λειτουργίες του μπορούν να υποδιαιρεθούν σε αυτές όπου παρεμβαίνουν οι περιοχές Fab (fragment, antigen binding) και σε εκείνες όπου μεσολαβούν οι περιοχές Fc (fragment, crystalizable) (σχήμα 1.11). Η Fab περιέχει τους τόπους δέσμησης στο αντιγόνο, ενώ η Fc τους τόπους δέσμησης στους Fc υποδοχείς που υπάρχουν στα ανοσοκύτταρα, στα αιμοπετάλια, στα ηπατοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.<sup>93</sup>

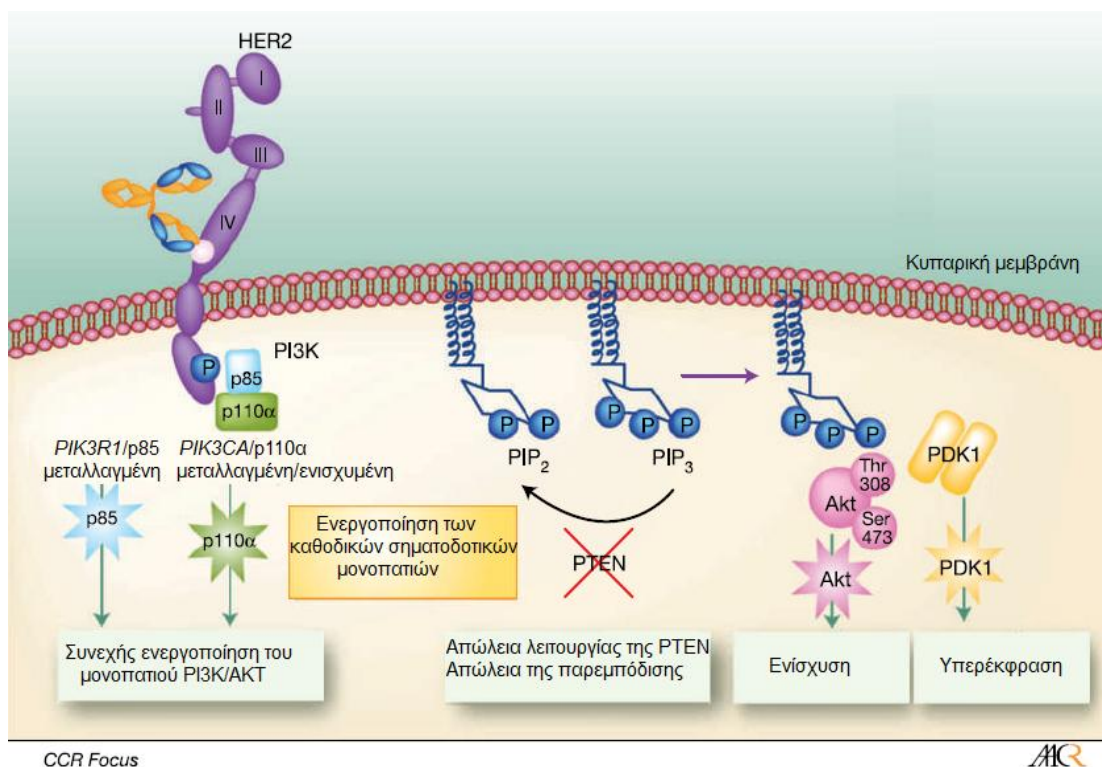
Το Trastuzumab δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια, μέσω της Fab περιοχής του, στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα HER2, παράγοντας μια κυτταροστατική επίδραση η οποία συνδέεται με την ανασχεση της φάσης G1 μέσω της αύξησης της έκφρασης του αναστολέα p27 της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης 2 (Cyclin dependent kinase 2, Cdk2).<sup>94, 95</sup> Επίσης, παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT<sup>94</sup> και αναστέλλει τη σηματοδότηση του PI3K αυξάνοντας την ενεργότητα της φωσφατάσης PTEN.<sup>96</sup> Επιπλέον το Trastuzumab, μέσω της Fc περιοχής του, δρα επηρεάζοντας την αντιγονικά εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα (σχήμα 1.12).<sup>97</sup>





Σχήμα 1.12: A) Η λειτουργία του Trastuzumab μέσω της Fab περιοχής του προέρχεται από τη δέσμευση του στην επικράτεια IV του HER2. Το Pertuzumab ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HER2, δεσμεύεται σε έναν επίτοπο που υπάρχει στην περιοχή II του HER2. B) Οι λειτουργίες του Trastuzumab που σχετίζονται με την Fc περιοχή τους ξεκινούν από την δέσμευση της Fc περιοχής τους σε άλλα κύτταρα που εκφράζουν Fc υποδοχείς, όπως ανοσοκύτταρα, ηπατοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Η Fc περιοχή του Trastuzumab μπορεί να δεσμεύσει τον Fcγ III (RIII) υποδοχέα που υπάρχει στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων από το ανοσοποιητικό σύστημα και να προκαλέσει τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσω της αντιγονικά εξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας.<sup>97 93</sup>

Η αύξηση της έκφρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά του HER2 αποτελεί έναν από τους πιο διεξοδικά μελετημένους μηχανισμούς αντίστασης στο Trastuzumab.<sup>93</sup> Όπως έχει ήδη αναφερθεί η απώλεια της PTEN καταλήγει στην υπερέκφραση του μονοπατιού PI3K/AKT.<sup>98</sup> Οι Nagata et al έδειξαν ότι μειωμένα επίπεδα της φωσφατάσης PTEN οδηγούν σε αυξημένη φωσφορυλίωση και σηματοδότηση του PI3K/AKT, αποτρέποντας την ανασχεση της ανάπτυξης, που μεσολαβείται από το Trastuzumab, των καρκινικών μαστικών κυττάρων που υπερεκφράζουν τον HER2.<sup>96</sup> Σε μοντέλα ανεπαρκή σε PTEN, οι αναστολείς της PI3K αποκατέστησαν την αντίσταση στο Trastuzumab *in vivo* και *in vitro*. Ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που υπερεκφράζουν τον HER2 αλλά με ανεπάρκεια στη PTEN είχαν σημαντικά μικρότερη ανταπόκριση σε θεραπεία βασισμένη στο Trastuzumab σε σχέση με ασθενείς των οποίων ο όγκος είχε φυσιολογική έκφραση της PTEN.<sup>96</sup>



**Σχήμα 1.13:** Γενικοί μηχανισμοί αντίστασης στο Trastuzumab. Το PTEN είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Η δέσμευση του Trastuzumab σταθεροποιεί και ενεργοποιεί το PTEN και κατά συνέπεια ρυθμίζει αρνητικά το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/AKT.<sup>96</sup> Όταν η λειτουργία του PTEN χαθεί, το PI3K παραμένει αδιάκοπα ενεργό ανεξαρτήτως δέσμευσης του Trastuzumab στο HER2. Η απώλεια του PTEN συνδέεται κλινικά με μη ανταπόκριση στην θεραπεία με το Trastuzumab. Γενωμικές ανωμαλίες στο μονοπάτι της PI3K είναι ένα συχνό φαινόμενο σε μια ποικιλία καρκίνων.<sup>99</sup> Πολλά συστατικά αυτού του μονοπατιού επηρεάζονται από μεταλλάξεις σωματικές ή της γενετικής σειράς αλλά μόνο σε λίγες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στο *PIK3CA* και στο *PTEN* ταυτόχρονα.<sup>100</sup> Γονιδιακές ανωμαλίες στο μονοπάτι της PI3K προκαλούν αδιάκοπη ενεργοποίηση του μονοπατιού που θα σηματοδοτεί καθοδικά του πυρήνα ανεξαρτήτως δέσμευσης του Trastuzumab στο HER2. Αυτή είναι η περίπτωση των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες p85α και p110α της PI3K. Η ενεργότητα της κινάσης AKT και η υπερενεργοποίηση του *PDPK1* έχουν επίσης αναμιχθεί με την αντίσταση στο Trastuzumab.<sup>93</sup>

Οι μεταλλάξεις στην PI3K έχουν επίσης εμπλακεί στην ανοχή στο Trastuzumab μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K/AKT (σχήμα 1.13). Οι Berns et al περιέγραψαν σημαντικά βελτιωμένη ικανότητα ανίχνευσης ασθενών με χαμηλή ανταπόκριση στο Trastuzumab σε ένα σύνολο 55 ασθενών με καρκίνο του μαστού όταν συνδύαζαν την χαμηλή έκφραση του *PTEN* με την παρουσία ογκογόνων μεταλλάξεων στο *PIK3CA*.<sup>101</sup> Αυτό το εύρημα δεν προκαλεί έκπληξη αφού το Trastuzumab

μπλοκάρει το σηματοδοτικό μονοπάτι ανοδικά από την PI3K. Αν υπάρχει μια καθοδική μετάλλαξη θα μπορεί να ξεπεράσει την αναστολή πριν από αυτή.

### 1.3.1.2 Εμπλοκή του μονοπατιού της PI3K στην αντίσταση στο φάρμακο lapatinib

Το lapatinib εγκρίθηκε από το FDA το 2007 για τη χρήση σε συνδυασμό με την capecitabine για την θεραπεία ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο μαστού οι οποίοι υπερεκφράζουν τον HER2 και που έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία (με σκευάσματα τα οποία μεταξύ άλλων περιέχουν και το Trastuzumab). Το 2010 εγκρίθηκε και για τη χρήση, σε συνδυασμό με το letrozole, για τη θεραπεία εμμηνοπαυσιακών γυναικών με μεταστατικό καρκίνο μαστού που υπερεκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς και τον HER2.<sup>102</sup>

Το lapatinib είναι ένας συνθετικός **αναστολέας κινάσης τυροσίνης (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI)** που στοχεύει τόσο τον HER2 όσο και το HER1 υποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί ότι, χάρη στη δομή του και στην ικανότητά του να δεσμεύεται σε μια περιοχή δέσμευσης ATP σε ανενεργή μορφή, παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση στην ενδοκυττάρια περιοχή τους κατά έναν αντιστρεπτό τρόπο.<sup>103, 104</sup> Με την παρεμπόδιση των HER1 και HER2 το lapatinib αναχαιτίζει την ενεργοποίηση των επόμενων ενδοκυττάρων μονοπατιών συμπεριλαμβανομένου και αυτού της PI3K/AKT.<sup>102</sup>

Σαν ένας αναστολέας κινάσης τυροσίνης, το lapatinib επηρεάζει τους υποδοχείς και τη σηματοδότηση σε ένα διαφορετικό επίπεδο σε σχέση με το Trastuzumab. Παρόλα αυτά όπως και στην περίπτωση του Trastuzumab κάποιοι καρκίνοι του μαστού δεν ανταποκρίνονται ή αναπτύσσουν αντοχή στο lapatinib. Το μονοπάτι της PI3K/PTEN παίζει και εδώ σπουδαίο ρόλο. Για παράδειγμα σύμφωνα με τους Eichhorn et al οι μεταλλάξεις ενεργοποίησης στο *PIK3CA* (E545K και H1047R) και η απώλεια της λειτουργίας του PTEN προκαλούν αντίσταση στο lapatinib.<sup>105</sup> Έτσι η παρουσία μεταλλάξεων στο *PIK3CA* και η απώλεια λειτουργίας του PTEN είναι δείκτες που μπορούν να προβλέψουν την χαμηλή ανταπόκριση στη θεραπεία με το lapatinib.<sup>102</sup>

### 1.3.2 Οι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* ως νέος θεραπευτικός στόχος

Η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών σχημάτων έναντι των συχνών ογκογόνων γενωμικών αλλαγών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και είναι μεγάλης σημασίας. Οι σωματικές

μεταλλάξεις στο *PIK3CA* θα ήταν ιδανικοί στόχοι λόγω της συχνής εμφάνισής τους και του γεγονότος ότι το 80% με 90% αυτών υπάρχουν σε μια από τις τρεις επαναλαμβανόμενες (hot spot) αλληλουχίες. Παρακάτω αναφέρονται αρκετές τάξεις ενώσεων που είναι πιθανόν να έχουν κλινική χρησιμότητα για τη στοχευμένη θεραπεία καρκίνων οι οποίοι φέρουν *PIK3CA* μεταλλάξεις.<sup>106</sup>

### 1.3.2.1 PI3K αναστολείς

Πριν την ανακάλυψη των σωματικών *PIK3CA* μεταλλάξεων στους ανθρώπινους καρκίνους, το PI3K ένζυμο είχε ήδη αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό μόριο που μεσολαβεί στην καρκινογένεση. Έτσι, αναπτύχθηκαν αναστολείς του PI3K με την ελπίδα ότι θα μπορούσε να επιτευχθεί ένα θεραπευτικό παράθυρο. Οι πιο πρώιμοι και καλύτερα χαρακτηρισμένοι αναστολείς του PI3K είναι η σορτμανίνη (wortmanin) και LY294002. Και οι δύο αυτές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν αποτελεσματικούς αντι-καρκινικούς παράγοντες σε *in vitro* μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας, όπως και σε *in vivo* μοντέλα ζώων.<sup>107, 108</sup> Το LY294002 έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει αμφοτέρως την *in vitro* PI3K ενεργότητα και φωσφορυλίωση των καθοδικών μορίων που επηρεάζονται από το *PIK3CA* σε επιθηλιακά μαστικά καρκινικά κύτταρα<sup>68</sup> και καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.<sup>109</sup> Όμως, λόγω της αναφερθείσας κυτταροτοξικότητας, η σορτμανίνη και LY294002 δεν έχουν κλινική χρησιμότητα σύμφωνα με την ανασκόπηση του Workman.<sup>110</sup> Επιπροσθέτως, δεν είναι ιδανικά για την ειδική στόχευση των μεταλλαγμένων *PIK3CA* διότι μπορούν να αναστείλουν και άλλες κινάσες από την **οικογένεια κινασών που μοιάζουν με την PI-3 κινάση (PI-3 kinase-like kinase, PIKK)** και αρκετές άλλες κινάσες όπως η mTOR.<sup>106</sup> Πρόσφατα ένας αριθμός ομάδων έχει αναφέρει την ανάπτυξη *PIK3CA* επιλεκτικών αναστολέων, και κάποιοι έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί *in vitro* και *in vivo*.<sup>106</sup>

Από την άλλη πλευρά, η ειδική στόχευση του *PIK3CA* μπορεί να είναι προβληματική, αφού το *PIK3CA* εμπλέκεται σε έναν αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, όπως είναι η σηματοδότηση της ινσουλίνης.<sup>10, 111</sup> Αυτό θα μπορούσε να καταλήξει σε αναστολείς του *PIK3CA* απαγορευτικά κυτταροτοξικούς, περιορίζοντας έτσι το κλινικό όφελος. Για παράδειγμα κάποιοι αναστολείς του *PIK3CA* έχει αποδειχθεί ότι ακυρώνουν την επίδραση της ινσουλίνης στα ποντίκια.<sup>111</sup> Παρόμοια, ποντίκια με ανεπάρκεια στο *PIK3CA* φάνηκε να έχουν ένα αυξημένο ποσοστό καρδιακής ανεπάρκειας.<sup>106</sup> Έτσι η σημαντική πιθανότητα

εμφάνισης παρενεργειών οδήγησε στην ανάπτυξη χημικών ενώσεων σχεδιασμένων να στοχεύουν τα καθοδικά μόρια που επηρεάζονται μέσα στο μονοπάτι του *PIK3CA* με την ελπίδα ότι αυτό ίσως να αποτελεί μια πιο αποτελεσματική στρατηγική για τη στόχευση καρκίνων που περιέχουν μεταλλάξεις στο *PIK3CA*.

### 1.3.2.2 Αναστολείς της ΑΚΤ

Η ΑΚΤ, που είναι επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση Β, είναι μια κινάση σερίνης θρεονίνης που βρίσκεται καθοδικά της PI3K, και η απορρύθμισή της σχετίζεται συχνά με πολλούς διαφορετικούς καρκίνους.<sup>112</sup> Πιο συγκεκριμένα, η μόνιμη (constitutive) ενεργοποίηση της ΑΚΤ έχει συνδεθεί με τις *PIK3CA* μεταλλάξεις σε αρκετά κυτταρικά μοντέλα *in vitro*.<sup>67-70, 109</sup> Για αυτό, οι αναστολείς της ΑΚΤ πιθανόν να αποδειχθούν χρήσιμοι στην στόχευση καρκίνων με μεταλλάξεις στο *PIK3CA*.

Η ΑΚΤ ανιχνεύθηκε ως ένα ογκογονίδιο δύο δεκαετίες πριν<sup>113</sup>, και πολλαπλοί αναστολείς της έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αποτροπή της ενεργοποίησης της ΑΚΤ και της κυτταρικής ανάπτυξης σε *in vitro* και *in vivo* καρκινικά μοντέλα.<sup>106, 114, 115</sup> Το Perifosine είναι ο πιο μελετημένος αναστολέας της ΑΚΤ, δείχνοντας αποτελεσματικός στην αποτροπή της ανάπτυξης των διάφορων καρκινικών κυτταρικών τύπων.<sup>114</sup> Όμως ως ένα απλό μέσο, το Perifosine δεν επέδειξε θεραπευτικό όφελος σε αρκετές θεραπευτικές δοκιμές φάσης II. Παρόλα αυτά, όπως έχει αποδειχθεί με *in vitro* μελέτες το Perifosine πιθανόν να έχει θεραπευτική προοπτική όταν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ακτινοβολία ή άλλα πρότυπα κυτταροτοξικά μέσα.<sup>106</sup> Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η API-2, μια χημική ένωση που είχε δείξει κάποια αποτελεσματικότητα σε δοκιμές πρώιμης φάσης αλλά εγκαταλείφθηκε λόγω υπερβολικής τοξικότητας<sup>106</sup>, είναι ένας αναστολέας της ΑΚΤ.<sup>115</sup> Αυτό το εύρημα ενθαρρύνει τη διερεύνηση της αναστολής της ΑΚΤ σε χαμηλότερες δόσεις από εκείνες που είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως, αποφεύγοντας έτσι τις επιβλαβείς παρενέργειες. Προς το παρόν, πολλές κλινικές δοκιμές των ΑΚΤ αναστολέων είναι σε εξέλιξη οι οποίες θα μπορούσαν να εξακριβώσουν την αποτελεσματικότητα αυτής της τάξης των μέσων.

Επιπρόσθετες μελέτες χρειάζεται να διεξαχθούν πάνω στη σχέση μεταξύ των *PIK3CA* μεταλλάξεων και της ΑΚΤ αφού υπάρχουν τρεις ξεχωριστές ισομορφές της (ΑΚΤ1, ΑΚΤ2 και ΑΚΤ3) και είναι πιθανό κάθε μία να έχει διαφορετικές επιδράσεις και/ ή κυτταροτοξικότητα. Μέχρι σήμερα, οι μεταλλάξεις του *PIK3CA* έχουν συνδεθεί πιο στενά

με *in vitro* κυτταρικά μοντέλα της ΑΚΤ1<sup>67-70</sup>, αφού μια μόνο μελέτη που εξέτασε τις τρεις ισομορφές αποκάλυψε ότι η ΑΚΤ1 πιθανόν να είναι εκείνη που επηρεάζεται περισσότερο από τις *PIK3CA* μεταλλάξεις.<sup>109</sup> Όμως, η ειδική λειτουργία της κάθε ισομορφής έχει σκιαγραφηθεί μέσα από διάφορες εργαστηριακές μελέτες. Για παράδειγμα το παρεμβαλλόμενο RNA (interfere RNA, i-RNA) που μεσολαβεί στο *Akt1* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού έχει δείξει ότι αυξάνει την κυτταρική κινητικότητα<sup>116</sup>, και τα *Akt1* knockout ποντίκια είναι μικρά σε μέγεθος και στείρα.<sup>117</sup> Επιπροσθέτως τα *Akt2* knockout ποντίκια αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη<sup>118</sup>, ενώ τα *Akt3* knockout ποντίκια εκθέτουν ανώμαλη ανάπτυξη του εγκεφάλου.<sup>119</sup> Ειδικοί αναστολείς της ΑΚΤ1 και 2 έχουν αναπτυχθεί και έχουν δείξει κάποια υπόσχεση *in vitro*.<sup>106</sup> Απαιτείται επιπλέον αποσαφήνιση των σχετικών επιδράσεων της αναστολής των διαφορετικών ισομορφών της ΑΚΤ σε καρκίνους που κρύβουν *PIK3CA* μεταλλάξεις, αφού το ενδεχόμενο για σημαντικές κυτταροτοξικές δράσεις παραμένει ένα εμπόδιο στη χρήση των αναστολέων της ΑΚΤ ως αποτελεσματική στοχευμένη θεραπεία για αυτούς τους καρκίνους.

### 1.3.2.3 Αναστολείς της mTOR

Η mTOR, ο στόχος της Rapamycin στα θηλαστικά, είναι μια κινάση θρεονίνης. Αποτελεί έναν καθοδικό τελεστή του *PIK3CA* και είναι πολύ σημαντική για αρκετές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβάνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>120</sup> και την αγγειογένεση.<sup>121</sup> Έχει φανεί ότι το μονοπάτι της mTOR ενεργοποιείται σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες κοτόπουλου<sup>69</sup> και σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.<sup>106</sup> Για αυτό το λόγο, η παρεμπόδιση του μονοπατιού της mTOR πιθανόν να αποδειχτεί ότι αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για τη στόχευση της σηματοδότησης που οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη σε καρκίνους με *PIK3CA* μεταλλάξεις.

Από τις χημικές ενώσεις που θα μπορούσαν ενδεχομένως να στοχεύσουν καρκίνους που φέρουν *PIK3CA* μεταλλάξεις, οι mTOR αναστολείς είναι πιο ώριμοι από τη σκοπιά της ανάπτυξής τους και της κλινικής τους χρήσης. Το Rapamycin, ένας mTOR αναστολέας, αρχικά αναπτύχθηκε στις αρχές των 1970 σαν ένας αντιμυκητιακός παράγοντας<sup>122</sup> και αργότερα εγκρίθηκε από το FDA για την θεραπεία της ανοσοκαταστολής.<sup>123</sup> Το Rapamycin και τα ανάλογα του έχουν χρησιμοποιηθεί με διαφορετική επιτυχία για τη θεραπεία ενός πλήθους διαφορετικών καρκίνων.<sup>106</sup> Η εύρεση βιοδεικτών για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε θεραπεία με τους mTOR

αναστολείς έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη αυτών των παραγόντων, εφόσον η ανταπόκριση στους αναστολείς αυτούς μεταβάλλεται. Θεωρητικά, οι μεταλλάξεις του *PIK3CA* θα μπορούσαν να αποτελούν τέτοιους προβλεπτικούς βιοδείκτες. Για παράδειγμα, έχει αποδειχτεί πως είτε το rapamycin είτε τα ανάλογα του μπορούν να παρεμποδίσουν την καρκινική μετατροπή των εμβρυϊκών ινοβλαστών του κοτόπουλου που εμφανίζουν μεταλλάξεις στο *PIK3CA*<sup>69</sup> και να αναστείλουν την καρκινική ανάπτυξη που προκαλείται από μεταλλάξεις στο *PIK3CA* σε έμβρυα κοτόπουλου.<sup>27</sup>

Παρά την κλινική δυνατότητα των αναστολέων της mTOR, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά εμπόδια στην περαιτέρω ανάπτυξή τους. Η mTOR σχηματίζει δύο συμπλέγματα μέσα στα κύτταρα, την mTORC1 και την mTORC2.<sup>124</sup> Η πρώτη μεσολαβεί σε μια θηλιά αρνητικής ανάδρασης με την PI3K/ AKT σηματοδότηση, και κατά αυτό τον τρόπο η παρεμπόδιση της mTOR φαρμακολογικά προκαλεί μια παράδοξη αύξηση της σηματοδότησης που προωθεί την ανάπτυξη από τις PI3K/AKT.<sup>125</sup> Επιπροσθέτως, η mTORC2 φωσφορυλιώνει άμεσα την AKT<sup>41</sup> αλλά μόνο σπάνια παρεμποδίζεται από το rapamycin και τα ανάλογά του κατά ένα τρόπο που εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού.<sup>106</sup> Εφόσον τα συμπλέγματα της mTOR βρίσκονται και στα δύο άκρα του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT και η mTORC2 αναστολή είναι περιορισμένη, χρειάζεται να ολοκληρωθούν περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί ευαισθησίας/ αντοχής στους mTOR αναστολείς και για να αναπτυχθούν βιοδείκτες που θα προβλέψουν την αποτελεσματικότητα της παρεμπόδισης των mTOR. Άλλες αποτελεσματικές στρατηγικές για τη στόχευση αυτού του περίπλοκου σηματοδοτικού μονοπατιού στο μέλλον μπορεί να περιλαμβάνουν το συνδυασμό παρόντων αναστολέων της mTOR είτε με νεώτερους αναστολείς του PI3K/AKT μονοπατιού, είτε με πιο παραδοσιακές μεθόδους όπως είναι η χημειοθεραπεία. Επιπροσθέτως, είναι πιθανό ότι η ανάπτυξη νέων αναστολέων ικανών να αναστείλουν την mTORC2, ή εναλλακτικά αμφότερες τις mTORC1 και mTORC2, θα μπορούσε να παρέχει μια πιο αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή.<sup>106</sup>





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (CTCs)

#### 2.1 Εισαγωγή

Η παρουσία των **κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs)** περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Asworth.<sup>126</sup> Είκοσι χρόνια αργότερα ο Steve Paget παρουσίασε στο πρώτο τεύχος του *Lancet* την «υπόθεση του σπόρου και του εδάφους» (“the seed and soil hypothesis”), σύμφωνα με την οποία «η μετάσταση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ επιλεγμένων καρκινικών κυττάρων (ο σπόρος) και του ειδικού μικροπεριβάλλοντος του οργάνου (το έδαφος)».<sup>127</sup> Σήμερα, η έρευνα στον καρκίνο έχει πράγματι αποδείξει τον κρίσιμο ρόλο των CTCs στην μεταστατική διάδοση των καρκινωμάτων.<sup>127</sup>

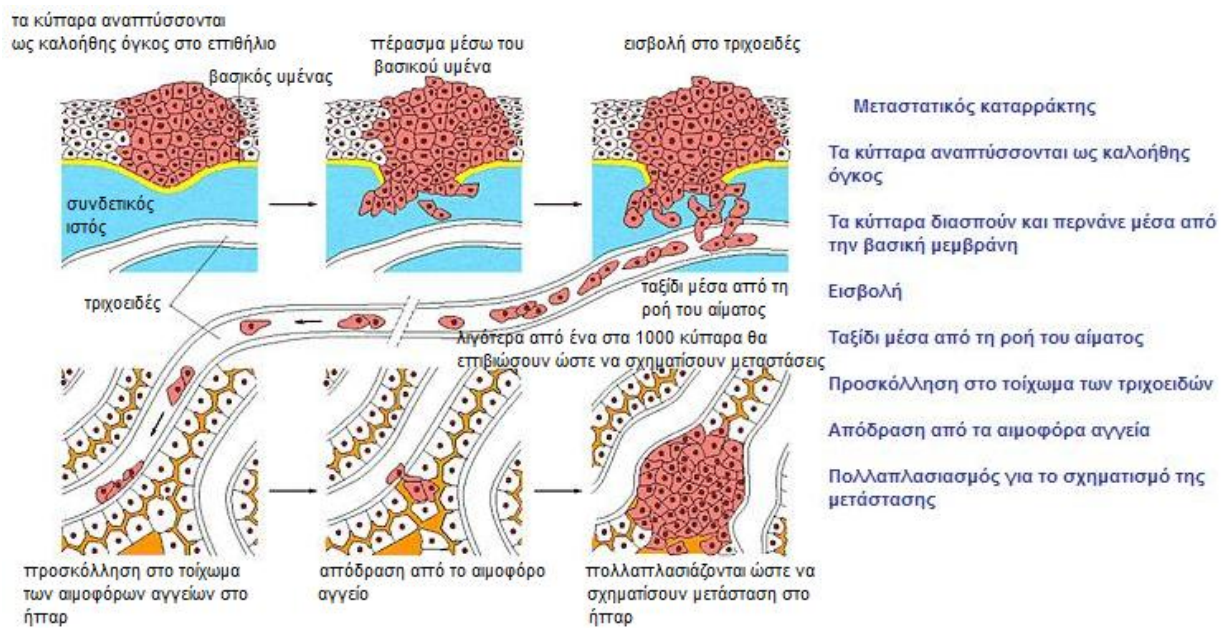
Τα **διεσπαρμένα καρκινικά (Disseminating Tumor Cells, DTCs)** και τα CTCs που υπάρχουν στον **μυελό των οστών (Bone Marrow, BM)** και στο περιφερικό αίμα αντιστοίχως, σχετίζονται στενά με τη μελέτη της βιολογίας της πρώιμης μεταστατικής διάδοσης και παρέχουν μια πηγή διάγνωσης στους ασθενείς με φανερές μεταστάσεις.<sup>128</sup> Στοιχεία από Ευρωπαϊκές ομάδες έχουν υποστηρίξει την προγνωστική σημασία των DTCs στον BM ασθενών με καρκίνο του μαστού. Η ανίχνευση και απαρίθμηση των CTCs στον καρκίνο του μαστού έχει καθιερωθεί σε αρκετές κλινικές μελέτες, δείχνοντας μια σχέση με την μείωση της **ελεύθερης από την πρόοδο της νόσου επιβίωσης (Progression Free Survival, PFS)** και με την μείωση της **ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS)** σε εγχειρήσιμο και σε προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Η ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού μετά από χημειοθεραπεία έχει επίσης προγνωστική θεραπεία.

Νέες τεχνολογίες με την απαιτούμενη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα έχουν αναπτυχθεί και εξακολουθούν να αναπτύσσονται ώστε να εκμεταλλευτούν παραπάνω την διαγνωστική δυνατότητα των CTCs.<sup>128</sup>

#### 2.2 Τα CTCs και η μικρομεταστατική διάδοση

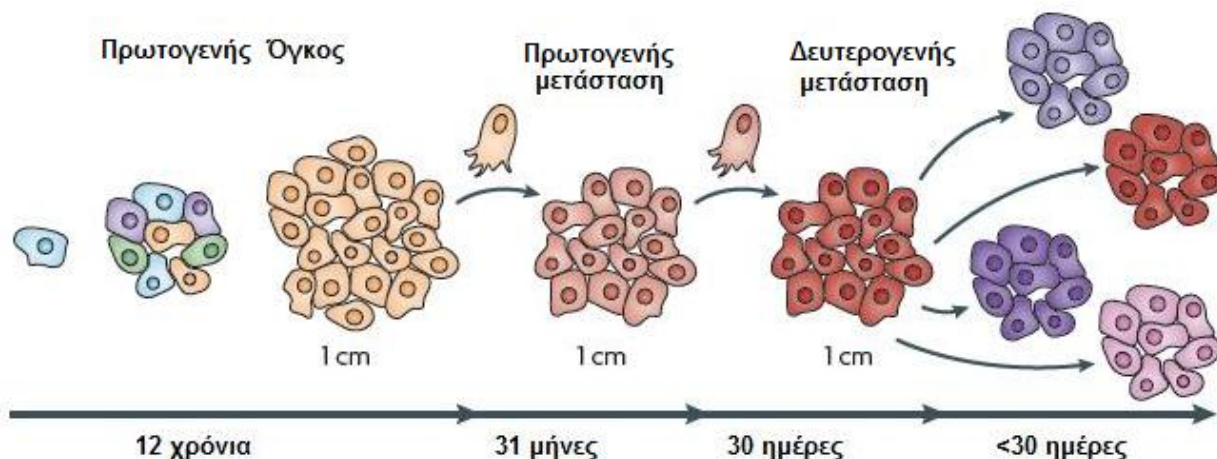
Η μετάσταση ευθύνεται για το 90 % της σχετιζόμενης με τον καρκίνο θνησιμότητας, ωστόσο παραμένει το λιγότερο κατανοητό σημείο της καρκινικής παθογένεσης.<sup>129</sup> Είναι

ξεκάθαρο ότι ο μεταστατικός καταρράκτης αποτελείται από μια σειρά πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών οι οποίες επιτρέπουν την μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων από την πρωταρχική θέση σε μια απομακρυσμένη τοποθεσία και το ξεκίνημα νέας καρκινικής ανάπτυξης (σχήμα 2.1).<sup>128</sup> Η μετάσταση είναι αποτέλεσμα μιας καταρακτώδους διαδικασίας πολλών βημάτων που περιλαμβάνει: 1) την αγγειογένεση στην περιοχή του πρωταρχικού καρκίνου, 2) την απόσπαση και επίθεση των καρκινικών κυττάρων, 3) ενδοαγγείωση (intravasation) 4) την επιβίωση και ανάσχεση στην κυκλοφορία, 5) εξαγγείωση (extravasation) και 6) την αποίκιση και ανάπτυξη των μεταστατικών όγκων.<sup>127</sup>



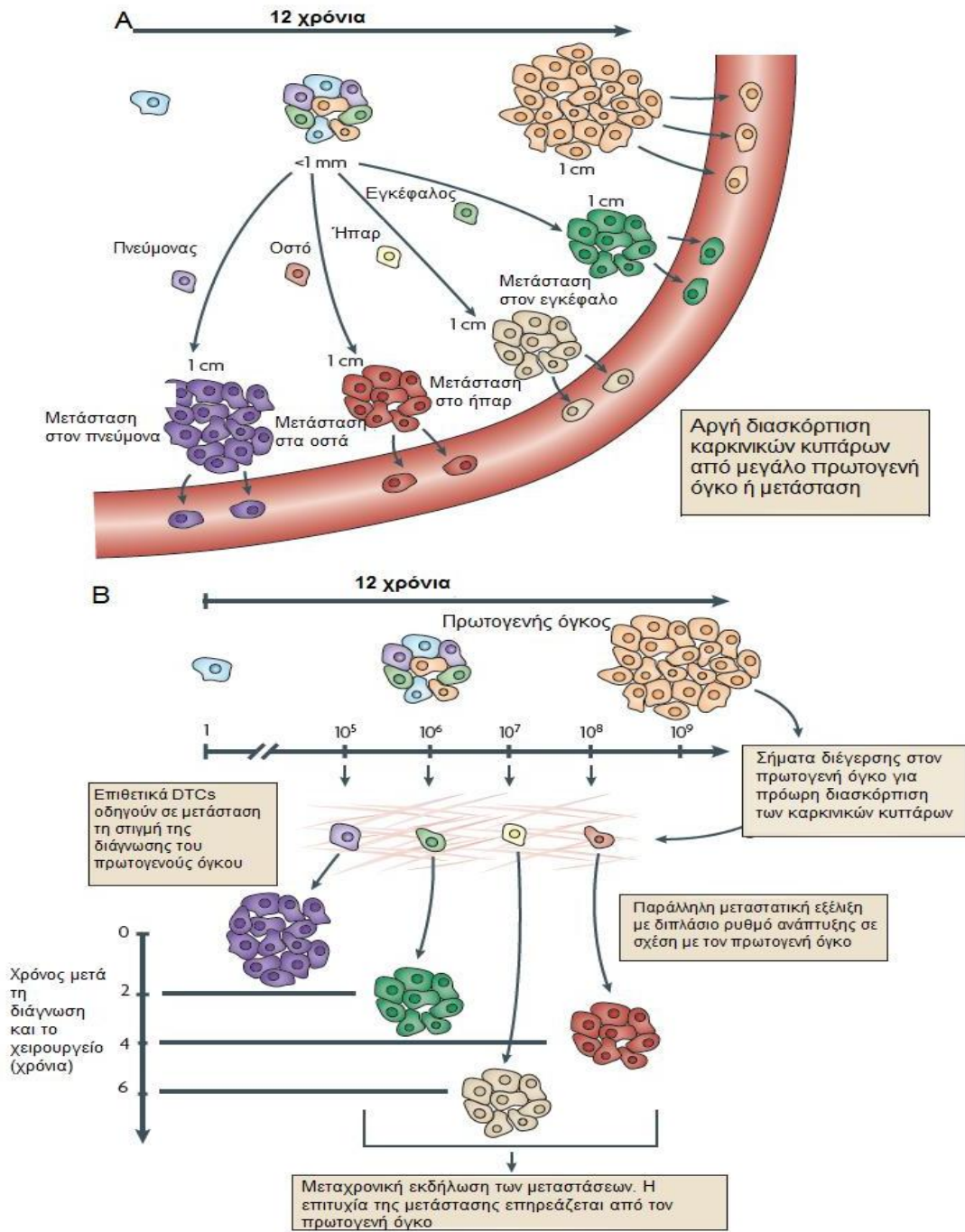
**Σχήμα 2.1:** Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να περάσουν από μια σειρά σταδίων πριν ξεκινήσει η μετάσταση.<sup>130</sup>

Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού μπορούν να εμφανίσουν επανερχόμενη μεταστατική νόσο ύστερα από περιόδους λανθάνουσας κατάστασης (dormancy) που κυμαίνονται από χρόνια έως ακόμα και δεκαετίες. Αυτή η παύση μπορεί να εξηγηθεί από τον καρκινικό λήθαργο (dormancy), ένα στάδιο στην καρκινική εξέλιξη όπου η υπολειμματική νόσος ενώ είναι παρούσα παραμένει ασυμπτωματική.<sup>131</sup> Τα CTCs έχουν ένα σπουδαίο ρόλο στη διασπορά του καρκίνου, αφού υπάρχουν σε ασθενείς πολλά χρόνια μετά την μαστεκτομή χωρίς στοιχεία της νόσου και ρέουν από επίμονους όγκους ασθενών με καρκίνο του μαστού σε αδράνεια



Σχήμα 2.2: Η αργή διασκόρπιση και το μοντέλο του καταρράκτη της μετάστασης (καρκίνος μαστού). Κατά την τοπική εξέλιξη τα επιθετικά κύτταρα επιλέγονται και η διασκόρπιση ξεκινάει. Στους πρωτογενείς όγκους και στις πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταστάσεις τα κύτταρα γίνονται όλο και περισσότερα κακοήθη μέχρι μια τελική μετάσταση από μια μετάσταση να σκοτώσει τον ασθενή. Χρειάζονται 157 ημέρες για διπλασιαστεί η μάζα του όγκου, 30 ημέρες για την πρώτη μετάσταση, 1 ημέρα για τη δευτερογενή μετάσταση και λιγότερο από μια ημέρα για να πεθάνει ο ασθενής.<sup>132</sup>

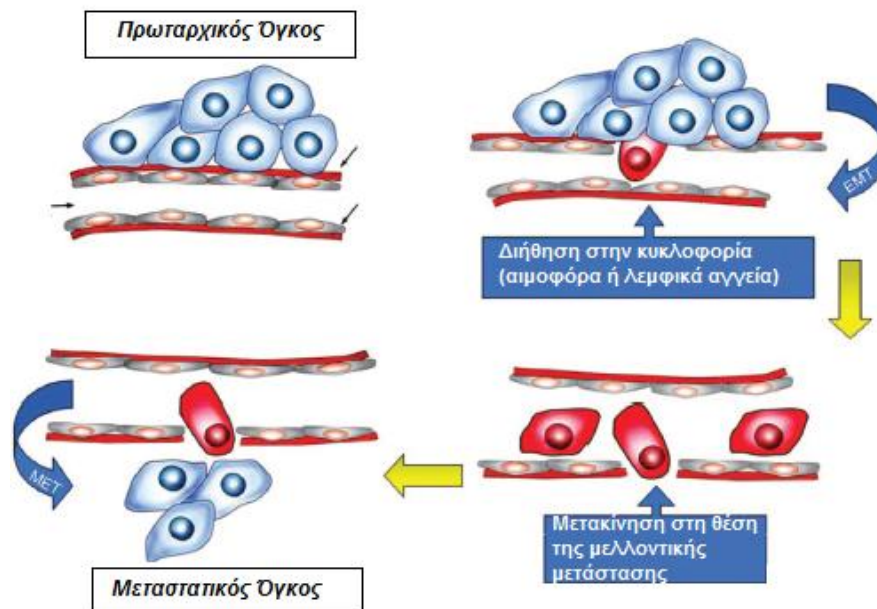
Το επικρατούν μοντέλο για την καρκινική εξέλιξη τοποθετεί το μηχανισμό της καρκινικής εξέλιξης εντός του πρωταρχικού όγκου πριν την μεταστατική διασπορά των πλήρως κακοήθων κυττάρων (σχήμα 2.2).<sup>128</sup> Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, που προτάθηκε πρόσφατα από τον Klein, οι μεταστάση που ξεκινά από πρώιμα DTCs εξελίσσεται παράλληλα με τους πρωτοπαθείς όγκους (σχήμα 2.3).<sup>132</sup> Στοιχεία από την πορεία της νόσου, από τους ρυθμούς ανάπτυξης των όγκων, από μελέτες αυτοψίας, από κλινικές δοκιμές και μοριακές γενετικές αναλύσεις των πρωταρχικών όγκων και των DTCs υποστηρίζουν το μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης, προτρέποντας σε αναθεώρηση της τρέχουσας διαγνωστικής και θεραπευτικής ρουτίνας.<sup>132</sup> Η απελευθέρωση των πρώιμων DTCs από τον λήθαργο πιθανόν να ευθύνεται συχνά για την ετεροχρονισμένη μετάσταση.<sup>133</sup> Εφόσον μόνο λίγα επιλεγμένα καρκινικά κύτταρα οδηγούν την καρκινική εξέλιξη και ευθύνονται για την αντοχή στη θεραπεία, η υψηλής διακριτικότητας γονιδιακή ανάλυση μεμονωμένων μεταστατικών προγονικών κυττάρων, η οποία τώρα είναι δυνατή, ίσως χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση νέων γονιδίων στόχων προς θεραπεία.<sup>128</sup>



Σχήμα 2.3: A) Πρόωρη διασκόρπιση και παράλληλη εξέλιξη: η διασκόρπιση ξεκινάει όταν η διάμετρος του όγκου είναι 1-4 mm. Μεταστάσεις σε διαφορετικά όργανα «καλλιεργούνται» ταυτόχρονα και αναπτύσσονται μέσα σε 6-12 χρόνια. Στον εγκέφαλο οι παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος μπορεί να καθυστερήσουν την ανάπτυξη της μετάστασης. Τα καρκινικά κύτταρα που φεύγουν από τον πρωτογενή όγκο τη στιγμή της διάγνωσης ή οι διάφορες μεταστάσεις είτε δε συμβάλλουν στο θάνατο είτε δε θα μπορέσουν να αναπτυχθούν. B) Στο παράλληλο μοντέλο διάφορα κύματα από DTCs μπορεί να διασκορπιστούν πριν τη διάγνωση και μπορεί να προχωρήσουν παράλληλα σε διαφορετικούς με διαφορετικούς ρυθμούς σε διαφορετικά όργανα. Παράγοντες που εκκρίνονται από τον πρωτογενή όγκο μπορεί να διεγείρουν τον αποικισμό ερμηνεύοντας έτσι τη σχέση μεταξύ του μεγέθους του όγκου και τη δυνατότητα της μεταστατικής ανάπτυξης.<sup>132</sup>



Οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν οδηγήσει το πεδίο της καρκινικής μετάστασης σε ιστορικά σταυροδρόμια.<sup>134</sup> Νέες ιδέες έχουν αναδυθεί όπως η αναστολή της μετάστασης και ο καρκινικός λήθαργος. Οι πρόσφατες έρευνες πάνω στην μετα- μεταγραφική ρύθμιση της μετάστασης από τα microRNAs (miRNAs), στην διαλεύκανση των μηχανισμών που υποβόσκουν πίσω από την επαγωγή της **μετάβασης από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT)** (σχήμα 2.4) και στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων που μοιάζει με αυτόν των βλαστοκυττάρων, έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες στο πεδίο.<sup>128</sup> Η ανάπτυξη πρόσφατων εργαλείων για την απεικόνιση της μετάστασης και η τρέχουσα τεχνολογία παίζουν επίσης πολύ σπουδαίο ρόλο.<sup>134</sup> Επιπροσθέτως, γονίδια που καταστέλλουν την μετάσταση και οδηγούν στον μεταστατικό κυτταρικό λήθαργο, όπως ο **καταστολέας 1 της μετάστασης του καρκίνου του μαστού (Breast cancer Metastasis Suppressor 1, BRMS1)** έχουν μελετηθεί διεξοδικά.<sup>135, 136</sup> Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την EMT σε συμπαγείς όγκους θα προσδώσει νέες βαθύτερες γνώσεις για τους μηχανισμούς της καρκινικής εξέλιξης, την ανίχνευση των μεταστάσεων και την ανάπτυξη αποτελεσματικών και βασισόμενων στους μηχανισμούς παράγοντες για βελτιωμένη θεραπευτική παρέμβαση.<sup>137</sup> Ειδικά τα microRNAs (miRNAs) αναφέρονται σαν κρίσιμοι παίκτες στην μεταστατική διαδικασία που τόσο προωθούν όσο και αναστέλλουν την μετάσταση.<sup>138</sup>



**Σχήμα 2.4:** Η μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα αλλάζει τον κυτταρικό φαινότυπο για να επιτρέψει τη διήθηση στη συστηματική κυκλοφορία. Η μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα λαμβάνει χώρα στο σημείο της απομακρυσμένης μετάστασης.<sup>139</sup>

## 2.3 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση των CTCs, την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό

Τα CTCs είναι εξαιρετικά σπάνια και σαν σπάνια γεγονότα ακολουθούν την κατανομή Poisson.<sup>140</sup> Για την αξιόπιστη ανίχνευση αυτών των κυττάρων είναι αναγκαίες μέθοδοι υψηλής αποτελεσματικότητας και προτυποποιημένα πρωτόκολλα προετοιμασίας.<sup>141</sup> Η κατανομή Poisson εφαρμόζεται όταν τυχαία κατανεμημένα αντικείμενα (κύτταρα) μετρώνται σε ένα συγκεκριμένο διάστημα ή όγκο.<sup>140</sup> Το όριο της ανίχνευσης στην περίπτωση των CTCs δεν εξαρτάται από την πρόσθεση επιπλέον ανιχνευτών ούτε από τη βελτίωση του οργάνου αλλά μόνο από την ποσότητα του αίματος που μπορεί να εξεταστεί για την παρουσία των CTCs. Αυτός ο περιορισμός πρέπει να ληφθεί υπόψη πριν την έναρξη κάθε ανάλυσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση πρώιμης ασθένειας.<sup>141</sup> Ένα μοντέλο που χρησιμοποιεί την κατανομή Poisson για τη συλλογή του αίματος και περιγράφει τη στατιστική των διαφορετικών διαδικαστικών βημάτων που απαιτούνται για την απομόνωση και ανίχνευση των CTCs έχει αναπτυχθεί.<sup>140</sup> Στις περισσότερες περιπτώσεις τα CTCs ανιχνεύονται ειδικά συνδυάζοντας δύο βήματα: την απομόνωση με εμπλουτισμό με την ανίχνευση.

