



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Διερεύνηση και κλινική αξιολόγηση νέων δεικτών μεθυλίωσης του  
DNA στον καρκίνο, στα πλαίσια της υγρής βιοψίας**

**ΣΟΦΙΑ ΜΑΣΤΟΡΑΚΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΛΙΟΣ 2018**



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Διερεύνηση και κλινική αξιολόγηση νέων δεικτών μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο, στα πλαίσια της υγρής βιοψίας**

**ΣΟΦΙΑ ΜΑΣΤΟΡΑΚΗ**

**A.M.: 001412**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗΤΡΙΑ:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ**

**Γεωργία Σωτηροπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών**

**Αμάντα Ψυρρή, Αναπλ. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ**

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ**

2. **Γεωργία Σωτηροπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών**

3. **Αμάντα Ψυρρή, Αναπλ. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ**

4. **Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ**

5. **Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ**

6. **Χρίστος Παπαδημητρίου, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ**

7. **Απόστολος Κλινάκης, Ερευνητής Β', ΙΙΒΕΑΑ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 19/07/2018**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η «υγρή βιοψία», βασισμένη στην ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs) και του εξωκυττάρου καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) παρέχει μία μη-επεμβατική παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, σε πραγματικό χρόνο. Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA, αποτελεί τα τελευταία χρόνια σημαντικό πεδίο έρευνας παγκοσμίως, καθώς αποτελεί πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση, αλλά λαμβάνει χώρα και σε όλα τα στάδια της νόσου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αρχικά μελετήθηκαν οι προαναλυτικές παράμετροι σταθερότητας και πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της πιστότητας και ακρίβειας των αναλύσεων μεθυλίωσης του DNA στην υγρή βιοψία. Αποτελεί την πρώτη μελέτη αξιολόγησης της σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και της μεθυλίωσης του χημικά τροποποιημένου DNA υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η πληροφορία της μεθυλίωσης δε διατηρείται εφόσον η απομόνωση του εξωκυττάρου καρκινικού DNA πραγματοποιηθεί από δείγματα πλάσματος συντηρημένα στους  $-70^{\circ}\text{C}$  για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 8 μηνών. Αντίθετα, το χημικά τροποποιημένο DNA μπορεί να διατηρηθεί σε καταψύκτες και των  $-20^{\circ}\text{C}$  και των  $-70^{\circ}\text{C}$  για ένα έτος, χωρίς κανένα πρόβλημα στην ανάλυση μεθυλίωσης με real-time MSP. Αναφορικά με την ακρίβεια ενίσχυσης του χημικά επεξεργασμένου DNA, λάβαμε πανομοιότυπα αποτελέσματα πριν και μετά την αντίδραση ενίσχυσης.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη, επικύρωση και κλινική αξιολόγηση μεθοδολογίας για τη μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1*, σε δείγματα CTCs και ctDNA, για την παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού που λαμβάνουν ενδοκρινή θεραπεία. Μέσω της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας, αναφέρουμε για πρώτη φορά την ανίχνευση μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs και την υψηλή αντιστοιχία με τη μεθυλίωση στο ctDNA πλάσματος των ίδιων ασθενών. Επιπλέον, η μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs ασθενών με ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο μαστού, βρέθηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έλλειψη ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία (everolimus/exemestane).

Επιπρόσθετα, αναπτύξαμε, επικυρώσαμε και αξιολογήσαμε κλινικά μία νέα μέθοδο για τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MLL3*. Με βάση τη μεθοδολογία αυτή, αξιολογήσαμε τη μεθυλίωση του *MLL3* ως νέο επιγενετικό βιοδείκτη στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά την ύπαρξη μεθυλίωσης του *MLL3* και την προγνωστική αξία της ανίχνευσής της στο ctDNA από πλάσμα ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Τέλος, πραγματοποιήσαμε μελέτη μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix, από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Τα γονίδια *SOX17*, *RASSF1A* και *MLL3* βρέθηκαν μεθυλιωμένα σε διαφορετικά ποσοστά, επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια των CTCs.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** υγρή βιοψία, μεθυλίωση του DNA, προαναλυτικές παράμετροι, έλεγχος ποιότητας, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, εξωκυττάρου καρκινικού DNA, βιοδείκτες καρκίνου

## ABSTRACT

Liquid biopsy, based on the analysis of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA), provides a non-invasive, real-time monitoring of tumor evolution and therapeutic efficacy. During the last few years, DNA methylation changes have been widely studied, as DNA methylation is considered as an early event in carcinogenesis but is also present at all stages of the disease.

In the present PhD thesis, we initially evaluated the preanalytical parameters and the performance of whole genome amplification (WGA) protocols for reliable downstream DNA methylation analyses in liquid biopsy. The present study is the first to evaluate the stability of DNA methylation in plasma and sodium bisulfite (SB)-treated DNA under different storage conditions. Our results indicate that DNA methylation information is not preserved, when ctDNA extraction is performed in plasma samples stored for more than 8 months even at -70°C. On the contrary, SB-treated DNA can be safely stored for a long time at both -20°C and -70°C, and DNA methylation analysis by real-time MSP can be safely performed in a total period of one year. Concerning the accuracy and precision of WGA of SB-treated DNA our results suggest that it is reliable since we get identical results before and after amplification using both SB-conversion kits.

Furthermore, we developed and clinically validated a liquid biopsy-based assay for *ESR1* methylation for the follow-up of metastatic breast cancer patients under endocrine treatment. We reported for the first time the presence of *ESR1* methylation in CTCs and its high concordance with paired plasma ctDNA derived from the same patients. Moreover, according to our findings, *ESR1* methylation in CTCs of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients was strongly associated with lack of response to everolimus/exemestane treatment.

We additionally developed and clinically validated an assay for