### 2.3.1 Απομόνωση των CTCs και εμπλουτισμός

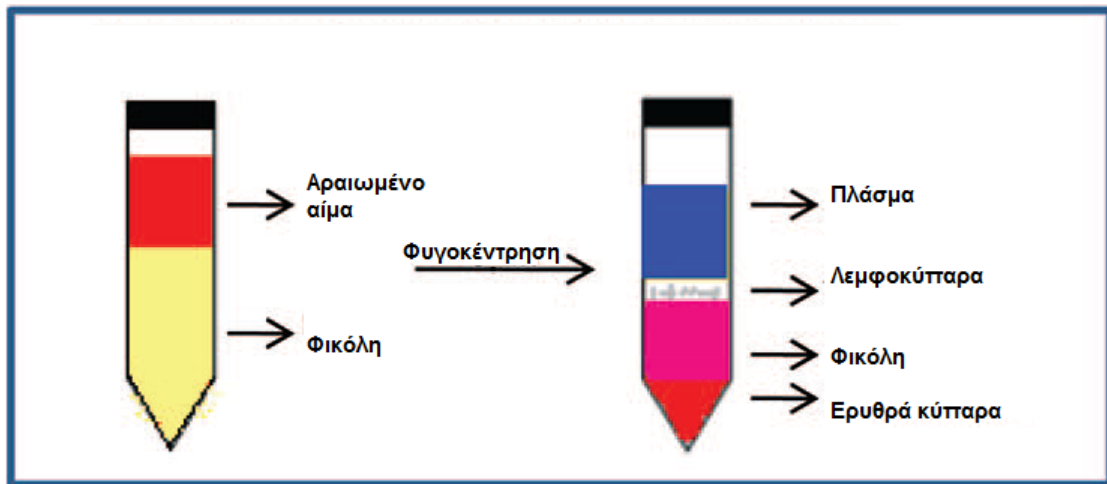
Τα CTCs μπορούν να διαχωριστούν από τα φυσιολογικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα βάσει των φυσιολογικών και βιολογικών τους ιδιοτήτων. Σημαντικές τεχνικές προκλήσεις παρουσιάζονται κατά την αναγνώριση αυτών των σπάνιων κυττάρων στην κυκλοφορία και κατά τον διαχωρισμό τους από τα επικρατούντα αιματολογικά και από τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Η σύλληψη και ο εμπλουτισμός διεξάγονται χρησιμοποιώντας ειδικά μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα και η έκφραση ειδικών πρωτεϊνών.<sup>139</sup>

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιημένες προσεγγίσεις για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των CTCs περιλαμβάνουν τη διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση παρουσία φικόλης και την ανοσομαγνητική απομόνωση. Και οι δύο προσεγγίσεις είναι κοπιαστικές διαδικασίες με μεταβλητή αποτελεσματικότητα.<sup>141</sup> Αυτές οι μέθοδοι εμπλουτισμού έχουν επίσης συνδυαστεί, για παράδειγμα ο εμπλουτισμός με φικόλη που ακολουθείται από θετική ανοσομαγνητική απομόνωση μέσω ενός αντισώματος έναντι ενός πανεπιθηλιακού αντιγόνου, του αντιγόνου της επιφάνειας του **επιθηλιακού κυττάρου που δρα σαν μόριο κυτταρικής προσκόλλησης (Epithelial Cell**

**Adhesion Molecule, EpcAM).** Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει την ετερογενή φύση των CTCs και υποδήλωσαν ότι όλες οι μέθοδοι εμπλουτισμού είναι προκατειλημμένες διότι δεν εκφράζουν όλα τα CTCs τα ίδια αντιγόνα στην κυτταρική επιφάνεια, όπως το EpcAM.<sup>141</sup>

### 2.3.1.1 Διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση

Κατά τη διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση, τα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC), στο κλάσμα των οποίων θεωρείται ότι συμπεριλαμβάνονται και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, συγκεντρώνονται σε ένα μεσοδακτύλιο και διαχωρίζονται έτσι από τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα πολυμορφοπύρηννα κύτταρα (granulocytes cells) (**σχήμα 2.5**). Τα κύτταρα του μεσοδακτυλίου συλλέγονται και χρησιμοποιούνται για περαιτέρω ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με τις τεχνικές που θα αναφερθούν παρακάτω. Η πρότυπη μέθοδος διαβαθμιζόμενης φυγοκέντρησης είναι αυτή της φικόλης (Ficoll, Histopaque), ενώ έχουν αναπτυχθεί και άλλα μέσα διαβαθμιζόμενης φυγοκέντρησης.<sup>142</sup> Αυτές οι προσεγγίσεις έχουν το μειονέκτημα, ότι μπορεί να μην ανακτήσουν όλα τα κακοήθη κύτταρα που είναι παρόντα σε ένα κλινικό δείγμα. Πειράματα εμβολιασμού γνωστού αριθμού καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα φυσιολογικών ατόμων έχουν δείξει, ότι τα κακοήθη κύτταρα καθιζάνουν κατά προτίμηση με τα PBMC, παρότι ένα μικρό ποσοστό μπορεί να ανιχνευτεί στο κλάσμα των πολυμορφοπύρηννων. Όμως, κατά την ανάλυση κλινικών δειγμάτων, καρκινικά κύτταρα ανιχνεύτηκαν στο κλάσμα των πολυμορφοπύρηννων, άλλοτε σε ποσοστό μικρότερο από τα καρκινικά κύτταρα που ανιχνεύτηκαν στα PBMC, άλλοτε όμως σε μεγαλύτερο ποσοστό. Μάλιστα σε λίγα περιστατικά ανιχνεύτηκαν καρκινικά κύτταρα μόνο στο κλάσμα των πολυμορφοπύρηννων.<sup>143</sup> Η ετερογένεια στο μέγεθος και την πυκνότητα των καρκινικών κυττάρων, αλλά και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μπορεί να είναι υπεύθυνα για αυτό το φαινόμενο.<sup>144, 145</sup>



Σχήμα 2.5: Εμπλουτισμός CTCs με τη μέθοδο της διαβαθμισμένης πυκνότητας με χρήση φικόλης

### 2.3.1.2 Ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τον εμπλουτισμό βασίζονται σε ανοσομαγνητικές τεχνικές και οι εμπορικά διαθέσιμες περιλαμβάνουν το σύστημα MACS (Magnetic Affinity Cell Sorting) και τα μαγνητικά σφαιρίδια. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούν αντισώματα συνδεδεμένα σε παραμαγνητικά σφαιρίδια με συγγένεια για ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Αυτός ο τύπος κυττάρων μπορεί κατόπιν να επιλεγεί με τη χρήση ενός ισχυρού μαγνήτη.<sup>146</sup>

Κάποιες μέθοδοι χρησιμοποιούν την αρνητική επιλογή κατά την οποία τα μαγνητικά σφαιρίδια είναι σημασμένα με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του πανλευκοκυτταρικού δείκτη CD45 ώστε να απομακρύνουν τα λευκοκύτταρα. Το μη επιλεγμένο τμήμα περιέχει τα CTCs. Ένα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι το γεγονός, ότι τα CTCs δεν είναι ανοσομαγνητικά σημασμένα επομένως δεν επηρεάζονται από αυτή τη διαδικασία<sup>147</sup> οπότε μπορούν να καλλιεργηθούν με σκοπό τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους.<sup>148</sup>

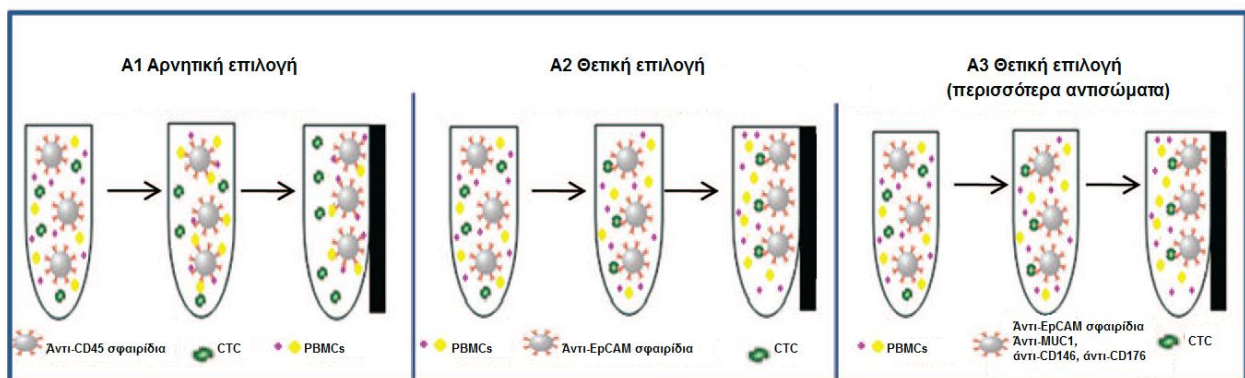
Οι περισσότερες μέθοδοι όμως χρησιμοποιούν την θετική επιλογή κατά την οποία εφαρμόζονται μαγνητικά σφαιρίδια σημασμένα με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ενός επιφανειακού, ειδικού για τα επιθηλιακά κύτταρα αντιγόνου, όπως για παράδειγμα το EpCAM ή έναντι κοινών επιτόπων των κυτταροκερατινών (anti-CK7/8 mAb).<sup>149</sup> Στην τελευταία περίπτωση πρέπει να προηγηθεί αύξηση της διαπερατότητας (permeabilization) και σταθεροποίηση (fixation) των κυττάρων, δεδομένου, ότι οι κυτταροκερατίνες είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Το πλεονέκτημα της θετικής



επιλογής είναι ο υψηλός εμπλουτισμός ( $10^4 - 2 \times 10^5$  φορές), ο οποίος οδηγεί σε αυξημένη ανάκτηση των CTCs και εξασφαλίζει αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης.<sup>147</sup>

Αυτά τα συστήματα βρέθηκε ότι είναι πιο ευαίσθητα από κάποια που βασίζονται στη διαβάθμιση πυκνότητας. Όμως λόγω της έλλειψης αρκετά ειδικών επιθηλιακών αντιγόνων, κάποια CTCs μπορεί να χαθούν κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Επιπροσθέτως, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι πιθανά λόγω της απώλειας των ειδικών επιθηλιακών αντιγόνων από τα CTCs.<sup>139</sup>

Λόγω των παραπάνω, αρκετές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν την αρνητική επιλογή με την θετική επιλογή να ακολουθεί (σχήμα 2.6). Για παράδειγμα οι Mostert et al. πρόσφατα πρότειναν τη συνδυασμένη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του CD-146 και έναντι του EpCAM με στόχο τη βελτίωση της ανίχνευσης των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού<sup>150</sup>, και οι Schindlbeck et al. έδειξαν ότι το ποσοστό ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων αυξήθηκε με τη χρήση του αντι-CD146.<sup>151</sup>



**Σχήμα 2.6:** Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός: A1, αρνητική επιλογή μέσω της απομάκρυνσης των λευκοκυττάρων από το αντίσωμα έναντι του CD-45, A2 θετική επιλογή μέσω ενός αντισώματος έναντι ενός πανεπιθηλιακού αντιγόνου διαφοροποίησης, το EpCAM, A3 Συνδυασμένη χρήση των αντισωμάτων έναντι δεικτών της επιφάνειας των CTCs.<sup>141 147, 150-152</sup>

### 2.3.1.3 Συσκευές μικροροής και διήθησης για την επιλογή και την απαρίθμηση των CTCs

Μια ποικιλία αναλυτικών πλατφόρμων τελευταίας τεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί βασιζόμενες σε μηχανισμούς μικροροής και διήθησης για την απομόνωση των CTCs.<sup>141</sup>

Το σύστημα απομόνωσης μέσω του μεγέθους των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων (**Isolation by Size of Epithelial Tumor cells, ISET**) είναι μια μέθοδος εμπλουτισμού η οποία βασίζεται στην απομόνωση των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους σε σχέση με αυτό των λευκοκυττάρων

του περιφερικού αίματος.<sup>153</sup> Όμως μέχρι σήμερα, δεν έχει επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι όλα τα CTCs είναι μεγαλύτερα από 8 μm.<sup>154</sup>

Μια πλατφόρμα μικροροής που περιγράφηκε πρόσφατα (CTC-Chip) μπορεί να απομονώσει αποτελεσματικά τα CTCs από το περιφερικό αίμα ασθενών με κοινούς καρκίνους του επιθήλιου.<sup>155</sup> Σε αυτήν τη συσκευή το αίμα ρέει μέσα από ένα σύνολο παραταγμένων μικρο-θέσεων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του EpCAM. Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο οι Nagrath et al. μπόρεσαν να απομονώσουν CTCs από το 99 % των δειγμάτων αίματος από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύματος, του προστάτη, του μαστού, του παγκρέατος ή του παχέος εντέρου ενώ αυτό δε συνέβη σε κανένα δείγμα από υγιή άτομα. Αυτή η πολύ ευαίσθητη μέθοδος απομόνωσε ακόμα και μικρούς αριθμούς CTCs, κάτι που την καθιστά ιδανική για την παρακολούθηση της θεραπείας σε πραγματικό χρόνο.<sup>155</sup>

Πρόσφατα οι Stott et al. ανέπτυξαν μια συσκευή μικροροής υψηλής εμβέλειας της οποίας ο σχεδιασμός εφαρμόζει παθητική ανάμιξη των αιμοσφαιρίων μέσω της παραγωγής μικροδινών ώστε να αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των CTCs στόχων και της επικαλυμμένης με αντισώματα επιφάνειας.<sup>156</sup> Η αποτελεσματική κυτταρική σύλληψη επικυρώθηκε με τον εμβολιασμό στο αίμα ελέγχου συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων, και η κλινική χρησιμότητα αποδείχθηκε με την εφαρμογή σε δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η κλινική χρησιμότητα αυτών των συσκευών είναι προς το παρόν υπό διερεύνηση.<sup>141</sup>

### 2.3.2 Συστήματα ανίχνευσης των CTCs

Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs περιλαμβάνουν: α) κυτταρομετρικές τεχνικές όπως είναι η **ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry, ICC)**, το εγκεκριμένο από το FDA CellSearch® σύστημα (Veridex), το σύστημα Ariol και η κυτταρομετρία σάρωσης με ακτινοβολία laser, β) μοριακές μεθόδους που βασίζονται στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων των CTCs, όπως οι υψηλής ευαισθησίας RT-qPCR μέθοδοι, οι πολλαπλές μέθοδοι αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT-PCR) ή ένας συνδυασμός απεικονιστικών και μοριακών μεθόδων και γ) μεθόδους που βασίζονται στις πρωτεΐνες όπως η μέθοδος EpiSpot, οι οποία ανιχνεύει ειδικές καρκινικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα CTCs. Η ανίχνευση με αντισώματα έναντι των κυτταροκινών αποτελεί προς το παρόν την πιο επικυρωμένη και προτυποποιημένη προσέγγιση.<sup>141</sup>

Αυτές οι διαφορετικές προσεγγίσεις διαφέρουν κυρίως στον τρόπο με τον οποίο ανιχνεύουν τα CTCs. Οι κυτταρομετρικές στηρίζονται στον χαρακτηρισμό των απομονωμένων κυττάρων ως CTCs μέσω αντισωμάτων επισημασμένων με φθορισμό έναντι κυρίως επιθηλιακών αντιγόνων όπως η CK-19. Ένας περιορισμένος αριθμός άλλων πρωτεϊνικών δεικτών έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον λόγο. Αντίθετα, οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται κυρίως στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα CTCs. Με τη χρήση αυτής της προσέγγισης μπορεί να φανεί η παρουσία ενός μικρού αριθμού CTCs μέσω της υψηλής ευαισθησίας ανίχνευσης επιθηλιακών δεικτών όπως είναι η CK-19, παρουσία εκατομμυρίων μονοπύρηνων κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Οι μοριακές μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού των CTCs που υπάρχουν σε ένα δείγμα: ωστόσο μια πληθώρα μοριακών δεικτών (π.χ γονιδιακή έκφραση, DNA μεταλλάξεις) μπορούν να ανιχνευτούν στα CTCs, κάνοντας δυνατό τον μοριακό χαρακτηρισμό. Αυτές οι προσεγγίσεις συμπληρώνουν η μια την άλλη διότι δίνουν διαφορετικές πληροφορίες για τα CTCs.<sup>141</sup>

**Πίνακας 2.1: Σύνοψη των αναλυτικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs.<sup>141</sup>**

Σύστημα μεθόδου	Εμπλουτισμός	Ανίχνευση	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<b>Κυτταρομετρικές μέθοδοι</b>				
Η δοκιμασία των CTCs του Cell Search	Θετική επιλογή: Αντισώματα έναντι του ΕpCAM συνδεδεμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια	Ειδικοί δείκτες για τα CTCs: CK-19	Εγκεκριμένο από το FDA	Εξαρτάται από την θετικότητα στο ΕpCAM
		Λευκοκύτταρα: CD-45	Οπτική επιβεβαίωση των CTCs	Περιορισμένος αριθμός δεικτών
		Βιωσιμότητα κυτάρου DAPI	Κλινική συσχέτιση στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού	
CTC Chip	Θετική επιλογή: Αντισώματα έναντι του ΕpCAM επικαλύπτουν ένα σύνολο μικρο-θέσεων	Θετικοί δείκτες: CKs	Υψηλό ποσοστό ανίχνευσης	Υποκειμενική ανάλυση των CTCs
		Αρνητικός δείκτης: CD-45	Οπτική επιβεβαίωση των CTCs	Περαιτέρω διερεύνηση για την ειδικότητα της μεθόδου
		Πυρήνας: DAPI		Εξαρτώμενο από τη θετικότητα στο ΕpCAM
Η μέθοδος Epispot	Αρνητική επιλογή: CD45 <sup>+</sup> cells	Ανοσολογική ανίχνευση των εκρινόμενων πρωτεϊνών: CK-19, βλενίνη 1, καθεψίνη-D	Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	Η κλινική συσχέτιση δεν έχει επιβεβαιωθεί
			Υψηλή ευαισθησία	
Το σύστημα του Ariol	Αντισώματα έναντι των CK και έναντι του ΕpCAM	Θετικοί δείκτες: CKs	Υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης CTCs από το Cell Search	Εξαρτώμενο από τη θετικότητα στο ΕpCAM και στη CK-19
		Αρνητικός: CD-45		

Πυρήνας: DAPI				
Συσκευές διήθησης των CTCs	Μέγεθος (φίλτρα)	Θετικοί δείκτες: CKs	Πλατφόρμα απομόνωσης και ανάλυσης	Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να είναι ετερογενή σε μέγεθος
			Πολλαπλή απεικόνιση και γενετική ανάλυση	
Κυτταρομετρητής σάρωσης με Laser	Θετική επιλογή: Αντισώματα έναντι του EpCAM συνδεδεμένα σε στήλες	Αντίσωμα έναντι επιθηλιακού δείκτη επισημασμένο με φθορισμό	Αυτόματη μικροσκοπική διαδικασία για σάρωση περισσότερων των $5 \cdot 10^4$ κυττάρων σε κατάλληλο χρόνο	Εξαρτώμενο από τη θετικότητα στο EpCAM
			Εμπλουτισμός πάνω από 10.000 φορές	
			Υπολογίζει πολύ μικρούς αριθμούς καρκινικών κυττάρων	
Τεχνολογία Dylight	Συσκευή διήθησης	Πολλαπλά αντισώματα: κυτοκερατίνη, HER2, ALDH1, CD44 και CD24	Απεικονιστική ανάλυση πολλών δεικτών	Εφαρμογή σε κυτταρικές σειρές
Μοριακές μέθοδοι				
RT-PCR	Διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση με φικόλη	CK-19, HER2, h-MAM, CEA, maspin, GABA A, B726P	Υψηλή ευαισθησία	Όχι μορφολογική ανάλυση
			Προγνωστική σημασία σε πρώιμο καρκίνο του μαστού	
			Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	
RT-qPCR	Διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση με φικόλη	CK-19, BST1, PTPRC	Υψηλή ευαισθησία	Όχι μορφολογική ανάλυση
			Ποσοτικοποίηση	
			Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	

Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού

			Ανεξάρτητη από το ErCAM	
RT-qPCR	OncoQuick εμπλουτισμός και προενίσχυση	C CNE, DKFZp762E1312, EMP2, MAL2, PPIC και SLC6A8, hMAM και ErCAM, ακτίνη	Υψηλή ευαισθησία	Όχι μορφολογική ανάλυση
			Ποσοτικοποίηση	
			Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	
Πολλαπλή RT-PCR	Αντισώματα έναντι του ErCAM και της MUC 1 συνδεδεμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια	Πολλαπλή PCR για: mucin 1, HER2, ErCAM, ακτίνη	Υψηλή ευαισθησία	Όχι μορφολογική ανάλυση
			Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	Μέθοδος εξαρτώμενη από τη θετικότητα στο ErCAM και στο MUC1
			Εξοικονόμηση δείγματος, χρόνου μείωση τ κόστους	Όχι ποσοτικοποίηση
Υγρή μικροσυστοιχία σφαιριδίων	Διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση φικόλης και θετική επιλογή με αντισώματα συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια έναντι του ErCAM	Πολλαπλή PCR για CK-19, HER2, MAGE-A3, hMAM, PBGD, TWIST-1	Εξοικονόμηση δείγματος και χρόνου μείωση του κόστους	Όχι μορφολογική ανάλυση
			Ταυτόχρονη ανίχνευση 6 δεικτών στα CTCs	Μέθοδος- εξαρτώμενη από τη θετικότητα στο ErCAM
			Ανιχνεύει μόνο βιώσιμα κύτταρα	PCR-τελικού σημείου

### 2.3.2.1 Κυτταρομετρικές μέθοδοι

Η συμβατική ανοσοκυτταροχημική μέθοδος (ICC) χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα έναντι διαφορετικών επιθηλιακών αντιγόνων για διαφορετικούς όγκους, για παράδειγμα, η κυτταροκερατίνη (cytokeratin, CK) και μαστοσφαιρίνη (mammaglobin) για τον καρκίνο του μαστού, και καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) και CK-20 για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.<sup>157-159</sup> Τα κύτταρα που εκφράζουν επιθηλιακούς δείκτες μπορούν να ανιχνευτούν εύκολα, όμως λόγω της παρουσίας μη κακοήθων κυττάρων που φέρουν τον ίδιο δείκτη μπορούν να υπάρξουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.<sup>160</sup> Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν χάσει την έκφραση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων κατά την διάρκεια της **επιθήλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT)** δεν αιχμαλωτίζονται.<sup>160</sup> Η έλλειψη δεικτών υψηλής ειδικότητας αποτρέπει από την ευαισθησία αυτήν την μέθοδο και είναι κάτι που μπορεί να βελτιωθεί με την χρήση πολλαπλών δεικτών.

Το σύστημα Cell Search® για την απαρίθμηση των CTCs στο περιφερικό αίμα είναι η μόνη μέθοδος που έχει εγκριθεί από το FDA για κλινική χρήση. Σε αυτή τη μέθοδο, 7.5 mL αίματος φυγοκεντρώνται με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των κυττάρων από το πλάσμα και τη στιβάδα του διαλύματος πλήρωσης. Στη συνέχεια, μετά την απομάκρυνση της στιβάδας του πλάσματος και του διαλύματος πλήρωσης, τα CTCs αιχμαλωτίζονται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επιστρωμένων με αντισώματα έναντι του EpCAM, υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου. Στο επόμενο στάδιο διαφοροποιούνται φαινοτυπικά από τα λευκοκύτταρα επισυνάπτοντας το προϊόν με ομάδες μονοκλωνικών αντισωμάτων, έναντι των κυτταροκινών – κυρίως έναντι της CK-19- για την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων και έναντι των CD45 για την αναγνώριση των λευκών αιμοσφαιρίων και με την χρωστική 4',6' - diamidino-2-phenylindole (DAPI) για την ανίχνευση των ακέραιων κυττάρων. Το επισημασμένο δείγμα φορτώνεται σε μια κασσέτα και αναλύεται (CellTracks® Analyzer II: Immumicon, Huntington Valley, PA) από ένα αυτόματο σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιεί φθορισμό το οποίο αναγνωρίζει τα CTCs σαν εμπύρνα κύτταρα που εκφράζουν την CK αλλά όχι τα CD45.<sup>161</sup> Το σύστημα αρχικά επικυρώθηκε από τους Allard et al.<sup>162</sup> μέσα από την ανάλυση δειγμάτων προερχόμενων από περισσότερους από 900 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο.<sup>162</sup> <sup>163</sup>Η τεχνική φάνηκε να είναι ακριβής και υψηλής αναπαραγωγιμότητας, με υψηλή συσχέτιση μεταξύ των τοπικών και των εργαστηρίων αναφοράς.<sup>162, 163</sup> Όμως σύμφωνα με τους Sieuwerts et al. η μέθοδος απομόνωσης του CellSearch με τη χρήση των αντισωμάτων έναντι του EpCAM για την αρχική Σοφία Φάρκωνα 43

απομόνωση των κυττάρων, δεν αναγνωρίζει, συγκεκριμένα μαστικά καρκινικά κύτταρα που μοιάζουν με τα φυσιολογικά με γενικώς επιθετικά χαρακτηριστικά.<sup>152</sup> Συμπέραναν λοιπόν πως απαιτούνται νέες δοκιμές οι οποίες θα περιλαμβάνουν αντισώματα τα οποία θα αναγνωρίζουν καρκινικά κύτταρα του μαστού όμοια με τα φυσιολογικά αλλά όχι κύτταρα αιμοποιητικής καταγωγής. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης έρευνας των Godman et al, και παρά τις μελέτες επικύρωσης ευρείας κλίμακας και την έγκριση από το FDA, το βέλτιστο όριο λήψης απόφασης κατά την απαρίθμηση και την ανίχνευση των CTCs είναι ακόμα υπό μελέτη.<sup>164</sup>

### **2.3.2.2 Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs**

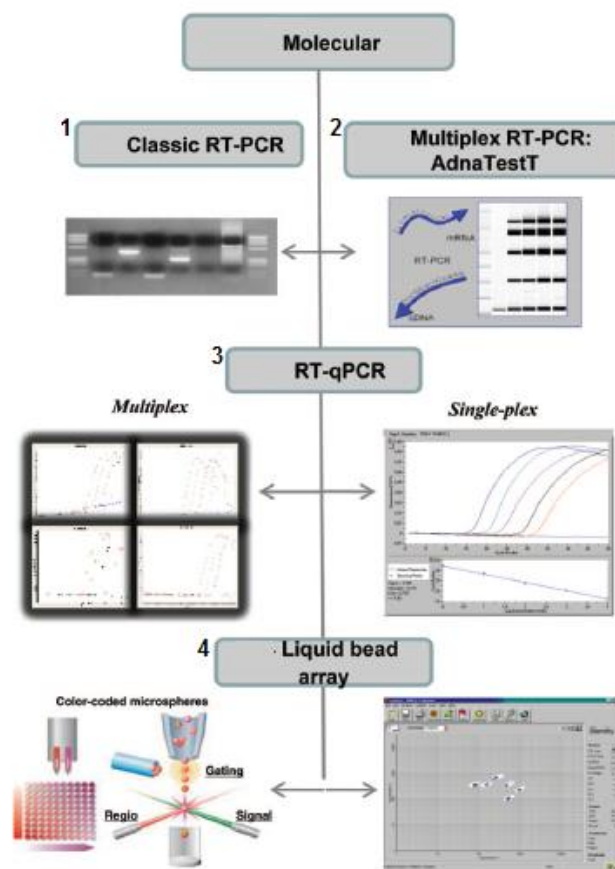
Οι μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και απαρίθμηση των CTCs πλεονεκτούν ως προς την απώτατη αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα της PCR.<sup>141</sup> Αυτές οι μέθοδοι είναι υψηλής εμβέλειας και εύκολο να διεξαχθούν διότι βασίζονται στην απομόνωση του ολικού RNA από βιώσιμα CTCs, και στην ενίσχυση μέσω RT-PCR ειδικών καρκινικών και επιθηλιακών στόχων. Σημαντικό είναι ότι οι RT-PCR μέθοδοι μπορούν να σχεδιαστούν *in silico* (μέσω της χρήσης ειδικών προγραμμάτων software), αυτοματοποιούνται εύκολα και υπόκεινται σε συστήματα εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.<sup>165</sup>

Ο προσδιορισμός καρκινο-σχετιζόμενων μετάγραφων με RT-PCR περιλαμβάνει πολλά βήματα, το πρώτο εκ των οποίων είναι η απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων (PBMC) από περιφερικό αίμα ή μυελό των οστών. Η συνήθης προσέγγιση, όπως έχουμε ήδη αναφέρει προηγουμένως, είναι η διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση, αλλά πολλοί είναι οι ερευνητές που χρησιμοποιούν και τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό για να εμπλουτίσουν το δείγμα σε επιθηλιακά κύτταρα. Η χρήση της real-time RT-PCR παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του καρκινικού φορτίου στα κλινικά δείγματα, ενώ ένα επιπλέον πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα επιλογής ενός ορίου λήψης αποφάσεων (cut-off) για τη διάκριση μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων ελέγχου και των παθολογικών δειγμάτων, βελτιώνοντας την ειδικότητα της κάθε μεθόδου που αναπτύσσεται.<sup>166</sup>

Η ανίχνευση του mRNA γονιδίων που υπέρ-εκφράζονται ή είναι μεταλλαγμένα χρησιμοποιώντας RT-PCR είναι μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την ανίχνευση των CTCs. Καθώς το RNA αποικοδομείται γρήγορα στο αίμα μετά από τον



κυτταρικό θάνατο, η ανίχνευση του RNA βασίζεται στην παρουσία ενός ολόκληρου καρκινικού κυττάρου και όχι κυτταρικών θραυσμάτων ή ελεύθερου RNA. Στην RT-PCR μετά τη σύνθεση του cDNA το γονίδιο-στόχος ενισχύεται χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές που είναι ειδικοί για το γονίδιο που θα μελετηθεί κάθε φορά. Ωστόσο η RT-PCR είναι πιθανόν να οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην επιμόλυνση του δείγματος, στην έκφραση των γονιδίων αυτών σε φυσιολογικά κύτταρα και την παρουσία ψευδογονιδίων (γονίδια χωρίς κωδικοποίηση πρωτεΐνης).



Σχήμα 2.7: Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων των CTCs: 1) κλασική RT-PCR, 2) πολλαπλή RT-PCR, Adna Test για τον καρκίνο του μαστού 3) Πολλαπλή qRT-PCR 4) Υγρή μικροσυστοιχία σφαιριδίων.<sup>141</sup>

Με δεδομένο το μεγάλο υπόβαθρο των κυκλοφορούντων κυττάρων, είναι πιθανόν απαραίτητη η ανίχνευση ενός καρκινικού κυττάρου παρουσία περισσότερων από  $10^6$  λευκοκυττάρων. Μολονότι η RT-PCR είναι ενδεχομένως αρκετά ευαίσθητη, αφού γενικά οι μεθοδολογίες που βασίζονται στην ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, και ειδική αναλυτικά ώστε να πετύχει αυτόν το στόχο, απαιτείται

η χρήση ειδικών δεικτών mRNA. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στην ειδικότητα, αυτή εξαρτάται κυρίων από την επιλογή μοριακών δεικτών, η έκφραση των οποίων θα πρέπει να είναι χαρακτηριστική για τα καρκινικά κύτταρα και εντελώς απύση στα φυσιολογικά PBMCs. Το μόνο μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι, όπως προαναφέρθηκε, ότι δεν επιτρέπει μια ακριβή εκτίμηση του αριθμού των CTCs που είναι παρόντα σε ένα δείγμα, διότι ένας διαφορετικός αριθμός μεταγράφων μπορεί να εκφραστεί από διαφορετικά κύτταρα, και μόνο ο αριθμός των μεταγράφων στόχων που είναι παρόντα μπορεί να υπολογιστεί. Ένα βασικό πλεονέκτημα των μοριακών μεθόδων είναι η ευελιξία τους, ιδιαίτερα των πολλαπλών μεθόδων, που μειώνουν την απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, το χρόνο και το αναλυτικό κόστος. Επιπροσθέτως, η ποσοτική RT-PCR επιτρέπει τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης ενός δεδομένου δείκτη, τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.<sup>141</sup>

Η κερατίνη 19 υπήρξε από τους πιο δημοφιλείς μοριακούς δείκτες. Περίπου 22 χρόνια πριν οι Slade et al. ανέπτυξαν μια RT-PCR μεθοδολογία για την ανίχνευση της μικρομετάστασης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού βάσει της εκτίμησης του αριθμού των μεταγράφων της κερατίνης 19 (*KRT19*, που είναι επίσης γνωστή ως *CK-19*) σε δείγματα αίματος και μυελού των οστών.<sup>167</sup> Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας ανέπτυξε μια RT-PCR μεθοδολογία για τον προσδιορισμό του mRNA της *CK-19*<sup>168, 169</sup> και εξέτασαν τόσο την αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα όσο και την κλινική δυνατότητα για την μοριακή ανίχνευση των κρυφών καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού.<sup>170-173</sup>

Σήμερα πολλοί στόχοι πέρα από την *CK-19* παρουσιάζουν ενδιαφέρον να εξεταστούν στα CTCs.<sup>141</sup> Μολαταύτα, το γεγονός ότι τα CTCs είναι πολύ σπάνια και ότι το διαθέσιμο δείγμα είναι πολύ περιορισμένο παρουσιάζει φοβερές αναλυτικές και τεχνολογικές προκλήσεις.<sup>141</sup> Ο πιο σημαντικός περιορισμός των διαθέσιμων μεθοδολογιών για την ανάλυση των CTCs είναι, όπως θα δούμε παρακάτω, ο μικρός αριθμός γονιδίων στόχων που μπορούν να αναλυθούν.<sup>141</sup>

Η RT-PCR ανάλυση πολλών δεικτών για την ανάλυση των CTCs μπορεί να ξεπεράσει αυτά τα προβλήματα. Για παράδειγμα, πρόσφατα στο εργαστήριο μας αναπτύχθηκε μια υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας τεχνολογία υγρών μικροσυστοιχιών σφαιριδίων η οποία βασιζόμενη στην πολλαπλή PCR ανιχνεύει την έκφραση έξι καθιερωμένων γονιδίων στόχων στα CTCs.<sup>174</sup> Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, που εξετάστηκε σε κλινικά δείγματα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού

**(Metastatic Breast Cancer, BMC)** τα γονίδια ενισχύονται και ανιχνεύονται στην ίδια αντίδραση, σε μια πολύ περιορισμένη ποσότητα δείγματος από CTCs, εξοικονομώντας έτσι πολύτιμο δείγμα και μειώνοντας το κόστος και το χρόνο της ανάλυσης. Αυτή η προσέγγιση συνθέτει μια βάση για μια πολλαπλή προσέγγιση της μελέτης περισσότερων των 100 γονιδίων στα CTCs.<sup>141</sup>

Η απομόνωση, ανίχνευση και απαρίθμηση των CTCs έχουν αξιοσημείωτη δυνατότητα να επηρεάσουν τον κλινικό χειρισμό των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Εντούτοις, υπάρχει ουσιαστική μεταβλητότητα στην αναλογία των θετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες τεχνικές ανίχνευσης. Διαφορετικές μέθοδοι οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα όπως φαίνεται από τη συγκριτική ανάλυση δειγμάτων από τους ίδιους ασθενείς με διαφορετικές τεχνολογίες. Έτσι τα κλινικά αποτελέσματα εξαρτώνται κατά πολύ από την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των CTCs. Παρά το γεγονός ότι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους είναι υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής εκτεταμένες μελέτες ειδικά σχεδιασμένες ώστε να συγκρίνουν την αποτελεσματικότητά τους όταν χρησιμοποιούνται τα ίδια κλινικά δείγματα. Αυτό είναι ένα σημαντικό θέμα που αφορά την κλινική τους χρήση, αφού ιδιαίτερα στην πρώιμη νόσο, οι διαφορές στην αναλυτική ευαισθησία μεταξύ αυτών των μεθόδων μπορούν να παίξουν έναν πολύ κρίσιμο ρόλο. Η έλλειψη προτυποποίησης της τεχνολογίας αποτρέπει την υλοποίηση της εφαρμογής της ανάλυσης των CTCs στην καθημερινή κλινική πράξη.<sup>141</sup> Πολλές πρόσφατες μελέτες στρέφονται σε αυτό, συγκρίνοντας διαφορετικές μεθοδολογίες.<sup>141</sup>

## **2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στα CTCs**

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την κατανόηση μας όσον αφορά τη βιολογία της μετάστασης, για να βελτιώσει τη διαχείριση των ασθενών και για να βοηθήσει στην αναγνώριση νέων δεικτών για βιολογικές θεραπείες που στοχεύουν στην πρόληψη της μεταστατικής υποτροπής. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs και συγκεκριμένα στην αναγνώριση δεικτών που εκφράζονται από τα CTCs. Μια άλλη ενδεχομένως σημαντική χρήση των CTCs για την ανάλυση βιοδεικτών είναι η ανίχνευση ογκογόνων μεταλλάξεων που μπορεί να προβλέψουν ανταπόκριση σε στοχευμένα μέσα, οπότε αρκετές μελέτες στρέφονται πλέον και προς τα εκεί.

Η χρήση αναστολέων κινάσης τυροσίνης για τη στόχευση του *EGFR* σε ασθενείς με **Μη Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (Non Small Lung Cancer, NSLC)** είναι αποτελεσματική αλλά περιορίζεται από την ανάκουψη μεταλλάξεων που προσδίδουν αντίσταση στη συγκεκριμένη θεραπεία. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs μπορεί να παρέχει μια στρατηγική για την συνεχή, μη επεμβατική παρακολούθηση των καρκινικών γονοτύπων κατά την διάρκεια της αγωγής. Οι Maheswaran et al αφού εξέτασαν την καταλληλότητα της αλληλοειδικής SARMS μεθόδου<sup>175</sup> για την ανίχνευση *EGFR* μεταλλάξεων σε σπάνιους πληθυσμούς κυττάρων, και αφού τεκμηρίωσαν την αξιοπιστία της, την εφήρμοσαν για την ανάλυση των CTCs που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ασθενών με NSLC.<sup>176</sup> Αρχικά συνέκριναν τις *EGFR* μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στα CTCs με τη SARMS, με εκείνες από το ταυτόχρονα απομονωμένο από το πλάσμα ελεύθερο DNA και με εκείνες από το αντίστοιχο ,προερχόμενο από τη βιοψία, καρκινικό δείγμα. Ανίχνευσαν τις αναμενόμενες *EGFR* ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα CTCs στο 92% των ασθενών και στο αντίστοιχο DNA που προερχόταν από το πλάσμα στο 33% των ασθενών. Επιπροσθέτως ανίχνευσαν την T790M μετάλλαξη, που προσδίδει ανοχή στη φαρμακευτική θεραπεία, σε CTCs ασθενών με *EGFR* μεταλλάξεις στους οποίους είχαν χορηγηθεί αναστολείς κινάσης τυροσίνης. Όταν η μετάλλαξη T790M ήταν ανιχνεύσιμη σε δείγματα προερχόμενα από την βιοψία του όγκου, η παρουσία της σχετίστηκε με μειωμένη ελεύθερη από την προόδο της νόσου επιβίωση. Η συνεχής ανάλυση των καρκινικών κυττάρων έδειξε ότι μια μείωση του αριθμού των «αιχμαλωτισμένων» κυττάρων σχετίστηκε με την ανταπόκριση του όγκου στη ραδιογραφία, ενώ μια αύξηση του αριθμού των κυττάρων σχετίστηκε με την εξέλιξη του όγκου, και συνδυάστηκε σε κάποιες περιπτώσεις με την ανάκουψη πρόσθετων μεταλλάξεων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μοριακή ανάλυση των CTCs από το αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα προσφέρει την δυνατότητα της παρακολούθησης των αλλαγών στους γονότυπους των επιθηλιακών όγκων κατά την διάρκεια της συνεδρίας της θεραπείας.

Κωδικές μεταλλάξεις στο γονίδιο των υποδοχέων ανδρογόνων, *AR*, έχουν αναγνωρισθεί σε δείγματα ιστού από ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη και αντιπροσωπεύουν ένα πιθανό μηχανισμό που υποβόσκει την ανάπτυξη του **ανθεκτικού στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη (Castration Resistant Prostate Cancer, CRPC)**. Ωστόσο, υπάρχει μια ανεπάρκεια ιστών προερχόμενων από τους όγκους που είναι διαθέσιμοι για μοριακές μελέτες των ασθενών με CRPC οπότε τα CTCs στο αίμα τους αντιπροσωπεύουν μια πιθανή διέξοδο για την εξέταση της

συγκεκριμένης νόσου. Οι Jiang et al χρησιμοποίησαν το kit απομόνωσης και απαρίθμησης των CTCs του Cell Search ενώ για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων το kit της Qiagen (Qiagen's All Prep DNA/RNA Micro kit). Το γονίδιο *AR* ενισχύθηκε μέσω PCR και η κατάσταση των μεταλλάξεων και η σχετική αφθονία αναλύθηκαν εφαρμόζοντας την τεχνολογία της αποδιατακτικής HPLC ακολοθούμενη από DNA sequencing. Μεταλλάξεις στο *AR* ανιχνεύτηκαν στο 57% των ασθενών με CRPC. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν 19 παρανοηματικές μεταλλάξεις, 2 σιωπηλές μεταλλάξεις, 5 απαλοιφές και μια ένθεση. Πολλές από τις *AR* αναγνωρίστηκαν/βρέθηκαν σε δείγματα προερχόμενα από τη βιοψία και σχετίστηκαν με την αντίσταση στις θεραπείες που στοχεύουν τα ανδρογόνα.<sup>177</sup>

Οι Punpoose et al. εξέτασαν την αιχμαλώτιση των CTCs με διαφορετικές πλατφόρμες τεχνολογίας περιλαμβάνοντας το CellSearch και δύο πλατφόρμες biochip, και χρησιμοποίησαν τα απομονωμένα CTCs για να αναπτύξουν και να βελτιστοποιήσουν μεθόδους για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs. Απέφεραν ότι οι πλατφόρμες τεχνολογίας που δοκιμάστηκαν είχαν παρόμοια απόδοση στην απομόνωση των CTCs, και βρήκαν ότι η απόδοση της απομόνωσης εξαρτάται από το επίπεδο της έκφρασης του ErCAM. Απέδειξαν ότι τα απομονωμένα CTCs είναι επιδεκτικά ανάλυσης βιοδεικτών όπως η κατάσταση του HER2, η RT-qPCR για δείκτες καρκίνου του μαστού, η ανίχνευση μεταλλάξεων στο *KRAS* και η χρώση του EGFR μέσω ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence, IF). Μια άλλη ενδεχομένως σημαντική χρήση των CTCs για την ανάλυση βιοδεικτών είναι η ανίχνευση ογκογόνων μεταλλάξεων που μπορεί να προβλέψουν ανταπόκριση σε στοχευμένα μέσα. Οι μέθοδοι γονοτύπωσης, όπως η αλληλοειδική PCR, συνήθως έχουν μια ευαισθησία έως περίπου 1% μεταλλαγμένο DNA παρουσία φυσιολογικού DNA, οπότε τα φυσιολογικά αντίγραφα του γονιδίου ενδιαφέροντος από τα συν- απομονωμένα με τα CTCs WBCs θα μπορούσαν να παρεμποδίζουν την ανίχνευση των ειδικών μεταλλάξεων στα CTCs. Οι Punpoose et al. ανέπτυξαν μια μέθοδο ανίχνευσης μεταλλάξεων που θα μπορούσε να ανεχτεί την επιμόλυνση από το φυσιολογικό DNA ξεκινώντας με την ειδική ανίχνευση ενός μόνο γονιδίου στο συνολικό CTC lysate, ακολουθούμενη από γονοτυπικές μεθόδους ανάλυσης με ανιχνευτή Taqman χρησιμοποιώντας διατάξεις «παραταγμένων» PCR (digital PCR), ένα κρίσιμο βήμα για την αύξηση της ειδικής συγκέντρωσης του μεταλλαγμένου DNA σε σχέση με το WT DNA. Η εκτέλεση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε εμβολιάζοντας στο αίμα τα μεταλλαγμένα στο *KRAS* κύτταρα H2122, σε επίπεδα που κυμάνθηκαν από 10 έως περισσότερα από 10.000 κύτταρα ανά

7.5 mL αίματος. Η μετάλλαξη G12C του *KRAS* ήταν ανιχνεύσιμη στο DNA όταν αυτό προερχόταν από 10 κύτταρα, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των θετικών πηγαδιών με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων.<sup>178</sup>

Η ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με μελάνωμα μέσω ανάλυσης με ποσοτική RT-PCR (RT-qPCR) σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Ωστόσο η εκτίμηση των CTCs από το αίμα είναι δύσκολη λόγω έλειψης ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι των αντιγόνων της κυτταρικής επιφάνειας για την αιχμαλώτιση των μελανοκυττάρων. Επιπλέον η ειδικότητα των RT-qPCR μεθόδων σε σχέση/όσον αφορά τον εξεταζόμενο τύπο κυττάρου είναι αμφιλεγόμενη, κυρίως επειδή δεν είναι ξεκάθαρο ότι όλοι οι σχετικοί με τα μελανοκύτταρα βιοδείκτες όντως προέρχονται από τα CTCs στο αίμα των ασθενών με μελάνωμα. Για το λόγο αυτό οι Kitago et al. προσέγγισαν το ζήτημα συνδυάζοντας την ανοσομαγνητική απομόνωση μέσω σφαιριδίων με μοριακές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από 57 ασθενείς με μελάνωμα και από 5 υγιείς δότες, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) για το **μεγάλο μοριακού βάρους αντιγόνο που σχετίζεται με το Μελάνωμα (High Molecular Weight- Melanoma Associated Antigen, HMW-MAA)** συνδεδεμένα με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια για την απομόνωση των CTCs, και ακολούθως απομονώθηκε από αυτά mRNA και/ ή DNA. Στη συνέχεια διεξήχθη δοκιμασία για να ελεγχθεί η έκφραση μιας ομάδας γονιδίων σχετιζόμενων με το μελάνωμα (*MLANA*, *MAGEA3*, and *MITF*) και η παρουσία του *BRAFmt*, ενός εναλλακτικού μετάγραφου του *BRAF* γονιδίου που κωδικεύει τη V600E μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, η οποία επιβεβαίωσε τα CTCs που απομονώθηκαν με τα σφαιρίδια ως μελανοκύτταρα. Για την ανάλυση του *BRAFmt* χρησιμοποιήθηκε μια PCR που περιλάμβανε συσσωματώματα νουκλεϊκών πεπτιδικών οξέων (rna- clamping PCR). Ο εμβολιασμός των PBCs με μελανοκύτταρα έδειξε ότι η μέθοδος ανίχνευσης που βασίζεται στα σφαιρίδια μπορεί να ανιχνεύσει περίπου ένα μελανοκύτταρο ανά  $10^6$  PBCs. Η RT-qPCR ανίχνευσε την έκφραση των *MLANA*, *MAGEA* και *MITF* στο 44%, 67% και 44% των ασθενών, αντιστοίχως, ενώ το *BRAFmt* ανιχνεύτηκε στο 81% των εξετασθέντων ασθενών με μελάνωμα σταδίου IV.<sup>179</sup>

Μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *Von-Hippel Lindau (VHL)* έχουν ανιχνευτεί σε περισσότερα από το 60% των σποραδικών **clear Cell Renal Carcinomas (RCCs)**. Ενώ για τους ασθενείς με RCCs πιστευόταν ότι θεραπεύονται με ριζική νεφρεκτομή κάποιες φορές αναπτύσσουν απομακρυσμένη μετάσταση 5-10 χρόνια μετά το χειρουργείο κάτι που υποδεικνύει την αιματογενή κυκλοφορία των καρκινικών Σοφία Φάρκωνα

κυττάρων. Χρήσιμοι καρκινικοί δείκτες για το RCC δεν έχουν ακόμα καθιερωθεί. Με στόχο την ανίχνευση ασθενών με υψηλό κίνδυνο για μετάσταση μετά το χειρουργείο, οι Ashida et al ανέπτυξαν μιας υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας nested RT-PCR μέθοδο χρησιμοποιώντας τη *VHL* μετάλλαξη για την ανίχνευση των CTCs.<sup>180</sup> Σάρωσαν 29 σποραδικά clear cell RCCs από ασθενείς για μεταλλάξεις του *VHL* γονιδίου χρησιμοποιώντας άμεση DNA αλληλούχηση. Μετά εξέτασαν δείγματα αίματος χρησιμοποιώντας την ειδική για την μετάλλαξη nested RT-PCR. Σωματικές μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε 20 από τα 29 clear cell RCCs. Οι μεταλλάξεις στο *VHL* γονίδιο ανιχνεύτηκαν στο περιφερικό ή renal venous blood στο 75% των ασθενών. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την παρουσία CTCs με *VHL* μετάλλαξη.

#### **2.4 Τα CTCs σαν νέοι βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού**

Τα CTCs έχουν ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί στο αίμα των ασθενών με διάφορους συμπαγείς όγκους, ιδιαίτερα με καρκίνο του μαστού, όπου έχει φανεί ξεκάθαρα η προγνωστική σημασία της παρουσίας της μικρομετάστασης στον καρκίνο του μαστού τη στιγμή της διάγνωσης.<sup>181</sup> Αφού η πρώιμη διασπορά των καρκινικών κυττάρων στο αίμα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στο καρκίνο του μαστού, πολύ δουλειά έχει γίνει τόσο σε δείγματα μυελού των οστών όσο και σε δείγματα περιφερικού αίματος. Επειδή η επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία περιφερικού αίματος είναι πιο αποδεκτή από τους ασθενείς, η ανάλυση των CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υγρή βιοψία (liquid biopsy) που επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου και δίνει τη δυνατότητα στους κλινικούς να έχουν προγενέστερη προειδοποίηση της επικείμενης φανεράς μεταστατικής ασθένειας. Η πρόκληση τώρα είναι να ενσωματωθεί η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος σαν ένα προγνωστικό και προβλεπτικό εργαλείο στην διαχείριση του καρκίνου του μαστού. Ο αριθμός των δημοσιεύσεων για την προγνωστική σημασία των CTCs αυξάνεται σταθερά από το 2002.<sup>128</sup>

Το 10 % - 30 % των ασθενών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III και το 50 % - 70 % των γυναικών με μεταστατικό καρκίνο μαστού έχουν ανιχνεύσιμα CTCs. Και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία και η αύξηση των CTCs συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση.<sup>182</sup> Στην περίπτωση της μετάστασης, η επίμονη παρουσία των CTCs ύστερα από τρεις με πέντε βδομάδες νέας θεραπείας φαίνεται να υποδηλώνει την έλλειψη αποτελεσματικότητας αυτής της θεραπείας και μια τρέχουσα αναμενόμενη κλινική

δοκιμή προσφώνει την αξία αλλαγής προς μια εναλλακτική θεραπεία ή της αναμονής για τα κλινικά και ραδιογραφικά ευρήματα της εξέλιξης της νόσου.<sup>128</sup>

#### 2.4.1 Πρώιμος καρκίνος του μαστού

Οι Stathoroulou et al . έδειξαν για πρώτη φορά, μέσω της RT-PCR, ότι η μοριακή ανίχνευση κυττάρων θετικών στο mRNA της CK-19, στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού σταδίου I και II πριν την έναρξη της επικουρικής θεραπείας, έχει ανεξάρτητη προγνωστική σημασία σαν ένας δείκτης κακής κλινικής έκβασης.<sup>183</sup> Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από τους Xenidis et al. με τη χρήση RT-qPCR.<sup>170</sup> Επιπροσθέτως, η ανίχνευση στο περιφερικό αίμα κυττάρων θετικών στο mRNA της CK-19 και στο mRNA της mammaglobin (MGB1) πριν την επικουρική θεραπεία προβλέπει μικρή **ελεύθερης νόσου επιβίωση (Disease Free Survival, DFS)**.<sup>171</sup> Οι Ignatiadis et al. βρήκαν ότι το 40.8 % ενός συνόλου 444 ασθενών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III, πριν την έναρξη της επικουρικής θεραπείας έφεραν CTCs θετικά στο mRNA της CK-19.<sup>172</sup> Επίσης αναλύθηκε η συσχέτιση μεταξύ της ανίχνευσης CTCs θετικών στο mRNA της CK-19 και της κλινικής έκβασης σε ασθενείς με όγκους θετικούς στους υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptor,ER), αρνητικούς στους ER, τριπλά αρνητικούς, θετικούς στο HER2 και θετικούς στους ER αλλά αρνητικούς στο HER2. Ύστερα από μια παρακολούθηση 53.5 μηνών, οι ασθενείς με CTCs που εξέφραζαν την CK-19 υπεστήσαν μειωμένη ελεύθερης νόσου επιβίωση και μειωμένη ολική επιβίωση (Overall Survival, OS). Αυτό ήταν πιο εμφανές σε ασθενείς με καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου, αρνητικούς στους ER, τριπλά αρνητικούς και θετικούς στο HER2.<sup>172</sup>

Όταν η παρουσία των θετικών CTCs στο mRNA της CK-19 αναλύθηκε μέσω RT-qPCR σε δείγματα αίματος από ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού πριν και μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας, βρέθηκε ότι η ανίχνευση CTCs που εκφράζουν την CK-19 στο αίμα μετά την χημειοθεραπεία είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου που υποδηλώνει την ύπαρξη υπολειπόμενης νόσου ανθεκτικής στη χημειοθεραπεία.<sup>184</sup> Η ανίχνευση θετικών CTCs στο mRNA της CK-19, χρησιμοποιώντας RT-PCR, τόσο πριν όσο και μετά την χημειοθεραπεία σχετίστηκε με την εύρεση θετικών DTCs στο mRNA της CK-19 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε αρχικό στάδιο. Βρέθηκε ότι ο προσδιορισμός της κατάστασης των CTCs μέσω RT-PCR μεταφέρει πληροφορίες οι οποίες είναι κλινικά σχετικές όχι υποδεέστερες με τις αντίστοιχες από την κατάσταση των DTCs και λόγω της εύκολης δειγματοληψίας,



δικαιολογεί περισσότερη εξέταση σαν ένα εργαλείο για την παρακολούθηση της **ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Minimal Residual Disease, MRD)**. Ο συνδυασμός αυτών των ευρημάτων, πιθανόν να αλλάξει την κλινική διαχείριση των ασθενών με μη μεταστατικό καρκίνο μαστού και υποδηλώνει ότι η μεταστατική αποτελεσματικότητα των CTCs θα μπορούσε να είναι υψηλότερη από αυτή που προηγουμένως έχει αναφερθεί.<sup>128</sup>

#### 2.4.2 Μεταστατικός καρκίνος του μαστού

Ο **μεταστατικός καρκίνος του μαστού (Metastatic Breast Cancer, MBC)** είναι μια ασθένεια ανίατη αφού στην πραγματικότητα η θεραπεία του είναι κυρίως κατευναστική.<sup>185</sup> Οι Cristofanilli et al. διερεύνησαν για πρώτη φορά αν η παρουσία των CTCs προβλέπει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, την PFS και την OS.<sup>184</sup> Ιδιαίτερα σε ασθενείς που μόλις διαγνώστηκαν με MBC οι οποίοι επρόκειτο να ξεκινήσουν θεραπεία πρώτης γραμμής η ίδια ομάδα είχε δείξει ότι η ανίχνευση των CTCs, χρησιμοποιώντας το σύστημα Cell Search πριν την έναρξη της θεραπείας πρώτης γραμμής, μπορούσε να προβλέψει την PFS και OS.<sup>186</sup>

Η παρουσία των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής<sup>187</sup>, ενώ οι ασθενείς με μεταστατικό **φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού (Inflammatory Breast Cancer, IBC)** είχαν χαμηλότερη επικράτηση και λιγότερα CTCs σε σχέση με τους μη φλεγμονώδεις μεταστατικούς ασθενείς.<sup>188</sup> Οι Liu et al. διεξήγαγαν μια προορατική (prospective) μελέτη και απέδειξαν μια στενή σχέση μεταξύ των σχετικών με τα CTCs αποτελεσμάτων και της εξέλιξης της ακτινογραφικής νόσου σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία ή θεραπεία του ενδοκρίμματος για τον μεταστατικό καρκίνο του μαστού.<sup>189</sup> Ωστόσο, η αξία της ανίχνευσης των CTCs στον MBC μέσω του CellSearch πιθανόν να εξαρτάται από την κλινική κατάσταση και από την αγωγή που χρησιμοποιείται.<sup>185</sup>

Πρόσφατα κάποιες ερευνητικές ομάδες δημοσίευσαν αναφορές από το βιολογικό χαρακτηρισμό των CTCs σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο μαστού που επικεντρώνονται στην εκτίμηση της κατάστασης του HER2 στα CTCs.<sup>190-193</sup> Οι Pestrin et al. εξέτασαν την κατάσταση του HER2 μέσω ανοσοφθορισμού και FISH σε CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.<sup>192</sup> Το 29 % των ασθενών με πρωταρχικούς όγκους αρνητικούς στο HER2 βρέθηκαν να έχουν CTCs θετικά στο HER2. Επιπλέον, το 42% των ασθενών με πρωτοπαθείς όγκους θετικούς στο HER2 είχαν CTCs αρνητικά στο

HER2. Οι Meng et al. ανέφεραν ανταπόκριση σε στοχευόμενη θεραπεία έναντι του HER2 σε ασθενείς που είχαν μεν CTCs θετικά στο HER2 αλλά με πρωταρχικούς όγκους που δεν εξέφραζαν το HER2.<sup>191</sup>

#### **2.4.3 Τα CTCs σαν προβλεπτικοί δείκτες της ανταπόκρισης στη θεραπεία**

Τα CTCs μπορούν να ανιχνεύσουν ασθενείς οι οποίοι είναι πιο πιθανό να θεραπευτούν με επιθετική αγωγή, όπως και ασθενείς με τάση για συστηματική αποτυχία. Αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να ταιριάξει στους ασθενείς την πιο κατάλληλη στρατηγική θεραπείας συμπεριλαμβάνοντας συνδυασμούς μεταξύ τοπικής και συστημικής θεραπείας.<sup>185</sup>

Η παρακολούθηση των CTCs πριν και μετά την συστηματική συνεπικουρική θεραπεία μπορεί να παρέχει μοναδικές πληροφορίες για τον κλινικό χειρισμό του κάθε ασθενούς ατομικά και να επιτρέψει μια έγκαιρη αλλαγή στη θεραπεία, χρόνια πριν την εμφάνιση εμφανών μη ιάσιμων σημαδιών μεταστάσεων. Επιπλέον, υπάρχει μια επείγουσα ανάγκη για βιοδείκτες για εξατομικευμένη παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αποτελεσματικότητας της συνεπικουρικής θεραπείας. Προς το παρόν, η επιτυχία ή αποτυχία των αντικαρκινικών θεραπειών εκτιμάται αναδρομικά μόνο, μέσω της παρουσίας ή απουσίας φανεράς μετάστασης κατά την διάρκεια της περιόδου της μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Εντούτοις, οι φανερές μεταστάσεις δεν θεραπεύονται με τις περισσότερες τρέχουσες θεραπείες. Η παρακολούθηση των CTCs θα παρέχει νέα γνώση στην επιλογή των ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων κάτω από βιολογικές θεραπείες.<sup>185</sup>

Η προγνωστική αξία που σχετίζεται με την ανίχνευση των CTCs στον MBC φέρνει πρόσθετα θέματα όσον αφορά τη βιολογική αξία αυτής της πληροφορίας. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ένα προφίλ των CTCs ανθεκτικών στα φάρμακα το οποίο προβλέπει την ανταπόκριση στη θεραπεία, ανεξάρτητα από τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο της νόσου και για αυτό το λόγο μπορούσε να βοηθήσει στην επιλογή των ασθενών.<sup>194</sup>

CTCs που αντιστέκονται στην χημειοθεραπεία έχουν προβλεπτική αξία στον MBC και πιθανόν διατηρούν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων. Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι στον MBC, η παρουσία CTCs που εξέφραζαν πρωτεΐνες σχετικές με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε φάρμακα (Multi-drug Resistance related Proteins, MRPs), και aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH 1), προβλέπει την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στον MBC η αλλαγή του αριθμού των CTCs συνδέθηκε στενά με αποτελέσματα από τις

απεικόνιστικές μεθόδους πριν και μετά τη θεραπεία, οπότε τα CTCs μπορούν να θεωρηθούν ένας βιοδείκτης ο οποίος πιθανόν να προβλέψει την επίδραση της θεραπείας νωρίτερα από τις απεικονιστικούς τρόπους.<sup>195</sup> Σε ασθενείς χωρίς κλινικό εύρημα της μετάστασης παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον η προγνωστική και ολική συμβίωση που σημειώθηκε μεταξύ αυτών με αυξημένα επίπεδα CTCs και με μη αυξημένα επίπεδα CTCs πριν και μετά την χημειοθεραπεία αντίστοιχως.<sup>196</sup> Σύμφωνα με την GerarQuattro δοκιμή, που στόχευσε στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs πριν και μετά την νέα συνεπικουρική θεραπεία στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού, οι πληροφορίες για την HER2 κατάσταση των CTCs μπορεί να είναι χρήσιμη στη διαστρωμάτωση και παρακολούθηση HER2 κατευθυνόμενων θεραπειών.<sup>197</sup>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM

#### 3.1 Εισαγωγή

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων είναι πρωταρχικής σημασίας στη βιολογία. Ο καθορισμός των παραλλαγών στην αλληλουχία του DNA μεταξύ των ατόμων θεμελιώνει τη Μοριακή Γενετική. Αυτή η ανάλυση συνήθως διεξαγόταν, μέχρι τις αρχές του 90, με την εξέταση των **πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs)** χρησιμοποιώντας την τεχνική της **αποτύπωσης κατά Southern (Southern Blotting)**.<sup>198, 199</sup> Η συγκεκριμένη προσέγγιση αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη, και οδήγησε στην παραγωγή τεράστιας βιβλιογραφίας, παρά το γεγονός ότι είναι σχετικά αργή και επιτρέπει μόνο την εξέταση του περιορισμένου αριθμού **σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)** που είτε δημιουργούν είτε καταστρέφουν μια θέση αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση.<sup>199</sup>

Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR)**<sup>200</sup> έχει διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την ανάλυση του γενωμικού DNA. Από το 1985 όπου και εμφανίστηκε η πρώτη δημοσίευση για την επαναστατική αυτή μέθοδο<sup>201</sup>, έγινε δυνατή η διάγνωση γενετικών ασθενειών όταν συνδυάστηκε με μια ποικιλία άλλων τεχνικών<sup>202-205</sup>, ενώ αναφέρθηκε η χρήση αυτής και της άμεσης αλληλούχησης (Sequencing) για τη διάγνωση κληρονομούμενων ασθενειών.<sup>202-204, 206</sup>

Σήμερα η βασική αντίδραση PCR έχει προσαρμοσθεί για ένα τεράστιο εύρος διαφορετικών εφαρμογών, οπότε δεδομένου ότι όλες οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA δεν οδηγούν πάντα σε τροποποίηση ενός σημείου αναγνώρισης από ένα περιοριστικό ένζυμο, έχουν αναπτυχθεί πιο γενικές μέθοδοι για την ανίχνευση γνωστών διαφορών στην αλληλουχία.

Η αλληλο-ειδική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1989, με αρκετές παραλλαγές να αναφύονται μέσα στα επόμενα χρόνια όπως ο υβριδισμός με συνθετικά **ολιγονουλεοτίδια ειδικά για κάθε αλληλόμορφο (Allele-Specific Oligonucleotides, ASOs)**, η ειδική PCR για την ενίσχυση μεταλλαγμένου αλληλίου (**Mutant Allele Specific Amplification, MASA**), η ενίσχυση με PCR

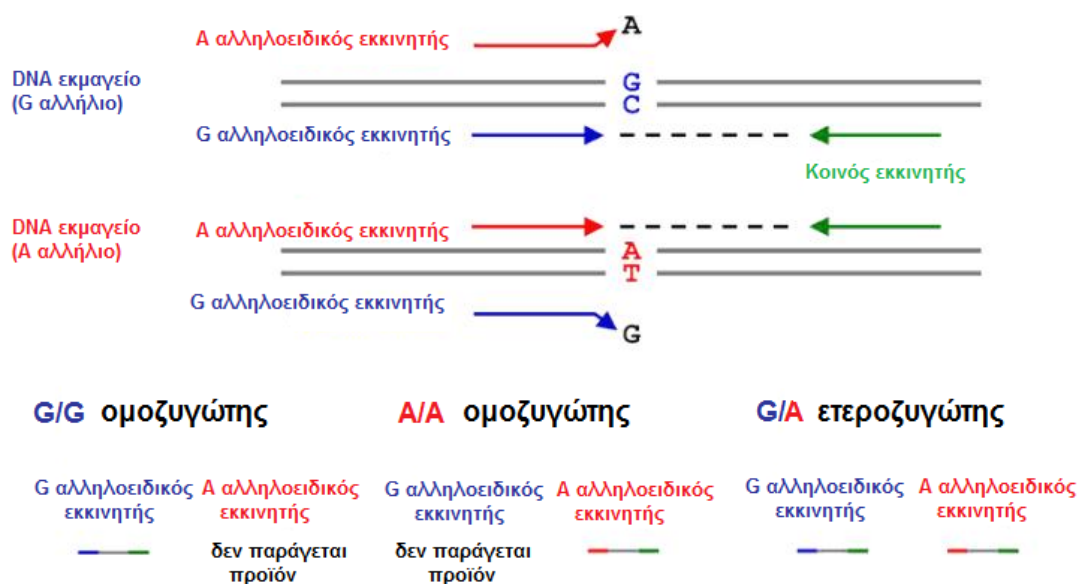
**συγκεκριμένων αλληλίων (PCR Amplification of Specific Alleles, PASA) και η ARMS PCR (Allele Refractory Mutation System).**<sup>199, 207-210</sup>

### 3.2 Οι βασικές αρχές της ARMS PCR

Αυτές οι συσχετιζόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούν την διαφορά στην αποτελεσματικότητα της επέκτασης, κατά την αντίδραση της PCR, μεταξύ εκκινητών με συμπληρωματικές και μη συμπληρωματικές 3' βάσεις. Η *Taq* DNA πολυμεράση, που χρησιμοποιείται στις PCR αντιδράσεις, θα επεκτείνει εκκινητές με μια μη συμπληρωματική 3' βάση στην DNA μήτρα 40 με 100 φορές λιγότερο αποδοτικά από ότι τους αντίστοιχους με σωστά ταιριασμένο 3' άκρο. Ένα απόλυτο ταιρίασμα μεταξύ εκκινητή και εκμαγείου θα αποδώσει ένα προϊόν, ενώ ένα ή περισσότερα κακο-ταιριάσματα στο 3' άκρο θα παρεμποδίσει την επέκταση. Όταν χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με έναν κοινό ανοδικό εκκινητή, η PCR ενίσχυση είτε των φυσιολογικών είτε των μεταλλαγμένων αλληλίων παράγει DNA προϊόντα προβλεπόμενου μεγέθους ανάλογα με το παρών εκμαγείο. Ανιχνεύοντας ποιο ζευγάρι εκκινητών παράγει τα προϊόντα, ο γονότυπος ενός δείγματος είναι δυνατόν να προσδιορισθεί. Η ανίχνευση και η αναγνώριση των προϊόντων είναι τα πιο ευμετάβλητα βήματα σε μια ARMS μέθοδο και η ταχύτητα με την οποία αυτά ανιχνεύονται συνεισφέρει στη διεκπεραιωτική ικανότητα κάθε μεθόδου. Ο πιο απλός τρόπος είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, όπου τα προϊόντα της αντίδρασης ξεχωρίζουν με βάση το μέγεθος τους και ανιχνεύονται μέσω του φθορισμού της χρωστικής που παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA ύστερα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η φασματομετρία μάζας ανιχνεύει και ταυτοποιεί τα προϊόντα βάσει του μοριακού τους βάρους, ενώ η DNA αλληλούχηση τα ξεχωρίζει από το μέγεθος και με τη χρήση φθοριζόντων ιχνηθετών.<sup>211, 212</sup> Άλλες μέθοδοι χρησιμοποιούν το **φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας συντονισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)**, την **πόλωση φθορισμού (Fluorescence Polarization, FP)**, την φωταύγεια, την απορρόφηση και την θερμοκρασία τήξης.<sup>213, 214</sup> Οι περισσότερες έχουν σχεδιαστεί ώστε να στηθούν και να διεξαχθούν σε μικροπλακίδια 96 θέσεων/φρεατίων.

### 3.3 Σχεδιασμός μιας τυπικής ARMS μεθόδου

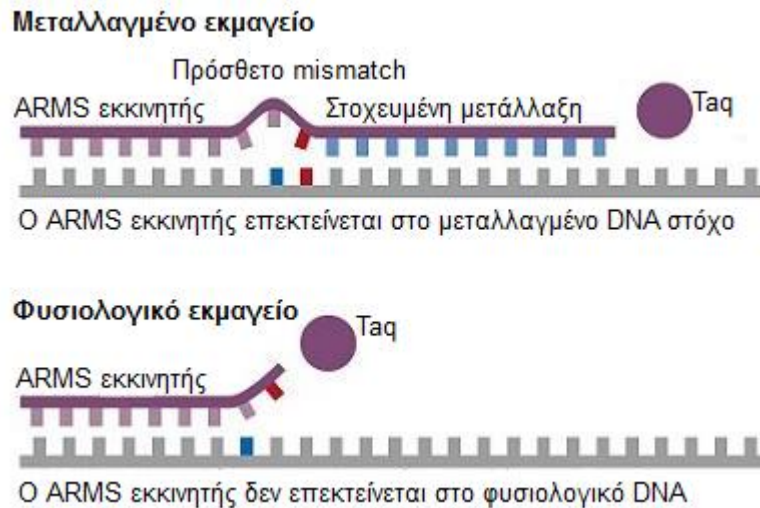
Για το στήσιμο μιας τυπικής ARMS PCR σχεδιάζεται ένα κοινό εναρκτήριο ολιγονουκλεοτίδιο και δύο αλληλοειδικά εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια. Οι αλληλοειδικοί εκκινητές ενώ υβριδοποιούνται αμφότεροι στην αλληλουχία που συνορεύει στο πολυμορφικό σημείο, διαφέρουν κατά μία βάση στο 3΄άκρο τους: ο ειδικός για το μεταλλαγμένο αλληλίο θα έχει βάση συμπληρωματική της συγκεκριμένης αλληλουχίας και θα είναι ο μεταλλαγμένος εκκινητής (mutant primer), ενώ αντίστροφα ο ειδικός για το φυσιολογικό θα έχει 3΄τελική βάση συμπληρωματική της αλληλουχίας αγρίου τύπου και θα είναι ο φυσιολογικός ή αγρίου τύπου εκκινητής(normal primer). Η αλληλουχία που επιλέγεται για τον κοινό εκκινητή ουσιαστικά καθορίζει το μήκος του κομματιού που θα επεκταθεί κατά την PCR. Ο κοινός εκκινητής θα πρέπει να σχεδιαστεί ώστε να ενισχύσει ένα τμήμα DNA αρκετά μεγάλο για την εκάστοτε μέθοδο ανίχνευσης που θα εφαρμοσθεί.



Σχήμα 3.1: Γενικευμένο διάγραμμα της ARMS PCR.<sup>215</sup>

Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιούνται, λοιπόν, δύο διαφορετικές αντιδράσεις μια με τον εκκινητή αγρίου τύπου και μία με τον μεταλλαγμένο εκκινητή (τα προϊόντα των οποίων ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης). Η αντίδραση που περιέχει τον εκκινητή αγρίου τύπου θα πολλαπλασιάσει DNA- μήτρα αγρίου τύπου ενώ η αντίδραση που περιέχει τον μεταλλαγμένο εκκινητή θα πολλαπλασιάσει μόνο το μεταλλαγμένο DNA εκμαγείο (σχήμα 3.1). Όμως, από τη στιγμή που θα υπάρξει

επέκταση πέρα από (και παρά) τη μη συμπληρωματική βάση στο 3' άκρο η ενίσχυση προχωρά φυσιολογικά από το νεοσυντιθέμενο κλώνο. Έτσι, μια εξορισμού σημαντική αδυναμία της ARMS PCR είναι ότι το μη ταιριασμένο (μη ταιριασμένο μόνο στο 3' άκρο του ενός εκκινητή ) εκμαγείο είναι δυνατόν να ενισχυθεί με αποτέλεσμα, επειδή κάθε επέκταση από κακο-ταιριασμένους εκκινητές μεταφέρει την αλληλουχία του εκκινητή (επιβεβαιώνεται από Sequencing)<sup>216</sup>, στους επόμενους κύκλους της PCR σχηματίζονται τα απόλυτα ταιριαστά εκμαγεία και τελικά παράγονται τα παρατηρούμενα μη ανεπιθύμητα προϊόντα.<sup>199, 216</sup> Οι παράγοντες που συνεισφέρουν σε αυτή την αδυναμία της ARMS είναι ότι όταν μεγάλος αριθμός τέτοιων μορίων μήτρων προστίθεται στην αντίδραση, η ενίσχυση είναι δυνατόν να εξελιχθεί διότι το μικρό ποσοστό από τους κακο-ταιριασμένους εκκινητές φτάνει στο κατώφλι της αντίδρασης. Δεύτερον, υπάρχουν mismatches που επεκτείνονται πιο αποδοτικά από άλλα<sup>199, 217</sup>, και έτσι η αναλογία της επέκτασης από τους αντίστοιχους εκκινητές σε κάθε κύκλο PCR ποικίλλει. Για το λόγο αυτό, συνίσταται κατά τη σύνθεση των εκκινητών της ARMS-PCR να προστίθεται μια δεύτερη προμελετημένη ανακολουθία βάσεων κοντά σε αυτό το άκρο του εκκινητή (συνήθως 3 ή 4 θέσεις εσωτερικά του 3' άκρου). Κάτι τέτοιο συνήθως λύνει αποφασιστικά το πρόβλημα.<sup>199, 217</sup>



**Σχήμα 3.2:** Μία μη συμπληρωματική βάση κοντά στην 3' τελικό άκρο του εκκινητή αποσταθεροποιεί περισσότερο το σύμπλεγμα εκκινητή και εκμαγείου. Όσο η πρόσθετη μη συμπληρωματική βάση προχωρά πιο κοντά στο 3' άκρο προσδίδει στον εκκινητή αυξημένη παρεμποδιστική δράση.<sup>199</sup> (<http://www.qiagen.com/images/logo.gif>)

Οι συνθήκες της PCR μπορεί να έχουν μια σημαντική επίδραση στην ειδικότητα της επέκτασης του DNA από έναν αλληλοειδικό εκκινητή. (Παρότι η ποσοτική εξάρτηση των



αποδιδόμενων ποσοτήτων της PCR σε ένα εισαγμένο στόχο υποτάσσεται σε μια γραμμική λογαριθμική σχέση σε ένα χαμηλό αριθμό κύκλων, δεν κρατάει πέρα από περίπου 1 nM DNA).<sup>218, 219</sup> Επίσης είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα του μη ειδικού ή τυχαίου υβριδισμού σε μερικώς πανομοιότυπες αλληλουχίες σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι για τη χρήση περίπλοκου γενωμικού DNA στόχου μια προσεχτική προσέγγιση απαιτεί την εφαρμογή αυστηρών συνθηκών για τον υβριδισμό και χαμηλό αριθμό κύκλων. Η μεταβλητή ποιότητα δειγμάτων μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα μιας μεμονωμένης αντίδρασης. Τα δείγματα αναφοράς από ανεπηρέαστους ασθενείς αποτελούν ένα σημαντικό τρόπο ελέγχου αυτού. Κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου η παρουσία της μετάλλαξης στο ενισχυόμενο από τον μεταλλαγμένο εκκινητή DNA και η απουσία της μετάλλαξης στο DNA που ενισχύεται από τον φυσιολογικό εκκινητή θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με DNA sequencing. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε δείγματα των οποίων ο γονότυπος έχει καθοριστεί μέσω πιο κοπιαστικών μεθόδων όπως περιγράφηκε από τους Richter et al. κατά την επικύρωση της ARMS δοκιμασίας που ανέπτυξαν για την ανίχνευση των επαναλαμβανόμενων μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA1.<sup>210</sup>

### 3.4 Τροποποιημένα πρωτόκολλα της ARMS-PCR

Η ARMS-PCR προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συστημάτων που βασίζονται στην PCR, όπως τα RFLPs<sup>6</sup>, ή η διαφορική υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων<sup>7</sup> που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα για τη μελέτη γνωστών πολυμορφισμών.<sup>216</sup> Είναι γρήγορη και απλή, αφού τα αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν μέσα σε μια εργαστηριακή μέρα, ενώ δεν είναι απαραίτητη η προετοιμασία DNA υψηλής ποιότητας ιδανικό για την πέψη με ένζυμο περιορισμού.<sup>199</sup> Επιπλέον θεωρητικά οι δοκιμασίες ARMS μπορούν να αναπτυχθούν για κάθε τύπο σημειακής μετάλλαξης<sup>199</sup>, και να εφαρμοσθούν για την ανάλυση ποσοτήτων γενωμικού DNA σε επίπεδο ng.<sup>8,9</sup> Επιπροσθέτως είναι οικονομική, αφού στην αρχική της τουλάχιστον μορφή δεν ήταν απαραίτητα παρά μόνο τα δύο ζεύγη εκκινητών και η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αρχικά λοιπόν εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανίχνευση αρκετών πολυμορφισμών και γενικά κληρονομήσιμων μεταλλάξεων οι οποίες οδηγούν σε ασθένειες όπως η ανεπάρκεια της αντιθρυψίνης<sup>199</sup>, η δρεπανοκυτταρική αναιμία<sup>220</sup>, η κυστική ίνωση<sup>221</sup>, η θαλασσαιμία<sup>222</sup> κ.α

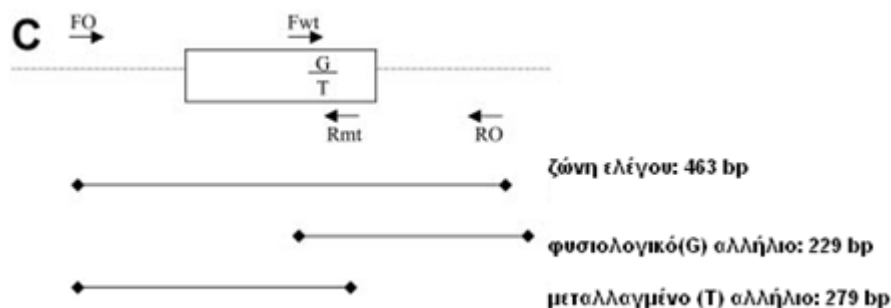
Βασικό μειονέκτημα των πρωταρχικών πρωτοκόλλων της αλληλοειδικής PCR ήταν η έλλειψη ευαισθησίας. Για παράδειγμα ενώ τα RFLPs σε συνδυασμό με την PCR μπορούν να ανιχνεύσουν μια σημειακή μετάλλαξη σε δείγματα DNA όταν υπάρχει σε μια συχνότητα 1 στα 10.000 ή λιγότερα<sup>223, 224</sup>, η υπολογιζόμενη ευαισθησία της αλληλοειδικής PCR ήταν περίπου 1 στα 40.<sup>225</sup> Αυτό συμβαίνει διότι, όπως προαναφέρθηκε, οι εκκινητές με το μη ταιριασμένο 3'άκρο μπορούν ακόμα να επεκταθούν μέχρι κάποιο βαθμό κάτω από τις περισσότερες συνθήκες PCR. Η ευαισθησία για την ανίχνευση μεταλλάξεων δεν είναι κρίσιμη όταν αναλύεται ένας σχετικά ομογενής πληθυσμός κυττάρων και όταν τα μεταλλαγμένα κύτταρα αποτελούν συχνό γεγονός μέσα στο συνολικό αριθμό των κυττάρων, όπως είναι η περίπτωση των κληρονομικών μεταλλάξεων. Όμως η μελέτη ενός ετερογενούς πληθυσμού κυττάρων όπου μόνο ένα μικρό ποσοστό κυττάρων ενδέχεται να φέρει την μετάλλαξη καθιστά απαραίτητη τη χρήση μιας μεθόδου με ένα υψηλό επίπεδο ευαισθησίας.<sup>216</sup> Έτσι πολλές ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να αναπτύξουν μεθόδους ARMS με μεγαλύτερη ευαισθησία, είτε παραλλάσσοντας το αρχικό πρωτόκολλο, είτε προσθέτοντας στο μίγμα της αντίδρασης ολιγονουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορισμό (probes) και παρακολουθώντας το παραγόμενο σήμα σε πραγματικό χρόνο και χρησιμοποιώντας για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR την ανάλυση καμπυλών τήξης κτλ. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα τα οποία είτε επιτρέπουν την ταυτόχρονη ενίσχυση των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων αλληλίων στο ίδιο σωληνάριο της αντίδρασης, είτε ενισχύουν μόνο τις μεταλλαγμένες αλληλουχίες ταυτόχρονα μαζί με μια εσωτερική αλληλουχία DNA διασφαλίζοντας έτσι τόσο την ποιότητα του δείγματος DNA όσο και την ομαλή διεξαγωγή της αντίδρασης σε ένα μόνο πείραμα. Μερικά παραδείγματα αναφέρονται ενδεικτικά παρακάτω.

Οι Cha et al. περιέγραψαν ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο αλληλοειδικής PCR, την μέθοδο (Mismatch Amplification Mutation Assay, MAMA), το οποίο επέτρεψε την ανίχνευση ενός μεταλλαγμένου αλληλίου παρουσία  $10^5$  φυσιολογικών αλληλίων. Στην προσπάθειά τους να βελτιώσουν την τεχνική, αριστοποίησαν την διαδικασία μεταβάλλοντας τον αριθμό και τους τύπους των μη συμπληρωματικών βάσεων στο 3'άκρο, τη θερμοκρασία και την διάρκεια της υβριδοποίησης και τις συνθήκες του διαλύματος του μίγματος της αντίδρασης.<sup>216</sup>

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Low et al., η nested ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation Allele Specific- PCR) αποδείχτηκε ότι ήταν πιο ευαίσθητη από την μη nested παραλλαγή της και μπορούσε να ανιχνεύσει ένα μεταλλαγμένο κύτταρο

μεταξύ  $10^5$  φυσιολογικών κυττάρων. Επιπλέον συγκρίθηκε με την PCR-single stranded conformational polymorphism και η nested PCR ήταν  $10^4$  φορές πιο ευαίσθητη για την ανίχνευση μεταλλαγμένων p53 σε απομονωμένο DNA.<sup>226</sup>

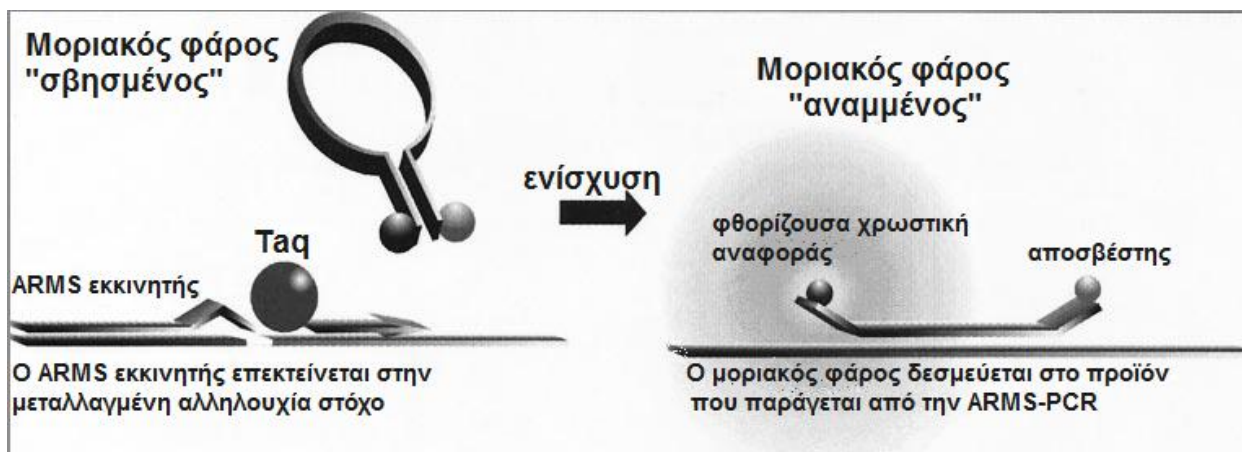
Οι Jones et al. ανέπτυξαν ARMS PCR για την γονοτυπική ανάλυση της μετάλλαξης V617F στην **κινάση 2 Janus (Janus Kinase 2, JAK)**.<sup>227</sup> Χρησιμοποιώντας δύο μόνο ζεύγη εκκινητών πέτυχαν την ταυτόχρονη ενίσχυση των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών αλληλίων όπως και μιας εσωτερικής αλληλουχίας ελέγχου στο ίδιο σωληνάριο αντίδρασης. Η μέθοδος τους πλεονεκτούσε ως προς την απλότητα, την ταχύτητα και το χαμηλό κόστος αφού δεν απαιτούσε ειδικό εξοπλισμό παρά έναν θερμικό κυκλοποιητή. Ωστόσο δεν ήταν αρκετά ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύσει χαμηλά επίπεδα της μετάλλαξης (**σχήμα 3.3**), πιθανόν λόγω του ανταγωνισμού των εκκινητών μεταξύ των διαφορετικών PCR αντιδράσεων. Για αυτό το λόγο και επειδή όπως αποδείχθηκε είναι πιθανή η παρουσία επίκτητων V617F μεταλλάξεων σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές οι Chen et al βελτιστοποίησαν τις συνθήκες της αντίδρασης.<sup>228</sup> Το τροποποιημένο πρωτόκολλο ανίχνευε την μετάλλαξη με μια υψηλής αναπαραγωγιμότητας αναλυτική ευαισθησία από 0.05-0.1 % και άρα είναι πλέον κατάλληλο για την ανίχνευση των χαμηλών επιπέδων της *JAK2* μετάλλαξης.<sup>228</sup>



**Σχήμα 3.3:** Η μέθοδος ARMS PCR για την ανίχνευση της 2343 G>T στο γενωμικό DNA.<sup>227</sup>

Η ARMS PCR δεν άργησε να συνδυαστεί με την real time PCR. Μία από τις πρώτες προσπάθειες έγινε από τους Clayton 2000 et al. οι οποίοι εισήγαγαν την ποσοτικοποίηση στη βασική μορφή της ARMS με στόχο την ανίχνευση των κοινά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στο *K-ras* ογκογονίδιο.<sup>229</sup> Πιο συγκεκριμένα συνδύασαν την εμπορικά διαθέσιμη ARMS μέθοδο (KRAS Elucigene) με την μέτρηση και

καταγραφή του φθορισμού που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης, από την υβριδοποίηση μοριακών φάγων στις παραγόμενες αλληλουχίες στόχους (σχήμα 3.4).



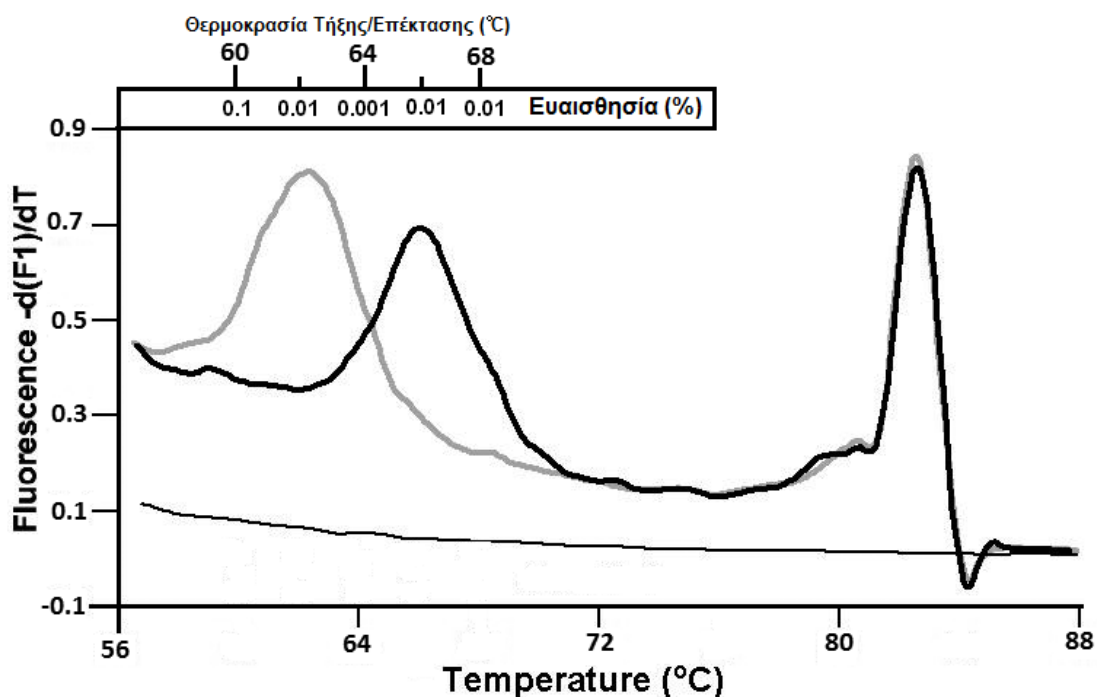
Σχήμα 3.4: Όταν ένας ARMS εκκινητής δεσμεύεται στο μεταλλαγμένο DNA στόχο, πραγματοποιείται επέκταση και ενίσχυση. Στον αντίστοιχο φυσιολογικό στόχο, ο οποίος μπορεί να υπάρχει σε μεγάλη περίσσεια το 3' άκρο δεν είναι συμπληρωματικό οπότε η ενίσχυση μπορεί να υπάρξει με εξαιρετικά χαμηλή αποδοτικότητα. Τα ενισχυμένα προϊόντα μπορούν να ανιχνευτούν μέσω αλληλοειδικών ιχνηθετών οι οποίοι είναι επισημασμένοι με φθορισμό.

Οι ARMS αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταλλάξεων σε καρκινικά δείγματα πνεύμονα, ενώ σε κάθε δείγμα διεξήχθη και μια αντίδραση ελέγχου για να μετρηθεί η συνολική ποσότητα της ενισχυόμενης αλληλουχίας του *K-ras* και να υπολογιστεί ο λόγος των μεταλλαγμένων προς τις φυσιολογικές αλληλουχίες. Η μέθοδος ανίχνευσε *K-ras* μεταλλάξεις στο 44 % των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα και ήταν ισοδύναμη με τις συχνότητες που είχαν αναφερθεί έως τότε στη βιβλιογραφία με τη χρήση εξαιρετικά ευαίσθητων μεθόδων. Επίσης είναι ομογενής και δεν χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία των ενισχυμένων προϊόντων. Η μέθοδος εφαρμόσθηκε επιτυχώς και σε επόμενες μελέτες.<sup>230</sup>

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν ακόμα περισσότερες παραλλαγές της βασικής μορφής της αλληλοειδικής PCR. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται μέθοδοι με ενσωματωμένες **αλληλουχίες «κλειδωμένων» νουκλεϊκών οξέων που παρεμποδίζουν (Locked Nucleic Acid, LNA)** την ενίσχυση της φυσιολογικής αλληλουχίας για αυξημένη ειδικότητα.<sup>231, 232</sup> Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συσσωματώματα (clamps) νουκλεϊκών οξέων για την παρεμπόδιση της ενίσχυσης της αλληλουχίας αγρίου τύπου, συμπεριλαμβάνοντας πεπτιδικά νουκλεϊκά οξέα (Peptide Nucleic Acid, PNA)<sup>233, 234</sup> και ιχνηθέτες LNA.<sup>235, 236</sup> Σε κάποιες μεθόδους, οι εκκινητές που επιλέγουν το μεταλλαγμένο DNA συνδυάζονται με ιχνηθέτες

που παρεμποδίζουν την ενίσχυση της φυσιολογικής αλληλουχίας. Σε μια εκδοχή ο ιχνηθέτης παρεμποδιστής ανταγωνίζεται με τον αλληλοειδικό εκκινητή<sup>237, 238</sup> για αυξημένη ευαισθησία. Ωστόσο, όλες αυτές οι μέθοδοι μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν επιτυγχάνονται ευαισθησίες χαμηλότερες από το 0.1 %.<sup>237-239</sup>

Πρόσφατα οι Zhou και συνεργάτες συνδύασαν την αλληλοειδική PCR, τον ανταγωνιστικό παρεμποδισμό από ολιγονουκλεοτίδιο ανιχνευτή, την ασύμμετρη PCR και την ανάλυση των καμπύλων τήξης προκειμένου να αυξήσουν την ανίχνευση σπάνιων αλληλίων σε ένα ομογενές σύστημα.<sup>240</sup> Η μέθοδος περιγράφηκε στη σημειακή μετάλλαξη p.V600E (v1799 T>A) του *BRAF*, την πιο κοινή αλλαγή στο θηλοειδές καρκίνωμα του θηροειδούς<sup>241</sup> που υπάρχει σε περισσότερες από το 80 % των περιπτώσεων που μελετήθηκαν.<sup>241, 242</sup> Με την μείωση της συγκέντρωσης του αλληλοειδικού εκκινητή αυξήθηκε μεν η ειδικότητα, μειώθηκε δε η απόδοση της PCR. Αυτό αντισταθμίστηκε με την διεξαγωγή 80 κύκλων rapid cycle PCR.<sup>243</sup> Η ασύμμετρη αυτή αντίδραση έχει σαν αποτέλεσμα να παραχθεί σε περίσσεια η μία μόνο αλυσίδα του ενισχυόμενου προϊόντος. Αν λοιπόν στο μίγμα της αντίδρασης συμπεριλαμβάνονται ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές, είτε μη επισημασμένοι φθορισμομετρικά, είτε διπλής υβριδοποίησης είτε μοριακοί φάγοι, κατά την τήξη των προϊόντων της PCR μπορούν να παρατηρηθούν καμπύλες τήξης με μορφή ειδική του αλληλίου κάτω από τον ανιχνευτή (σχήμα 3.5). Με την συγκεκριμένη προσέγγιση, πέτυχαν την ανίχνευση σπάνιων αλληλίων με ευαισθησία μεγαλύτερη από 0.001% και εξαιρετική ειδικότητα αφού η θερμοκρασία τήξης του υβριδίου ανιχνευτή/αλληλίου επιβεβαιώνει την παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου.



Σχήμα 3.5: Οι καμπύλες πρώτης παραγώγου αποκτήθηκαν μετά την PCR παρουσία ενός μη επισημασμένου παρεμποδιστικού ανιχνευτή ο οποίος ανιχνεύει την μετάλλαξη c. 1799T>A. Η προερχόμενη από το 100% φυσιολογικό DNA καμπύλη τήξης φαίνεται με το μαύρο χρώμα, ενώ το 100% μεταλλαγμένο φαίνεται με γκρι. Η μαύρη λεπτή γραμμή προέρχεται από δείγμα που δεν περιέχει DNA. Και για τα δύο εκμαγεία η προκύπτουσα κορυφή τήξης είναι στους 83 °C. Η κορυφή τήξης του διμερούς μεταξύ του ανιχνευτή και του PCR προϊόντος είναι 66 °C για το συμπληρωματικό φυσιολογικό αλληλίο και 62 °C για το μη συμπληρωματικό μεταλλαγμένο αλληλίο.

### 3.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* με την ARMS PCR

Σε προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκε η σπουδαιότητα της ανίχνευσης των μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικεύει την καταλυτική υπομονάδα της PI3K. Μέχρι τώρα το θέμα έχει προσεγγιστεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες<sup>87, 244, 245</sup>, που έχουν παρουσιάσει αξιόλογα αποτελέσματα, ενώ στο εργαστήριο μας αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση των πιο συχνά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στο *PIK3CA*.<sup>1</sup> Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία, που βασίζεται στην ενίσχυση μικρού μήκους DNA κατάλοιπων, αποδείχθηκε αξιόπιστη, πολύ ευαίσθητη, οικονομικά συμφέρουσα, εύκολη στην διεξαγωγή και μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα υψηλής εμπέλειας φαρμακοδιαγνωστικό setting.

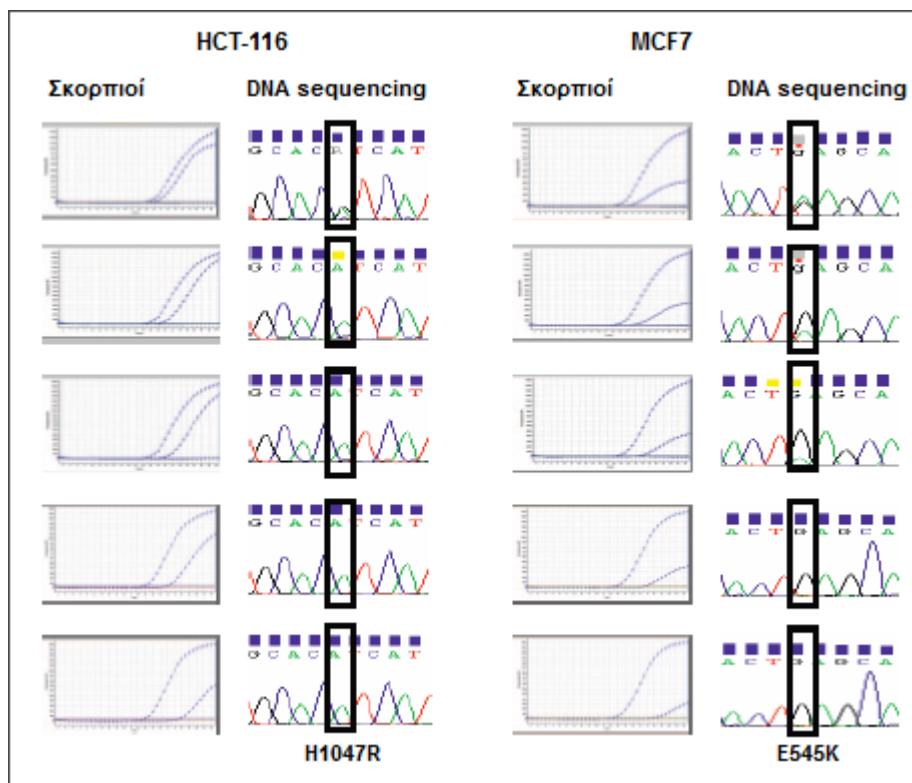
Οι Board et al. συνδυάζοντας το Amplification Refractory Mutation System (ARMS™; AstraZeneca) με την αλληλοειδική PCR με Σκορπιούς (allele specific PCR and Σοφία Φάρκωνα

Scorpions™) και με παρακολούθηση του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης, ανέπτυξαν πολλαπλές μεθόδους για τις πιο συχνά αναφερόμενες μεταλλάξεις στο *PIK3CA*.<sup>246</sup>

Πιο συγκεκριμένα σχεδιάστηκαν ARMS εκκινητές έναντι των μεταλλάξεων H1047R και H1047L στο εξόνιο 20 και έναντι των μεταλλάξεων E542K και E545K στο εξόνιο 9. Επίσης σχεδιάστηκε ένας εκκινητής αναφοράς/ελέγχου για την cDNA θέση 2450 στο *PIK3CA* όπως και τρεις Σκορπιοί εκκινητές επισημασμένοι με διαφορετικά φθορισμοφόρα μόρια με στόχο την πολλαπλότητα ενός αριθμού δοκιμών σε κάθε αντίδραση. Κατά αυτό τον τρόπο οι αντιδράσεις multiplexed σε αντιδράσεις που περιείχαν μία δοκιμή ελέγχου και δύο ARMS δοκιμές (μία για το εξόνιο 9 και μία για το εξόνιο 20).

Για να καθορίσουν την ειδικότητα των αντιδράσεων, διεξήγαγαν κάθε δοκιμή με ποσότητα γενωμικού DNA που κυμαινόταν από 5-50 ng ανά αντίδραση, ώστε να εκτιμηθεί το αρχικό σήμα φθορισμού που προέρχεται από την επέκταση του λάθος ταιριασμένου στο 3' άκρο του εκκινητή. Στη συνέχεια καθορίστηκε η τιμή της διαφοράς μεταξύ των Ct των μεταλλαγμένων αλληλουχιών και των Ct των φυσιολογικών αλληλουχιών ( $\Delta Ct$ ). Οι αντιδράσεις διεξάχθηκαν 6 φορές για κάθε συγκέντρωση και επαναλήφθηκε τριπλά σε ανεξάρτητες συνθήκες προκειμένου να καθοριστεί ένα σημείο αποκοπής της  $\Delta Ct$  κάτω από το οποίο κάθε ενίσχυση μπορεί να θεωρηθεί ότι παρατηρείται λόγω της παρουσίας της μετάλλαξης και όχι λόγω του αρχικού σήματος φθορισμού. Οι ARMS δοκιμασίες που αφορούσαν το εξόνιο 20 είχαν ευαισθησία 0.1 % εντός των προκαθορισμένων σημείων αποκοπής της  $\Delta Ct$  ενώ οι ARMS δοκιμασίες που αφορούσαν το εξόνιο 9 είχαν ευαισθησία 1 % εντός των προκαθορισμένων σημείων αποκοπής της  $\Delta Ct$ . Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκαν αναμίξεις κυτταρικών σειρών οι οποίες περιείχαν την μετάλλαξη H1047R (HCT-116) και E545K (MCF7) για τη σύγκριση των ARMS δοκιμασιών με το Sequencing (**σχήμα 3.6**). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι το Sequencing δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει το μεταλλαγμένο H1047R και E545K αντίγραφα όταν υπήρχαν σε ένα ποσοστό μικρότερο από το 50 % και το 30 % του συνολικού μίγματος της αντίδρασης αντιστοίχως. Αντίθετα οι δοκιμασίες ARMS/Scorpion ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν την παρουσία ενός μεταλλαγμένου αλληλίου σε ποσοστό 1 % του συνολικού DNA. Τέλος εφάρμοσαν την αναπτυχθείσα μέθοδο σε DNA το οποίο απομονώθηκε από φρέσκους καρκινικούς ιστούς διαφόρων οργάνων για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στο *PIK3CA*. Όπως αποδείχθηκε η

ARMS δοκιμασία αναγνώρισε περισσότερες μεταλλάξεις στα κλινικά δείγματα σε σχέση με την άμεση αλληλούχηση.



Σχήμα 3.6: Οι ευαισθησίες των ARMS δοκιμασιών σε σχέση με το Sequencing.<sup>246</sup>

Η ίδια επιστημονική ομάδα εφάρμοσε την προαναφερθείσα μέθοδο με στόχο την διερεύνηση της ενδεχόμενης χρήσης του cell free DNA (cfDNA) σαν μια πηγή για την ανίχνευση μεταλλάξεων του *PIK3CA* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.<sup>247</sup> Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκε cfDNA από το αίμα ασθενών με μεταστατικό και με τοπικό εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού και αναλύθηκε για τις συχνότερα εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στο *PIK3CA*. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν στο 28 % των προερχόμενων από το πλάσμα cfDNA και στο 21 % των προερχόμενων από τον ορό cfDNA σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού αλλά δεν ανιχνεύθηκαν στο cfDNA όταν αυτό προερχόταν από το αίμα ασθενών με εντοπισμένο καρκίνο του μαστού. Στις περιπτώσεις όπου ταιριάστηκαν τα προερχόμενα από τον όγκο στοιχεία με τα αντίστοιχα από το cfDNA, η συμφωνία (ίδιο προφίλ μεταλλάξεων στο πλάσμα και στον όγκο) ήταν 95 %. Όταν μια μετάλλαξη του *PIK3CA* ήταν παρούσα στον όγκο, το «μάζεμα» στο προερχόμενο από το πλάσμα cfDNA ήταν 80 %. Τα παραπάνω στοιχεία απόδειξαν την δυνατή και ενδεχόμενη χρήση του cfDNA για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Οι Board et



Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού

α). λοιπόν διερευνούν αν ο χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στο cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας προβλεπτικός δείκτης που θα επιτρέψει τον καταμερισμό των ασθενών σε κλινικές δοκιμές θεραπευτικών μέσων που στοχεύουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των PI3Ks.



## Σκοπός της Εργασίας

Το γονίδιο *PIK3CA* φέρει ένα αυξημένο ποσοστό σωματικών μεταλλάξεων ενώ παράλληλα οι μεταλλάξεις αυτές έχουν συσχετιστεί με αντίσταση στη θεραπεία στο φάρμακο Trastuzumab (Herceptin).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* σε κλινικά δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, και συγκεκριμένα σε DNA απομονωμένο από δείγματα ιστών παραφίνης, σε δείγματα DNA απομονωμένου από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC) περιφερικού αίματος και δείγματα πλάσματος ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Η ευαισθησία για την ανίχνευση μεταλλάξεων δεν είναι κρίσιμη όταν αναλύεται ένας σχετικά ομογενής πληθυσμός κυττάρων και όταν τα μεταλλαγμένα κύτταρα αποτελούν συχνό γεγονός μέσα στο συνολικό αριθμό των κυττάρων, όπως είναι η περίπτωση των κληρονομικών μεταλλάξεων. Όμως η μελέτη ενός ετερογενούς πληθυσμού κυττάρων όπως στους καρκινικούς ιστούς όπου μόνο ένα μικρό ποσοστό κυττάρων ενδέχεται να φέρει την μετάλλαξη, όπως και η ανίχνευση μεταλλάξεων στα CTCs, τα οποία αποτελούν εξαιρετικά σπάνια γεγονότα, καθιστά απαραίτητη τη χρήση μιας μεθόδου με ένα υψηλό επίπεδο ευαισθησίας.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία έγινε αρχικά εφαρμογή της μεθόδου HRMA που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριό μας στα πλαίσια προηγούμενης διατριβής ειδίκευσης. Αξολούθησε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου βασιζόμενης στην HRMA και στην ARMS PCR με ευαισθησία κατάλληλη για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A στο εξόνιο 9 του *PIK3CA* στα CTCs.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1. Πρότυπα υλικά

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μαστική καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 (προσφορά του καθηγητή κ. Β. Γεωργούλια, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογίας Καρκίνου, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης), ως θετικός μάρτυρας για τη μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του γονιδίου *PIK3CA*, διότι είναι γνωστό ότι η συγκεκριμένη καρκινική σειρά φέρει και τη συγκεκριμένη μετάλλαξη του γονιδίου. Επίσης χρησιμοποιήθηκε DNA προερχόμενο από το ολικό αίμα υγιών αιμοδοτών ως αρνητικό δείγμα ελέγχου.

#### 4.2 Δείγματα Ελέγχου

Ως δείγματα ελέγχου για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης (FFPEs). Τα δείγματα αυτά είχαν αναλυθεί σε προηγούμενη εργασία με την μέθοδο HRMA<sup>1</sup> που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας από τον Παναγιώτη Βορκά, οπότε είχε επιβεβαιωθεί η παρουσία ή όχι των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *PIK3CA*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα προερχόμενα από καρκινικούς ιστούς για τα οποία είχε επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των συγκεκριμένων μεταλλάξεων και πέντε δείγματα από φυσιολογικούς ιστούς στα οποία δεν υπήρχαν οι μεταλλάξεις.

#### 4.3 Κλινικά Δείγματα

##### 4.3.1 Κλινικά δείγματα ιστών παραφίνης (FFPEs)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 31 δείγματα γενωμικού DNA από μαστικούς ιστούς με καρκίνο μονιμοποιημένων σε μπλοκ παραφίνης (FFPEs). Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από τα νοσοκομεία «Έλενα Βενιζέλου» (προσφορά του Δρ. Σφήκα), μετά την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών. Επίσης στην παρούσα εργασία περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση 75 δειγμάτων γενωμικού DNA ασθενών με καρκίνο του μαστού που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας από τον Π.Βορκά στα πλαίσια της διπλωματικής του διατριβής. Τα συγκεκριμένα δείγματα προέρχονται από το Σοφία Φάρκωνα

εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου της Κρήτης  
(Καθ. Β. Γεωργούλιας)

#### **4.3.1.1 Απομόνωση DNA από ιστούς**

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τους ιστούς παραφίνης (FFPEs) των ασθενών έγινε με το High Pure PCR Template Preparation Kit, (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

#### **4.3.1.2 Πειραματική πορεία**

Η πειραματική πορεία περιελάμβανε τα εξής στάδια:

1. Σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5mL προσθήκη 25-50mg ιστού σε παραφίνη
2. Εμβάπτιση σε ξυλόλιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min
3. Εμβάπτιση διαδοχικά σε αιθανόλη 100%, 80%, 60%, 40% και τελικά σε απεσταγμένο νερό
4. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης του ιστού
5. Προσθήκη 40μL διαλύματος ανασυσταμένης πρωτεΐνάσης K και ανάμειξη των περιεχομένων του σωληναρίου
6. Ολονύχτια επώαση του σωληναρίου σε υδατόλουτρο στους 37 °C
7. Προσθήκη 20μL διαλύματος ανασυσταμένης πρωτεΐνάσης K
8. Επώαση του σωληναρίου για 1h στους 55°C, όπου πραγματοποιείται η λύση του ιστού
9. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης και καλή ανάμειξη
10. Επώαση του σωληναρίου για 10min στους 72°C
11. Προσθήκη 100μL ισοπροπανόλης και ανάμειξη
12. Μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου σε μικροστήλη συνδεδεμένη με σωληνάριο συλλογής
13. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα

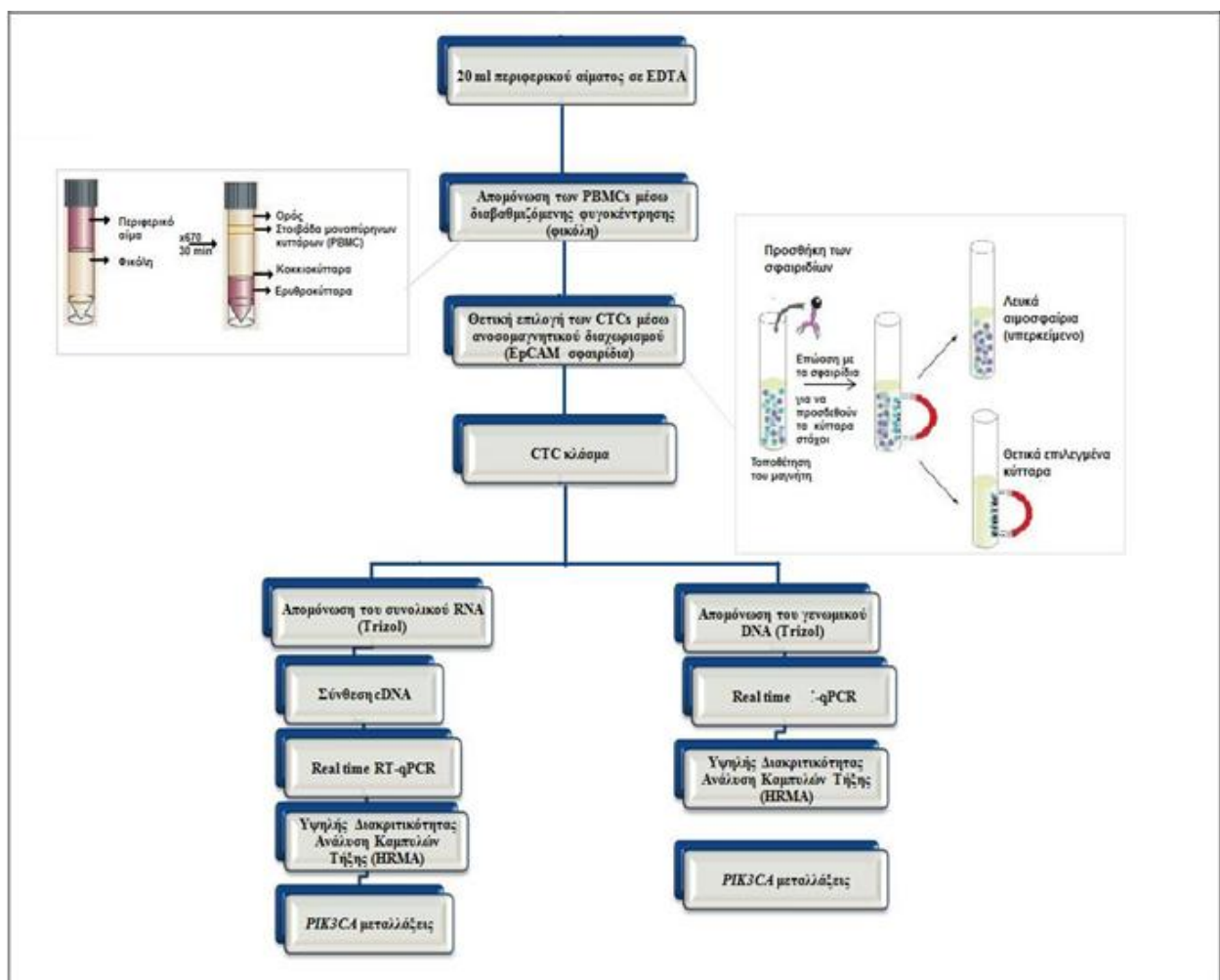
14. Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων
15. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
16. Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
17. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
18. Προσθήκη εκ νέου 500μL διαλύματος έκπλυσης στη μικροστήλη
19. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min
20. Νέα φυγοκέντρηση στα 13000g για 10s και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
21. Τοποθέτηση της μικροστήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5mL
22. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στη μικροστήλη, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70 °C
23. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min, οπότε στο σωληνάριο συλλέγεται το DNA.

#### **4.3.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC)**

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν CTC από περιφερικό αίμα (20 mL) που ελήφθησαν από 57 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας, 34 δείγματα από ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και 24 δείγματα από υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από τα νοσοκομεία «Ιασώ General» και «Έλενα Βενιζέλου», μετά την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ τα δείγματα περιφερικού αίματος των υγιών αιμοδοτών προήλθαν από το Περιφερικό Νοσοκομείο Πατησίων «Αγ. Ανάργυροι» και «Έλενα Βενιζέλου». Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Αρ. Στρατή.

#### 4.3.2.1 Απομόνωση CTCs από περιφερικό αίμα. Απομόνωση DNA, RNA και σύνθεση cDNA από τα CTCs

Από τα παραπάνω δείγματα αρχικά απομονώθηκαν τα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) και ακολούθησε θετικός ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός του κλάσματος των CTC με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα έναντι του επιθηλιακού δείκτη ErCAM. Στη συνέχεια από αυτά απομονώθηκε το γενωμικό DNA και το RNA για τη σύνθεση cDNA. Οι παραπάνω εργασίες πραγματοποιήθηκαν από την Δρ Αρετή Στρατή στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της<sup>248</sup> και παρουσιάζονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.1: Απομόνωση DNA και RNA από τα CTCs και μετέπειτα αναλυτική πορεία.



### 4.3.3 Cell free DNA (cfDNA)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα πλάσματος (20 mL) που ελήφθησαν από 25 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας, 45 δείγματα από ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και 12 δείγματα από υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από τα νοσοκομεία «Ιασώ General» και «Έλενα Βενιζέλου», μετά την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ τα δείγματα περιφερικού αίματος των υγιών αιμοδοτών προήλθαν από το Περιφερικό Νοσοκομείο Πατησίων «Αγ. Ανάργυροι» και «Έλενα Βενιζέλου».

Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε το cell free DNA (cfDNA). Η απομόνωση έγινε από την υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Χειμωνίδου, με βάση το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.2: Πειραματική πορεία για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *PIK3CA* στο cell free DNA

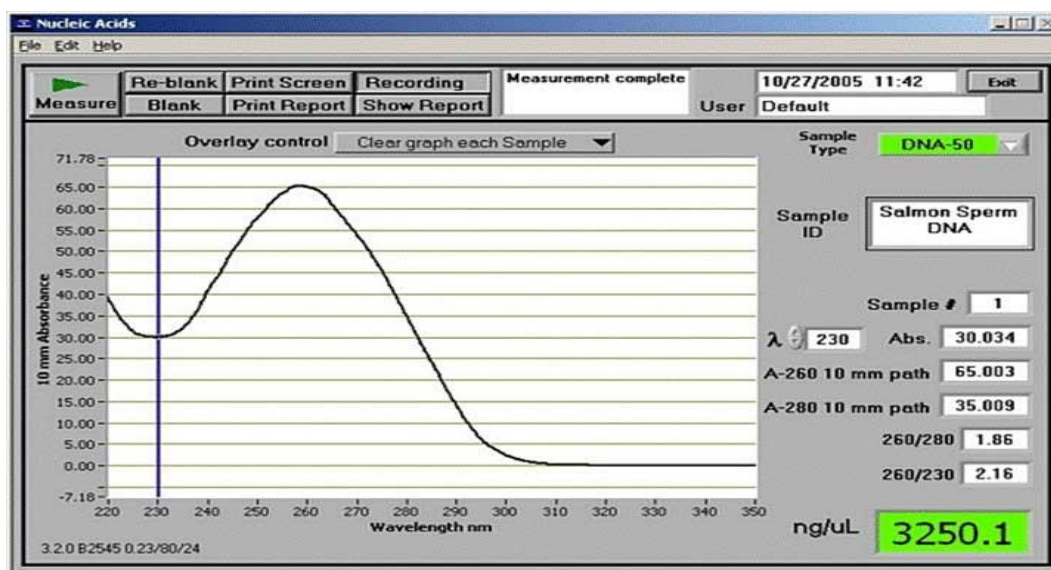
### 4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA πραγματοποιήθηκε στο ειδικό φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000 Spectrophotometer. Το Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) είναι ένα φασματοφωτόμετρο (220-750 nm) που απαιτεί 1  $\mu$ L δείγματος για να μετρήσει με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Έτσι καταργείται η χρήση των κυψελίδων, επιτρέποντας γρήγορο καθαρισμό του οργάνου από δείγμα σε δείγμα Σοφία Φάρκωνα

(Σχήμα 4.1). Επίσης έχει την ικανότητα να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων, χωρίς να χρειάζεται αραίωση (50X μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ό,τι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Το όριο ανίχνευσης είναι 2 ng/μL. Η αναλογία της απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της καθαρότητας του RNA και του DNA. Το δείγμα γίνεται αποδεκτό ως "καθαρό" όταν έχει αναλογία ~1,8, για το DNA, ενώ μία αναλογία ~2.0 είναι αποδεκτή ως "καθαρό" για το RNA. Αν η αναλογία είναι μικρότερη σε κάθε περίπτωση, μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280nm. Στο **σχήμα 4.3** παρουσιάζεται ο χειρισμός του Nanodrop ενώ στο **σχήμα 4.4** παρουσιάζεται χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA.



Σχήμα 4.3: Χειρισμός του Nanodrop: α) τοποθέτηση με πιπέτα 0,5-2,5 μL στην οπή β) Θέση βραχίονα κατά την μέτρηση της απορρόφησης γ) Καθαρισμός της θέσης μετά την μέτρηση.



Σχήμα 4.4: Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop

#### 4.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA, που συντίθενται κατά τη μέθοδο PCR. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των βάσεων τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα, κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε "ζώνες". Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής του DNA με μόρια, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA.

Αρχικά, παρασκευάζεται **πηκτή αγαρόζης 2% (w/v)**, η οποία περιέχει 2,0g αγαρόζη (Sigma, USA), σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE 0,5X (0,5X: διάλυμα αραιωμένο κατά 0,5 φορές) (2M Tris, 1M οξικό οξύ, 50 mM EDTA, pH 7,6), στην οποία προστίθεται 3μL από βρωμιούχο αιθίδιο (5 μg/mL). Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10 μL) αναμιγνύεται με **διάλυμα πλήρωσης (gel-loading buffer)** [5 mL γλυκερόλης, 1mL κυανού της βρωφαινόλης 10%, 1 mL κυανού του ξυλενίου 10%, 250 μL ρυθμιστικό διάλυμα TAE 40X (40X: συμπυκνωμένο κατά 40 φορές) και 2,75 mL H<sub>2</sub>O] σε αναλογία 5:1. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 0,5X, υπό σταθερή τάση 100 V (συσκευή ηλεκτροφόρησης Biorad) για περίπου 30 min. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση διαλύματος του **δείκτη μοριακών βαρών DNA (molecular weight marker)**, [50bp ή 100bp DNA-ladder, extended (Carl Roth GmbH Co. KG)], για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο ύστερα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στα 312 nm.

#### Ψηφιακή φωτογράφιση.

Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει και με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος (gel analyzer

program). Το σύστημα αυτό, αν και οικονομικό, παρέχει εικόνες χαμηλότερης ευκρίνειας σε σχέση με την κλασσική φωτογράφιση.

#### 4.6 Real-time PCR- Οργανολογία

Η μέθοδος PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

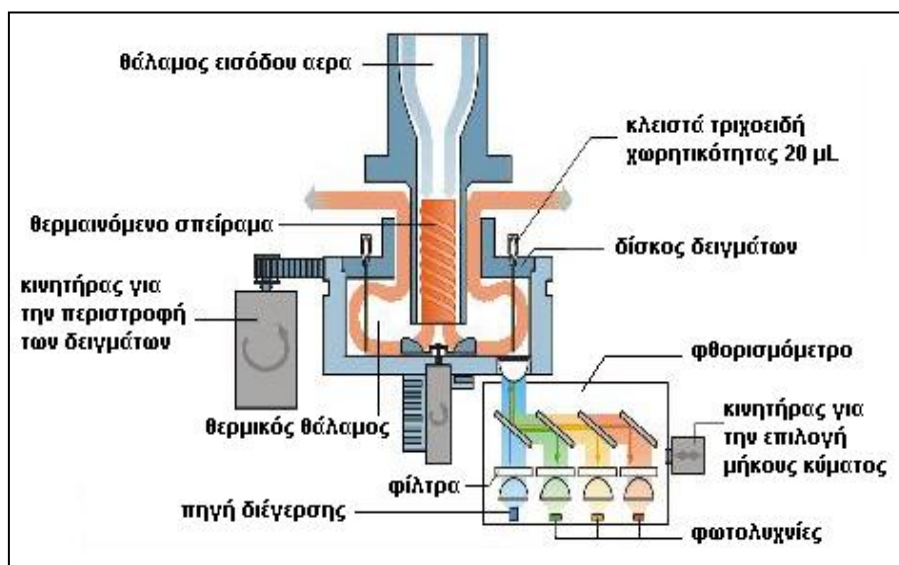
Για την πειραματική μας εργασία, για την ανίχνευση μεταλλάξεων με HRMA, χρησιμοποιήσαμε χρωστικές φθορισμού δέσμησης του dsDNA (LCGreen Plus). Το λαμβανόμενο σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Με την καταγραφή της ποσότητας του εκπεμπόμενου φθορισμού σε κάθε κύκλο είναι δυνατό να παρακολουθείται η αντίδραση κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, όπου η πρώτη σημαντική αύξηση του προϊόντος συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου στόχου. Δηλαδή ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου εξαρτάται από την ποσότητα του DNA- στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχή της αντίδρασης.<sup>249</sup> Όσο περισσότερη αρχική ποσότητα γενετικού υλικού είναι παρούσα κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να οδηγηθεί η αντίδραση στο σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται ως στατιστικώς σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το σήμα υποβάθρου. Αυτό το σημείο ορίζεται ως  $C_q$ .<sup>165</sup>

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για όλους τους προσδιορισμούς με real time PCR, για τις βελτιστοποιήσεις συνθηκών της αντίδρασης και για την ανάλυση των δειγμάτων, ήταν το LightCycler της εταιρίας Roche. Το όργανο LightCycler (Σχήμα 4.12) πραγματοποιεί την αντίδραση PCR μέσα σε γυάλινα τριχοειδή τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο, ενώ η θέρμανση και η ψύξη γίνεται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα. Το όργανο χρησιμοποιεί ένα φθορισμόμετρο με τρία διαφορετικά φίλτρα. Μια μπλε δίοδος (Light Emission Diode, LED), με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη διέγερση των δειγμάτων, ενώ ο φθορισμός ανιχνεύεται στα 530 nm, 640 nm και 710 nm. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής.

α)



β)



Σχήμα 4.5: Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler της Roche και β) της οργανολογίας του.<sup>250</sup>

Για την παρακολούθηση της αντίδρασης PCR ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου (αριθμό δειγμάτων, ονόματα, συγκεντρώσεις, κλπ.) στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια, ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και τέλος επεξεργάζεται τα αποτελέσματα μέσω των αναλυτικών προγραμμάτων.<sup>250</sup>

Κατά την αντίδραση της real-time PCR, όλες οι θερμοκρασιακές μεταβάσεις γίνονται με τον μέγιστο ρυθμό του οργάνου (20°C/s). Επίσης, στο τέλος κάθε προγράμματος προστέθηκε ένα επιπλέον στάδιο, με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95 °C για 2min και ψύξη στους 40 °C για 2min. Κατά αυτό τον τρόπο αφενός ευνοείται ο καλύτερος σχηματισμός ετερόδιπλων κατά την ARMS-HRMA, αφετέρου ο (πρώτος) έλεγχος των παραγόμενων προϊόντων γίνεται με βάση τις καμπύλες τήξης τους, τόσο στην ARMS-PCR όσο και στην ARMS-HRMA αμέσως μετά το πέρας του σταδίου της επέκτασης.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ 1624 A>G ΚΑΙ 1633 G>A ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 9 ΤΟΥ *PIK3CA* ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΗΣ

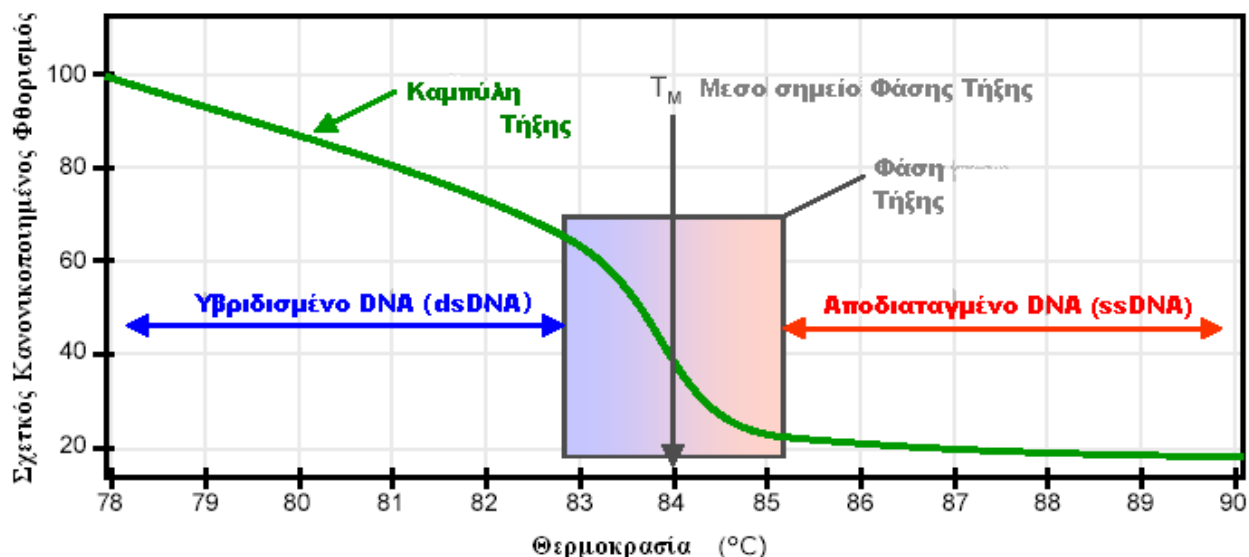
#### 5.1 Εισαγωγή

Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας μεθοδολογία για την ανίχνευση των πιο συχνά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στο *PIK3CA*, με υψηλής διακριτικότητας ανάλυση των καμπυλών τήξης (High Resolution Melting Analysis, HRMA) των παραγόμενων προϊόντων PCR. Η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει τη δυνατότητα γρήγορης και οικονομικής ανίχνευσης των μεταλλάξεων, ενώ η υψηλή της ευαισθησία την καθιστά κατάλληλη για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων οι οποίες υπάρχουν συνήθως σε χαμηλά ποσοστά σε δείγματα προερχόμενα από καρκινικούς ιστούς.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε από τον Παναγιώτη Βορκά στα πλαίσια της διατριβής ειδίκευσης του <sup>1</sup>, για την ανίχνευση των συχνά εμφανιζόμενων (hot spot) μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* σε μια σειρά δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, σε δείγματα DNA από ιστούς ακινητοποιημένους σε παραφίνη, σε δείγματα cell free DNA, καθώς και σε δείγματα cDNA. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται στο 1% περίπου, δηλαδή μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία ενός μεταλλαγμένου αλληλίου παρουσία εκατό φυσιολογικών.

#### 5.2 Αρχή της μεθόδου

Μια πρόσφατη καινοτομία, που πρωτοεισήχθηκε με σκοπό την ανάλυση μεταλλάξεων το 1997 και δεν απαιτεί το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR σε πηκτές ή στήλες, βασίζεται στην ανάλυση των καμπυλών τήξης των προϊόντων PCR, με ειδικά όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας. Κάθε δίκλωνο DNA έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ), η οποία προσδιορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA γίνεται μονόκλωνο ή προτιμότερα η θερμοκρασία όπου χάνεται η μισή ελικοειδής μορφή (σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1: Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRM. Με πράσινο η μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό της αρχικής φάσης με υβριδισμένα μόρια, μέσω της δραστηρικής μείωσης φθορισμού της φάσης τήξης στη φάση αποδιάταξης. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς η παρεμβαλλόμενη χρωστική ουσία στο DNA απελευθερώνεται από το δίκλωνο DNA όταν αυτό αποδιατάσσεται. Το μεσαίο σημείο της φάσης τήξης, στο οποίο το ποσοστό μεταβολής του σήματος τήξης είναι μέγιστο, καθορίζει τη θερμοκρασία της τήξης ( $T_m$ ).

Αυτές οι  $T_m$  διαφέρουν ανάλογα με τις εξής παραμέτρους: α) το μήκος του δίκλωνου DNA, β) το βαθμό περιεχομένου βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης, GC (η  $T_m$  είναι υψηλότερη όσο πιο πλούσιο το μόριο του DNA σε GC λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους), γ) την αλληλουχία και δ) των βαθμών συμπληρωματικότητας μεταξύ των κλώνων.<sup>251, 252</sup>

Η ανάλυση με καμπύλες τήξης στηρίζεται στην προσθήκη επισημασμένων ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηθετών ή μορίων που φθορίζουν όταν δεσμεύονται με δίκλωνο DNA, κατά την αντίδραση της PCR. Μετά την αντίδραση, μια καμπύλη τήξης παράγεται από τη θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR παρουσία του ιχνηθέτη ή της χρωστικής, κατά την οποία προκύπτουν μεταβολές στα σήματα φθορισμού όταν το προϊόν PCR αποδιατάσσεται ή «τήκεται» και ο ιχνηθέτης αποδεσμεύεται από το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού.

Όπως αναφέραμε, κάποιες από αυτές τις μεθόδους δεν απαιτούν εξειδικευμένους ιχνηθέτες για κάθε εφαρμογή, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ουσίες που φθορίζουν παρουσία δίκλωνου DNA, όπως η χρωστικές SYBR Green I, LC Green, και LC Green Plus. Αυτές οι χρωστικές έχουν την ιδιότητα να δεσμεύονται στο δίκλωνο (υβριδισμένο) DNA και ενόσω το μόριο είναι δίκλωνο, φθορίζουν έντονα. Αντίθετα κατά



την αποδιάταξη του DNA, αποβάλλονται ενώ ταυτόχρονα ο φθορισμός τους μειώνεται σημαντικά. Αυτή η μέθοδος δεν απαιτεί ιχνηθέτες ή ακριβή οργανολογία γενικότερα, ενώ ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει ως προς την απλότητά της, ιδιαίτερα στο στάδιο της βελτιστοποίησης των συνθηκών. Αυτοί είναι και οι βασικότεροι λόγοι για τους οποίους η χρήση φθορίζουσών χρωστικών όλο και αυξάνει. Συγκεκριμένα, δεν απαιτείται PCR σε πραγματικό χρόνο ή για συγκεκριμένο αλληλόμορφο, ούτε εξειδικευμένους ιχνηθέτες, αλλά μόνο δύο εκκινητές (primers), ένα απλό θερμικό κυκλοποιητή PCR και ένα όργανο τήξης. Σήμερα, για την ανάκτηση των καμπύλων τήξης, χρησιμοποιούνται κυρίως αυτές οι χρωστικές. Εκτενέστερα, θα δούμε τις λεπτομέρειες για την ιχνηθέτηση στη συνέχεια.

Τα όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας μπορούν να λαμβάνουν αξιόπιστα σήματα φθορισμού ακόμα και ανά 0.002°C. Έχουν την ικανότητα να ανακτήσουν μέχρι 50 σημεία σήματος για κάθε βαθμό Κελσίου. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο ενδιαφέρον παρατηρείται από την επιστημονική κοινότητα για την τεχνική αυτή με τη χρήση της να διευρύνεται συνεχώς.

### 5.3 Οργανολογία

Για την ανάκτηση των καμπύλων τήξης, χρησιμοποιήθηκε το όργανο HR-1 (**σχήμα 5.2**), το οποίο αποτελεί το πρώτο όργανο υψηλής διακριτικότητας ανάλυσης τήξης που κυκλοφόρησε (Idaho Technology, Salt Lake City, USA) και είναι σχεδιασμένο αποκλειστικά για HRM ανάλυση. Το όργανο αυτό έχει τη δυνατότητα να τρέξει ένα τριχοειδές (στο οποίο περιέχονται τα PCR προϊόντα) ανά μέτρηση και αποτελείται από το θερμικό θάλαμο, το φθορισμόμετρο, τμήματα- οδηγούς, ηλεκτρονικά εξαρτήματα και την ηλεκτρική παροχή. Ο κρύος αέρας εισέρχεται μέσα στο θερμικό θάλαμο και ρυθμίζει τη θερμοκρασία των γυάλινων τριχοειδών όπου βρίσκονται τα δείγματα. Ο ανεμιστήρας διασφαλίζει την αποτελεσματική κυκλοφορία του αέρα και την σωστή και ομοιογενή θερμοκρασία. Το HR-1, που όπως αναφέρθηκε είναι αποκλειστικά για HRM ανάλυση, σε σχέση με άλλα όργανα, όπως οι κυκλοποιητές, έχει τη σημαντική διαφορά στον τρόπο μετάδοσης της θερμότητας, ακόμα και σε σχέση με τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται για HRM ανάλυση. Η θέρμανση επιτυγχάνεται με διαβίβαση ρεύματος μέσω ενός καλωδίου που τυλίγεται γύρω από έναν κύλινδρο αργιλίου και περιβάλλει τον τριχοειδή γιάλινο σωλήνα. Το άκρο του τριχοειδούς τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής.



**Σχήμα 5.2: Το όργανο HR-1. (Idaho Technology, USA)**

Για την παρακολούθηση της αποδιάταξης-τήξης, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και τέλος επεξεργάζεται τα αποτελέσματα μέσω λογισμικών προγραμμάτων.

Για την ανάκτηση των καμπυλών τήξης των προϊόντων της ARMS-PCR χρησιμοποιήθηκε και το Light Cycler της Roche, αφού από τη στιγμή που καθορίστηκε η πειραματική θερμοκρασία τήξης αυτών, δεν ήταν αναγκαία η ανάλυση των αντίστοιχων καμπυλών με την λεπτομέρεια που παρέχει το όργανο HR-1. Τα όργανα της real-time PCR, αν και χρησιμοποιούνται για ανάλυση τήξης, στην ουσία θεωρούνται ως πρόδρομα των HRM οργάνων στην ανάλυση με καμπύλες τήξης.

#### **5.4 Παράμετροι που επηρεάζουν την διακριτικότητα**

Υπάρχουν πολλές παράμετροι που επηρεάζουν την υψηλή ευκρίνεια ενός οργάνου HRM καθορίζοντας έτσι την ορθότητα και ακρίβεια του, οι οποίοι είναι η θερμική ομοιογένεια, ο θερμοκρασιακός έλεγχος, η ανάκτηση δεδομένων θερμοκρασίας και φθορισμού, η πυκνότητα δεδομένων (σημεία/ °C), η ένταση σήματος, η ένταση θορύβου, ο ρυθμός τήξης, ο χρόνος ολοκλήρωσης και η μετατροπή του σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό, των δυαδικών ψηφίων.<sup>251, 253</sup>

## 5.5 Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Η ανάλυση τήξεως εκμεταλλεύεται τις αλλαγές που προκύπτουν στην καμπύλη τήξεως. Η διαφοροποίηση μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: α) Αλλαγές στο σχήμα της καμπύλης τήξης και β) Διαφορά στο σημείο τήξης  $T_m$ .

Για τη διαφοροποίηση αυτή τα μόρια DNA χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Όταν ένα μόριο δίκλωνου DNA είναι πλήρως συμπληρωματικό ως προς τις βάσεις των δύο κλώνων του, ονομάζεται ομόδιπλο. Ενώ όταν δύο υβριδισμένοι κλώνοι, αλληλόμορφοι, δεν είναι πλήρως συμπληρωματικοί, αλλά σχηματίζουν ένα δίκλωνο μόριο, διαφέροντας μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες βάσεις, τότε το δίκλωνο αυτό μόριο, ονομάζεται ετερόδιπλο. Η διαφορά μεταξύ των καμπύλων τήξης δεν είναι πάντοτε διακριτή. Για να γίνει εμφανής η διαφορά μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων απαιτείται επεξεργασία των αποτελεσμάτων, που περιλαμβάνει μία ή περισσότερες από τις εξής διαδικασίες:

- Σχεδόν πάντοτε κανονικοποίηση (**normalization**) των καμπύλων τήξεως θέτοντας τον μέγιστο φθορισμό ως το 100% και τον ελάχιστο στο 0% σε κάθε καμπύλη.
- καμπύλες θερμοκρασιακής-μετατόπισης (**temperature-shifted** ή **temperature-overlay curves**), επιθέτοντας τις κανονικοποιημένες καμπύλες σε χαμηλού ποσοστού φθορισμό. Η θερμοκρασιακή-μετατόπιση, δηλαδή, γίνεται σε επίπεδο επεξεργασίας αποτελεσμάτων και αποδίδει μια καινούργια σειρά από καμπύλες. Έχει σκοπό να ενισχύσει οπτικά τη δυνατότητα διάκρισης και σύγκρισης των ετεροζυγωτών από τους ομοζυγώτες και πολλές φορές και μεταξύ τους σε μελέτες γονοτύπωσης. Συνηθίζεται η επιλογή της μετατόπισης να είναι σε περιοχή μέχρι το 5% του φθορισμού, αναπόφευκτα όμως σε όργανα χαμηλότερης ποιότητας δεδομένων, χρειάζεται μια περιοχή μέχρι 20%. Τίποτα δεν απαγορεύει, παρόλα αυτά, η μετατόπιση να γίνει σε υψηλότερα ποσοστά φθορισμού, με στόχο πάντα την πιο άνετη και εύκολη οπτική διάκριση των καμπύλων κάθε προϊόντος.
- Κατασκευή της καμπύλης πρώτης παραγώγου του λαμβανόμενος σήματος φθορισμού [-dF/dT].
- Καμπύλες διαφοράς φθορισμού (**fluorescence difference curves**) από την καμπύλη «wild type», που υπολογίζεται αφαιρώντας την κάθε ανακτηθείσα

καμπύλη – τη μέση τιμή της - από τη μέση τιμή της καμπύλης «φυσικού τύπου»  
Χρησιμοποιείται πλέον ευρύτατα στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε μελέτες γονοτύπωσης.<sup>251</sup>

Οι καμπύλες τήξης είναι δυνατό να επηρεαστούν από τους εξής παράγοντες: τη συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, την ιονική ισχύ, μεταβολές στη συγκέντρωση  $Mg^{2+}$ , το είδος της χρωστικής, τη συγκέντρωση της χρωστικής, τον ρυθμό θέρμανσης, τον ρυθμό ψύξης του δείγματος, το μήκος του προϊόντος PCR που αναλύεται και το ποσοστό wild-type προς μεταλλαγμένο στο δείγμα, στη διάκριση των ετεροζυγωτών. Γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η μελέτη βελτιστοποίησης της κάθε μεθόδου.<sup>254</sup>

## 5.6 Χρήση χρωστικών

Οι κύριες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση καμπύλων τήξεως είναι το SYBR Green I και το LC-Green, αν και υπάρχει ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός χρωστικών. Πρέπει επίσης να διευκρινίσουμε ότι στο εμπόριο κυκλοφορούν οι χρωστικές LC-Green I και LC-Green Plus, για της οποίες αναφέρεται ότι έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με μόνη διαφορά το υψηλότερο σήμα φθορισμού του LCGreen Plus.<sup>255</sup> Οι χρωστικές αυτές δεν χρησιμοποιούνται μόνο για προσδιορισμό καμπύλης τήξεως, αλλά και για παρακολούθηση των προϊόντων σε PCR πραγματικού χρόνου.

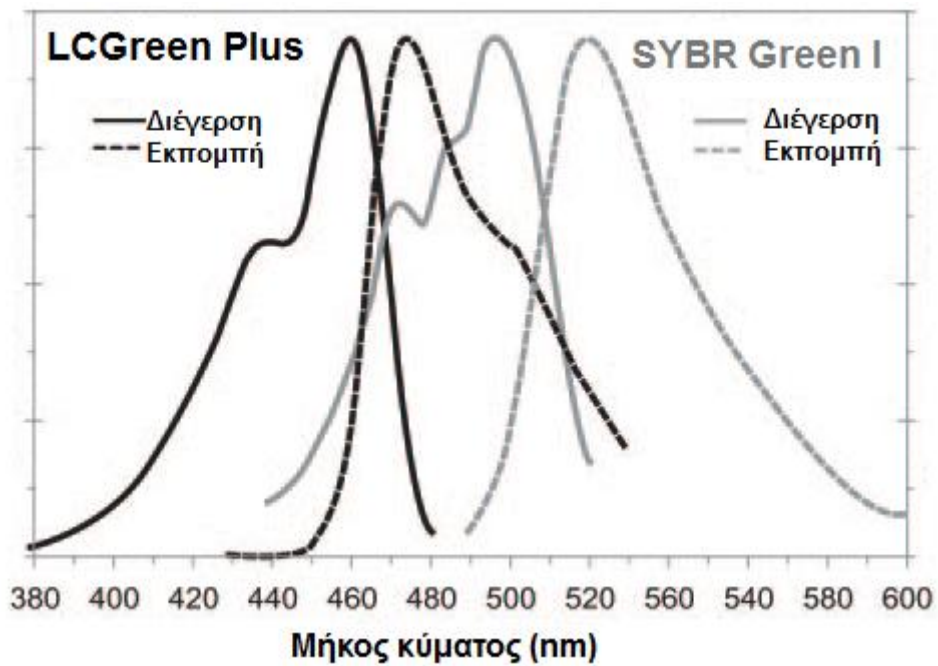
Η χρωστική LC-Green παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 440-470nm και μέγιστη εκπομπή στα 470-520nm, ενώ το SYBR Green I στα 480-510nm και 510- 540nm αντίστοιχα (**Σχήμα 5.3**). Η φθορίζουσα χρωστική, έχει την ικανότητα να προσδένεται στην διπλή έλικα του DNA. Θεωρείται ότι εισέρχεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου και με τη σύνδεσή του σε αυτό, ο φθορισμός του αυξάνει μέχρι 100 φορές. Η ποσότητα χρωστικής που προσδένεται στο νεοσυντιθέμενο δίκλωνο dsDNA, είναι ανάλογη του σήματος φθορισμού, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα τόσο για ποσοτική όσο και ποιοτική ανάλυση. Κατά την αποδιάταξη του dsDNA, όπως συμβαίνει στην περίπτωση ανάλυσης καμπύλης τήξεως, η ένταση του φθορισμού μειώνεται, αφού τα μόρια αποδεσμεύονται από το DNA. Έτσι, μπορούμε να μετρήσουμε την ένταση φθορισμού στο τέλος της επέκτασης των εκκινητών κάθε κύκλου PCR, όπως γίνεται στην PCR πραγματικού χρόνου, αλλά και μετά την ολοκλήρωσή της σε όργανα ανάλυσης καμπύλων τήξεως. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ξεπεράσει το εμπόδιο του ειδικά επισημασμένου με φθορίζουσα ουσία, ανιχνευτή, καθορίζοντας έτσι την

Σοφία Φάρκωνα

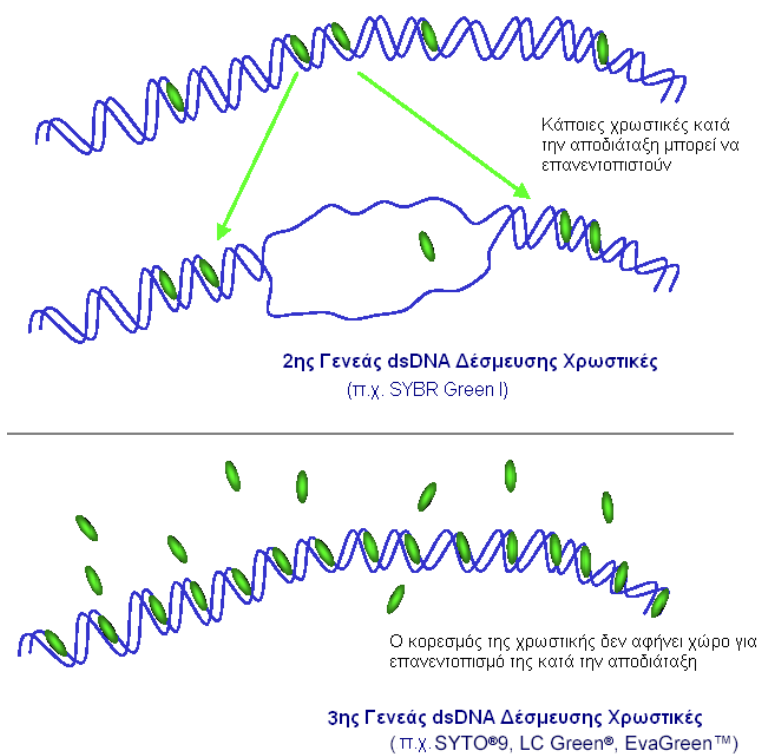
ειδικότητά της αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών. Η έλλειψη ειδικότητας στη δέσμευση, στο δίκλωνο DNA των χρωστικών αυτών, είναι ένα μειονέκτημα, αλλά παράλληλα και πλεονέκτημα. Τα διμερή των εκκινητών, αλλά και των μη ειδικών προϊόντων, ανιχνεύονται, χρησιμοποιώντας τις χρωστικές αυτές, αν και από την άλλη πλευρά δεν χρειάζονται εξειδικευμένα μόρια ή ολιγονουκλεοτίδια για την επισήμανση του παραγόμενου DNA. Στην περίπτωση των διμερών των εκκινητών, κατάλληλη βελτιστοποίηση των συνθηκών, έτσι ώστε να μην παραμένουν διμερή τους μετά το πέρας των κύκλων τις PCR, μπορεί να άρει το μειονέκτημα αυτό. Επίσης, και η κατάλληλη επιλογή της ακολουθίας που θα χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, αφού με την ανάλυση τήξεως, τα διμερή των εκκινητών εάν επιλεχθούν κατάλληλα, θα αποδιαταχθούν σε σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία, έτσι που να μην παρεμποδίζουν την ανάλυση.<sup>254</sup>

Έχει όμως παρατηρηθεί ότι η χρωστική SYBR Green I δίνει ένα αδρό χαρακτηρισμό των όσων είχαν ενισχυθεί, εμποδίζοντας πολλές φορές τη διάκριση ετερόδιπλων και ομόδιπλων αλληλουχιών. Η πιθανότερη εξήγηση σ' αυτό, είναι ότι κατά τη διάρκεια της τήξης, το SYBR Green I αποδεσμεύεται από χαμηλού σημείου τήξης δίκλωνες περιοχές, για να δεσμευτεί με υψηλότερου σημείου περιοχές (**Σχήμα 5.4**), αλλά και από αποδιαταγμένο ssDNA σε dsDNA που δεν έχει ακόμα πλήρως αποδιαταχτεί. Έτσι, αλλοιώνεται η καταγραφή της πραγματικής πορείας της μετάβασης. Ως αποτέλεσμα, το SYBR Green αδυνατεί να δώσει υψηλό σήμα σε μόρια dsDNA που τήκονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αφού όπως παρατηρούμε οι κορυφές χαμηλής θερμοκρασίας είναι πολύ μικρές. Επίσης, δεν μπορεί να χαρακτηριστεί η καμπύλη τήξεως σύμφωνα με τα πραγματικά δεδομένα της θερμικής τους σταθερότητας, δηλαδή δεν θα είναι εμφανής η οποιαδήποτε σταδιακή αποδιάταξη του δίκλωνου DNA που θα μπορούσε να χαρακτηρίσει την καμπύλη αυτή. Αντίθετα, το LC-Green δεν παρουσιάζει ανακατανομή κατά την τήξη του και έτσι αναγνωρίζει καλύτερα τις χαμηλότερου σημείου τήξεως μεταβάσεις. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι το SYBR Green I προτιμά προϊόντα PCR που τήκονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.<sup>256</sup>

Οι φθορίζουσες χρωστικές 3<sup>ης</sup> γενιάς, δεν έχουν ιδιαίτερα ανασταλτική δράση στην PCR, κάτι που σημαίνει ότι μια υψηλότερη συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η υψηλότερη συγκέντρωση χρωστικών ουσιών αυξάνει τα επίπεδα κορεσμού του δίκλωνου DNA με τα μόρια χρωστικών ουσιών. Ο κορεσμός θεωρείται ότι μειώνει τα φαινόμενα ανακατανομής χρωστικών ουσιών κατά τη διάρκεια της DNA αποδιάταξης, αυξάνοντας τη διακριτικότητα της ανάλυσης καμπύλων τήξης.<sup>254</sup>



Σχήμα 5.3: Φάσμα φθορισμού των LC Green Plus και SYBR Green I



Σχήμα 5.4: Ανακατανομή των χρωστικών ουσιών παρεμβολής στο DNA κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης του DNA. <sup>254</sup>

## 5.7 Ανίχνευση των μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A στο εξόνιο 9 του *PIK3CA*

### 5.7.1 *In silico* σχεδιασμός εκκινητών<sup>1</sup>

Ως *in silico* μελέτη ονομάζεται η υπολογιστική μελέτη που γίνεται με σκοπό τον καλύτερο σχεδιασμό της μεθόδου. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Primer Premier 5.0. Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί γενικά ένα ζεύγος εκκινητών συνοψίζονται παρακάτω:

- Η πιο σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι η 3' περιοχή του εκκινητή, λόγω του ότι η ενίσχυση ξεκινά από την περιοχή αυτή. Γενικά, αυτά τα άκρα πρέπει να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές, να μην περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες και εκφυλισμένες αλληλουχίες.
- Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους, έτσι ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινητών.
- Συνιστάται οι δύο εκκινητές να χαρακτηρίζονται από ανάλογη περιεκτικότητα σε βάσεις GC και με Tm σε όμοιες θερμοκρασίες.
- Η περιεκτικότητα των εκκινητών σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40% και 70%.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πάντοτε υψηλής καθαρότητας.
- Η αλληλουχία-στόχος είναι προτιμότερο να είναι μια "ισορροπημένη" περιοχή, δηλαδή να περιλαμβάνει ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων A, T, G, C και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, ή επαναλαμβανόμενη.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε από το Βορκά Π. με βάση τα παραπάνω κριτήρια. Η αλληλουχία του γενωμικού DNA, όπως αυτή λαμβάνεται από τη GeneBank, παρουσιάζεται στο **σχήμα 5.5** Η περιοχή που ενισχύεται καλύπτει τμήμα του εξονίου 9 και το προϊόν έχει μήκος 92bp. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται είναι η μετατροπή της αδενίνης (A) σε γουανίνη (G) στη θέση 1624 και η μετατροπή της γουανίνης (G) σε αδενίνη (A) στη θέση 1633.

```
aatgaaataaattatTTTacaacagTTaattagcaatgtaaaatttattgaaaatgtatttgctttttc
tgtaaatcatctgtgaaTccagaggggaaaaaatatgacaaagaaagctatataagatatttttatttt
acagAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCA
AAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTTCTAT
GGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGAattctctgtttctttttctttattacagaaaaaa
taactgaaTTTggctgatctcagcatgtttttaccatacctattggaataaataaagcagaatttacatg
atTTTtaactataaacattgccttttttaaaaac
```

Σχήμα 5.5: Η αλληλουχία του εξονίου 9 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. Με κεφαλαία παρουσιάζεται το εξόνιο και με μικρά τα ιντρόνια. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις, με μοβ οι βάσεις στις οποίες διαφέρει με την ομόλογη αλληλουχία του ψευδογονιδίου και με περίγραμμα οι εκκινητές. Ο πρόσθιος εκκινητής με κίτρινο χρώμα ενώ ο ανάστροφος με γαλάζιο.

### 5.7.2 Συνθήκες Real-time PCR για το εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA*

Στον **πίνακα 5.1** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο.

**Πίνακας 5.1:** Χαρακτηριστικά εκκινητών real-time HRMA-PCR. Τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5´-3´	nt	T <sub>m</sub>	Προϊόν
Πρόσθιος	GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA	24	61.0 °C	92bp
Ανάστροφος	TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC	24	58.4 °C	

Στον **πίνακα 5.2** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για το εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA*.



**Πίνακας 5.2:** Συστατικά της αντίδρασης real-time HRMA PCR για το εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA*

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Πρόσθιος εκκινητής	10μM	0.3	0,3 μM
Ανάστροφος εκκινητής	10μM	0.3	0,3 μM
dNTP's	10mM	0.4	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.0	2.5 mM
BSA	10μg/μL	0.15	0.15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2.0	1 X
Ταq πολυμεράση (Promega)	5U/μL	0.1	0.05U/μL
LCGreen I	10X	1.0	1X
H <sub>2</sub> O	-	3.75	-
Δείγμα DNA	25ng/μL	1.0	2.5ng/μL
<b>Συνολικός όγκος (μL)</b>		<b>10</b>	

Στον **πίνακα 5.3** παρουσιάζονται οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.3: Συνθήκες PCR για το εξόνιο 9 του *PIK3CA*

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2 min	} 60 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 5 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	67°C/ 20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C/ 20sec	
Σταθεροποίηση του προϊόντος	60°C/10sec	
Διαχωρισμός Κλώνων DNA	95°C/ 1 min	
Σχηματισμός ετεροζυγωτών / Ψύξη	40°C/ 1 min	

Μετά από το στάδιο ενίσχυσης (amplification) έχουμε προσθέσει το στάδιο ανάκτησης των καμπυλών τήξης, ώστε μετά το τέλος της αντίδρασης να μπορούμε να ελέγξουμε παρατηρώντας τόσο την καμπύλη όσο και τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος ότι πρόκειται για το επιθυμητό προϊόν. Με βάση το το Primer Premier, το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε για τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινητών, η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του προϊόντος είναι 81.0°C. Οποιαδήποτε άλλη μετάβαση αποδεικνύει την ύπαρξη παραπροϊόντος.

Για την ανάλυση των καμπυλών τήξης PCR προϊόντων με υψηλή διακριτικότητα, τα δείγματα αναλύονται χρησιμοποιώντας το όργανο HR-1, που περιγράφηκε προηγουμένως. Στον **πίνακα 5.4** παρουσιάζονται οι συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξης που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.4: Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως

Πρόγραμμα	92bp PCR προϊόν
Ρυθμός τήξης	0.2°C/ s
Θερμοκρασία ψύξης	60 °C
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης	70 °C
Θερμοκρασία λήξης	90 °C

## **5.8 Εφαρμογή μεθοδολογίας για ανάλυση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA* σε κλινικά δείγματα**

Η παραπάνω μεθοδολογία, η οποία παρουσιάζει ευαισθησία της τάξεως του 1% για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του *PIK3CA*, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο κλινικών δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εξετάστηκαν δείγματα DNA των κατηγοριών που ακολουθούν:

- 117 δείγματα DNA που απομονώθηκαν από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs): 57 ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 34 ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και 26 υγιών αιμοδοτών.
- 87 δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs περιφερικού αίματος: 57 ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 9 ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και 21 υγιών αιμοδοτών.
- 82 δείγματα cell free DNA που απομονώθηκαν από πλάσμα περιφερικού αίματος: 25 ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 45 ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και 12 υγιών αιμοδοτών.

### 5.8.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και μεταλλάξεων G>A σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs

Στον πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φυσιολογικών δειγμάτων.

**Πίνακας 5.5:** HRMA αποτελέσματα από την ανάλυση καμπύλων τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	12N	-	14	25N	-
2	13N	-	15	26N	-
3	14N	-	16	27N	-
4	15N	-	17	28N	-
5	16N	-	18	29N	-
6	17N	-	19	30N	-
7	18N	-	20	31N	-
8	19N	-	21	32N	-
9	20N	-	22	33N	-
10	21N	-	23	34N	-
11	22N	-	24	35N	-
12	23N	-	25	36N	-
13	24N	-	26	37N	-
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/26 δείγματα υγιών</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

Στον **πίνακα 5.6** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

**Πίνακας 5.6: Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης**

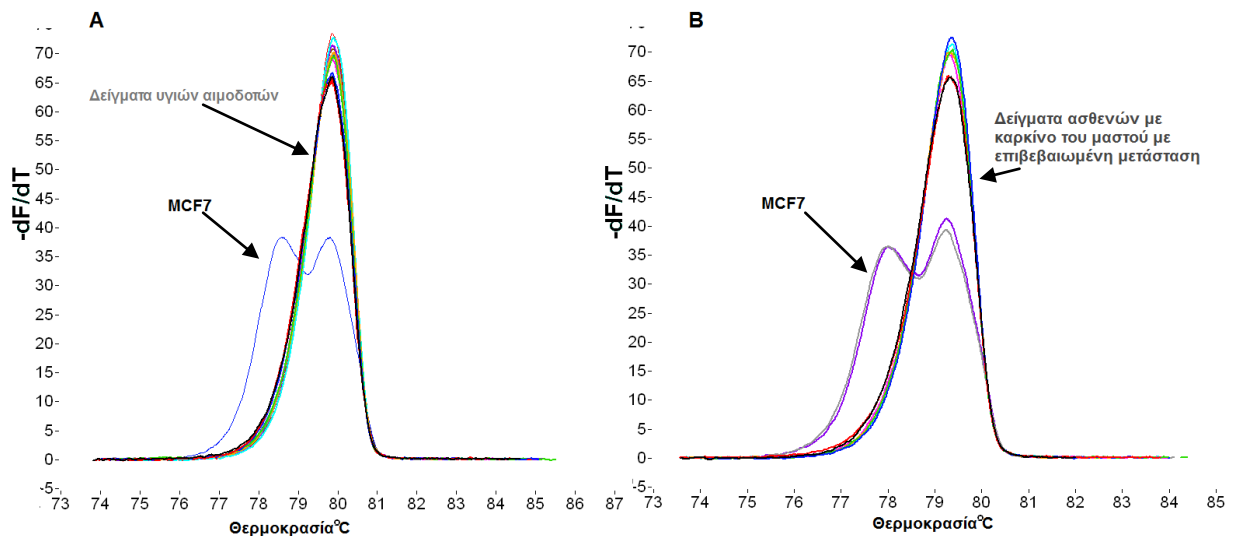
α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	MET14	-	18	MET41	-
2	MET17	-	19	MET42	-
3	MET24	-	20	MET43	-
4	MET25	-	21	MET44	-
5	MET26	-	22	MET46	-
6	MET27	-	23	MET47	-
7	MET28	-	24	MET48	-
8	MET31	-	25	MET49	-
9	MET32	-	26	MET50	-
10	MET33	-	27	MET51	-
11	MET34	-	28	MET52	-
12	MET35	-	29	MET53	-
13	MET36	-	30	MET54	-
14	MET37	-	31	MET55	-
15	MET38	-	32	MET56	-
16	MET39	-	33	MET57	-
17	MET40	-	34	MET58	-
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/34 δείγματα ασθενών με μετάσταση</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

Στον **πίνακα 5.7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων των ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού.

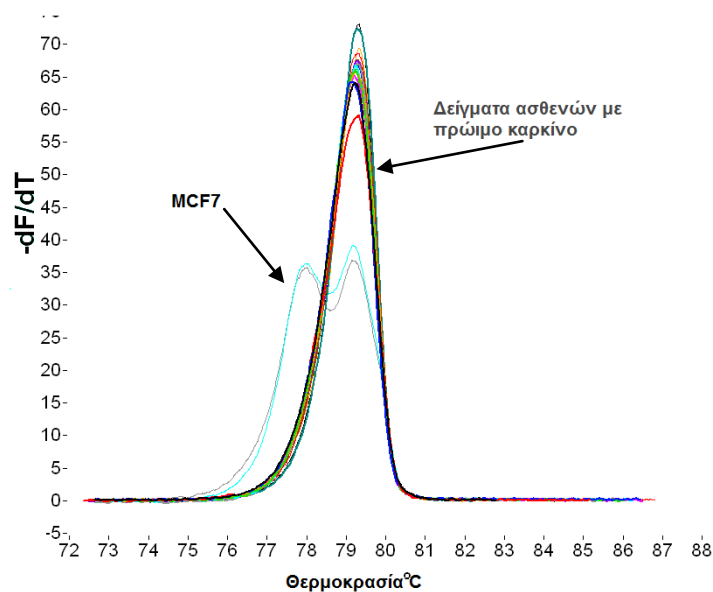
**Πίνακας 5.7: HRMA ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	1314	-	30	IA287	-
2	1320	-	31	IA289	-
3	1323	-	32	IA290	-
4	1325	-	33	IA293	-
5	1332	-	34	IA294	-
6	1337	-	35	IA295	-
7	1340	-	36	IA299	-
8	1341	-	37	1367	-
9	1352	-	38	1368	-
10	1353	-	39	1370	-
11	1355	-	40	1371	-
12	1356	-	41	1372	-
13	1361	-	42	1373	-
14	IA257	-	43	1375	-
15	IA258	-	44	1387	-
16	IA259	-	45	1389	-
17	IA260	-	46	1369	-
18	IA261	-	47	1374	-
19	IA262	-	48	1394	-
20	IA263	-	49	1396	-
21	IA265	-	50	1397	-
22	IA269	-	51	1400	-
23	IA270	-	52	1401	-
24	IA276	-	53	1403	-
25	IA277	-	54	1408	-
26	IA288	-	55	1409	-
27	IA283	-	56	1416	-
28	IA284	-	57	1417	-
29	IA285	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/57 δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφόμενα όπου φαίνονται οι καμπύλες πρώτης παραγώγου που προέκυψαν από την ανάλυση των καμπυλών τήξης των προϊόντων PCR των παραπάνω δειγμάτων. Στο **σχήμα 5.6A** παρουσιάζονται τα δείγματα των υγιών αιμοδοτών, στο **σχήμα 5.6B** τα δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ενώ στο **σχήμα 5.7** τα δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο. Παρατηρούμε ότι κανένα από τα παραπάνω δείγματα δεν παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου.



**Σχήμα 5.6:** Καταγραφόμενα καμπυλών τήξεως A. δειγμάτων υγιών αιμοδοτών B. δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού με επιβεβαιωμένη μετάσταση.



**Σχήμα 5.7:** Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού.

### 5.8.2 Ανίχνευση των μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν δείγματα cDNA που συντέθηκαν από το mRNA που απομονώθηκε από CTCs 57 ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού, 9 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού καθώς και 21 υγιών αιμοδοτών. Οι κωδικοί των δειγμάτων και τα αποτελέσματα της ανάλυσης HRMA παρουσιάζονται στους πίνακες 5.8, 5.9, και 5.10.

Πίνακας 5.8: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs υγιών αιμοδοτών

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	17N	-	12	28N	
2	18N	-	13	29N	
3	19N	-	14	30N	
4	20N	-	15	31N	-
5	21N	-	16	32N	-
6	22N	-	17	33N	-
7	23N	-	18	34N	-
8	24N	-	19	35N	-
9	25N	-	20	36N	-
10	26N	-	21	37N	-
11	27N	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/21 δείγματα υγιών αιμοδοτών</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					



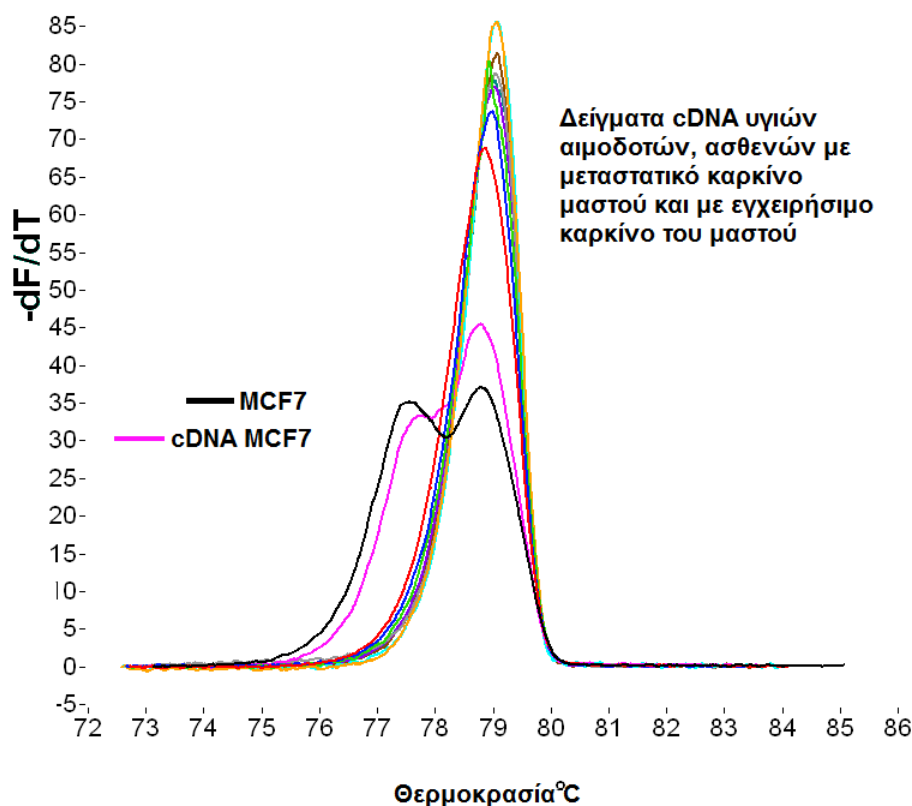
**Πίνακας 5.9: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	MET37	-	6	MET43	-
2	MET38	-	7	MET44	-
3	MET39	-	8	MET45	-
4	MET40	-	9	MET46	-
5	MET42	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/9 δείγματα ασθενών με μετάσταση</b> <b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

**Πίνακας 5.10: HRMA ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	1314	-	30	IA287	-
2	1320	-	31	IA289	-
3	1323	-	32	IA290	-
4	1325	-	33	IA293	-
5	1332	-	34	IA294	-
6	1337	-	35	IA295	-
7	1340	-	36	IA299	-
8	1341	-	37	1367	-
9	1352	-	38	1368	-
10	1353	-	39	1370	-
11	1355	-	40	1371	-
12	1356	-	41	1372	-
13	1361	-	42	1373	-
14	IA257	-	43	1375	-
15	IA258	-	44	1387	-
16	IA259	-	45	1389	-
17	IA260	-	46	1369	-
18	IA261	-	47	1374	-
19	IA262	-	48	1394	-
20	IA263	-	49	1396	-
21	IA265	-	50	1397	-
22	IA269	-	51	1400	-
23	IA270	-	52	1401	-
24	IA276	-	53	1403	-
25	IA277	-	54	1408	-
26	IA288	-	55	1409	-
27	IA283	-	56	1416	-
28	IA284	-	57	1417	-
29	IA285	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/57 δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

Στο παρακάτω καταγράφημα (σχήμα 5.8) φαίνονται οι πρώτες παράγωγοι των ανακτηθεισών καμπυλών τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων, των μεταστατικών και των δειγμάτων των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού.



Σχήμα 5.8: Καταγράφημα καμπυλών τήξεως στο οποίο φαίνεται ότι κανένα δείγμα από τις παραπάνω κατηγορίες των δειγμάτων (υγιών ατόμων, ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση μεταστατικοί και με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού) δεν παρουσιάζουν μετάβαση μεταλλαγμένου *PIK3CA*.

### 5.8.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα cell free DNA

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα cell free DNA που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα 25 ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού (adjuvant), 45 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο καθώς και 12 υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες 5.11, 5.12 και 5.13.

**Πίνακας 5.11: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα υγιών αιμοδοτών**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	18N	-	7	32N	-
2	19N	-	8	33N	-
3	20N	-	9	34N	-
4	21N	-	10	35N	-
5	22N	-	11	36N	-
6	31N	-	12	37N	-
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/12 δείγματα φυσιολογικών αιμοδοτών</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 0%</b>					

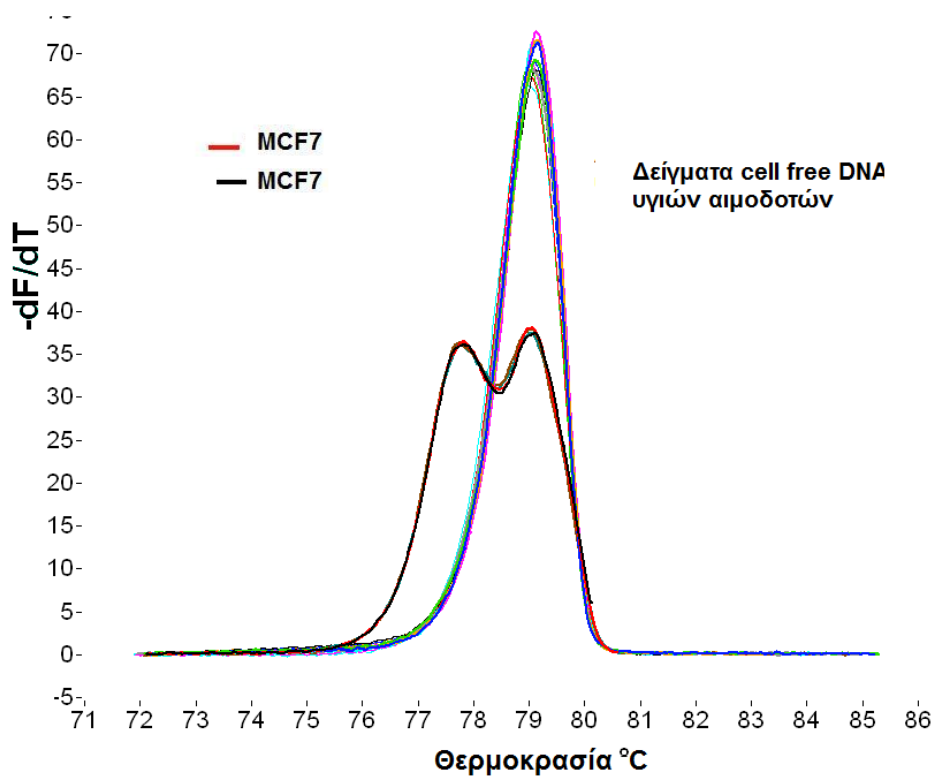
**Πίνακας 5.12: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	240B	-	14	265B	+
2	241B	-	15	266B	-
3	242B	-	13	267B	-
4	243B	-	17	270B	-
5	244B	-	18	271B	-
6	245B	-	19	272B	-
7	248B	-	20	273B	-
8	249B	-	21	274B	-
9	252B	-	22	275B	-
10	255B	-	23	276B	-
11	256B	-	24	279B	-
12	258B	-	25	280B	-
13	260B	-	26		
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 1 μεταλλαγμένο δείγμα/25 δείγματα ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού ΠΟΣΟΣΤΟ 4%</b>					

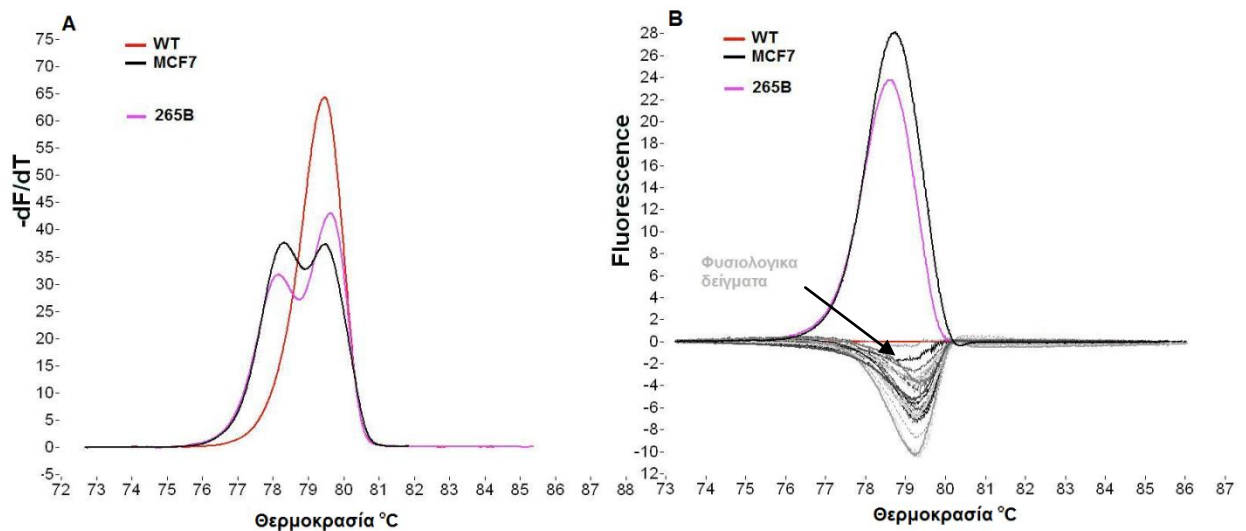
**Πίνακας 5.13: HRMA ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από πλάσμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού**

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	281B	-	24	304B	-
2	282B	-	25	305B	-
3	283B	-	26	306B	-
4	284B	-	27	307B	-
5	285B	-	28	308B	-
6	286B	-	29	309B	-
7	287B	-	30	310B	-
8	288B	-	31	311B	-
9	289B	-	32	312B	-
10	290B	-	33	313B	-
11	291B	-	34	314B	-
12	292B	-	35	315B	-
13	293B	-	36	316B	-
14	294B	-	37	317B	-
15	295B	-	38	318B	-
16	296B	-	39	319B	-
17	297B	-	40	320B	+
18	298B	-	41	321B	-
19	299B	-	42	322B	-
20	300B	-	43	323B	-
21	301B	-	44	324B	-
22	302B	+	45	325B	-
23	303B	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 2 μεταλλαγμένα δείγματα/45 δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο</b> <b>ΠΟΣΟΣΤΟ 4.4 %</b>					

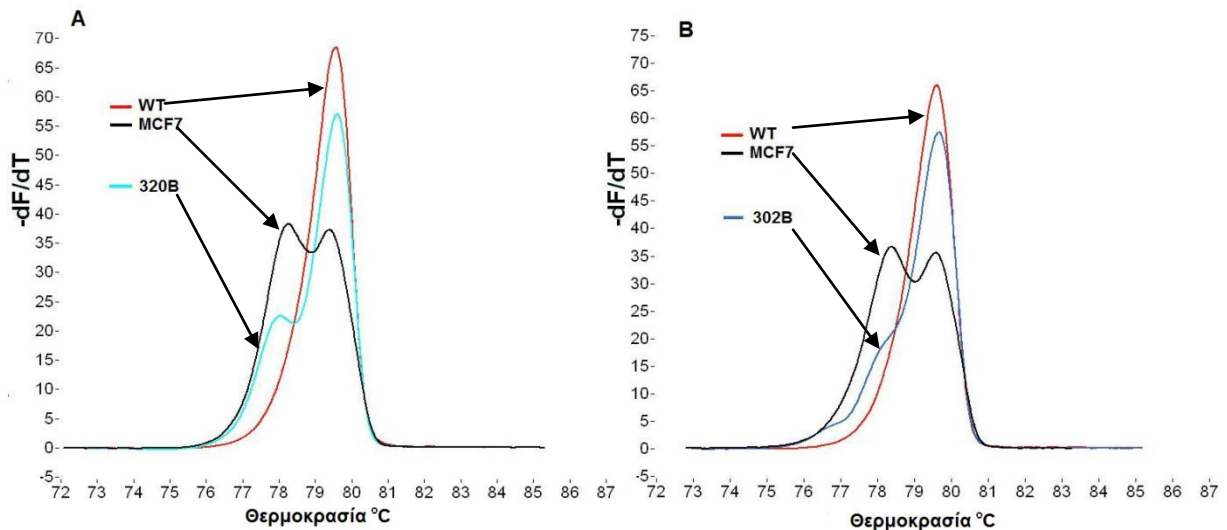
Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφίματα από την ανάλυση καμπυλών τήξεων των δειγμάτων υγιών αιμοδοτών (σχήμα 5.9), και των δειγμάτων που παρουσίασαν μετάβαση μεταλλαγμένου από τους ασθενείς με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού (σχήμα 5.10) και από τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (σχήμα 5.11 και 5.12).



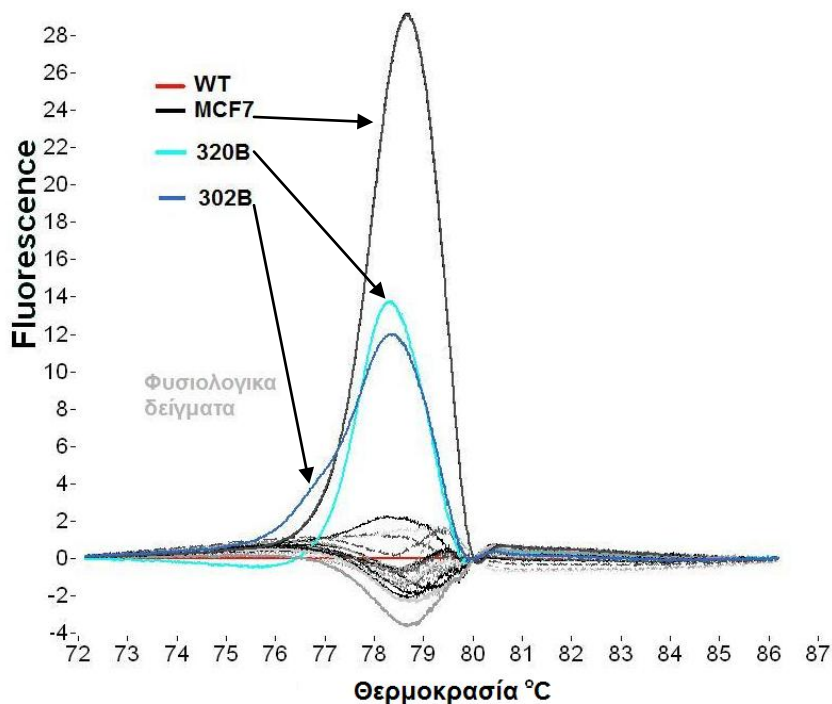
Σχήμα 5.9: Καταγράφημα καμπυλών τήξεων cell free DNA υγιών αιμοδοτών.



Σχήμα 5.10: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεων cell free DNA ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού. A) Στο διάγραμμα πρώτης παραγώγου το δείγμα 265B παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου B) Στο διάγραμμα διαφοράς φθορισμού ο φθορισμός του δείγματος 265B παρουσιάζει απόκλιση από τη γραμμή βάσης όπως και ο θετικός μάρτυρας ελέγχου, η κυτταρική σειρά MCF7



Σχήμα 5.11: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεων cell free DNA ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού A) Στο διάγραμμα πρώτης παραγώγου το δείγμα 320B παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου B) Στο διάγραμμα πρώτης παραγώγου 302B παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου.



Σχήμα 5.12: Καταγράφημα καμπύλης διαφοράς φθορισμού ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Παρατηρούμε ο φθορισμός των δειγμάτων 320B και 302B παρουσιάζει απόκλιση από τη γραμμή βάσης των φυσιολογικών.



#### **5.8.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων 1624 A>G και 1633 G>A σε δείγματα γενωμικού DNA από FFPEs ασθενών με καρκίνο του μαστού.**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο το μονοπάτι της PI3K/PTEN εμπλέκεται στην αντίσταση στη θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab. Όταν η λειτουργία του PTEN χαθεί, το PI3K παραμένει αδιάκοπα ενεργό ανεξαρτήτως δέσμησης του Trastuzumab στο HER2. Οι μεταλλάξεις στην PI3K έχουν επίσης εμπλακεί στην ανοχή στο Trastuzumab μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K/AKT.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν με την HRMA για την ανίχνευση των δύο πιο συχνά εμφανιζόμενων μεταλλάξεων στο εξόνιο 9, 31 δείγματα γενωμικού DNA προερχόμενο από τους ιστούς ασθενών (FFPEs) με καρκίνο του μαστού,. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης που διενεργείται από το εργαστήριό μας σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο της Κρήτης, η οποία έχει σαν στόχο τον έλεγχο της συσχέτισης του μονοπατιού PI3K/PTEN με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab. Οι παραπάνω ασθενείς έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού, έχουν λάβει θεραπευτική αγωγή με Trastuzumab και γνωρίζουμε την ανταπόκριση που έδειξαν στη θεραπεία αυτή, καθώς και όλα τα κλινικά τους στοιχεία.

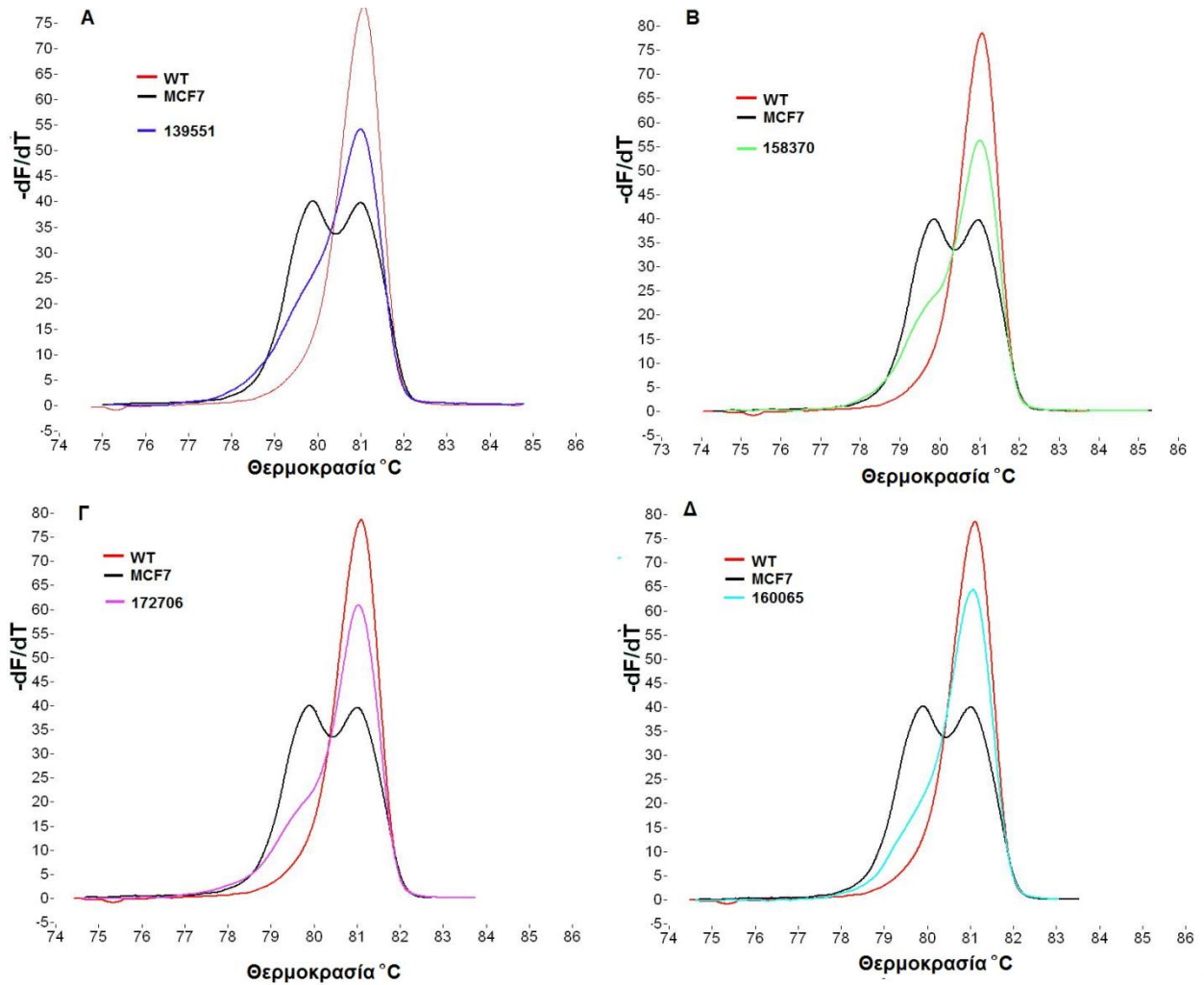
Στον **πίνακα 5.14** που ακολουθεί καταγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των παραπάνω δειγμάτων.

Πίνακας 5.14: HRMA ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού

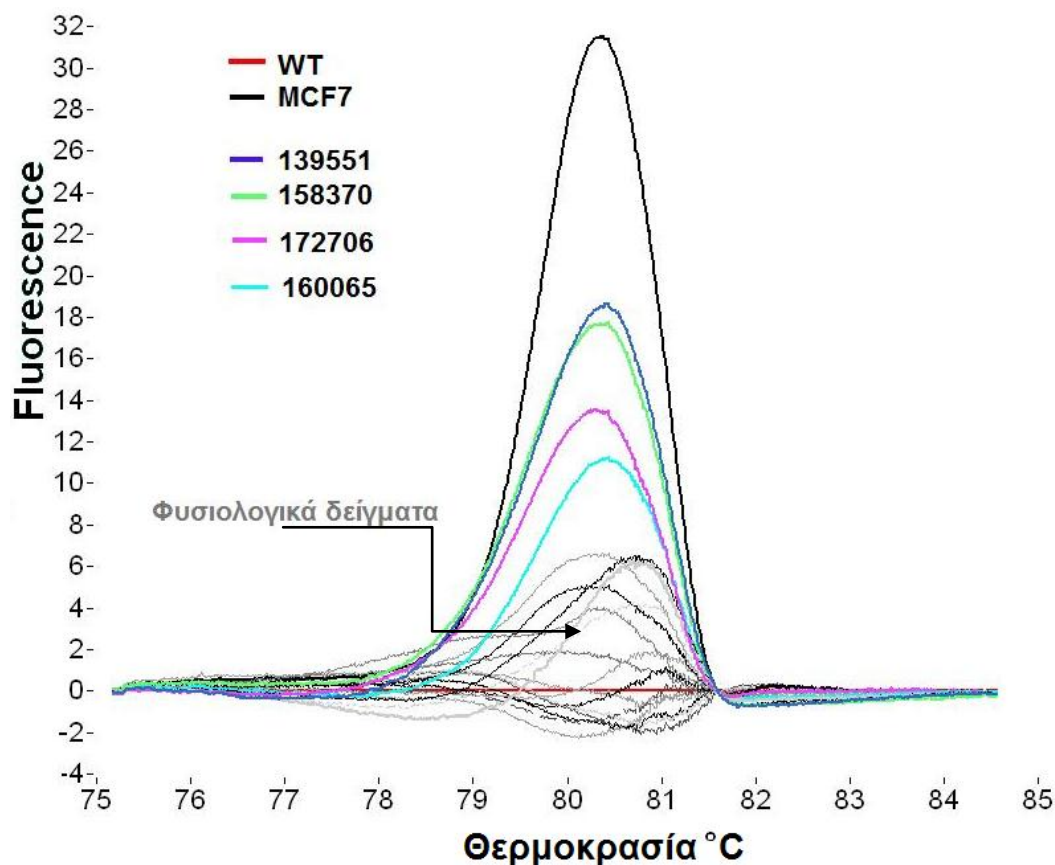
α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	189326	-	17	8596	-
2	180643	-	18	34133	+
3	159115	-	19	3572/08	-
4	193576	-	20	128800	-
5	160065	+	21	129631	-
6	199900	-	22	1199	+
7	201307	-	23	37809/08	+
8	182339	-	24	204086	-
9	172706	+	25	09-18M3	-
10	158370	+	26	5019	-
11	139551	+	27	37702	-
12	108675	-	28	518/10	-
13	83044B	-	29	1853Γ	-
14	101177	-	30	5198/02	-
15	772/06	-	31	2718/06Δ	-
16	110682	-			
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 7 μεταλλαγμένα δείγματα/31 δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 22.5 %</b>					

Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφήματα ανάλυσης καμπυλών τήξεως, όπου παρουσιάζονται οι πρώτες παράγωγοι των τεσσάρων δειγμάτων που παρουσιάζουν μετάβασης μεταλλαγμένου (σχήμα 5.13 A, 5.13B, 5.13Γ και 5.13Δ) και ένα κατάγραφο διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζεται η απόκλιση του φθορισμού των παραπάνω δειγμάτων σε σχέση με τη γραμμή βάσης των φυσιολογικών (σχήμα 5.14).

Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού

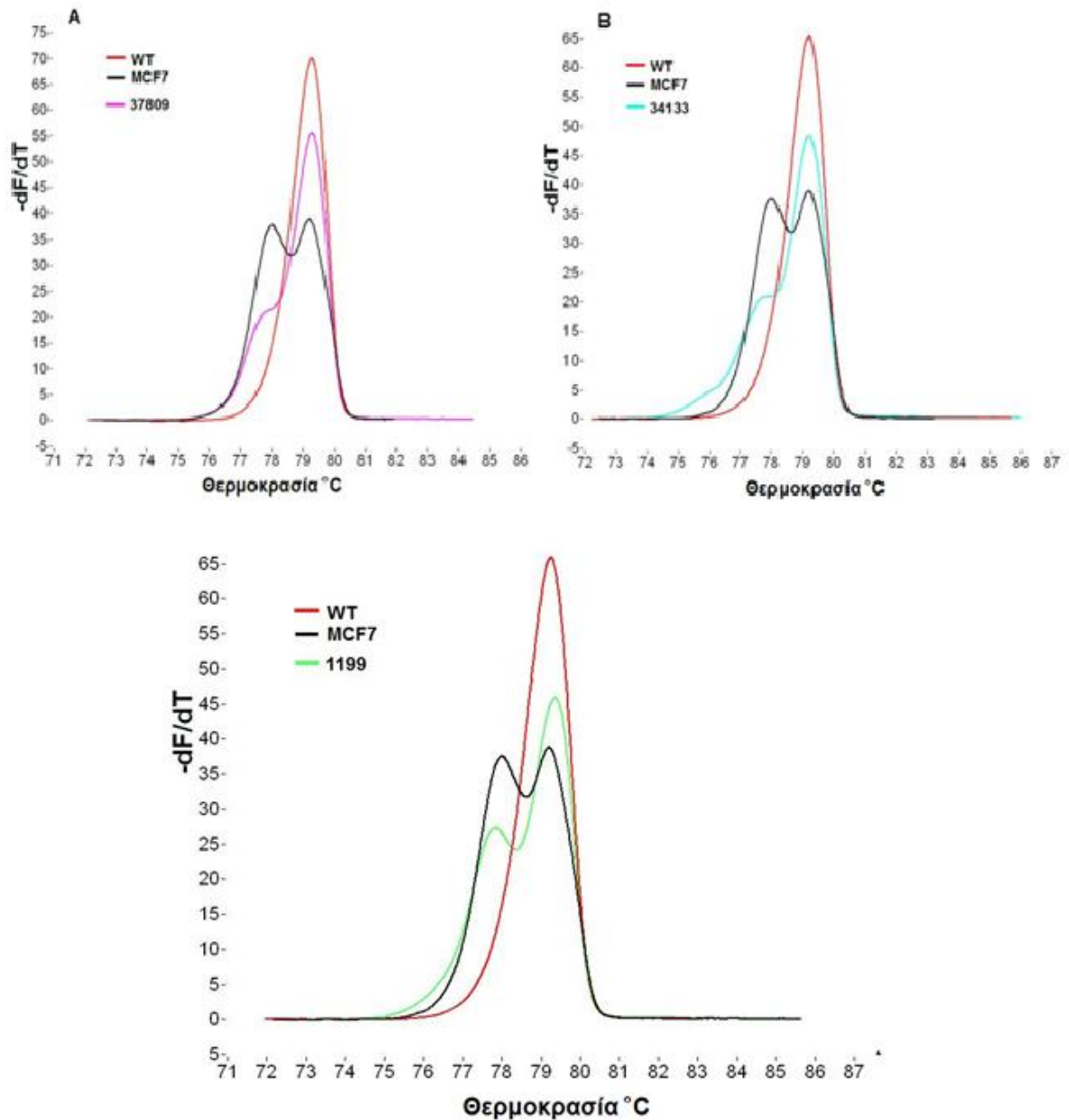


Σχήμα 5.13: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. Α) Το δείγμα 139551 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου, Β) Το δείγμα 158370 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου, Γ) Το δείγμα 172706 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου, Δ) Το δείγμα 160065 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου.

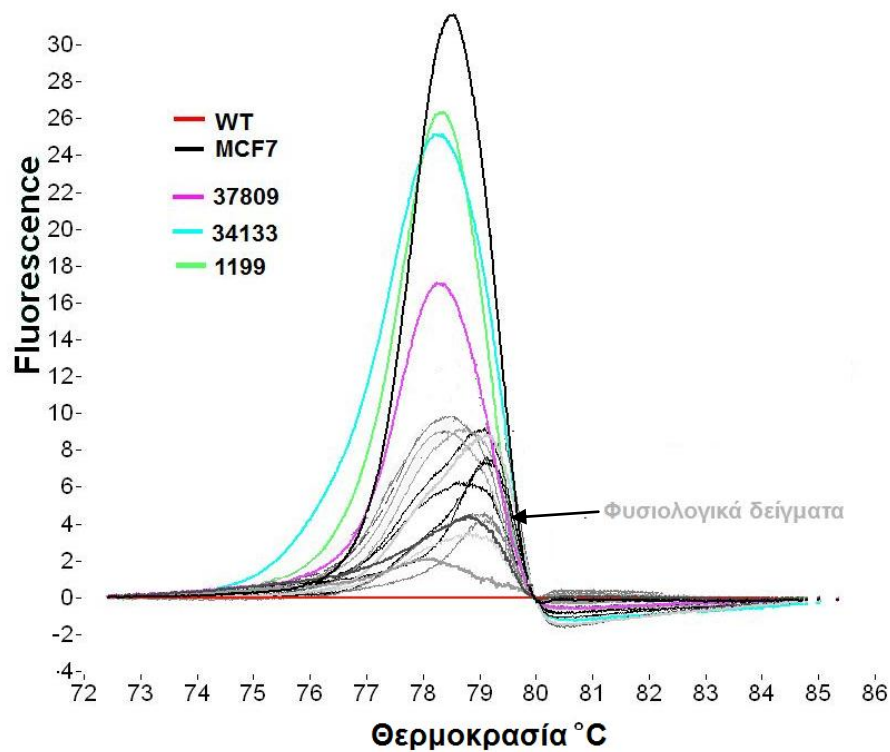


Σχήμα 5.14: Καμπύλες διαφοράς φθορισμού. Ο φθορισμός των δειγμάτων 139551, 158370, 172706 και 160065 παρουσιάζει απόκλιση από τη γραμμή βάσης των φυσιολογικών.

Ακολουθούν τα καταγραφήματα ανάλυσης καμπυλών τήξεως, όπου παρουσιάζονται οι πρώτες παράγωγοι των υπόλοιπων τριών δειγμάτων που παρουσιάζουν μετάβαση μεταλλαγμένου (σχήμα 5.15 A, 5.15B, 5.15Γ) και ένα καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζεται η απόκλιση του φθορισμού των παραπάνω δειγμάτων σε σχέση με τη γραμμή βάσης των φυσιολογικών (σχήμα 5.16).



Σχήμα 5.15: Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. Α) Το δείγμα 37809 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου, Β) Το δείγμα 34133 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου Γ) Το δείγμα 1199 παρουσιάζει μετάβαση μεταλλαγμένου.



Σχήμα 5.16: Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού. Ο φθορισμός των δειγμάτων 37809, 341333 και 1199 διαφέρει από τη γραμμή βάσης των φυσιολογικών.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης είχαν αναλυθεί στο εργαστήριο μας, από το Βορκά Παναγιώτη στα πλαίσια της διατριβής του ειδίκευσης, 75 ακόμα δείγματα ιστών παραφίνης για την ίδια κατηγορία ασθενών( μελέτη αντίκρισης στο Trastuzumab). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται στον **πίνακα 5.15**.

Πίνακας 5.15: HRMA ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού (2008)

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A	α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 1624 A>G ή 1633 G>A
1	50719I	-	38	30790M	-
2	106554	-	39	55745Γ	-
3	6797	-	40	4785	-
4	B1924	-	41	95428A	-
5	09530	-	42	947	-
6	64206	-	43	4096	-
7	2090	-	44	48808Z	-
8	0-2831	-	45	93568	-
9	5375	-	46	81038	-
10	34592A	-	47	1448/8	-
11	105917G	-	48	69093Z	-
12	R82B	-	49	13084	-
13	92048G	-	50	25280-02	-
14	145782B	-	51	01-1625	-
15	48349Θ	-	52	103207G	-
16	16843	+	53	1731	-
17	5964	-	54	55224B	-
18	110540G	-	55	69277H	-
19	111673G	-	56	154899	-
20	197998T	-	57	1528/04	-
21	61690	-	58	H67	+
22	94914B	-	59	H26	-
23	88603A	-	60	206990T	-
24	5052	-	61	0-228	-
25	3813	-	62	71721K	-
26	8495	-	63	64345Γ	-
27	49384B	-	64	66640E	-
28	53800I	-	65	993689	-
29	28413A	-	66	03223B	-
30	153715	-	67	56774	-
31	9492	-	68	56493	-
32	136314B	-	69	52350A	-
33	10715	-	70	0-8484	-
34	8546	-	71	2228	-
35	10398	+	72	4444	+
36	39940M	-	73	26467Z	-
37	94767	+	74	99962G	-
			75	88154Γ	+
<b>ΣΥΝΟΛΟ: 6 μεταλλαγμένα δείγματα/75 δείγματα ασθενών με καρκίνο</b>					
<b>ΠΟΣΟΣΤΟ 8 %</b>					

Συνοψίζοντας, χρησιμοποιώντας την HRMA ελέγξαμε συνολικά 106 δείγματα DNA από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. Από αυτά 13 εμφανίζουν μετάβαση μεταλλαγμένου και άρα είναι θετικά είτε στην μετάλλαξη 1624 G>A είτε στην μετάλλαξη 1633 G>A. Συμπερασματικά το ποσοστό εμφάνισης των δύο αυτών μεταλλάξεων είναι 12.2%.

Σε επόμενο στάδιο τα συγκεκριμένα δείγματα θα μελετηθούν ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης PTEN με ανοσοϊστοχημεία. Οι αντίστοιχοι ασθενείς έχουν λάβει ήδη θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab και τα αποτελέσματα της ανταπόκρισής τους σε αυτή μας είναι γνωστά. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα θα επεξεργαστούν προκειμένου να εξαχθεί ένα συνολικό συμπέρασμα ως προς τη σχέση του μονοπατιού PI3K/PTEN με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab.

## 5.9 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφηκε συνοπτικά η αρχή της μεθόδου που στηρίζεται στην ανάλυση καμπυλών τήξης με υψηλή διακριτικότητα, για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η HRMA, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας από τον Παναγιώτη Βορκά στα πλαίσια της διπλωματικής του ειδίκευσης, για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα αναλύσαμε 31 δείγματα ενώ συμπεριλάβαμε και τα αποτελέσματα από την ανάλυση 75 ακόμα δειγμάτων που είχε διεξαχθεί στο εργαστήριο μας. Σε ένα σύνολο 106 δειγμάτων λοιπόν, τα 13 από αυτά παρουσίασαν μετάβαση μεταλλαγμένου (12.2%). Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει το αυξημένο ποσοστό των μεταλλάξεων στο *PIK3CA*, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από CTCs, σε δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs, καθώς και σε δείγματα cell free DNA από τις εξής ομάδες ασθενών: Α) υγιείς αιμοδότες (για έλεγχο της διαγνωστικής ειδικότητας της μεθόδου), Β) ασθενείς με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού, Γ) από ασθενείς με επιβεβαιωμένη μετάσταση. Όπως ήταν αναμενόμενο, στις τρεις κατηγορίες δειγμάτων υγιών αιμοδοτών δεν ανιχνεύτηκαν οι μεταλλάξεις. Όσον αφορά τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο, οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 4% μόνο στα cell free DNA δείγματα αλλά όχι στα δείγματα DNA και cDNA που προέρχονταν από τα CTCs. Τέλος όσον αφορά τους ασθενείς με



Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού

χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού, οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν επίσης μόνο στα cell free DNA δείγματα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω η ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει τη ανίχνευση των συχνότερων μεταλλάξεων του εξονίου 9 του *PIK3CA* σε δείγματα cell free DNA αλλά όχι σε δείγματα DNA προερχόμενα από τα CTCs.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 1633 G>A ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 9 ΤΟΥ *PIK3CA* ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

#### 6.1 Εισαγωγή

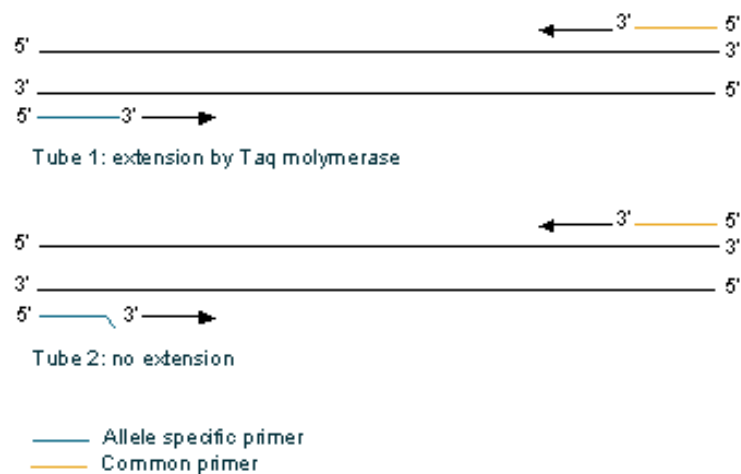
Η μεθοδολογία ARMS-PCR, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, είναι μια μέθοδος που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1989<sup>199</sup>, η οποία πλεονεκτεί έναντι άλλων συστημάτων που χρησιμοποιούν την PCR ως προς την απλότητα, την ταχύτητα με την οποία εξάγονται τα αποτελέσματα αλλά και το χαμηλό της κόστος. Επιπλέον, θεωρητικά, οι δοκιμασίες ARMS μπορούν να αναπτυχθούν για κάθε τύπο σημειακής μετάλλαξης. Ωστόσο, τα πρωταρχικά πρωτόκολλα της ARMS-PCR δεν χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, κυρίως λόγω του ότι οι εκκινητές με μη συμπληρωματική βάση στο 3' άκρο τους μπορούν ακόμη να επεκταθούν μέχρι κάποιο βαθμό κάτω από τις περισσότερες συνθήκες.

Με βάση τα παραπάνω ο στόχος μας ήταν να αναπτύξουμε ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο που θα συνδυάζει τη φιλοσοφία της ARMS PCR με τα πλεονεκτήματα της HRMA. Ένα πρώτο στάδιο της παραπάνω προσπάθειας ήταν ο σχεδιασμός μιας κλασικής μεθόδου ARMS, για την ανίχνευση αλληλίων, τα οποία φέρουν την μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του *PIK3CA*, ώστε να εξοικειωθούμε με τον ιδιαίτερο αυτό τύπο της αντίδρασης. Αφού σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών ειδικό για το αλληλίο που φέρει την μετάλλαξη, ακολούθησε βελτιστοποίηση Α) ως προς τη θερμοκρασία υβριδισμού και Β) ως προς την τελική συγκέντρωση των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης.

#### 6.2 Σχεδιασμός εκκινητών για ARMS PCR

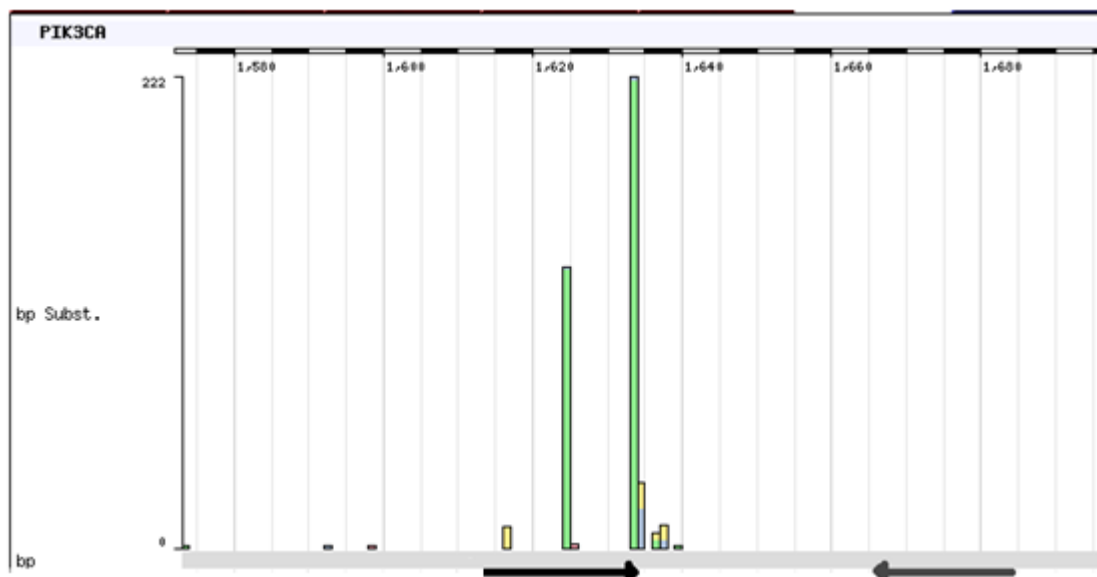
Ο σχεδιασμός ζεύγων εκκινητών για τη διάκριση των μεταλλαγμένων αλληλουχιών από τις φυσιολογικές, απαιτεί την προσεκτική εξέταση της εμπλεκόμενης μετάλλαξης διότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν mismatches που επεκτείνονται πιο αποδοτικά από άλλα από το ένζυμο Taq πολυμεράση.<sup>199, 217</sup> Στη συνέχεια σχεδιάζεται ένας κοινός εκκινητής και δύο αλληλοειδικοί εκκινητές οι οποίοι διαφέρουν κατά μια βάση στο 3' άκρο τους. Η βάση του 3' άκρου του ειδικού για την μετάλλαξη εκκινητή

(mutant primer) είναι συμπληρωματική με αυτήν του μεταλλαγμένου αλληλίου και αντιστοίχως η βάση του 3'κατάλοιπου του εκκινητή του ειδικού για τη φυσιολογική αλληλουχία (wild type primer) είναι συμπληρωματική με αυτήν του φυσιολογικού. Επειδή μία μόνο μη συμπληρωματική βάση στο 3'κατάλοιπο δεν αρκεί για την επίτευξη επαρκούς διάκρισης<sup>199, 217</sup>, ιδιαίτερα όταν η αναλογία των μεταλλαγμένων προς τις φυσιολογικές αλληλουχίες είναι μικρή, ενδείκνυται η εισαγωγή ενός πρόσθετου mismatch 1, 2, ή 3 βάσεις πριν από το 3'κατάλοιπο με στόχο την περεταίρω αποσταθεροποίησή του.



**Σχήμα 6.1:** Ο αλληλοειδικός εκκινητής θα επεκταθεί από την πολυμεράση μόνο αν βάση στο 3'άκρο του είναι συμπληρωματικό με αυτό της αλληλουχίας στόχου. (<http://cf.eqscheme.org/info/public/cf/assayarms.xhtml>)

Οι συχνότερες μεταλλάξεις στην περιοχή του εξονίου 9 του γονιδίου *PIK3CA* για τον καρκίνο του μαστού παρουσιάζονται στο **σχήμα 6.2**. Στην παρούσα εργασία έχουμε προσανατολίσει τις προσπάθειες μας στην ανάπτυξη ARMS μεθόδου για την ανίχνευση της πιο συχνά εμφανιζόμενης μεταξύ αυτών που είναι η 1633 G>A.



Σχήμα 6.2: Όλες οι σωματικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PIK3CA*. Με βέλη παρουσιάζονται οι εκκινητές της ARMS PCR. Το 3' άκρο του πρόσθιου εκκινητή ταυτίζεται με το σημείο της μετάλλαξης 1633 G>A.

### 6.3 ARMS PCR για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A

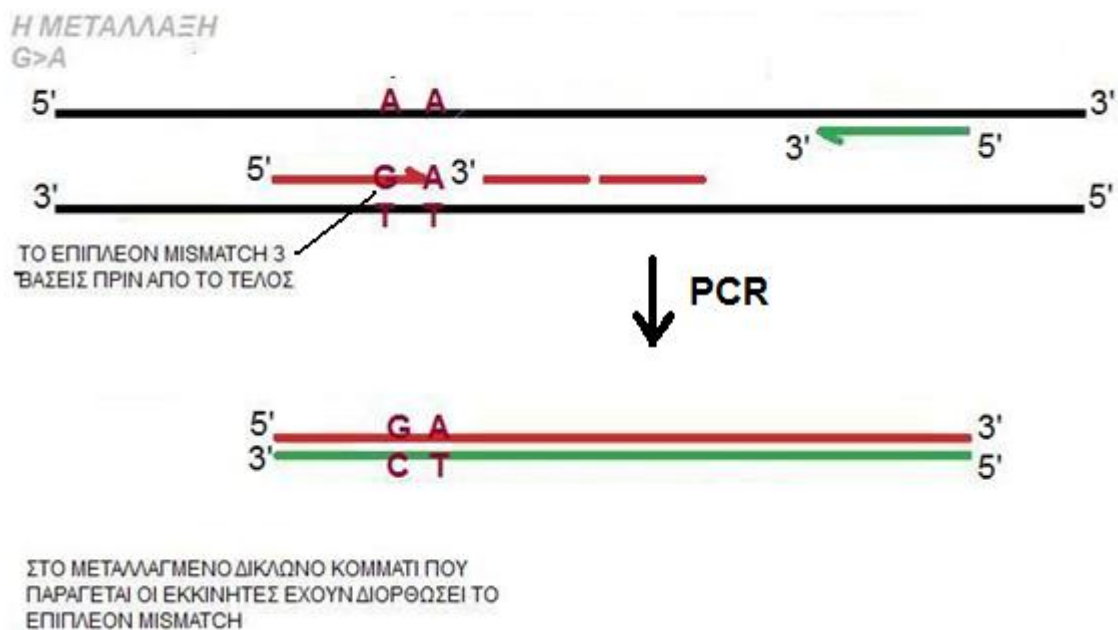
Στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών απόλυτα ειδικό για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία και άλλο ένα ειδικό για τη φυσιολογική. Στην πρώτη περίπτωση, ο αλληλοειδικός εκκινητής (mutant primer), που παράγει τον νοηματικό κλώνο, έχει σχεδιαστεί ώστε να υβριδοποιείται στην αλληλουχία που συνορεύει στο σημείο της μετάλλαξης και η βάση στο 3' άκρο του να είναι συμπληρωματική με εκείνη της μετάλλαξης. Στη δεύτερη περίπτωση η βάση στο 3' άκρο του αλληλοειδικού εκκινητή είναι συμπληρωματική με την αντίστοιχη του φυσιολογικού αλλήλιου. Ο εκκινητής που παράγει τον αντινοηματικό κλώνο είναι κοινός και για τις δύο αλληλουχίες (common primer). Επιπλέον, προκειμένου να αποσταθεροποιηθεί το 3' άκρο του κάθε αλληλοειδικού εκκινητή έχουμε εισάγει μία πρόσθετη μη συμπληρωματική βάση 3 θέσεις εσωτερικά του 3' άκρου (σχήματα 6.4 και 6.5.) Κατά την εφαρμογή των κατάλληλων συνθηκών διεξαγωγής της αντίδρασης PCR παράγεται ένα προϊόν μήκους 68 bp με θεωρητική θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) 78.4 °C (Παράρτημα 1) που αφορά στην πρώτη περίπτωση το μεταλλαγμένο αλλήλιο και στη δεύτερη το φυσιολογικό. Εντούτοις αν ο αλληλοειδικός εκκινητής υβριδοποιηθεί στο μη συμπληρωματικό στο 3' άκρο του εκμαγείο DNA και, λόγω λάθους της πολυμεράσης, επεκταθεί το παραγόμενο προϊόν θα φέρει την αλληλουχία του (σχήμα 6.4) Στο σχήμα 6.3 φαίνεται η περιοχή υβριδοποίησης του ARMS ζεύγους εκκινητών.

Εδώ πρέπει να τονίσουμε ότι ο κοινός εκκινητής είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε το 3' άκρο του να υβριδοποιείται σε αυτά τα δύο νουκλεοτίδια στα οποία η περιοχή που μας ενδιαφέρει διαφέρει με την ομόλογη αλληλουχία του ψευδογονοδίου. Κατά αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η ενίσχυση της αλληλουχίας του ψευδογονιδίου (σχήμα 6.3).

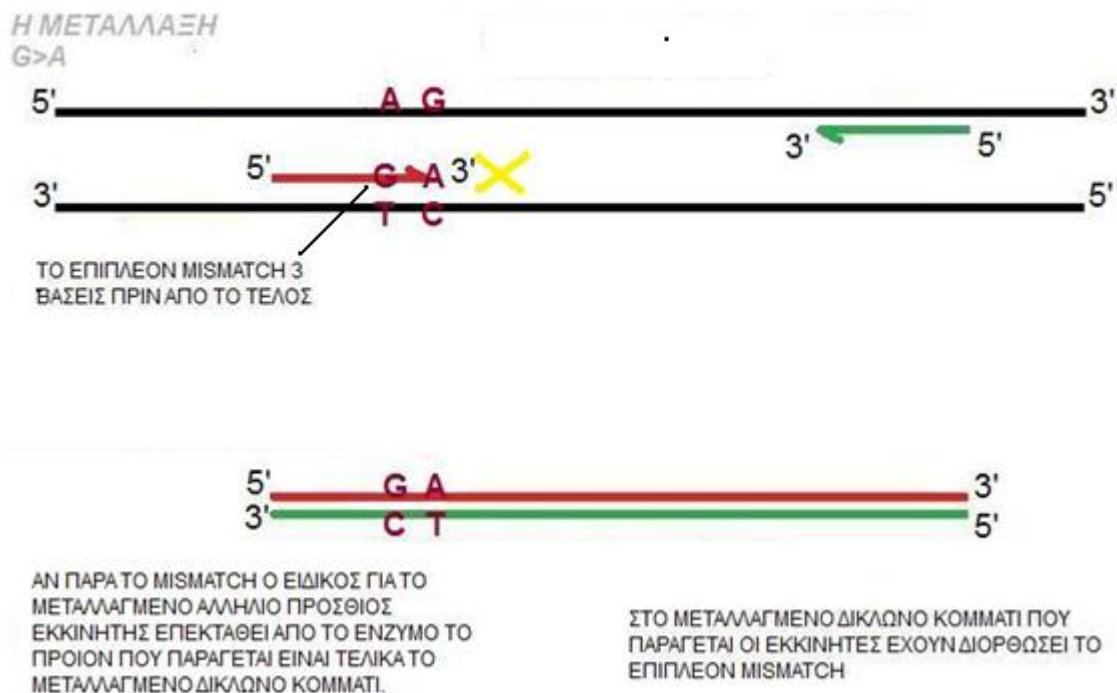
```

aatgaaataaaattatTTTacaacagttaattagcaatgtaaaatttattgaaaatgtatttgctttttc
tgtaaatcatctgtgaatccagaggggaaaaatatgacaaagaaagctatataagatattatTTTatTTT
acagAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCA
AAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTTCTAT
GGACTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGAttctctgtttctttttcttttattacagaaaaaata
actgaaatttggtgatctcagcatgtttttaccatacctattggaataaataaagcagaatttacatgat
ttttaactataaacattgccttttttaaaaac
    
```

Σχήμα 6.3: Η περιοχή υβριδοποίησης του ARMS ζεύγους εκκινητών. Με κεφαλαία παρουσιάζεται το εξόνιο και με μικρά τα ιντρόνια. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται το σημείο της μετάλλαξης, με μοβ οι βάσεις στις οποίες διαφέρει με την ομόλογη αλληλουχία με το ψευδογονίδιο, με γαλάζιο χρώμα η περιοχή υβριδοποίησης του αλληλοειδικού πρόσθιου εκκινητή ενώ με πράσινο χρώμα και με περίγραμμα περιοχή υβριδοποίησης του ανάστροφου κοινού εκκινητή με πράσινο χρώμα.



Σχήμα 6.4: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία εκκινητή (κόκκινο χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. Ο ανάστροφος εκκινητής, απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. Επειδή η βάση στο 3' άκρο του (A) είναι συμπληρωματική με την βάση στο σημείο της μετάλλαξης (T), η πολυμεράση το επεκτείνει οπότε με το πέρας της PCR έχει παραχθεί ένα δίκλωνο κομμάτι που φέρει την μετάλλαξη. Επίσης στο παραγόμενο προϊόν έχει διορθωθεί το επιπλέον mismatch που είχαμε εισάγει εσωτερικά του 3' άκρου για να αποσταθεροποιήσουμε τον εκκινητή.



Σχήμα 6.5: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία εκκινητή σε φυσιολογική αλληλουχία. Το 3' τελικό νουκλεοτίδιο του μεταλλαγμένου εκκινητή δεν είναι συμπληρωματικό της κυτοσίνης που υπάρχει στο αντίστοιχο φυσιολογικό αλληλίο και το 3' άκρο χάρη στην επιπλέον μη συμπληρωματική βάση έχει αποσταθεροποιηθεί οπότε κάτω από κατάλληλες συνθήκες η πολυμεράση δεν θα το επεκτείνει. Αν παρόλα αυτά κάποια στιγμή υπάρξει τελικά αυτή η επέκταση, στους επόμενους κύκλους θα παραχθεί το μεταλλαγμένο δίκλωνο προϊόν.

#### 6.4 Συστατικά και συνθήκες της ARMS PCR για την μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του *PIK3CA*

Στον **πίνακα 6.1** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη αντίδραση.

**Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά εκκινητών της αντίδρασης ARMS PCR**

Εκκινητής	Αλληλουχία 5´-3´	nt	T <sub>an</sub>	Προϊόν PCR
Πρόσθιος	TCCTCTCTCTGAAATCGCTA	20	52.5°C	68bp
Ανάστροφος	TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC	24	58.4 °C	

Στον **πίνακα 6.2** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη αντίδραση.

**Πίνακας 6.2: Συστατικά της αντίδρασης real-time ARMS PCR για το προϊόν 68bp**

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Πρόσθιος εκκινητής	10μM	0.3	0.3 μM
Ανάστροφος εκκινητής	10μM	0.3	0.3 μM
dNTP's	10mM	0.4	0.4 mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.0	2.5 mM
BSA	10μg/μL	0.15	0.15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2.0	1 X
Taq πολυμεράση (Promega)	5U/μL	0.1	0.05U/ μL
LCGreen I	10X	1.0	1X
H <sub>2</sub> O	-	3.75	-
Δείγμα DNA	25ng/μL	1.0	2.5ng/μL
<b>Συνολικός όγκος</b>		<b>10</b>	



Στον **πίνακα 6.3** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη αντίδραση

**Πίνακας 6.3:** Συνθήκες της αντίδρασης *real-time ARMS PCR* για το προϊόν 68bp του εξονίου 9 του γονιδίου *PIK3CA*

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2 min	} 60 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 5 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	63°C/ 20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C/ 20sec	
Σταθεροποίηση του προϊόντος	60°C/10sec	
Διαχωρισμός Κλώνων DNA	95°C/ 1 min	
Σχηματισμός ετεροζυγωτών / Ψύξη	40°C/ 1 min	

Μετά από το στάδιο της ενίσχυσης (amplification) έχουμε προσθέσει το στάδιο ανάκτησης καμπύλων τήξης, έτσι ώστε μετά το τέλος της αντίδρασης να μπορούμε να ελέγξουμε παρατηρώντας τόσο την καμπύλη όσο και τη θερμοκρασία τήξης του παραγόμενου προϊόντος ότι πρόκειται για το επιθυμητό προϊόν. Με βάση το Primer Premier, το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε για τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινητών, η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του παραγόμενου προϊόντος είναι 78.4 °C. Οποιαδήποτε άλλη μετάβαση δηλώνει την υπέρβαση παραπροϊόντος.

## 6.5 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

### 6.5.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

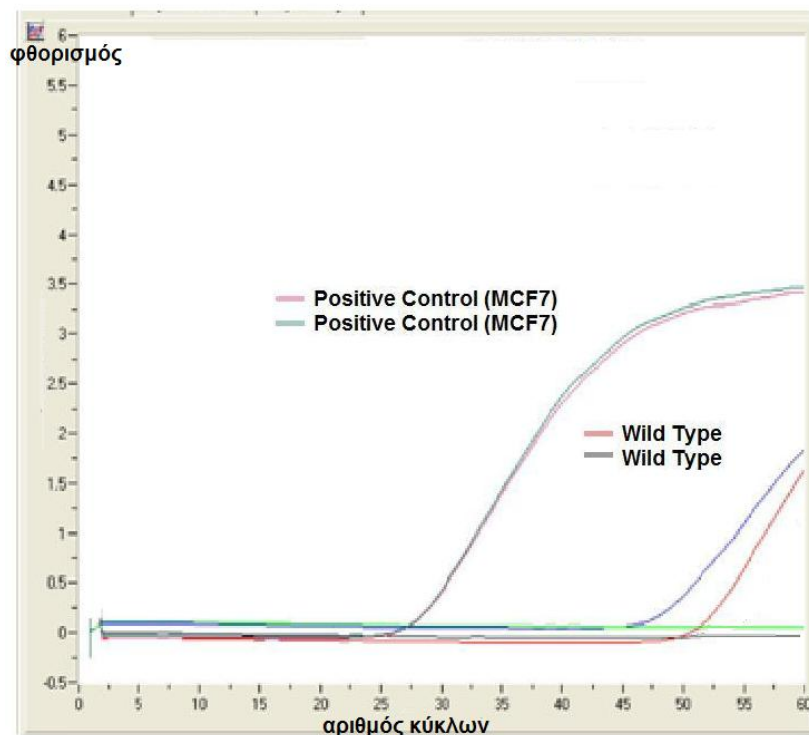
Για την ανάπτυξη της μεθολογίας ARMS-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρότυπα δείγματα: η μαστική καρκινική σειρά MCF7, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της μετάλλαξης (positive control) που φέρει την υπό ανίχνευση μετάλλαξη, και DNA απομονωμένο από το ολικό αίμα υγιούς δότη (wild type control) ως αρνητικός μάρτυρας που φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία.

### 6.5.2 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών της ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του *PIK3CA*.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών  $T_{an}$  παίζει σημαντικό ρόλο για την ειδική ενίσχυση των μορίων που φέρουν την μετάλλαξη. Για αυτό το λόγο δοκιμάσαμε παρακάτω θερμοκρασίες υβριδισμού:

- $T_{an} = 55^{\circ}\text{C}$

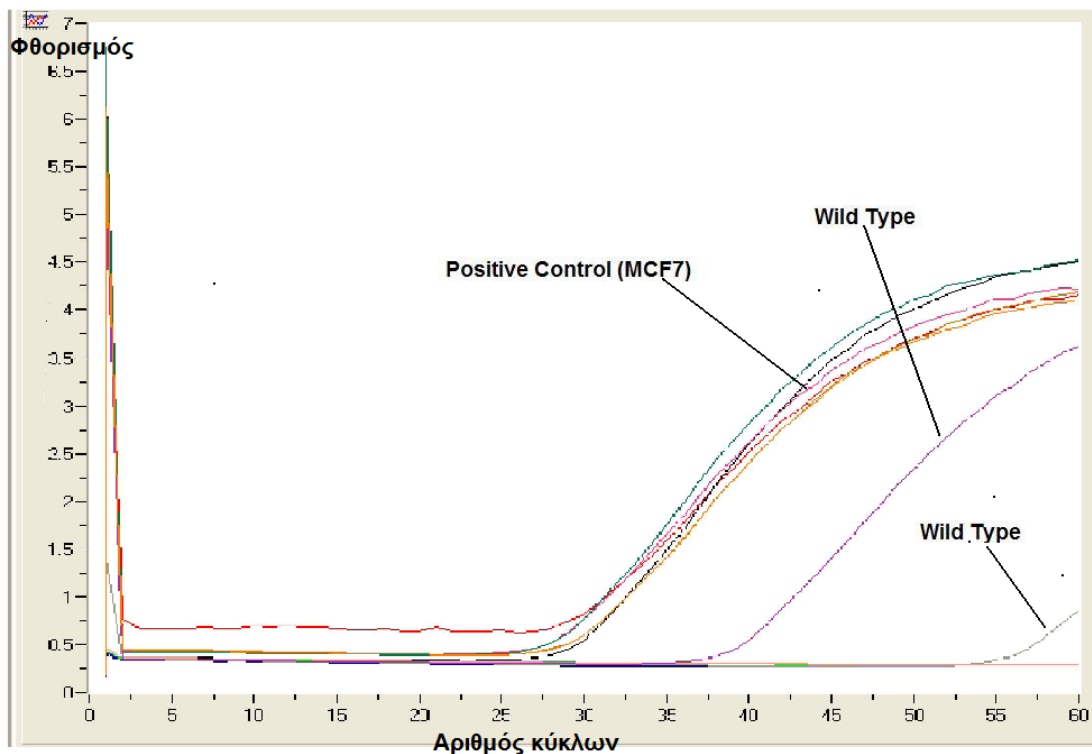
Θέτοντας θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών  $55^{\circ}\text{C}$  πήραμε ειδικό προϊόν όταν στην αντίδραση η DNA μήτρα ήταν η κυτταρική σειρά MCF7 (θετικός για την μετάλλαξη μάρτυρας, positive control) αλλά και όταν ως DNA μήτρα ήταν φυσιολογικό DNA. Η καμπύλη ενίσχυσης PCR απεικονίζεται στο **σχήμα 6.6**.



**Σχήμα 6.6:** Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει  $T_{an} = 55^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρείται η λήψη προϊόντος από τους θετικούς μάρτυρες ελέγχου (MCF7) αλλά και από τους αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου (WT)

- $T_{an} = 60^{\circ}\text{C}$

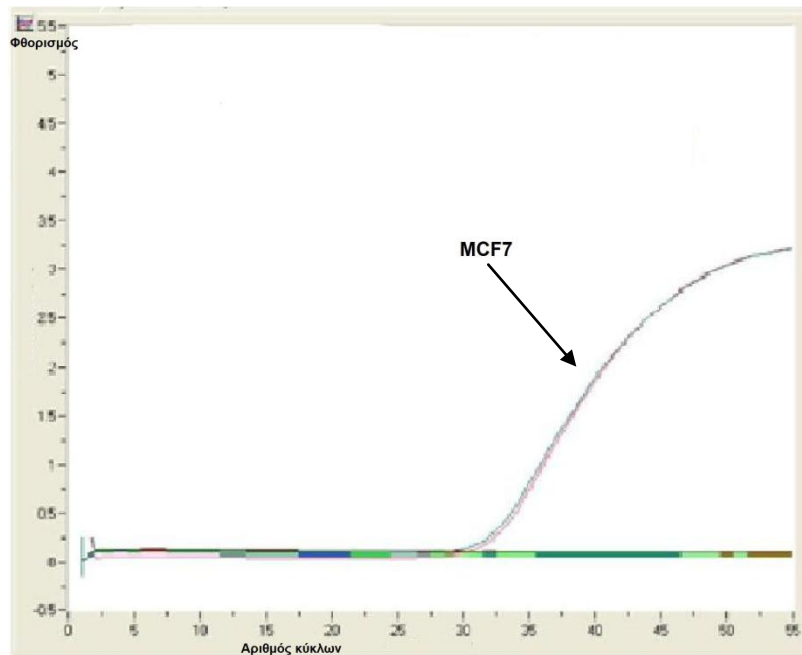
Θέτοντας θερμοκρασία υβριδισμού εκκινήτων  $60^{\circ}\text{C}$  όπου παρατηρήσαμε πάλι την παραγωγή του ειδικού προϊόντος και από το φυσιολογικό DNA εκμαγείο. Η καμπύλη ενίσχυσης PCR απεικονίζεται στο **σχήμα 6.7**.



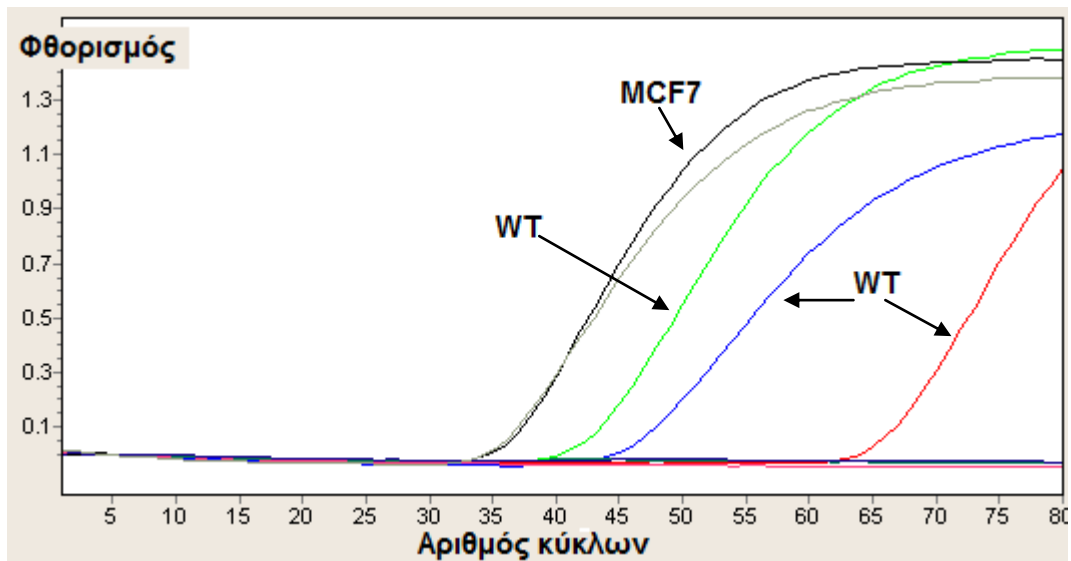
**Σχήμα 6.7:** Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει  $T_{an} = 60^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρείται η λήψη προϊόντος από τους θετικούς μάρτυρες της μετάλλαξης αλλά και από τους αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου (WT).

- $T_{an} = 63^{\circ}\text{C}$

Αυξάνοντας τη θερμοκρασία υβριδισμού στους  $63^{\circ}\text{C}$  παρατηρήσαμε την πρώτη φορά επιλεκτική ενίσχυση του θετικού μάρτυρα ελέγχου (MCF7) (**σχήμα 6.8**). Αυτό το αποτέλεσμα δεν επαναλήφθηκε δεύτερη φορά σε πείραμα που διεξάχθηκε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (**σχήμα 6.9**).



Σχήμα 6.8: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, στην οποία έχουμε θέσει  $T_{an} = 63^{\circ}\text{C}$ . Στο πρώτο γράφημα που απεικονίζει το αποτέλεσμα του πρώτου πειράματος παρατηρούμε επιλεκτική ενίσχυση του θετικού μάρτυρα της μετάλλαξης (MCF7).

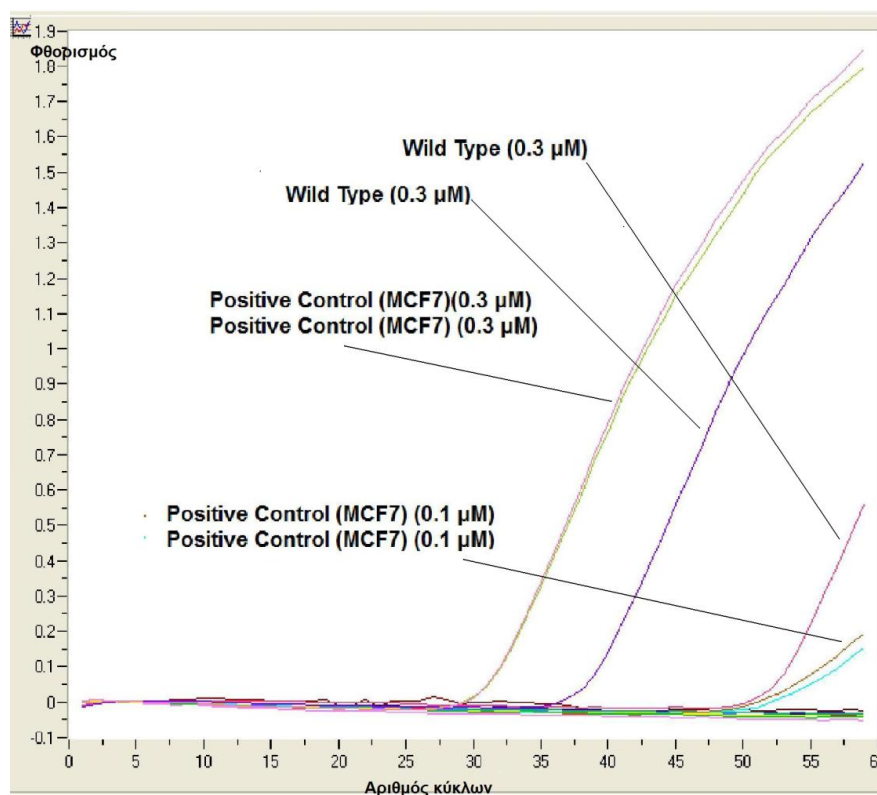


Σχήμα 6.9: Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, επαναληπτικού πειράματος στο οποίο έχουμε θέσει  $T_{an} = 63^{\circ}\text{C}$ . Εκτός από το θετικό μάρτυρα της μετάλλαξης (MCF7) έχουν ενισχυθεί και οι αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου (WT).

Από την παραπάνω σειρά πειραμάτων δεν βγάλαμε κάποιο συμπέρασμα ως προς την βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού.

### 6.5.3 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών της ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 1633 G>A του εξονίου 9 του *PIK3CA*.

Σε επόμενο πείραμα θέλαμε να ελέγξουμε πως επηρεάζει η μείωση της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών το συνολικό αποτέλεσμα. Δοκιμάσαμε λοιπόν στο ίδιο run να υπάρχουν αντιδράσεις με τελική συγκέντρωση εκκινητών 0.3  $\mu\text{M}$  και αντιδράσεις με τελική συγκέντρωση εκκινητών 0.1  $\mu\text{M}$  κρατώντας το  $T_{\text{an}}$  σταθερά στους 63  $^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρήσαμε ότι για τελική συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{M}$  η ειδικότητα δεν είναι ικανοποιητική και ότι για άλλη μια φορά ενισχύεται και το φυσιολογικό DNA σε  $C_q$  κοντά με το αντίστοιχο του μεταλλαγμένου. Στις αντιδράσεις με τελική συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{M}$  η ευαισθησία της αντίδρασης έχει μειωθεί δραματικά (σχήμα 6.10).



Σχήμα 6.10: Καμπύλη ενίσχυσης PCR πειράματος κατά το οποίο ελέγξαμε την επίδραση της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών. Στο ίδιο run υπάρχουν τέσσερις αντιδράσεις (δύο με θετικό μάρτυρα της μετάλλαξης, MCF7 και δύο με αρνητικό μάρτυρα της μετάλλαξης, WT) στις οποίες η τελική συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0.3  $\mu\text{M}$

## 6.6 Συμπεράσματα

Χρησιμοποιώντας το παραπάνω ζευγάρι εκκινητών ARMS δεν καταφέραμε να αναπτύξουμε ένα πρωτόκολλο που να χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική ειδικότητα ώστε να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται σε ιδιαιτερότητα της ίδιας της αλληλουχίας στόχου ή και στην μη αποτελεσματική παρεμπόδιση της ενίσχυσης του φυσιολογικού αλληλίου από τον εκκινητή που είναι ειδικός για την μετάλλαξη. Λόγω της ιδιαιτερότητας της αλληλουχίας και του είδους του mismatch, δεν ήταν δυνατό να σχεδιαστεί καλύτερος εκκινητής έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη ειδικότητα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS- HRMA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 1633 G>A ΣΤΟ *PIK3CA*

#### 7.1 Εισαγωγή

Μετά την προσπάθεια ανάπτυξης της μεθοδολογίας ARMS για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A στο εξόνιο 9 του *PIK3CA*, η οποία δεν μας οδήγησε σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου με ικανοποιητική ειδικότητα, στραφήκαμε στην ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας που θα συνδυάζει την ARMS-PCR με την HRMA.

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών με το οποίο πραγματοποιείται η ARMS-PCR και ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών που είναι κοινό για τη φυσιολογική και την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Στόχος της συγκεκριμένης μεθοδολογίας είναι: α) ο έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας DNA που χρησιμοποιείται σαν στόχος και από τα δύο ζεύγη εκκινητών, β) ο έλεγχος της ορθής εκτέλεσης της αντίδρασης της PCR (αντιδραστήρια, παρεμποδίζουσες ουσίες), γ) σε περίπτωση που και τα δύο ζεύγη εκκινητών υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή και το προϊόν που προκύπτει από την επέκταση του κοινού ζεύγους εκκινητών είναι μεγαλύτερου μήκους τότε το ζεύγος εκκινητών της ARMS-PCR μπορεί να το χρησιμοποιήσει σαν εκμαγείο για την παραγωγή του αντίστοιχου προϊόντος.

Η μεθοδολογία ARMS-PCR με τη χρήση εσωτερικού πρότυπου προϊόντος έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν κυρίως για τον έλεγχο της ορθότητας των αποτελεσμάτων και την αποφυγή της λήψης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Στις περιπτώσεις αυτές, το κοινό ζεύγος εκκινητών είναι σχεδιασμένο ώστε να υβριδοποιείται σε διαφορετική περιοχή (εξόνιο ή ιντρόνιο του ίδιου γονιδίου ή ακόμα και σε διαφορετικό γονίδιο). Η ταυτοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

#### 7.2 Συνδυασμός εκκινητών HRMA με ARMS εκκινητή

Στην παρούσα εργασία οι τρεις εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να συνδυαστεί ARMS PCR με την HRMA. Οι δύο εξ αυτών αποτελούν το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε από τον Π. Βορκά για την ενίσχυση της αλληλουχίας των 92 bp του εξονίου 9 του *PIK3CA*<sup>1</sup>, και είναι κοινοί για το φυσιολογικό και το

μεταλλαγμένο αλληλίο και παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στους εκκινητές αυτούς έχει προσαρμοστεί μία αυθαίρετη αλληλουχία πλούσια σε GC βάσεις στο 5' άκρο του ανάστροφου εκκινητή ώστε το προϊόν της PCR (προϊόν A) να έχει μήκος 104 bp και αυξημένη θερμοκρασία τήξης ( $T_m = 84^\circ \text{C}$ ) σε σχέση με το πρωταρχικό (σχήμα 7.2). Στον τρίτο, που υβριδοποιείται στην ίδια αλληλουχία με τον αλληλοειδικό για το μεταλλαγμένο αλληλίο εκκινητή της ARMS PCR, που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6, έχει επίσης προστεθεί μία πλούσια σε GC βάσεις αλληλουχία οπότε το προϊόν (προϊόν B) της PCR μεταξύ αυτού και του κοινού ανάστροφου εκκινητή έχει μήκος 99 bp και  $T_m = 86.5^\circ \text{C}$  (σχήμα 7.3). Στο σχήμα 7.1 απεικονίζονται οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών στο εξόνιο 9.

```
aatgaaaataaattatttttacaacagtttaattagcaatgtaaatttattgaaaatgtatttgctttttc
tgtaaatcatctgtgaatccagaggggaaaaaatatgacaaagaaagctatataagatattatttttt
acagAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAATGACAAAGAACAGCTCA
AAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTTCTAT
GGAGTCACAGGTAAGTGCTAAATGGAGAttctctgttttcttttttctttattacagaaaaaata
actgaatttggctgatctcagcatgttttttaccatacctattggaataaataaagcagaatttacatgat
ttttaaactataaacattgccttttttaaaaac
```

Σχήμα 7.1: Η αλληλουχία του εξονίου 9 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. Με κεφαλαία παρουσιάζεται το εξόνιο και με μικρά τα ιντρόνια. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η μετάλλαξη, με μοβ οι βάσεις στις οποίες διαφέρει με την ομόλογη αλληλουχία του ψευδογονιδίου και με περίγραμμα οι εκκινητές. Η περιοχή στην οποία υβριδοποιείται ο πρόσθιος εκκινητής, που είναι κοινός για τη φυσιολογική και τη μεταλλαγμένη αλληλουχία, παρουσιάζεται με πράσινο ενώ η περιοχή υβριδοποίησης του ανάστροφου εκκινητή ο οποίος είναι επίσης κοινός για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλίο με γαλάζιο. Η περιοχή υβριδοποίησης του εκκινητή της ARMS που είναι ειδικός για το μεταλλαγμένο αλληλίο παρουσιάζεται με γκρι χρώμα.



**Εκκινητές της μεθόδου HRMA**

**Primers (5'→3')**

**F-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA**  $T_m=61.0\text{ }^\circ\text{C}$

**R-GCCAGCCAGGGG-TCCATTTAGCACTTACCTGTGAC**  $T_m=81.1\text{ }^\circ\text{C}$  (58.4 χωρίς την αλληλουχία GC)

**Προϊόν A**

**GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAA  
AGATTTTCTATGGAGTACACAGGTAAGTGCTAAAATGGACCCCTGGCTGGC**

$T_m=84\text{ }^\circ\text{C}$  (Primer Premier)

Μήκος προϊόντος= 104 bp

**Σχήμα 7.2:** Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν των εκκινητών για την HRMA. Στον ανάστροφο εκκινητή έχει προστεθεί μία αλληλουχία πλούσια σε βάσεις GC. Το προϊόν που αναμένεται από την αντίδραση PCR έχει έτσι μεγαλύτερο μήκος και μεγαλύτερο  $T_m$  σε σχέση με αυτό που παράγεται από την αντίδραση PCR με τους εκκινητές στην αρχική τους μορφή.

**Εκκινητές της ARMS-PCR 1633G>A**

**(5'→3')**

**F-CCTGCCCCAGCGACGCCCC-TCCTCTCTCTGAAATCGCTA**  $T_m=89.4\text{ }^\circ\text{C}$  (52.5 χωρίς την αλληλουχία GC)

**R-GCCAGCCAGGGG-TCCATTTAGCACTTACCTGTGAC**  $T_m=81.1\text{ }^\circ\text{C}$  (58.4 χωρίς την αλληλουχία GC)

**Προϊόν B**

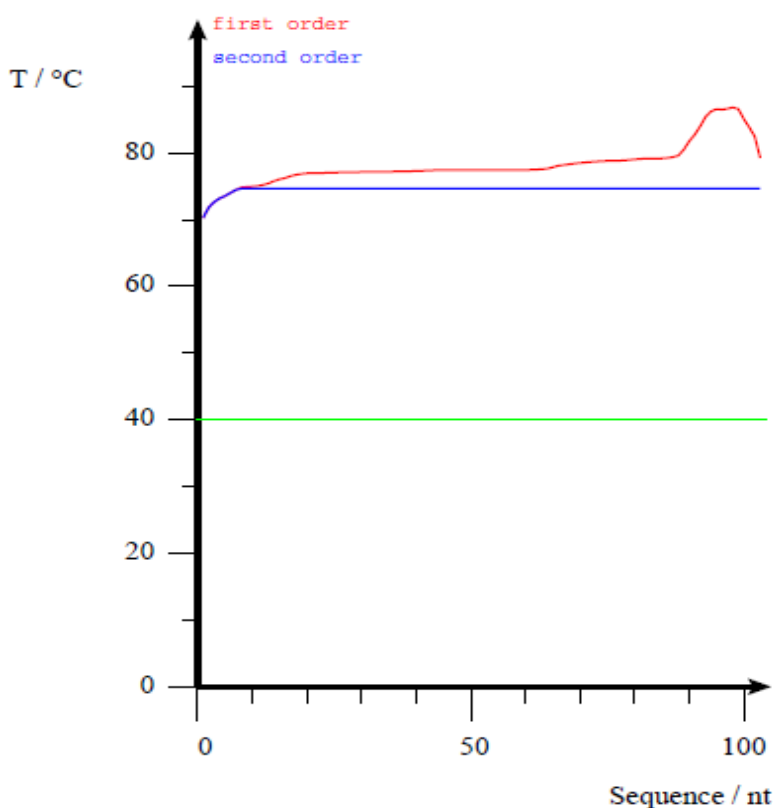
**CCTGCCCCAGCGACGCCCCTCCTCTCTCTGAAATCGCTAAGCAGGAGAAAGATTTTCTA  
TGGAGTACACAGGTAAGTGCTAAAATGGACCCCTGGCTGGC**

$T_m=86.5\text{ }^\circ\text{C}$  (Primer Premier)

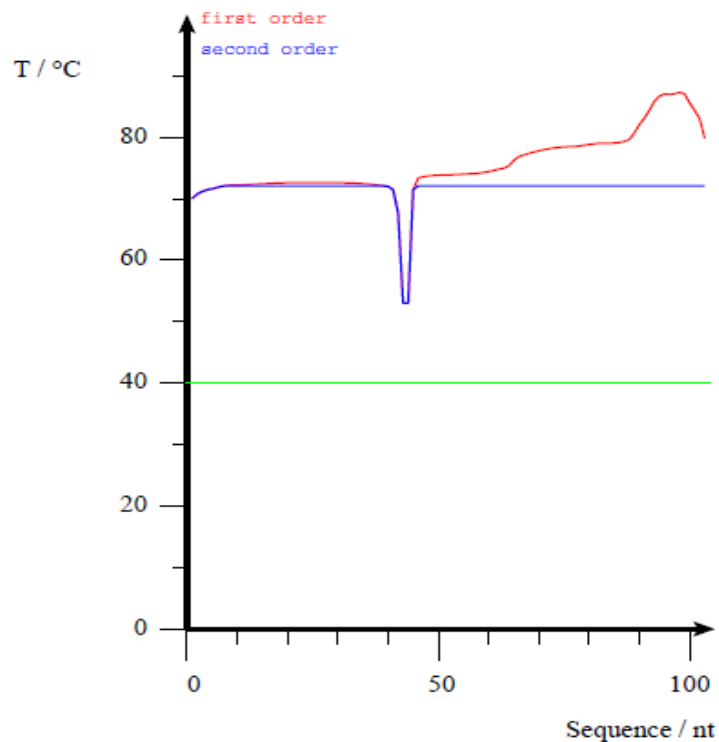
Μήκος προϊόντος= 99 bp

**Σχήμα 7.3:** Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ARMS-PCR. Στο 5' άκρο της αλληλουχίας τους έχει προστεθεί μία αλληλουχία πλούσια σε βάσεις GC. Το προϊόν που αναμένεται από την αντίδραση PCR έχει έτσι μεγαλύτερο μήκος και μεγαλύτερο  $T_m$  σε σχέση με αυτό που παράγεται από την αντίδραση PCR με τους εκκινητές στην αρχική τους μορφή.

Με το λογισμικό POLAND<sup>257</sup> (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>), ελέγχεται η πιθανότητα το προϊόν να έχει δύο (ή περισσότερες) διαφορετικές περιοχές τήξης (παρουσιάζεται με μπλε χρώμα και αναφέρεται ως «second order»), ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζεται και το προφίλ αποδιάταξης ανά περιοχή (παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα και αναφέρεται ως «first order»). Επίσης, μπορεί να εξετασθεί το μέγεθος διαφοροποίησης σε περίπτωση σχηματισμού μεταλλαγμένου ετεροζυγώτη. Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου με το POLAND του προϊόντος από την HRMA PCR (προϊόν Α), όπου παρατηρείται μονή μετάβαση τήξης, ενώ στο σχήμα 7.5 παρατηρείται ότι ο σχηματισμός ετεροζυγώτη στη θέση 44 του προϊόντος, όπου και εντοπίζεται η μετάλλαξη 1633 G > A υπολογίστηκε να έχει σημαντική διαφοροποίηση

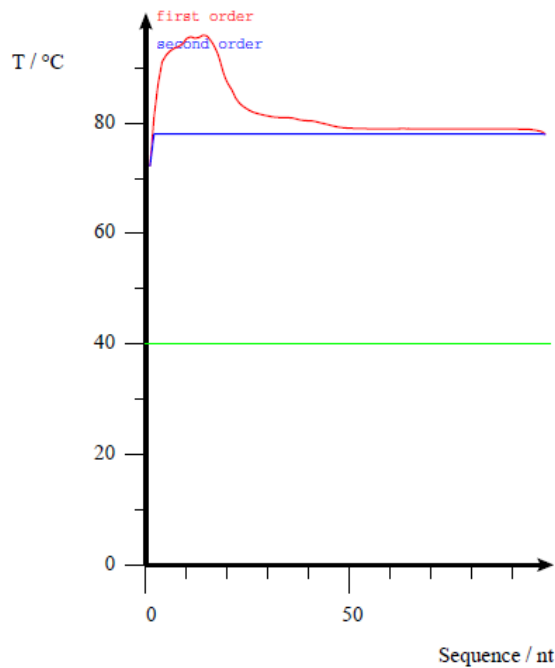


Σχήμα 7.4: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν που παράγεται από την HRMA PCR (προϊόν Α) με το ζεύγος εκκινητών που είναι κοινό για την φυσιολογική και την μεταλλαγμένη αλληλουχία.



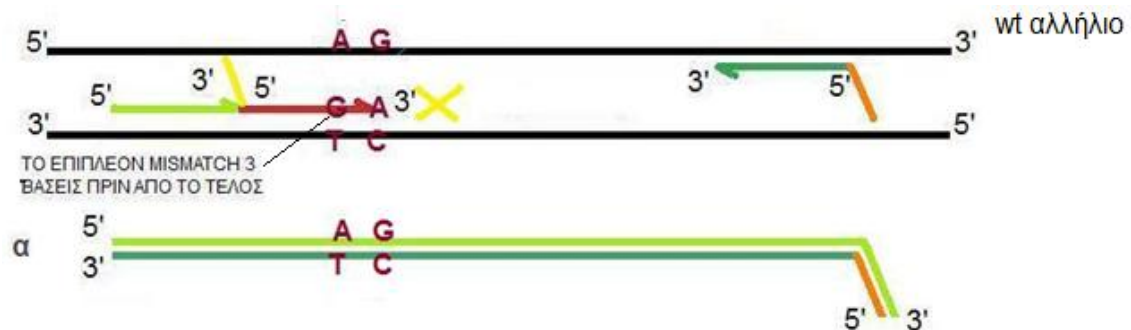
Σχήμα 7.5: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν 104bp (προϊόν A), με ζεύγος νουκλεοτιδίων χωρίς συμπληρωματικότητα στη θέση 44.

Έλεγχος με το λογισμικό POLAND, για το προϊόν των 99 bp από την ARMS PCR (προϊόν B) έδειξε επίσης μονή μετάβαση τήξης.



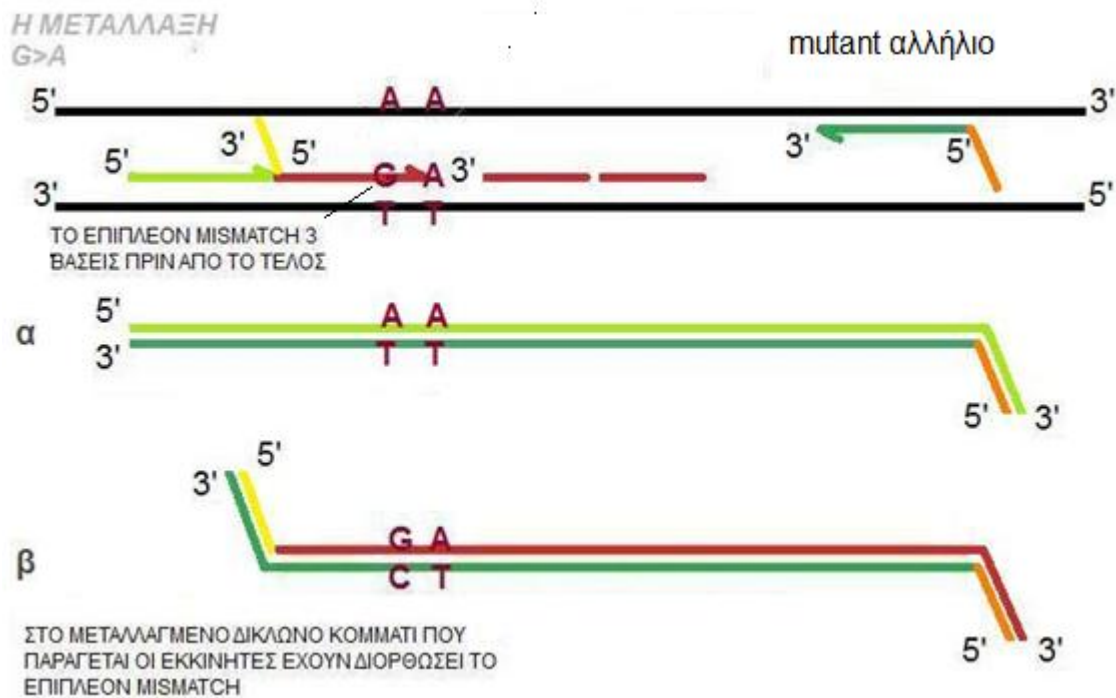
Σχήμα 7.6: Αποτελέσματα του λογισμικού POLAND για το προϊόν από την PCR με το ARMS ζεύγος εκκινητών μήκους 99 bp (προϊόν B).

Στα επόμενα σχήματα βλέπουμε τα αναμενόμενα προϊόντα από την αντίδραση με το κάθε ζεύγος εκκινητών σε φυσιολογικά (σχήμα 7.7) ή μεταλλαγμένα αλληλία (σχήμα 7.8).



Σχήμα 7.7: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία ARMS εκκινητή (κόκκινο χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. Ο ανάστροφος εκκινητής, απεικονίζεται με πράσινο σκούρο χρώμα ενώ ο πρόσθιος εκκινητής της HRMA απεικονίζεται με πράσινο ανοιχτό χρώμα. Το 3' τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή, του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία, δεν είναι συμπληρωματικό της κυτοσίνης που υπάρχει στο αντίστοιχο φυσιολογικό αλληλίο και χάρη στην επιπλέον μη συμπληρωματική βάση έχει αποσταθεροποιηθεί οπότε κάτω από κατάλληλες συνθήκες η πολυμεράση δεν θα το επεκτείνει, οπότε θα παραχθεί προϊόν μόνο από την αντίδραση του HRMA ζεύγους εκκινητών. Αν παρόλα αυτά κάποια στιγμή υπάρξει τελικά αυτή η επέκταση, στους επόμενους κύκλους θα παραχθεί και το μεταλλαγμένο δίκλωνο προϊόν.

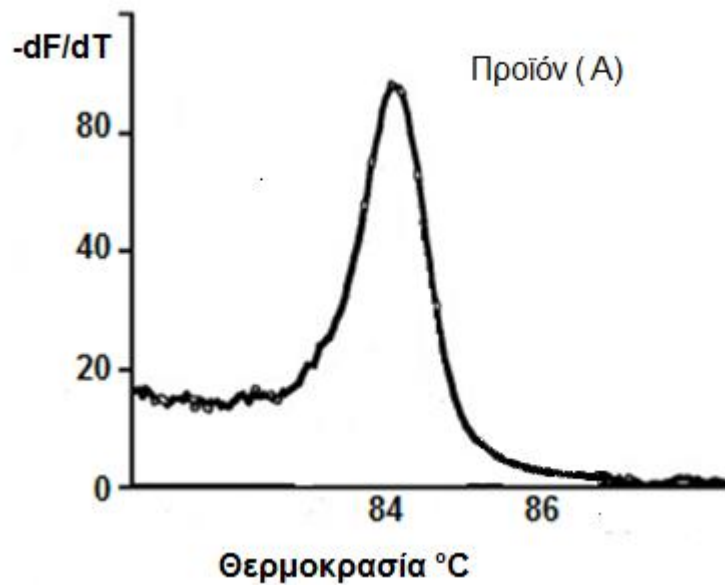
Στην αλληλουχία του φυσιολογικού αλληλίου από τους δύο πρόσθιους εκκινητές ταιριάζει απόλυτα μόνο ο εκκινητής της HRMA. Το 3' άκρο του ARMS εκκινητή περιέχει δύο αταίριαστες βάσεις με αυτές του εκμαγείου. Για αυτό το λόγο και λόγω ανταγωνισμού με τον πρόσθιο κοινό εκκινητή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και για όσο θα υπάρχουν και οι δύο εκκινητές μέσα στο μίγμα της αντίδρασης, μειώνεται η πιθανότητα λήψης ARMS προϊόντος από τη φυσιολογική αλληλουχία (σχήμα 7.7).



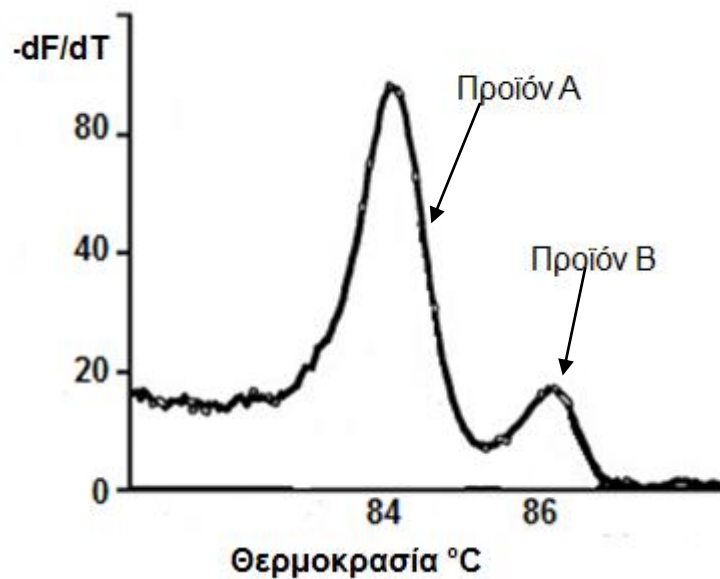
Σχήμα 7.8: Σχηματική αναπαράσταση της υβριδοποίησης του ειδικού για την μεταλλαγμένη αλληλουχία ARMS εκκινητή (κόκκινο χρώμα) και του HRMA εκκινητή (πράσινο ανοιχτό χρώμα) σε μεταλλαγμένη αλληλουχία. Ο ανάστροφος εκκινητής, απεικονίζεται με πράσινο (σκούρο) χρώμα. Επειδή η βάση στο 3' άκρο του (A) είναι συμπληρωματική με την βάση στο σημείο της μετάλλαξης (T), η πολυμεράση το επεκτείνει οπότε με το πέρας της PCR έχει παραχθεί ένα δίκλωνο κομμάτι που φέρει την μετάλλαξη. Επίσης στο παραγόμενο προϊόν έχει διορθωθεί το επιπλέον mismatch που είχαμε εισάγει εσωτερικά του 3' άκρου για να αποσταθεροποιήσουμε τον εκκινητή.

Η τελευταία βάση του 3' άκρου του πρόσθιου ARMS ταιριάζει με την μεταλλαγμένη αλληλουχία, οπότε σε αυτή την περίπτωση κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες θα υβριδοποιηθεί και με τη δράση της πολυμεράσης θα παράγεται ARMS προϊόν. Ωστόσο επειδή η περιοχή υβριδοποίησης του κοινού πρόσθιου είναι κοινή και στα δύο αλληλία θα παράγεται και HRMA προϊόν (σχήμα 7.8).

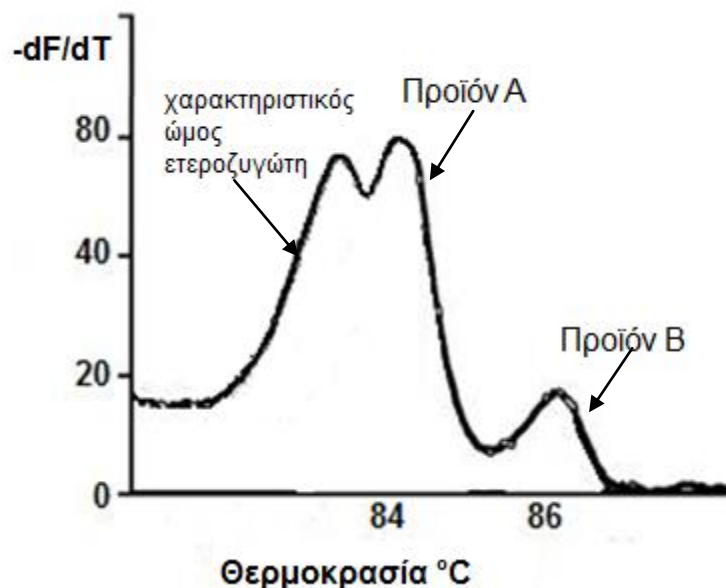




Σχήμα 7.10: ARMS-HRMA, *PIK3CA* εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και  $T_m$  από φυσιολογικό δείγμα.



Σχήμα 7.11: ARMS-HRMA, *PIK3CA*, εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και  $T_m$  από ομόζυγο μεταλλαγμένο δείγμα.



Σχήμα 7.12: ARMS-HRMA, *PIK3CA*, εξόνιο 9, μετάλλαξη 1633 G>A: Αναμενόμενο σχήμα και  $T_m$  από μεταλλαγμένο ετερόζυγο δείγμα.

### 7.3 Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης με το ARMS ζεύγος εκκινητών στο οποίο έχουν ενσωματωθεί οι πλούσιες σε GC αλληλουχίες

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν κάποια πειράματα με το ARMS ζεύγος εκκινητών προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση των ενσωματωμένων GC αλληλουχιών στα 5' άκρα τους, στην θερμοκρασία τήξης και στο σχήμα των καμπύλων τήξης του παραγόμενου προϊόντος (A). Στον **πίνακα 7.1** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων εκκινητών.

Πίνακας 7.1: Χαρακτηριστικά εκκινητών της αντίδρασης ARMS PCR που παράγει το προϊόν μήκους 99bp.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	nt	$T_{an}$	Προϊόν (bp)
Πρόσθιος	<b>CCTGCCCCAGCGAGCCCCCTCCTCTCTCTGAAATCGCTA</b>	39	89.4 °C	99bp
Ανάστροφος	<b>GCCAGCCAGGGGTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC</b>	36	81.1 °C	



Στον **πίνακα 7.2** παρουσιάζονται οι συνθήκες της αντίδρασης ARMS που παράγει το προϊόν μήκους 99 bp. Μετά τους 60 κύκλους του σταδίου της ενίσχυσης έχουμε προσθέσει ένα στάδιο κατά το οποίο το όργανο παίρνει τις καμπύλες τήξης των παραγόμενων προϊόντων της PCR. Με τον τρόπο αυτό, παρατηρώντας τις καμπύλες τήξης τους αμέσως μετά το πέρας της αντίδρασης, μπορούμε να ελέγξουμε αν η θερμοκρασία τήξης τους συμφωνεί (κατά προσέγγιση) με τη θεωρητική. Τα καταγραφήματα όμως αυτά δεν έχουν μεγάλη διακριτικότητα, οπότε για να ελέγξουμε με λεπτομέρεια και το σχήμα της καμπύλης, τα PCR προϊόντα αναλύονται στο όργανο HR-1. Στον **πίνακα 7.3** παρουσιάζεται το πρόγραμμα ανάκτησης καμπυλών τήξης με χρήση του οργάνου HR-1.

**Πίνακας 7.2: Συνθήκες της αντίδρασης real-time ARMS PCR που παράγει το προϊόν (A) μήκους 99bp του εξονίου 9 του γονιδίου PIK3CA**

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2 min	} 60 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 5 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	65°C/ 20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C/ 20sec	} Λήψη καμπυλών τήξης
Επανυβριδοποίηση/ψύξη	60°C/10sec	
Διαχωρισμός Κλώνων DNA	95°C/ 1 min	
Σχηματισμός ετεροζυγωτών / Ψύξη	40°C/ 1 min	

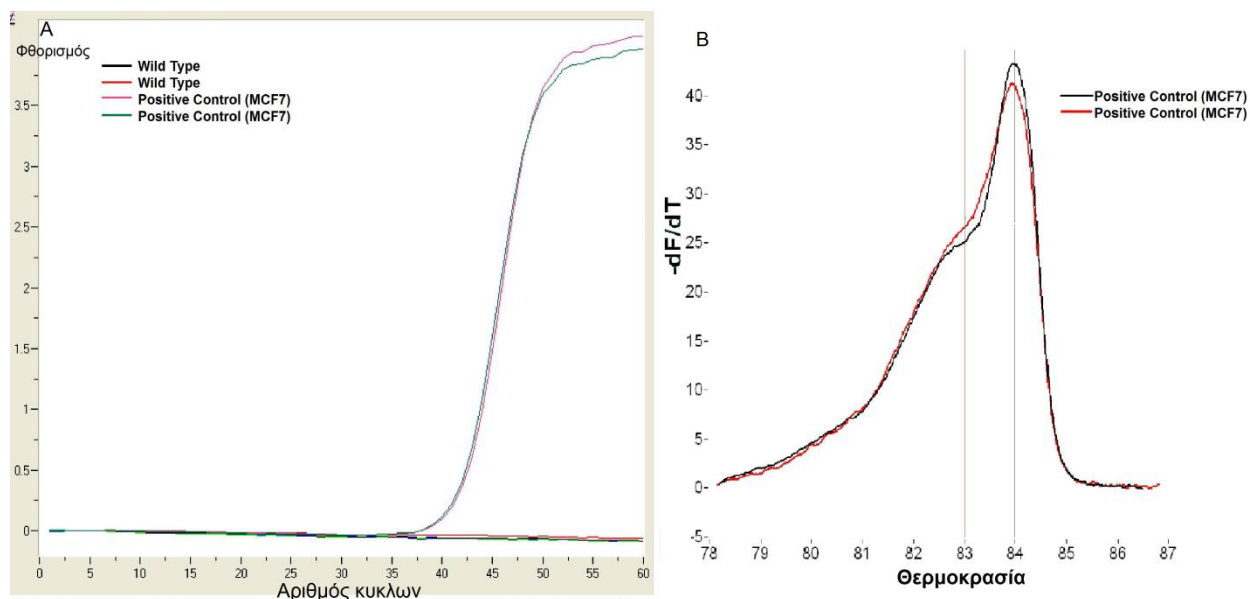
**Πίνακας 7.3: Πρόγραμμα ανάκτησης καμπυλών τήξεως *PIK3CA***

Πρόγραμμα	PCR προϊόν 99 bp
Ρυθμός τήξης	0.2 °C/s
Θερμοκρασίας ψύξης	60 °C
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης	70 °C
Θερμοκρασία λήξης	90 °C

#### **7.4 Αποτελέσματα της αντίδρασης με το ARMS ζεύγος εκκινήτων στο οποίο έχουν ενσωματωθεί οι πλούσιες σε GC αλληλουχίες**

Ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινήτων θέσαμε 65 °C. Το συγκεκριμένο πείραμα διεξάχθηκε προκειμένου να ελέγξουμε πως επιδρούν οι πλούσιες σε GC βάσεις αλληλουχίες, οι οποίες έχουν προστεθεί στα 5' άκρα των εκκινήτων και που ενσωματώνονται στην αλληλουχία του παραγόμενου προϊόντος, τόσο στη θερμοκρασία τήξης όσο και στο σχήμα των καμπυλών τήξης αυτών. Στο **σχήμα 7.13 A** απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης της PCR ενώ στο σχήμα **7.13B** η πρώτη παράγωγος της καμπύλης τήξης των αντίστοιχων παραγόμενων προϊόντων.

Ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* στον καρκίνο του μαστού



**Σχήμα 7.13.** Α) Καμπύλη ενίσχυσης της PCR σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 65 °C. Παρατηρούμε ότι παράχθηκε προϊόν μόνο από τον θετικό μάρτυρα ελέγχου (MCF7). Β) Καμπύλη πρώτης παραγώγου της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR.

Παρατηρούμε ότι η πειραματική θερμοκρασία τήξης του προϊόντος που παράγεται από την αντίδραση ARMS είναι περίπου 84 °C.

### 7.5 Συστατικά και συνθήκες της ARMS-HRMA

**Πίνακας 7.4:** Χαρακτηριστικά εκκινήτων της αντίδρασης HRMA-ARMS PCR.

Εκκινήτης	Αλληλουχία 5´-3´	nt	T <sub>an</sub>	Προϊόν
Πρόσθιος ARMS εκκινήτης	<b>CCTGCCCCAGCGACGCCCTCCTCTCTCTGAAATCGCTA</b>	39	89.4 °C	} 99bp
Ανάστροφος HRMA εκκινήτης	<b>GCCAGCCAGGGGTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC</b>	36	81.1°C	
Πρόσθιος HRMA εκκινήτης	GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA	24	61 °C	} 104bp

**Πίνακας 7.5. Συστατικά της αντίδρασης real-time PCR για το προϊόν 104bp και 99 bp του εξονίου 9 (η αντίδραση στο ίδιο σωληνάριο) του γονιδίου *PIK3CA*.**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
Πρόσθιος εκκινητής (HRM)	10μM	0.2	0,2 μM
Πρόσθιος εκκινητής (ARMS-GC)	10μM	0.3	0,3 μM
Ανάστροφος εκκινητής(HRM- GC)	10μM	0.5	0,5 μM
dNTP's	10mM	0.4	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.0	2.5 mM
BSA	10μg/μL	0.15	0.15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2.0	1 X
Ταq πολυμεράση (Promega)	5U/μL	0.1	0.05U/μL
LCGreen I	10X	1.0	1X
H <sub>2</sub> O	-	3.35	-
Δείγμα DNA	25ng/μL	1.0	2.5ng/μL
<b>Συνολικός όγκος</b>		<b>10</b>	

**Πίνακας 7.6: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το προϊόν 104bp και 99 bp του εξονίου 9 του γονιδίου *PIK3CA***

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2 min	1 <sup>ο</sup> στάδιο ενίσχυσης: <b>20 κύκλοι</b>
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/ 5 sec	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	65°C/ 20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C/ 20sec	
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/ 5 sec	2 <sup>ο</sup> στάδιο ενίσχυσης <b>40 κύκλοι</b>
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	68°C/ 16 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C/ 20sec	
Σταθεροποίηση νεοσυντιθέμενων προϊόντων	60°C/10sec	
Διαχωρισμός Κλώνων DNA	95°C/ 2 min	
Σχηματισμός ετεροζυγωτών / Ψύξη	40°C/ 2 min	

Οι τελικές συνθήκες της ανάλυσης των καμπυλών τήξης για κάθε μέθοδο συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 7.7: Συνθήκες ανάκτησης καμπύλων τήξης για την ARMS PCR και την ARMS-HRM PCR του εξονίου 9 του γονιδίου *PIK3CA* για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G>A**

Πρόγραμμα λήψης καμπυλών τήξης	99bp και 104 bp PCR προϊόν
Ρυθμός τήξης	0.2 °C/s
Θερμοκρασίας ψύξης	60 °C
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης δεδομένων	70 °C
Θερμοκρασία λήξης	90 °C

## 7.6 Βελτιστοποιήσεις της ARMS-PCR σε συνδυασμό με την HRMA

### 7.6.1 Βελτιστοποιήσεις συγκέντρωσης εκκινητών

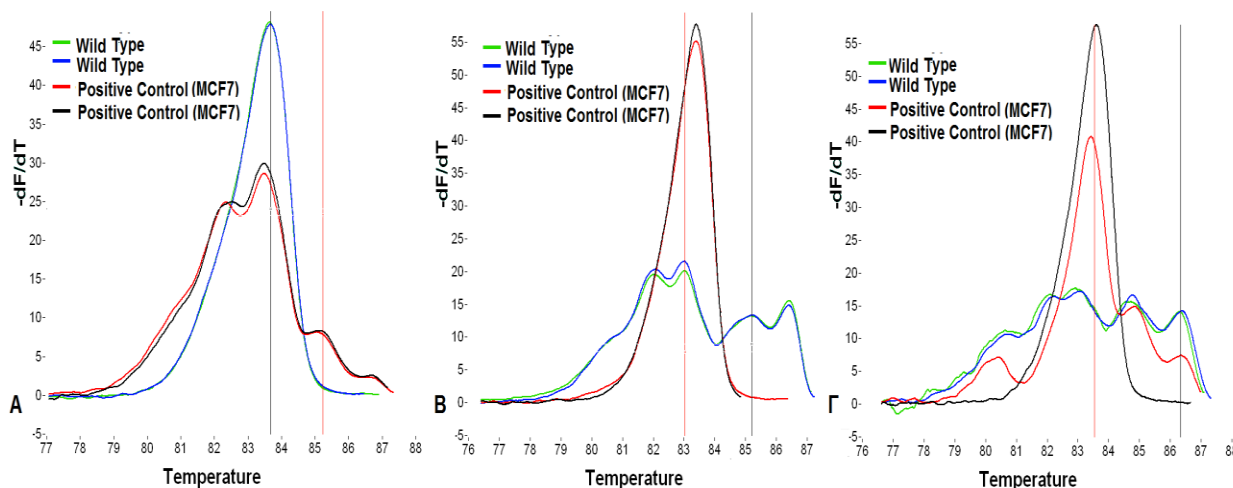
Για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ξεκινήσαμε αναλογιζόμενοι ότι στο μίγμα της αντίδρασης συνυπάρχουν δύο ζεύγη εκκινητών με κοινό τον ανάστροφο εκκινητή. Επειδή ο σκοπός μας ήταν να διεξάγονται επιτυχώς τόσο η ARMS-PCR, για την παραγωγή προϊόντος όταν το DNA εκμαγείο φέρει την μετάλλαξη 1633 G>A, όσο και η HRMA για την παραγωγή του προϊόντος ελέγχου χρειάστηκε να προσδιορίσουμε πειραματικά το βέλτιστο συνδυασμό συγκεντρώσεων των τριών εκκινητών

Σε πρώτη φάση, διατηρώντας τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών 63 °C, που είναι λίγο πιο χαμηλή από την βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού του ζεύγους εκκινητών για την HRMA-PCR, δοκιμάσαμε τους παρακάτω συνδυασμούς συγκεντρώσεων, όπως φαίνεται στον **πίνακα 7.8**. Στο συγκεκριμένο πείραμα προσπαθήσαμε να εξετάσουμε τη συμπεριφορά των δύο ζευγών εκκινητών, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και αν ο ανταγωνισμός που δημιουργείται μεταξύ τους βελτιώνει την ειδικότητα του ζεύγους εκκινητών για την ARMS-PCR.

**Πίνακας 7.8: Βελτιστοποιήσεις συγκεντρώσεων εκκινητών για ARMS-HRMA**

Συνδυασμός	Τελική συγκέντρωση HRMA εκκινητών	Τελική συγκέντρωση ARMS εκκινητών
A	0.3 μM	0.3 μM
B	0.2 μM	0.3 μM
Γ	0.1 μM	0.3 μM

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **σχήμα 7.14**.



**Σχήμα 7.14:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για αναλογία των ζευγών εκκινητών HRMA και ARMS A) 0.3 - 0.3  $\mu\text{M}$ , B) 0.2- 0.3  $\mu\text{M}$ , Γ) 0.1- 0.3  $\mu\text{M}$

Παρατηρούμε ότι ο καλύτερος συνδυασμός συγκεντρώσεων των δύο ζευγών εκκινητών είναι αυτός με 0,3 $\mu\text{M}$  ARMS-εκκινητών και 0,2 $\mu\text{M}$  HRM-εκκινητών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι κορυφές είναι πιο ευδιάκριτες και παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία, λόγω υψηλότερης κορυφής του ARMS-προϊόντος με πειραματικό  $T_m=86^\circ\text{C}$ . Επίσης δεν παρατηρείται η ARMS κορυφή στην καμπύλη πρώτης παραγώγου του αρνητικού μάρτυρα ελέγχου. Επιλέξαμε να συνεχίσουμε κρατώντας τη B) περίπτωση .

### 7.6.2 Βελτιστοποιήσεις της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών, και σταδίων ενίσχυσης της αντίδρασης

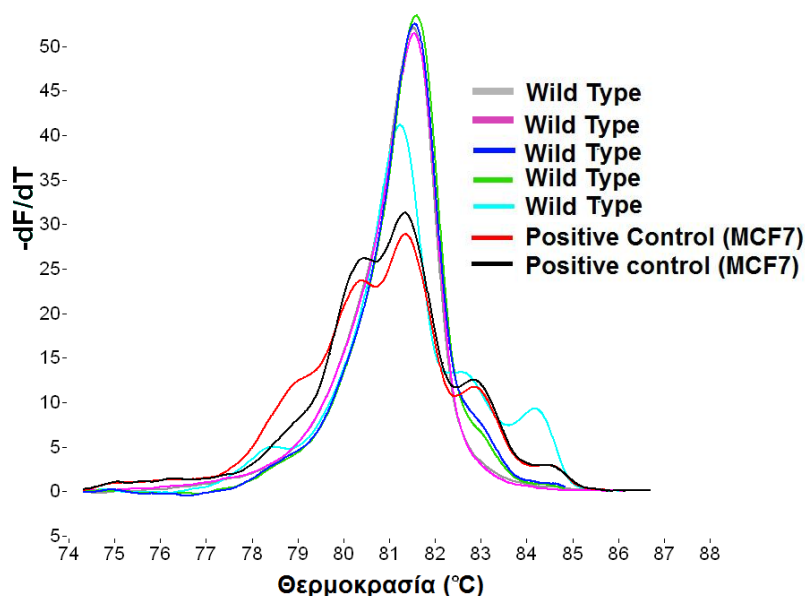
Ακολούθησαν οι παρακάτω δοκιμές θερμοκρασίας υβριδισμού (**πίνακας 7.9**):

**Πίνακας 7.9:** Βελτιστοποιήσεις θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών και αριθμού κύκλων

$\alpha/\alpha$	1 <sup>ο</sup> στάδιο ενίσχυσης		2 <sup>ο</sup> στάδιο ενίσχυσης	
	$T_{an}$ ( $^\circ\text{C}$ )	Αριθμός κύκλων	$T_{an}$ ( $^\circ\text{C}$ )	Αριθμός κύκλων
<b>A</b>	63	60		
<b>B</b>	65	60		
<b>Γ</b>	63	20	67	40
<b>Δ</b>	65	20	67	40
<b>E</b>	65	20	68	40

### A. Επανάληψη πειράματος με $T_{an} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αριθμό κύκλων 60

Επαναλάβαμε το πείραμα στο οποίο είχαμε θέσει  $T_{an} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$  και αριθμό κύκλων 60 με σκοπό να επιβεβαιώσουμε ότι η ειδικότητα που είχαμε παρατηρήσει δεν ήταν τυχαία. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο **σχήμα 7.15**.



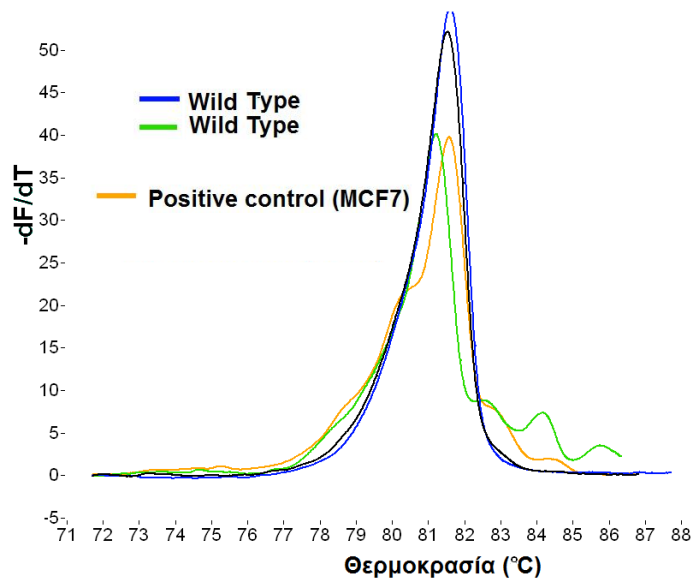
**Σχήμα 7.15:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για  $T_{an} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρείται η ύπαρξη ARMS κορυφής στην καμπύλη τόσο του θετικού μάρτυρα ελέγχου όσο και του αρνητικού μάρτυρα ελέγχου (WT).

Το αποτέλεσμα δεν είναι ικανοποιητικό αφού βλέπουμε ότι παίρνουμε ARMS προϊόν από τους αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου, ενώ η ARMS κορυφή από το μεταλλαγμένα πρότυπα δεν είναι αρκετά έντονη.



### B. $T_{an} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αριθμός κύκλων 60

Εφαρμόσαμε πιο αυστηρές συνθήκες, (αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού στους  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) με στόχο την αύξηση της ειδικότητας του ζεύγους εκκινητών ARMS. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο **σχήμα 7.16**.



**Σχήμα 7.16:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για  $T_{an} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρείται η λήψη μη ειδικού ARMS προϊόντος από το φυσιολογικό μάρτυρα ελέγχου (WT).

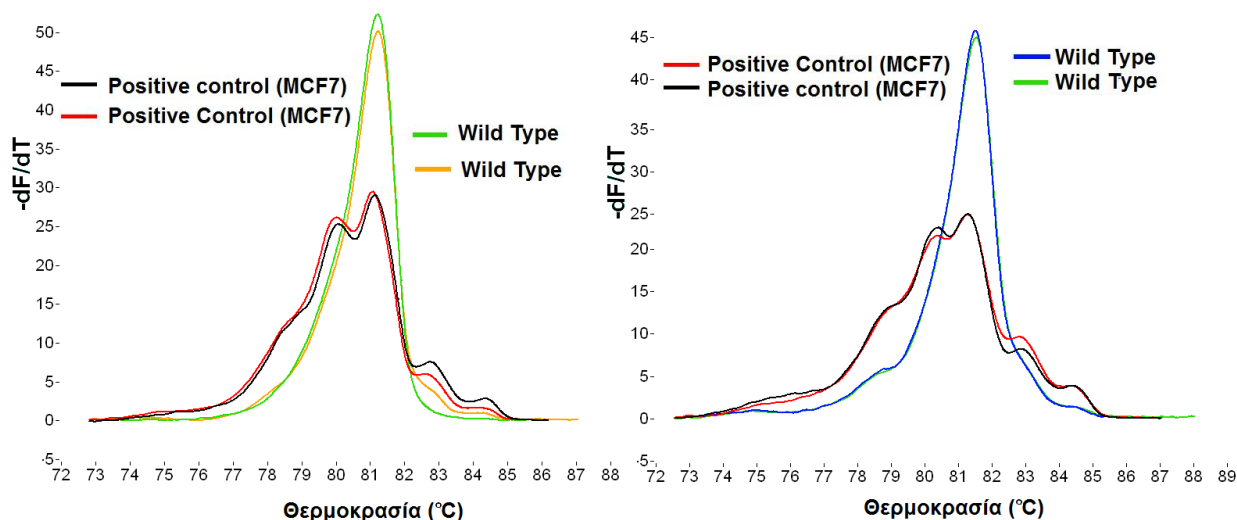
Συνεχίσαμε τις δοκιμές ανεβάζοντας το  $T_{an}$  στους  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Το αποτέλεσμα για άλλη μια φορά δεν μας ικανοποίησε.

Συνεχίσαμε βάζοντας δύο στάδια ενίσχυσης. Στο δεύτερο στάδιο οι συνθήκες θα είναι πιο αυστηρές προκειμένου να πετύχουμε την ειδική υβριδοποίηση των ARMS εκκινητών στην μεταλλαγμένη αλληλουχία:

**Γ.  $T_{an} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους πρώτους 20 κύκλους  $T_{an} = 67\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους υπόλοιπους 40 κύκλους**

**Δ.  $T_{an} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους πρώτους 20 κύκλους  $T_{an} = 67\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τους υπόλοιπους 40 κύκλους**

Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω δοκιμές φαίνονται στο **σχήμα 7.17**.

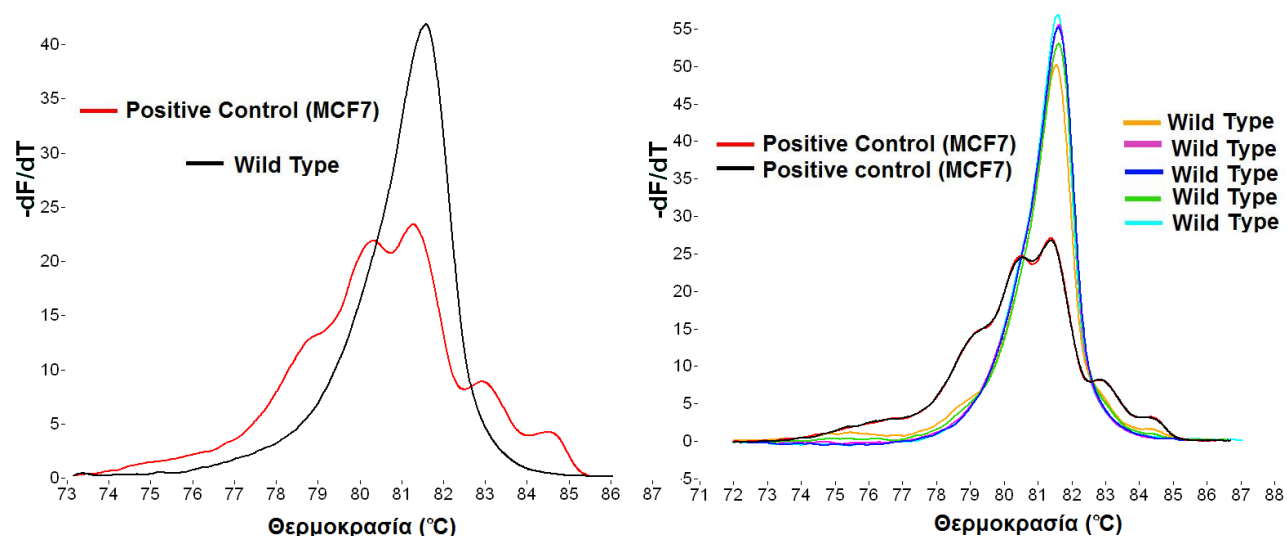


**Σχήμα 7.17:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων. Στο πρώτο διάγραμμα οι συνθήκες  $T_{an}= 63^{\circ}C/20$  κύκλοι  $T_{an}= 67^{\circ}C/40$  κύκλοι. Στο δεύτερο διάγραμμα οι συνθήκες ήταν  $T_{an}= 65^{\circ}C/20$  κύκλοι  $T_{an}= 67^{\circ}C/40$  κύκλοι.

Παρατηρούμε ότι με συνθήκες  $T_{an}= 65^{\circ}C/20$  κύκλοι  $T_{an}= 67^{\circ}C/40$  κύκλοι το ύψος της κορυφή ARMS στο αρνητικό μάρτυρα ελέγχου έχει μειωθεί.

**Ε.  $T_{an} = 65^{\circ}C$  στους πρώτους 20 κύκλους  $T_{an} = 68^{\circ}C$  για τους υπόλοιπους 40 κύκλους**

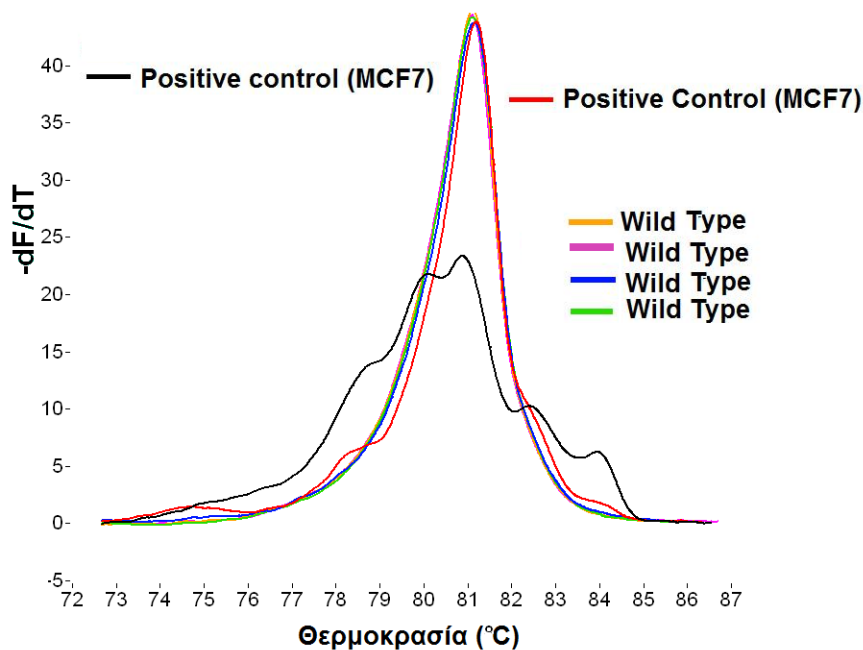
Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, θεωρήσαμε ότι πρέπει να θέσουμε ακόμα πιο αυστηρές συνθήκες στο δεύτερο στάδιο ενίσχυσης. Έτσι θέσαμε  $T_{an}$  δεύτερου σταδίου  $68^{\circ}C$  για 40 κύκλους (**σχήμα 7.18**).



**Σχήμα 7.18:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για  $T_{an}= 65^{\circ}C$  στους πρώτους 20 κύκλους και  $T_{an}= 68^{\circ}C$  στους υπόλοιπους 40 κύκλους.

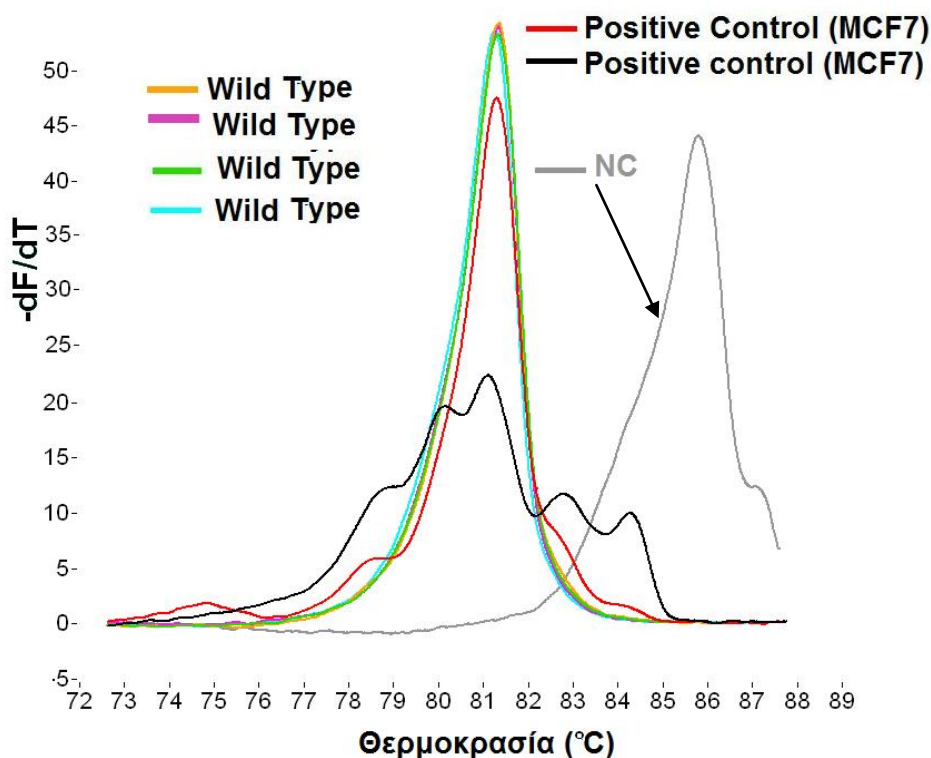
Τα αποτελέσματα έχουν σαφώς βελτιωθεί. Οι καμπύλες πρώτης παραγώγου του πρώτου περάματος με τις συγκεκριμένες συνθήκες, δείχνουν ότι δεν έχει παραχθεί προϊόν ARMS από το αρνητικό μάρτυρα (WT). Το πείραμα με τις συγκεκριμένες συνθήκες επαναλήφθηκε συμπεριλαμβάνοντας στο run περισσότερες αντιδράσεις με εκμαγείο τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου. Παρατηρήσαμε ότι οι καμπύλες πρώτης παραγώγου κάποιων από τα φυσιολογικά πρότυπα, εμφάνισαν ARMS κορυφή.

Στη συνέχεια προκειμένου να θέσουμε ακόμα πιο αυστηρές συνθήκες, μειώσαμε το χρόνο υβριδισμού των εκκινητών από 20 δευτερόλεπτα σε 16 δευτερόλεπτα, σκεπτόμενοι ότι αυτό θα δυσκόλευε τον υβριδισμό του εκκινητή στη φυσιολογική αλληλουχία και κατά συνέπεια θα μείωνε την πιθανότητα λήψης προϊόντος ARMS προϊόντος από ένα φυσιολογικό δείγμα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο **σχήμα 7.19**.



**Σχήμα 7.19:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για  $T_{an}= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους πρώτους 20 κύκλους και  $T_{an}= 68\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους επόμενους 40 κύκλους με χρόνο υβριδισμού εκκινητών μειωμένο στα 16 sec.

Το αποτέλεσμα με τις παραπάνω συνθήκες κρίθηκε ικανοποιητικό αφού παρατηρείται η παρουσία ARMS κορυφής μόνο στον θετικό μάρτυρα της μετάλλαξης (MCF7). Στη συνέχεια δοκιμάσαμε να αυξήσουμε τον αριθμό των κύκλων του δεύτερου σταδίου ενίσχυσης με στόχο της αύξηση της ευαισθησίας, η οποία αντικατοπτρίζεται από την αύξηση του ύψους της κορυφής ARMS. Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής παρουσιάζονται στο σχήμα **7.20**.



**Σχήμα 7.20:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των προτύπων για  $T_{an}= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους πρώτους 20 κύκλους και  $T_{an}= 68\text{ }^{\circ}\text{C}$  στους επόμενους 50 κύκλους με χρόνο υβριδισμού εκκινήτων μειωμένο στα 16 sec.

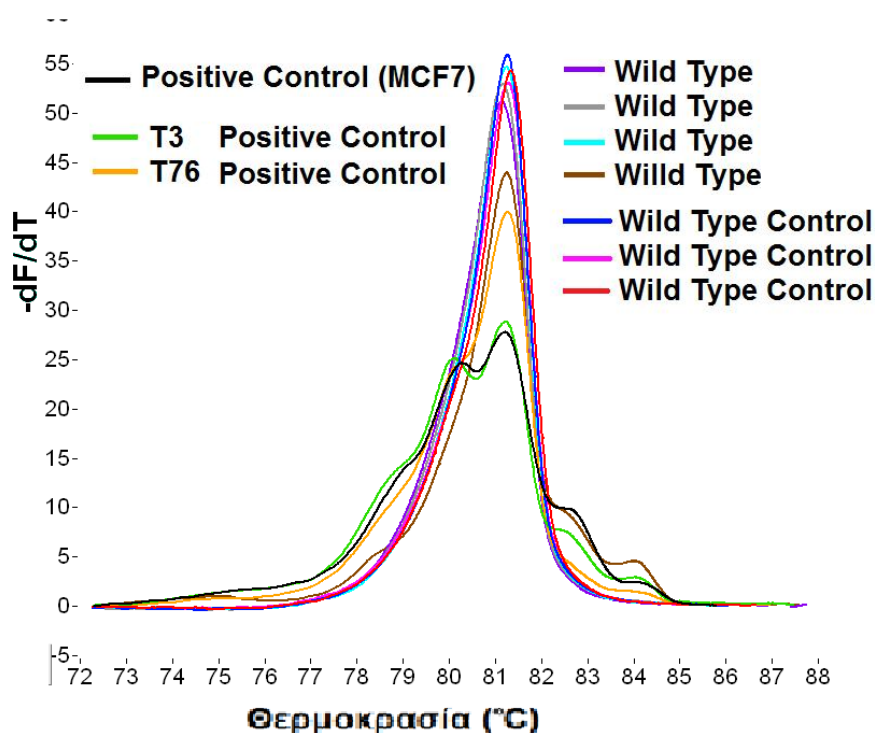
Η ευαισθησία όντως αυξήθηκε, αφού αυξήθηκε το ύψος της κορυφής ARMS στην καμπύλη πρώτης παραγώγου του θετικού μάρτυρα της μετάλλαξης MCF7. Ωστόσο σε κάποια πειράματα παρατηρήθηκε η λήψη (μη ειδικού) προϊόντος PCR από τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου της αντίδρασης PCR (Negative Control, NC). Για το λόγο αυτό, αποφασίσαμε να βάλουμε στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης 40 κύκλους.

Συνοψίζοντας το τελικό πρωτόκολλο της αντίδρασης ARMS-HRMA με τις βέλτιστες συνθήκες έχει δύο στάδια ενίσχυσης. Το πρώτο έχει 20 κύκλους με  $T_{an}= 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ενώ το δεύτερο στάδιο ενίσχυσης έχει  $T_{an}= 68\text{ }^{\circ}\text{C}$  με χρόνο υβριδισμού εκκινήτων 16 δευτερόλεπτα.

### 7.7 Εφαρμογή του πρωτόκολλου της ARMS-HRMA σε δείγματα ελέγχου

Προκειμένου να ελέγξουμε την ειδικότητα του πρωτοκόλλου ARMS-HRMA εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο που αναπτύξαμε, σε δείγματα ιστών ακινητοποιημένων σε μπλοκ παραφίνης που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενη ερευνητική εργασία. Χρησιμοποιήθηκαν 4 φυσιολογικά, δύο μεταλλαγμένα δείγματα μαζί με τα δύο πρότυπα

δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις βελτιστοποιήσεις. Το γράφημα των καμπύλων τήξεων παρουσιάζεται στο **σχήμα 7.21**.



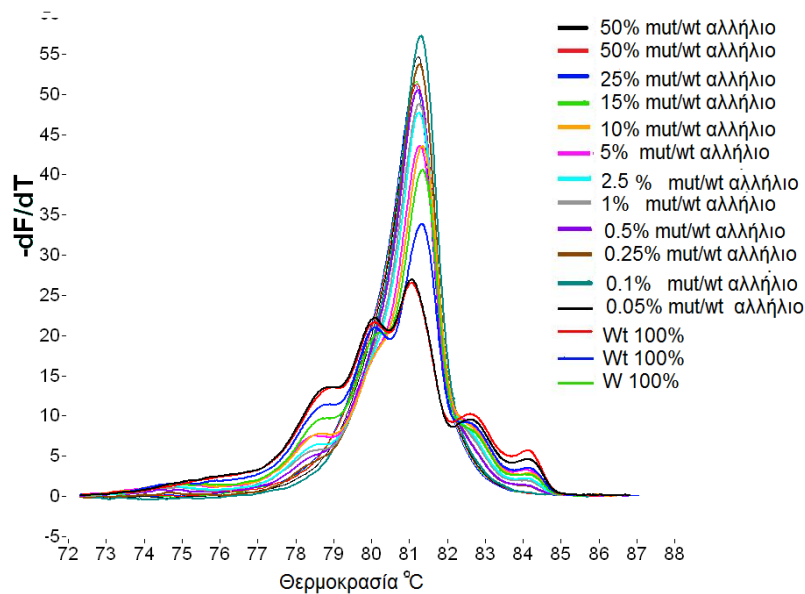
**Σχήμα 7.21:** Καμπύλες πρώτης παραγώγου των δειγμάτων ελέγχου. Παρατηρείται η παρουσία έντονης ARMS κορυφής στην καμπύλη ενός εκ των τεσσάρων φυσιολογικών δειγμάτων.

Με βάση το γράφημα του **σχήματος 7.21**, όπου παρατηρείται η παρουσία ARMS σε ένα εκ των τεσσάρων φυσιολογικών δειγμάτων ελέγχου, συμπεραίνουμε ότι το αναπτυγμένο πρωτόκολλο θέλει περαιτέρω βελτίωση ως προς την ειδικότητα.

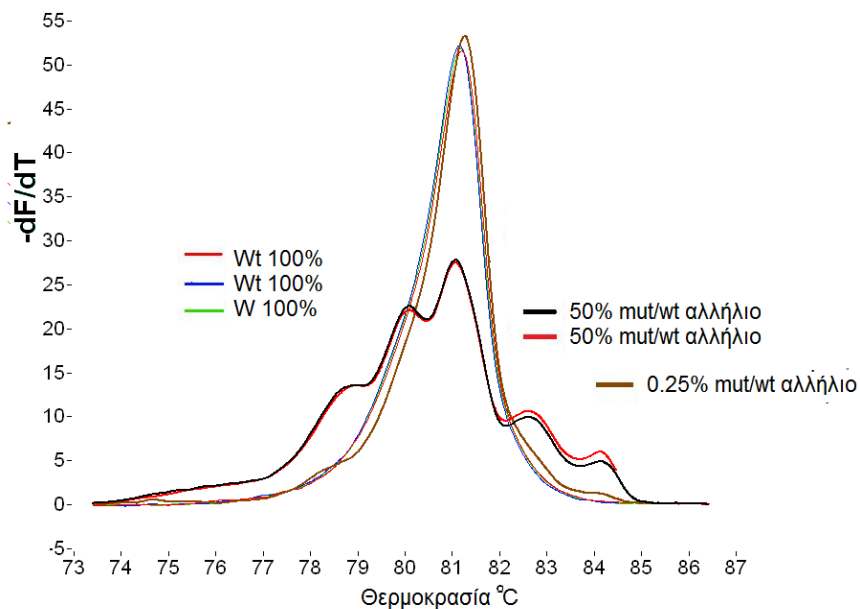
## 7.7 Μελέτη της ευαισθησίας της ARMS-HRMA

Προκειμένου να ελέγξουμε την ευαισθησία της ARMS HRM μεθόδου παρασκευάστηκαν ποσοστιαία πρότυπα με κατάλληλες αναμίξεις του μεταλλαγμένου DNA, από τον αρνητικό μάρτυρα της μετάλλαξης (MCF7) και του αρνητικού μάρτυρα για τη μετάλλαξη (WT). Τα ποσοστιαία πρότυπα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50% ( MCF7ετερόζυγο) και 100% φυσιολογικό DNA. Στόχος μας ήταν να προσδιορίσουμε το ελάχιστο ποσοστό μεταλλαγμένου, που μπορεί να ανιχνευθεί με την μέθοδο που μελετάμε, παρουσία περίσσειας φυσιολογικού. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές, έτσι ώστε να είμαστε βέβαιοι για τα αποτελέσματα. Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι με την ARMS-PCR σε συνδυασμό με το HRMA και το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορούμε να

ανιχνεύσουμε με βεβαιότητα ποσοστό 0.25% μεταλλαγμένου παρουσία φυσιολογικού. (Σχήμα 7.22 και 7.23)



Σχήμα 7.22: Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA.



Σχήμα 7.23: Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA. Παρατηρείται η παρουσία ευδιάκριτης κορυφής ARMS στο ποσοστιαίο πρότυπο που περιέχει το μεταλλαγμένο αλληλίο σε ποσοστό 0.25%.

Με βάση τα παραπάνω σχήματα η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλαγμένο DNA όταν το DNA του MCF7 αποτελεί το 0.25% του συνολικού DNA του προτύπου, άρα η ευαισθησία της μεθόδου φτάνει μέχρι και 0.25% MUT/WT DNA.

## 7.8 Συμπεράσματα

Κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ARMS- HRMA για την ανίχνευση της μετάλλαξης 1633 G> A στο *PIK3CA*, καταλήξαμε σε ένα πρωτόκολλο μετά από βελτιστοποιήσεις της τελικής συγκέντρωσης των εκκινητών, της θερμοκρασίας υβριδισμού τους, καθώς και του χρόνου υβριδισμού. Επιπλέον ελέγξαμε την απόδοση της αντίδρασης δοκιμάζοντας αρχικά ένα και τελικά δύο στάδια ενίσχυσης.

Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι: και με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν καταφέραμε να περιορίσουμε πλήρως την μη ειδική ενίσχυση των εκκινητών της ARMS-PCR όπως φάνηκε κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ελέγχου. Τέλος η ευαισθησία της μεθόδου φτάνει μέχρι και 0.25 % MUT/WT DNA οπότε είναι πιο ευαίσθητη από την HRMA της οποίας η ευαισθησία φτάνει έως και 1% MUT/WT DNA.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μονοπάτι των PI3Ks θεωρείται ότι παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στη καρκινογένεση. Οι πιο γνωστές γενετικές αλλαγές αυτού του μονοπατιού είναι: η απώλεια της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN, η ενίχυση της γονιδιακής περιοχής που περιλαμβάνει την AKT, και οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στην PI3K. Όσον αφορά την τελευταία, έχει αποδειχθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική της υπομονάδα, το *PIK3CA*, είναι συχνά μεταλλαγμένο σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκίνων και ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού (25-40%). Οι μεταλλάξεις του είναι σωματικές, ετερόζυγες, ογκογόνες παρουσιάζονται σε αυξημένα ποσοστά σε τρία σημεία (hot spots), και είναι η 3140 A>G, η 1633 G>A και η 1624 A>G με σειρά μειωμένης συχνότητας. Οι συχνότερα εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στο *PIK3CA* έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν μια αύξηση στην λειτουργία της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K, οπότε η ενεργότητα λιπιδικής κινάσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης παρουσιάζει σημαντική αύξηση. Επιπλέον, καθώς το μονοπάτι της PI3K έχει συσχετισθεί με αντίσταση στις θεραπείες που στοχεύουν τον υποδοχέα HER2 όταν αυτός υπερεκφράζεται, η ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος HRMA, που αναπτύχθηκε από τον Π. Βορκά στο πλαίσιο της διατριβής ειδίκευσής του στην Κλινική Χημεία, για την ανίχνευση των δύο συχνότερων μεταλλάξεων του εξονίου 9 του *PIK3CA* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν 31 δείγματα καρκινικών ιστών από ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι είχαν λάβει θεραπεία με Trastuzumab, ενώ στα ίδια δείγματα πρόκειται να ελεγχθούν με ανοσοϊστοχημεία τα επίπεδα έκφρασης της PTEN. Στα δείγματα αυτά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA και βρέθηκε ότι φέρουν είτε την μετάλλαξη 1633 G>A είτε την μετάλλαξη 1624 A>G σε ποσοστό 22.5 % . Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αυτά θα ενοποιηθούν με τα αποτελέσματα άλλων 75 δειγμάτων που αναλύθηκαν προηγουμένως, με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της παρουσίας των μεταλλάξεων του *PIK3CA* και του μονοπατιού PI3K/ PTEN στην ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Trastuzumab.

Στη συνέχεια εφαρμόσαμε την μέθοδο HRMA για την ανίχνευση της μετάλλαξης στα CTCs αφού ο μοριακός χαρακτηρισμός τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει

την κατανόησή μας όσον αφορά τη βιολογία της μετάστασης, για να βελτιώσει τη διαχείριση των ασθενών και για να βοηθήσει στην αναγνώριση νέων δεικτών για βιολογικές θεραπείες που στοχεύουν στην πρόληψη της μεταστατικής υποτροπής. Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs και συγκεκριμένα στην αναγνώριση δεικτών που εκφράζονται από αυτά. Μια άλλη ενδεχομένως σημαντική χρήση των CTCs για την ανάλυση βιοδεικτών είναι η ανίχνευση ογκογόνων μεταλλάξεων που μπορεί να προβλέψουν ανταπόκριση σε στοχευμένα μέσα, οπότε αρκετές μελέτες στρέφονται πλέον και προς αυτή την κατεύθυνση.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε για πρώτη φορά την παρουσία μεταλλάξεων στο *PIK3CA*, σε δείγματα γενωμικού DNA απομονωμένα από CTCs και σε δείγματα cDNA που συντέθηκε από mRNA που απομονώθηκε από CTCs. Ελέγχθηκαν υγιείς αιμοδότες, ασθενείς με διάγνωση μετάστασης και ασθενείς με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού. Στα παραπάνω δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Με την μέθοδο HRMA αναλύθηκαν επίσης δείγματα cell free DNA από περιφερικό αίμα, ασθενών με διάγνωση μετάστασης, ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού και υγιών αιμοδοτών. Μεταλλάξεις βρέθηκαν στο 4% των ασθενών στην πρώτη περίπτωση, στο 4% των ασθενών στη δεύτερη περίπτωση ενώ δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις σε κανένα από τους υγιείς αιμοδότες που μελετήσαμε.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα πιστεύουμε θα είχε ενδιαφέρον να αναλύσουμε δείγματα γενωμικού DNA προερχόμενου από τους ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού και δείγματα cfDNA των ίδιων ατόμων προκειμένου να ελέγξουμε το ποσοστό συμφωνίας ως προς την ανίχνευση των μεταλλαγμένων αλληλίων μεταξύ των δύο τύπων δειγμάτων. Αν οι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* μπορούν να ανιχνευτούν αξιόπιστα στο πλάσμα των ασθενών, με την HRMA, η δειγματοληψία θα είναι ευκολότερη και μη επεμβατική.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου, υψηλής ευαισθησίας, για την ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλίων παρουσία περίσσειας φυσιολογικών. Για την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης προσπαθήσαμε να συνδυάσουμε την HRMA που είχε αναπτυχθεί για το εξόνιο 9 με την ARMS-PCR: Το προϊόν που προκύπτει από την επέκταση του κοινού ζεύγους εκκινητών αποτελεί έναν εσωτερικό μάρτυρα ελέγχου υποδηλώνει τόσο την επιτυχία της αντίδρασης όσο και την ικανοποιητική ποιότητα του δείγματος. Το προϊόν που παράγεται από την επέκταση του αλληλοειδικού εκκινητή θα

υποδηλώνει την ύπαρξη της μετάλλαξης 1633 G>A. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των προϊόντων πραγματοποιείται με HRMA και ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων ως φυσιολογικών ή μεταλλαγμένων επιτυγχάνεται μέσω του αριθμού των κορυφών καθώς και της χαρακτηριστικής μορφής των καμπυλών τήξης.

Η HRMA-ARMS που αναπτύχθηκε ύστερα από μια σειρά βελτιστοποιήσεων έχει καλή αναλυτική ευαισθησία (0.25% MUT/WT) αλλά κακή διαγνωστική ειδικότητα. Έτσι, στην παρούσα της μορφή κρίνεται ακατάλληλη να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα.



## Παράρτημα

### 1. Αναφορές του Primer Premier για το ζεύγος εκκινητών της HRMA.

November 3, 2010

Primer Analysis Report

Page: 1

**Sequence: NewSequence**

(Sense primer) 5' GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA 3'  
 3' (258) CGAGTTTCGTTAAAGATGTGCTCT (281) 5'

(Anti-sense primer) 5' TOCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 3' (349) AGGTAAAATCGTGAATGGACACTG (326) 5'

**Properties:**

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	91	258	24	61.0	41.7	-43.3	31.0	1	--
Anti-sense	93	349	24	58.4	41.7	-41.6	33.5	1	--
Product	82	--	92	81.0	41.3	--	--	--	49.3

**Secondary structures of sense primer:**

1. Most stable hairpin:  
 ΔG -0.2 [kcal/mol] (3' Hairpin)  
 CATCTTTAAGCAACTCG 5'  
 A |||  
 CGAGA 3'

2. ΔG -1.9 [kcal/mol] (3' Hairpin)  
 TAAAGCAACTCG 5'  
 TTCTACAGAGA 3'

1. Most stable dimer:  
 ΔG -5.4 [kcal/mol]  
 5' GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA 3'  
 3' AGAGCACATCTTTAAGCAACTCG 5'

2. ΔG -4.2 [kcal/mol] (3' Dimer)  
 5' GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA 3'  
 3' AGAGCACATCTTTAAGCAACTCG 5'

3. ΔG -4.2 [kcal/mol] (3' Dimer)  
 5' GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA 3'  
 3' AGAGCACATCTTTAAGCAACTCG 5'

No false priming sites found

**Secondary structures of anti-sense primer:**

1. Most stable hairpin:  
 ΔG -0.0 [kcal/mol] (3' Hairpin)  
 ATTCAGATTTTACCT 5'  
 CCTGTGAC 3'

1. Most stable dimer:  
 ΔG -4.3 [kcal/mol] (3' Dimer)  
 5' TOCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 3' CAGTGTCCATTACGATTTTACCT 5'

No false priming sites found

## 2. Αναφορές από το Primer Premier για τους εκκινητές της ARMS-PCR

November 3, 2010

Primer Analysis Report

Page: 1

**Sequence: NewSequence**

(Sense primer) 5' TCCTCTCTCTGAAATCGCTA 3'  
 |||||  
 3' (282) AGGAGAGAGACTTTAGTGAT (301) 5'

(Anti-sense primer) 5' TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 |||||  
 3' (349) AGGTAAAATCGTGAATGGACACTG (326) 5'

**Properties:**

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	79	282	20	52.5	45.0	-35.5	33.9	1	--
Anti-sense	93	349	24	58.4	41.7	-41.6	33.5	1	--
Product	69	--	68	78.4	39.7	--	--	--	45.6

Secondary structures of sense primer:  
 No hairpins found

No dimers found

1. Most stable false priming site:  
 ΔG = -13.8 [kcal/mol]; Product = 308  
 5' TCCTCTCTCTGAAATCGCTA 3'  
 |||||  
 3' (38) AGGACAGAGACTTTTATTC (57) 5'

Secondary structures of anti-sense primer:

1. Most stable hairpin:  
 ΔG = 0.0 [kcal/mol] (3' Hairpin)  
 ATTCAGGATTTTACCT 5'  
 |||||  
 CCTGTGAC 3'

1. Most stable dimer:  
 ΔG = -4.3 [kcal/mol] (3' Dimer)  
 5' TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 |||||  
 3' CAGTGCCATTACGATTTTACCT 5'

No false priming sites found

Secondary structures of primer pair:

1. Most stable cross dimer:  
 ΔG = -6.7 [kcal/mol] (3' Cross dimer)  
 5' TCCTCTCTCTGAAATCGCTA 3'  
 |||||  
 3' CAGTGCCATTACGATTTTACCT 5'

2. ΔG = -5.4 [kcal/mol]  
 5' TCCTCTCTCTGAAATCGCTA 3'  
 |||||  
 3' CAGTGCCATTACGATTTTACCT 5'

### 3. Αναφορές από το Primer Premier για την ARMS-HRMA

A) ARMS ζεύγος εκκινήτων, στο οποίο είναι ενσωματωμένες οι πλούσιες σε GC βάσεις αλληλουχίες

October 27, 2011

Primer Analysis Report

Page: 1

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' CCTGCCCCAGGCGACGCCGCCCTCCTCTCTCTGAAATCGCTA 3'  
 3' (282) GGACGGGGTCGCTGGGGGAGGAGAGACTTTAGTGAT (320) 5'

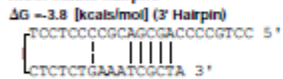
(Anti-sense primer) 5' GCCAGCCAGGGGTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 3' (380) CGGTGGTCCCCAGGTAAAATCGTGAATGGACTG (345) 5'

Properties:

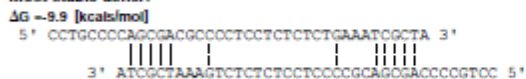
	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	57	282	39	89.4	64.1	-85.3	35.1	1	--
Anti-sense	89	380	36	81.1	55.6	-71.7	33.2	1	--
Product	46	--	99	86.1	53.5	--	--	--	59.6

Secondary structures of sense primer:

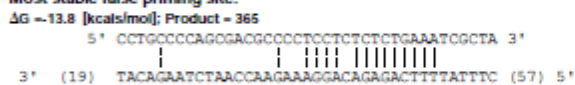
1. Most stable hairpin:



1. Most stable dimer:

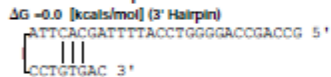


1. Most stable false priming site:

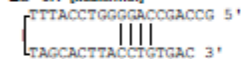


Secondary structures of anti-sense primer:

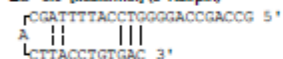
1. Most stable hairpin:



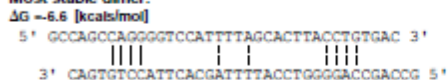
2. ΔG = -0.1 [kcal/mol]



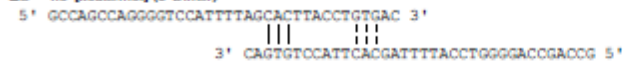
3. ΔG = -3.0 [kcal/mol] (3' Hairpin)



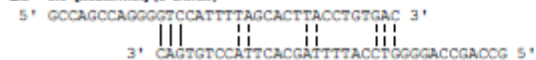
1. Most stable dimer:



2. ΔG = -4.3 [kcal/mol] (3' Dimer)



3. ΔG = -3.9 [kcal/mol] (3' Dimer)



No false priming sites found

## B) HRMA εκκινήτες για την ARMS-HRMA

October 27, 2011

Primer Analysis Report

Page: 1

**Sequence: NewSequence**

(Sense primer) 5' **G**OTCAAAGCAATTTCTACACGAGA 3'  
 3' (258) **CGAGTTTCGGTTAAAGATGGCTCT** (281) 5'

(Anti-sense primer) 5' **G**CCAGCCAGGGGTCCATTTAGCACTTACCTGTGAC 3'  
 3' (361) **CGGTGGTCCCCAGGTAAATCGTGAATGGACCTG** (326) 5'

**Properties:**

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	$\Delta G$ [kcal/mol]	Activity [ $\mu$ g/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	91	258	24	61.0	41.7	-43.3	31.0	1	--
Anti-sense	89	361	36	61.1	55.6	-71.7	33.2	1	--
Product	50	--	104	63.6	45.2	--	--	--	51.8

**Secondary structures of sense primer:**

- Most stable hairpin:**  
 $\Delta G = 0.2$  [kcal/mol] (7 Hairpin)
- $\Delta G = 1.9$  [kcal/mol] (7 Hairpin)
- Most stable dimer:**  
 $\Delta G = -5.4$  [kcal/mol]
- $\Delta G = -4.2$  [kcal/mol] (7 Dimer)
- $\Delta G = -4.2$  [kcal/mol] (7 Dimer)

No false priming sites found

**Secondary structures of anti-sense primer:**

- Most stable hairpin:**  
 $\Delta G = 0.0$  [kcal/mol] (7 Hairpin)
- $\Delta G = 0.1$  [kcal/mol]
- $\Delta G = 3.0$  [kcal/mol] (7 Hairpin)
- Most stable dimer:**  
 $\Delta G = -6.6$  [kcal/mol]
- $\Delta G = -4.3$  [kcal/mol] (7 Dimer)



### ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Σύντμηση	Αγγλικός όρος
<b>dormancy</b>	λήθαργος
<b>extravasation</b>	εξαγγείωση
<b>intravasation</b>	ενδοαγγείωση
<b>mismatch</b>	Λάθος ταιριασμένες βάσεις (όχι συμπληρωματικές)
<b>Sequencing</b>	αλληλούχηση
<b>Southern Blotting</b>	αποτύπωση κατά Southern



**ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ**

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
<b>ABD</b>	Adaptor Binding Domain	περιοχή που δεσμεύεται στον προσαρμογέα
<b>ARMS</b>	Allele Refractory Mutation System	
<b>ASOs</b>	Allele-Specific Oligonucleotides	ολιγονουλεοτίδια ειδικά για κάθε αλληλόμορφο
<b>ATF2</b>	Activating Transcription Factor 2	ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας 2
<b>BM</b>	Bone Marrow	μυελός των οστών
<b>BRMS1</b>	Breast cancer Metastasis Suppressor 1	ο καταστολέας 1 της μετάστασης του καρκίνου του μαστού
<b>cfDNA</b>	circulating free DNA	ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA
<b>CK-</b>	Cytokeratin	Κυτταροκερατίνη
<b>CRPC</b>	Castration Resistant Prostate Cancer	ανθεκτικός στον ευνουχισμό καρκίνος του προστάτη
<b>CTCs</b>	Circulating Tumor Cells	κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
<b>DFS</b>	Disease Free Survival	ελεύθερης νόσου επιβίωση
<b>DTCs</b>	Disseminating Tumor Cells	διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα
<b>EMT</b>	Epithelial-to-Mesenchymal Transition	επιθήλιο-μεσεγγυματική μετατροπή
<b>EGR1</b>	Early Growth Regulated Transcription Factor 1	πρώιμα ρυθμισμένο μεταγραφικό παράγοντα 1
<b>EGFR</b>	Epithermal Growth Factor Receptor	υποδοχέας του επιδερμικού

		αυξητικού παράγοντα
<b>EpCAM</b>	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Μόριο επιθηλιακής κυτταρικής προσκόλλησης
<b>ER</b>	Estrogen receptor	Υποδοχέας οιστρογόνων
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor	υποδοχέας του προερχόμενου από την ινοβλάστη αυξητικού παράγοντα
<b>FP</b>	Fluorescence Polarization	πόλωση φθορισμού
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer	φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας συντονισμού
<b>GPCRs</b>	G- Protein-Coupled Receptors	υποδοχείς συνδεδεμένοι με την G πρωτεΐνη
<b>GSK3</b>	Glycogen Synthase Kinase 3	κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου
<b>HER2</b>	Human Epidermal growth factor Receptor 2	υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
<b>HRMA</b>	High Resolution Melting Analysis	υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξης
<b>IBC</b>	Inflammatory Breast Cancer	φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού
<b>IGF-1R</b>	Insulin-like Growth Factor Receptor	υποδοχέας 1 του αυξητικού παράγοντα που μοιάζει με την ινσουλίνη
<b>IRS1</b>	Insulin Receptor Substrate 1	υπόστρωμα 1 του υποδοχέα ινσουλίνης
<b>ISET</b>	Isolation by Size of Epithelial Tumor cells	σύστημα απομόνωσης μέσω του

		μεγέθους των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων
<b>JAK</b>	Janus Kinase 2	κινάση 2 του Janus
<b>MASA</b>	Mutant Allele Specific Amplification	αλληλοειδική ανίσχυση μεταλλαγμένου
<b>MBC</b>	Metastatic Breast Cancer	μεταστατικός καρκίνος του μαστού
<b>MRD</b>	Minimal Residual Disease	ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor kappaB	ο πυρηνικός παράγοντας kappaB
<b>NSLC</b>	Non Small Lung Cancer	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα
<b>PASA</b>	PCR Amplification of Specific Alleles	ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων αλληλίων
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος
<b>PCR</b>	Polymerase Chain reaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PDGFR</b>	Platelet Derived Growth Factor Receptor	υποδοχέας του αιμοπεταλικού αυξητικού παράγοντα
<b>PDK1</b>	3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1	εξαρτώμενη από την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη-3 πρωτεϊνική κινάση-1
<b>PH</b>	Pleckstrin Homology	περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης
<b>PIKK</b>	PI-3 kinase-like kinase	οικογένεια κινασών που μοιάζουν με την PI-3 κινάση

<b>PIKs</b>	phosphoinositide kinases	κινάσες του φωσφοϊνοσιτιδίου
<b>PI3Ks</b>	phosphoinositide 3-kinases	κινάσες του 3- φωσφοϊνοσιτιδίου
<b>PIP4Ks</b>	phosphoinositide 4-kinases	κινάσες του 4- φωσφοϊνοσιτιδίου
<b>PIP5Ks</b>	phosphoinositide 5-kinases	κινάσες του 5- φωσφοϊνοσιτιδίου
<b>PIP2</b>	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate	4,5- διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
<b>PIP3</b>	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate	3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
<b>PKB</b>	Protein Kinase B	πρωτεϊνική κινάση B
<b>PDK1</b>	3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1	εξαρτώμενη από το 3- φωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση-1
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor $\gamma$	ενεργοποιούμενος από το υπεροξύσωμα πολλαπλασιαστικός υποδοχέας $\gamma$
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog	ομόλογη της φωσφατάσης και τενσίνης πρωτεΐνη
<b>RBD</b>	RAS Binding Domain	επικράτεια σύνδεσης με τη Ras
<b>RFLPs</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism	πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων
<b>Rheb</b>	Ras homolog enriched in brain	
<b>RTKs</b>	Receptors Tyrosine Kinases	υποδοχείς κινάσης τυροσίνης
<b>SNPs</b>	Single Nucleotide Polymorphisms	Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor-β	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
<b>TOR</b>	Target Of Rapamycin	
<b>TSC</b>	Tuberous Sclerosis Complex	σύμπλεγμα της κονδυλώδους σκλήρυνσης





## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vorkas P. A., Poumpouridou N. et al. PIK3CA Hotspot Mutation Scanning by a Novel and Highly Sensitive High-Resolution Small Amplicon Melting Analysis Method. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2010, 12(5): 697-704
2. Vanhaesebroeck B., Waterfield M. D. Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases. *Experimental Cell Research* 1999, 253(1): 239-54
3. Huang C.-H., Mandelker D. et al. The Structure of a Human p110alpha/p85alpha Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3Kalpha Mutations. *Science* 2007, 318(5857): 1744-8
4. Pacold M. E., Suire S. et al. Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase<sup>3</sup>. *Cell* 2000, 103(6): 931-44
5. Walker E. H., Perisic O. et al. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 1999, 402(6759): 313-20
6. Vanhaesebroeck B., Leever S. J. et al. Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* 1997, 22(7): 267-72
7. Jiang B. H., Liu L. Z. et al. Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Advances in Cancer Research: Academic Press* 2009: 19-65
8. Dhand R., Hiles I. et al. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J* 1994 Feb 1;13(3):522-33,
9. Klippel A., Escobedo J. A. et al. The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. *Mol Cell Biol* 1994, 14(4): 2675-85
10. Engelman J. A., Luo J., Cantley L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006, 7(8): 606-19
11. Luo J., Field S. J. et al. The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *The Journal of Cell Biology* 2005, 170(3): 455-64
12. Yu J., Zhang Y. et al. Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110alpha Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. *Mol Cell Biol* 1998, 18(3): 1379-87
13. Cantley L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002 May 31;296(5573):1655-7,
14. Luo J., Sobkiw C. L. et al. Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell metabolism* 2006, 3(5): 355-66
15. Zhao J. J., Cheng H. et al. The p110 $\alpha$  isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103(44): 16296-300
16. Hu P., Margolis B. et al. Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 1992, 12(3): 981-90
17. McGlade C. J., Ellis C. et al. SH2 domains of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase regulate binding to growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 1992, 12(3): 991-7
18. Zhu G., Decker S. J., Saltiel A. R. Direct analysis of the binding of Src-homology 2 domains of phospholipase C to the activated epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Oct 15;89(20):9559-63,

19. Peyssonnaud C., Provot S. et al. Induction of Postmitotic Neuroretina Cell Proliferation by Distinct Ras Downstream Signaling Pathways. *Mol Cell Biol* 2000, 20(19): 7068-79
20. Rodriguez-Viciano P., Marte B. M. et al. Phosphatidylinositol 3' Kinase: One of the Effectors of Ras [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 1996, 351(1336): 225-32
21. Klinghoffer R. A., Duckworth B. et al. Platelet-derived growth factor-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by receptor binding of SH2-domain-containing proteins which influence Ras activity. *Mol Cell Biol* 1996, 16(10): 5905-14
22. Chan T. O., Rodeck U. et al. Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer cell* 2002, 1(2): 181-91
23. Vivanco I., Sawyers C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(7): 489-501
24. Stephens L., Smrcka A. et al. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein <sup>23</sup> subunits. *Cell* 1994, 77(1): 83-93
25. Corvera S., Czech M. P. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends in Cell Biology* 1998, 8(11): 442-6
26. Alessi D. R., James S. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B±. *Current biology : CB* 1997, 7(4): 261-9
27. Bader A. G., Kang S. et al. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(12): 921-9
28. Garami A., Zwartkruis F. J. T. et al. Insulin Activation of Rheb, a Mediator of mTOR/S6K/4E-BP Signaling, Is Inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell* 2003, 11(6): 1457-66
29. Inoki K., Li Y. et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* 2003, 17(15): 1829-34
30. Inoki K., Li Y. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002, 4(9): 648-57
31. Tee A. R., Manning B. D. et al. Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb. *Current biology : CB* 2003, 13(15): 1259-68
32. Zhang Y., Gao X. et al. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 2003, 5(6): 578-81
33. Zhao L., Vogt P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008, 27(41): 5486-96
34. Medema R. H., Kops G. J. P. L. et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000, 404(6779): 782-7
35. Seoane J., Le H.-V. et al. Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell* 2004, 117(2): 211-23
36. Gilley J., Coffey P. J., Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of Cell Biology* 2003, 162(4): 613-22
37. Stahl M., Dijkers P. F. et al. The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27Kip1 and Bim in Response to IL-2. *The Journal of Immunology* 2002, 168(10): 5024-31

38. Gregory M. A., Qi Y., Hann S. R. Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Controls c-Myc Proteolysis and Subnuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(51): 51606-12
39. Nikolakaki E., Coffey P. J. et al. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene* 1993 Apr;8(4):833-40,
40. Sears R., Nuckolls F. et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & Development* 2000, 14(19): 2501-14
41. Sarbassov D. D., Guertin D. A. et al. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 2005, 307(5712): 1098-101
42. Harrington L. S., Findlay G. M. et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin $\beta$ -PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of Cell Biology* 2004, 166(2): 213-23
43. Rodriguez-Viciana P., Warne P. H. et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* 1994, 370(6490): 527-32
44. Rodriguez-Viciana P., Warne P. H. et al. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J* 1996 May 15;15(10):2442-51,
45. Li L., Ernstring B. R. et al. A Family of Putative Tumor Suppressors Is Structurally and Functionally Conserved in Humans and Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(47): 29403-6
46. Maehama T., Dixon J. E. The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(22): 13375-8
47. Salmena L., Carracedo A., Pandolfi P. P. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell* 2008, 133(3): 403-14
48. Patel L., Pass I. et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR $\alpha$  agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Current biology : CB* 2001, 11(10): 764-8
49. Shen Y. H., Zhang L. et al. Up-regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten) Mediates p38 MAPK Stress Signal-induced Inhibition of Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(12): 7727-36
50. Stambolic V., Tsao M.-S. et al. High Incidence of Breast and Endometrial Neoplasia Resembling Human Cowden Syndrome in pten+/ $\beta$  Mice. *Cancer Research* 2000, 60(13): 3605-11
51. Hettinger K., Vikhanskaya F. et al. c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ* 2006, 14(2): 218-29
52. Mahimainathan L., Das F. et al. Mesangial Cell Hypertrophy by High Glucose Is Mediated by Downregulation of the Tumor Suppressor PTEN. *Diabetes* 2006, 55(7): 2115-25
53. Xia D., Srinivas H. et al. Mitogen-activated Protein Kinase Kinase-4 Promotes Cell Survival by Decreasing PTEN Expression through an NF kappa B-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282(6): 3507-19
54. Foukas L. C., Beeton C. A. et al. Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase by Its Intrinsic Serine Kinase Activity In Vivo. *Mol Cell Biol* 2004, 24(3): 966-75
55. Foukas L. C., Shepherd P. R. Phosphoinositide 3-kinase: the protein kinase that time forgot. *Biochem Soc Trans* 2004 Apr;32(Pt 2):330-1,
56. Kang S., Denley A. et al. Oncogenic transformation induced by the p110 $\beta$ , - $\gamma$ , and - $\delta$  isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(5): 1289-94

57. Samuels Y., Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347:21-41,
58. Li J., Yen C. et al. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 1997, 275(5308): 1943-7
59. Steck P. A., Pershouse M. A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997, 15(4): 356-62
60. Phillips W. A., Russell S. E. et al. Mutation analysis of PIK3CA and PIK3CB in esophageal cancer and Barrett's esophagus. *International Journal of Cancer* 2006, 118(10): 2644-6
61. Barr F. G., Galili N. et al. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 1993, 3(2): 113-7
62. Ligresti G., Militello L. et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: Role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle* 2009, 8(9): 1352-8
63. Samuels Y., Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 2006 Jan;18(1):77-82
64. Samuels Y., Wang Z. et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 2004, 304(5670): 554
65. Arcaro A., Guerreiro A. S. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics* 2007 Aug;8(5):271-306,
66. Bader A. G., Kang S., Vogt P. K. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(5): 1475-9
67. Ikenoue T., Kanai F. et al. Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. *Cancer Research* 2005, 65(11): 4562-7
68. Isakoff S. J., Engelman J. A. et al. Breast Cancer- Associated PIK3CA Mutations Are Oncogenic in Mammary Epithelial Cells. *Cancer Research* 2005, 65(23): 10992-1000
69. Kang S., Bader A. G., Vogt P. K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(3): 802-7
70. Zhao J. J., Liu Z. et al. The oncogenic properties of mutant p110 alpha and p110 beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(51): 18443-8
71. Miled N., Yan Y. et al. Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit. *Science* 2007, 317(5835): 239-42
72. Yu J., Wjasow C., Backer J. M. Regulation of the p85/p110α Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(46): 30199-203
73. Huang C.-H., Mandelker D. et al. The Structure of a Human p110α/p85α Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3Kα Mutations. *Science* 2007, 318(5857): 1744-8
74. Gymnopoulos M., Elsliger M.-A., Vogt P. K. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104(13): 5569-74
75. Zhao L., Vogt P. K. Helical domain and kinase domain mutations in p110α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, 105(7): 2652-7

76. Lee J. W., Soung Y. H. et al. *PIK3CA* gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2004, 24(8): 1477-80
77. Huang C.-H., Mandelker D. et al. Insights into the oncogenic effects of *PIK3CA* mutations from the structure of p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$ . *Cell Cycle* 2008, 7(9): 1151-6
78. Page C., Huang M. et al. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells. *Int J Oncol* 2000 Jul;17(1):23-8,
79. Saal L. H., Holm K. et al. *PIK3CA* Mutations Correlate with Hormone Receptors, Node Metastasis, and ERBB2, and Are Mutually Exclusive with PTEN Loss in Human Breast Carcinoma. *Cancer Research* 2005, 65(7): 2554-9
80. Stemke-Hale K., Gonzalez-Angulo A. M. et al. An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of *PIK3CA*, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. *Cancer Research* 2008, 68(15): 6084-91
81. Li S., Rong M. et al. *PIK3CA* mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006, 96(1): 91-5
82. Lai Y.-L., Mau B.-L. et al. *PIK3CA* Exon 20 Mutation is Independently Associated with a Poor Prognosis in Breast Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology* 2008, 15(4): 1064-9
83. Lerma E., Catusus L. et al. Exon 20 *PIK3CA* mutations decreases survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Archiv* 2008, 453(2): 133-9
84. Barbareschi M., Buttitta F. et al. Different Prognostic Roles of Mutations in the Helical and Kinase Domains of the *PIK3CA* Gene in Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2007, 13(20): 6064-9
85. Maruyama N., Miyoshi Y. et al. Clinicopathologic Analysis of Breast Cancers with *PIK3CA* Mutations in Japanese Women. *Clinical Cancer Research* 2007, 13(2): 408-14
86. Perez-Tenorio G., Alkhorji L. et al. *PIK3CA* Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2007, 13(12): 3577-84
87. Kalinsky K., Jacks L. M. et al. *PIK3CA* Mutation Associates with Improved Outcome in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2009, 15(16): 5049-59
88. Buttitta F., Felicioni L. et al. *PIK3CA* mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *The Journal of Pathology* 2006, 208(3): 350-5
89. Fendly B. M., Winget M. et al. Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Reactive to Either the Human Epidermal Growth Factor Receptor or HER2/neu Gene Product. *Cancer Research* 1990, 50(5): 1550-8
90. Cobleigh M. A., Vogel C. L. et al. Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17(9): 2639
91. Piccart-Gebhart M. J., Procter M. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2005, 353(16): 1659-72
92. Vogel C. L., Cobleigh M. A. et al. Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002, 20(3): 719-26
93. Pohlmann P. R., Mayer I. A., Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2009, 15(24): 7479-91
94. Baselga J., Albanell J. et al. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 2001 Oct;28(5 Suppl 16):4-11,

95. Lane H. A., Motoyama A. B. et al. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S21-2,
96. Nagata Y., Lan K.-H. et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell* 2004, 6(2): 117-27
97. Barok M. r., Isola J. et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007, 6(7): 2065-72
98. Simpson L., Parsons R. PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research* 2001, 264(1): 29-41
99. Liu P., Cheng H. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8(8): 627-44
100. Brugge J., Hung M.-C., Mills G. B. A New Mutational activation in the PI3K Pathway. *Cancer cell* 2007, 12(2): 104-7
101. Berns K., Horlings H. M. et al. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer cell* 2007, 12(4): 395-402
102. Bouchalova K., Cizkova M. et al. Lapatinib in breast cancer - the predictive significance of HER1 (EGFR), HER2, PTEN and PIK3CA genes and lapatinib plasma level assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010 Dec;154(4):281-8,
103. Medina P. J., Goodin S. Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clinical Therapeutics* 2008, 30(8): 1426-47
104. Bilancia D., Rosati G. et al. Lapatinib in breast cancer. *Annals of Oncology* 2007, 18(suppl 6): vi26-vi30
105. Eichhorn P. J. A., Gili M. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Hyperactivation Results in Lapatinib Resistance that Is Reversed by the mTOR/Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor NVP-BE235. *Cancer Research* 2008, 68(22): 9221-30
106. Gustin J. P., Cosgrove D. P., Park B. H. The PIK3CA gene as a mutated target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008 Dec;8(8):733-40,
107. Hu L., Zaloudek C. et al. In Vivo and in Vitro Ovarian Carcinoma Growth Inhibition by a Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor (LY294002). *Clinical Cancer Research* 2000, 6(3): 880-6
108. Schultz R. M., Merriman R. L. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin. *Anticancer Res* 1995 Jul-Aug;15(4):1135-9,
109. Samuels Y., Diaz L. A. et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer cell* 2005, 7(6): 561-73
110. Workman P. Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment. *Biochem Soc Trans* 2004 Apr;32(Pt 2):393-6,
111. Knight Z. A., Gonzalez B. et al. A Pharmacological Map of the PI3-K Family Defines a Role for p110 alpha in Insulin Signaling. *Cell* 2006, 125(4): 733-47
112. Altomare D. A., Testa J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50): 7455-64
113. Staal S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987, 84(14): 5034-7

114. Kondapaka S. B., Singh S. S. et al. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Molecular Cancer Therapeutics* 2003, 2(11): 1093-103
115. Yang L., Dan H. C. et al. Akt/Protein Kinase B Signaling Inhibitor-2, a Selective Small Molecule Inhibitor of Akt Signaling with Antitumor Activity in Cancer Cells Overexpressing Akt. *Cancer Research* 2004, 64(13): 4394-9
116. Yoeli-Lerner M., Yiu G. K. et al. Akt Blocks Breast Cancer Cell Motility and Invasion through the Transcription Factor NFAT. *Molecular cell* 2005, 20(4): 539-50
117. Chen W. S., Xu P.-Z. et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development* 2001, 15(17): 2203-8
118. Cho H., Mu J. et al. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001, 292(5522): 1728-31
119. Tschopp O., Yang Z.-Z. et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 2005, 132(13): 2943-54
120. Wullschlegel S., Loewith R., Hall M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 2006, 124(3): 471-84
121. Bernardi R., Guernah I. et al. PML inhibits HIF-1[alpha] translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 2006, 442(7104): 779-85
122. Sehgal S. N., Baker H., Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975 Oct;28(10):727-32,
123. Neuhaus P., Klupp J., Langrehr J. M. mTOR inhibitors: An overview. *Liver Transplantation* 2001, 7(6): 473-84
124. Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 2005, 17(6): 596-603
125. Manning B. D. Balancing Akt with S6K. *The Journal of Cell Biology* 2004, 167(3): 399-403
126. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med J Australia* 1869, 146-7
127. Fidler I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):453-8,
128. Lianidou E. S., Markou A. Review: Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2011 Jul 29 2011,
129. Chaffer C. L., Weinberg R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(6024): 1559-64
130. Bruce Alberts A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. ed. New York 2002
131. Aguirre-Ghiso J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007, 7(11): 834-46
132. Klein C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(4): 302-12
133. Husemann Y., Geigl J. B. et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008 Jan;13(1):58-68
134. Polyak K., Weinberg R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(4): 265-73
135. Hurst D. R., Edmonds M. D. et al. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Up-regulates miR-146, Which Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research* 2009, 69(4): 1279-83

136. Vaidya K. S., Harihar S. et al. Breast Cancer Metastasis Suppressor-1 Differentially Modulates Growth Factor Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(42): 28354-60
137. Thiery J. P., Sleeman J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7(2): 131-42
138. Le X.-F., Merchant O. et al. The Roles of MicroRNAs in the Cancer Invasion-Metastasis Cascade. *Cancer Microenvironment*, 3(1): 137-47
139. Dotan E., Cohen S. J. et al. Circulating Tumor Cells: Evolving Evidence and Future Challenges. *The Oncologist* 2009, 14(11): 1070-82
140. Tibbe A. G. J., Miller M. C., Terstappen L. W. M. M. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry Part A* 2007, 71A(3): 154-62
141. Lianidou E. S., Markou A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clin Chem* 2011, 57(9): 1242-55
142. Rosenberg R., Gertler R. et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002, 49(4): 150-8
143. Partridge M., Phillips E. et al. Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumour cells in patients with head and neck SCC. *The Journal of Pathology* 1999, 189(3): 368-77
144. Choesmel V., Pierga J. Y. et al. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):R556-70 Epub 2004 Jul 29,
145. Molnar B., Ladanyi A. et al. Circulating Tumor Cell Clusters in the Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2001, 7(12): 4080-5
146. Ring A., Smith I. E., Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *The Lancet Oncology* 2004, 5(2): 79-88
147. Fehm T., Solomayer E. F. et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005, 7(2): 171-85
148. Stahl J. M., Sharma A. et al. Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. *Cancer Research* 2004, 64(19): 7002-10
149. Loberg R. D., Fridman Y. et al. Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review. *Neoplasia* 2004 Jul-Aug;6(4):302-9 2004,
150. Mostert B., Kraan J. et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(1): 33-41
151. Schindlbeck C., Stellwagen J. et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich-Antigen. *Clinical and Experimental Metastasis* 2008, 25(3): 233-40
152. Sieuwerts A. M., Kraan J. et al. Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Antibodies and the Detection of Circulating Normal-Like Breast Tumor Cells. *Journal of the National Cancer Institute* 2009, 101(1): 61-6
153. Vona G., Sabile A. et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells: A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. *The American Journal of Pathology* 2000, 156(1): 57-63
154. Mostert B., Sleijfer S. et al. Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer treatment reviews* 2009, 35(5): 463-74



155. Sequist L. V., Nagrath S. et al. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009 Mar;4(3):281-3,
156. Stott S. L., Hsu C.-H. et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43): 18392-7
157. Elshimali Y. I., Grody W. W. The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood. *Diagn Mol Pathol* 2006 Dec;15(4):187-94,
158. Harris L., Fritsche H. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2007, 25(33): 5287-312
159. Smerage J. B., Hayes D. F. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 2005, 94(1): 8-12
160. Paterlini-Brechot P., Benali N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer letters* 2007, 253(2): 180-204
161. Naoe M., Ogawa Y. et al. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer* 2007, 109(7): 1439-45
162. Allard W. J., Matera J. et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research* 2004, 10(20): 6897-904
163. Riethdorf S., Fritsche H. et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clinical Cancer Research* 2007, 13(3): 920-8
164. Goodman O. B., Fink L. M. et al. Circulating Tumor Cells in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer Baseline Values and Correlation with Prognostic Factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2009, 18(6): 1904-13
165. Bustin S. A., Benes V. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009, 55(4): 611-22
166. Ludwig J. A., Weinstein J. N. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(11): 845-56
167. Slade M. J., Smith B. M. et al. Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of Micrometastases in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17(3): 870
168. Stathopoulou A., Gizi A. et al. Real-Time Quantification of CK-19 mRNA-Positive Cells in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Using the Lightcycler System. *Clinical Cancer Research* 2003, 9(14): 5145-51
169. Stathopoulou A., Ntoulia M. et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *International Journal of Cancer* 2006, 119(7): 1654-9
170. Xenidis N., Perraki M. et al. Predictive and Prognostic Value of Peripheral Blood Cytokeratin-19 mRNA-Positive Cells Detected by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Node-Negative Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24(23): 3756-62
171. Ignatiadis M., Kallergi G. et al. Prognostic Value of the Molecular Detection of Circulating Tumor Cells Using a Multimarker Reverse Transcription-PCR Assay for Cytokeratin 19, Mammaglobin A, and HER2 in Early Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2008, 14(9): 2593-600
172. Ignatiadis M., Xenidis N. et al. Different Prognostic Value of Cytokeratin-19 mRNA-Positive Circulating Tumor Cells According to Estrogen Receptor and HER2

- Status in Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2007, 25(33): 5194-202
173. Xenidis N., Ignatiadis M. et al. Cytokeratin-19 mRNA-Positive Circulating Tumor Cells After Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27(13): 2177-84
174. Markou A., Strati A. et al. Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer by a Liquid Bead Array Hybridization Assay. *Clin Chem*, 57(3): 421-30
175. Whitcombe D., Theaker J. et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotech* 1999, 17(8): 804-7
176. Maheswaran S., Sequist L. V. et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *New England Journal of Medicine* 2008, 359(4): 366-77
177. Jiang Y., Palma J. F. et al. Detection of Androgen Receptor Mutations in Circulating Tumor Cells in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Chem* 2010, 56(9): 1492-5
178. Punnoose E. A., Atwal S. K. et al. Molecular Biomarker Analyses Using Circulating Tumor Cells. *PLoS ONE* 2010, 5(9): e12517
179. Kitago M., Koyanagi K. et al. mRNA Expression and BRAF Mutation in Circulating Melanoma Cells Isolated from Peripheral Blood with High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen-Specific Monoclonal Antibody Beads. *Clin Chem* 2009, 55(4): 757-64
180. Ashida S., Okuda H. et al. Detection of Circulating Cancer Cells with von Hippel-Lindau Gene Mutation in Peripheral Blood of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2000, 6(10): 3817-22
181. Braun S., Vogl F. D. et al. A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2005, 353(8): 793-802
182. Ignatiadis M., Georgoulas V., Mavroudis D. Micrometastatic disease in breast cancer: Clinical implications. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2008, 44(18): 2726-36
183. Stathopoulou A., Vlachonikolis I. et al. Molecular Detection of Cytokeratin-19B-Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients With Operable Breast Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance. *Journal of Clinical Oncology* 2002, 20(16): 3404-12
184. Cristofanilli M., Budd G. T. et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2004, 351(8): 781-91
185. Lianidou E. S., Markou A. Review: Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, ---
186. Cristofanilli M., Hayes D. F. et al. Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(7): 1420-30
187. Mego M., De Giorgi U. et al. Circulating tumour cells are associated with increased risk of venous thromboembolism in metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2009, 101(11): 1813-6
188. Mego M., De Giorgi U. et al. Circulating tumor cells in metastatic inflammatory breast cancer. *Annals of Oncology* 2009, 20(11): 1824-8
189. Liu M. C., Shields P. G. et al. Circulating Tumor Cells: A Useful Predictor of Treatment Efficacy in Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27(31): 5153-9
190. Fehm T., Becker S. et al. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary

- tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R74,
191. Meng S., Tripathy D. et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(25): 9393-8
192. Pestrin M., Bessi S. et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009, 118(3): 523-30
193. Hayes D. F., Walker T. M. et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2002 Nov;21(5):1111-7,
194. Gazzaniga P., Naso G. et al. Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells: prognostic and predictive value in epithelial tumors. *International Journal of Cancer*, 126(10): 2437-47
195. Nakamura S., Yagata H. et al. Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 17(3): 199-204
196. Serrano M. J., Sanchez-Rovira P. et al. Detection of circulating tumor Cells in the context of treatment: Prognostic value in breast cancer patients. *Cancer Biology & Therapy* 2009, 8(8): 671-5
197. Riethdorf S., Müller V. et al. Detection and HER2 Expression of Circulating Tumor Cells: Prospective Monitoring in Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant GeparQuattro Trial. *Clinical Cancer Research*, 16(9): 2634-45
198. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975 Nov 5;98(3):503-17,
199. Newton C. R., Graham A. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 1989, 17(7): 2503-16
200. Saiki R. K., Gelfand D. H. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 Jan 29;239(4839):487-91,
201. Saiki R. K., Scharf S. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4,
202. Newton C. R., Kalsheker N. et al. Diagnosis of  $\alpha$ 1 antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucleic Acids Research* 1988, 16(17): 8233-43
203. Stoffel E. S., Koeberl D. D. et al. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science* 1988 Jan 29;239(4839):491-4,
204. Engelke D. R., Hoener P. A., Collins F. S. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988, 85(2): 544-8
205. Kogan S. C., Doherty M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987 Oct 15;317(16):985-90,
206. Wong C., Dowling C. E. et al. Characterization of [beta]-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 1987, 330(6146): 384-6
207. Okayama H., Curiel D. T. et al. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med* 1989 Aug;114(2):105-13,

208. Hayashi N., Ito I. et al. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *The Lancet* 1995, 345(8960): 1257-9
209. Sommer S. S., Groszbach A. R., Bottema C. D. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *Biotechniques* 1992 Jan;12(1):82-7,
210. Richter S., Seth A. One step direct detection of recurrent mutations in the breast cancer susceptibility gene, BRCA1. *Int J Oncol* 1998 Jun;12(6):1263-7,
211. Maher C., Crowley D. et al. Double fluorescent-amplification refractory mutation detection (dF-ARMS) of the factor V Leiden and prothrombin mutations. *Thromb Haemost* 1999 Jan;81(1):76-80,
212. Humeny A., Rodel F. et al. MDR1 single nucleotide polymorphism C3435T in normal colorectal tissue and colorectal carcinomas detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anticancer Res* 2003 May-Jun;23(3B):2735-40,
213. Bengra C., Mifflin T. E. et al. Genotyping of Essential Hypertension Single-Nucleotide Polymorphisms by a Homogeneous PCR Method with Universal Energy Transfer Primers. *Clin Chem* 2002, 48(12): 2131-40
214. Myakishev M. V., Khripin Y. et al. High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers. *Genome Research* 2001, 11(1): 163-9
215. Walker John M. R. R. ed. *Medical Biomethods Handbook*. New Jersey: Humana Press 2005: 639
216. Cha R. S., Zarbl H. et al. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *Genome Research* 1992, 2(1): 14-20
217. Kwok S., Kellogg D. E. et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 1990, 18(4): 999-1005
218. Finn G. K., Kurz B. W. et al. Homologous plasmid recombination is elevated in immortalized transformed cells. *Mol Cell Biol* 1989, 9(9): 4009-17
219. Ayyadevara S., Thaden J. J., Shmookler Reis R. J. Discrimination of Primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 2000, 284(1): 11-8
220. Wu D. Y., Ugozzoli L. et al. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, 86(8): 2757-60
221. Ballabio A., Gibbs R., Caskey C. T. PCR test for cystic fibrosis deletion. *Nature* 1990, 343(6255): 220-
222. Old J. M., Varawalla N. Y., Weatherall D. J. Rapid detection and prenatal diagnosis of [beta]-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *The Lancet* 1990, 336(8719): 834-7
223. Kahn S. M., Jiang W. et al. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 1991 Jun;6(6):1079-83,
224. Kumar R., Barbacid M. Oncogene detection at the single cell level. *Oncogene* 1988 Dec;3(6):647-51,
225. Sarkar G., Cassady J. et al. Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Analytical Biochemistry* 1990, 186(1): 64-8
226. Low E. O., Jones A. M. et al. Analysis of the amplification refractory mutation allele-specific polymerase chain reaction system for sensitive and specific detection of p53 mutations in DNA. *The Journal of Pathology* 2000, 190(4): 512-5
227. Jones A. V., Kreil S. et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106(6): 2162-8

228. Chen Q., Lu P. et al. Amplification Refractory Mutation System, a Highly Sensitive and Simple Polymerase Chain Reaction Assay, for the Detection of JAK2 V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2007, 9(2): 272-6
229. Clayton S. J., Scott F. M. et al. K-ras Point Mutation Detection in Lung Cancer: Comparison of Two Approaches to Somatic Mutation Detection Using ARMS Allele-specific Amplification. *Clin Chem* 2000, 46(12): 1929-38
230. van Heek N. T., Clayton S. J. et al. Comparison of the novel quantitative ARMS assay and an enriched PCR-ASO assay for K-ras mutations with conventional cytology on endobiliary brush cytology from 312 consecutive extrahepatic biliary stenoses. *Journal of Clinical Pathology* 2005, 58(12): 1315-20
231. Levin J. D., Fiala D. et al. Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Research* 2006, 34(20): e142
232. Latorra D., Arar K., Hurley J. M. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes* 2003 Oct;17(5):253-9,
233. Chen C.-Y., Shiesh S.-C., Wu S.-J. Rapid Detection of K-ras Mutations in Bile by Peptide Nucleic Acid-mediated PCR Clamping and Melting Curve Analysis: Comparison with Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Clin Chem* 2004, 50(3): 481-9
234. Luo J.-D., Chan E.-C. et al. Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe. *Nucleic Acids Research*, 34(2): e12
235. Johnson M. P., Haupt L. M., Griffiths L. R. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2004, 32(6): e55
236. Alonso J. L., Amorós I., Cuesta G. LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewaters. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5): 1594-601
237. Orou A., Fechner B. et al. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening. *Hum Mutat* 1995;6(2):163-9,
238. B.McKinzie P., R.Delongchamp R. et al. ACB-PCR measurement of K-ras codon 12 mutant fractions in livers of Big Blue® rats treated with N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *Mutagenesis* 2006, 21(6): 391-7
239. Morlan J., Baker J., Sinicropi D. Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. *PLoS ONE* 2009, 4(2): e4584
240. Zhou L W. Y., Wittwer C.T. Rare allele enrichment and detection by allele-specific PCR, competitive probe blocking, and melting analysis. *BioTechniques* 2011 May, 50(5): 311-8
241. Kimura E. T., Nikiforova M. N. et al. High Prevalence of BRAF Mutations in Thyroid Cancer. *Cancer Research* 2003, 63(7): 1454-7
242. Davies H., Bignell G. R. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417(6892): 949-54
243. Wittwer C.T R. P. R., K.M. Ririe. Rapid PCR and melting curve analysis. In: Bustin SA ed., *Rapid PCR and melting curve analysis*, p 48-69ed. New York: Basic Technologies and Applications. Cambridge University Press, 2010
244. Su Z., Dias-Santagata D. et al. A Platform for Rapid Detection of Multiple Oncogenic Mutations With Relevance to Targeted Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1): 74-84

245. Wu G., Xing M. et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(5):R609-16 Epub 2005 May 31,
246. Board R. E., Thelwell N. J. et al. Multiplexed Assays for Detection of Mutations in PIK3CA. *Clin Chem* 2008, 54(4): 757-60
247. Board R., Wardley A. et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(2): 461-7
248. Strati A., Markou A. et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer* 2011, 11(1): 422
249. Rasmussen ed. R. Quantification on the Light Cycler. *Reprints from Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications*. Springer
250. Light Cycler Operator's Manual version 3,5, Roche Molecular Biochemicals. ed. 1999
251. Herrmann M. G., Durtschi J. D. et al. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clin Chem* 2006, 52(3): 494-503
252. Λιανίδου Ε. Σ. *Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής*. ed. Αθήνα 2006
253. Zhou L., Myers A. N. et al. Closed-Tube Genotyping with Unlabeled Oligonucleotide Probes and a Saturating DNA Dye. *Clin Chem* 2004, 50(8): 1328-35
254. Vorkas P. A., Poumpouridou N. et al. PIK3CA Hotspot Mutation Scanning by a Novel and Highly Sensitive High-Resolution Small Amplicon Melting Analysis Method. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(5): 697-704
255. Seipp M. T., Pattison D. et al. Quadruplex Genotyping of F5, F2, and MTHFR Variants in a Single Closed Tube by High-Resolution Amplicon Melting. *Clin Chem* 2008, 54(1): 108-15
256. Wittwer C. T., Reed G. H. et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin Chem* 2003, 49(6): 853-60
257. (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>). ed.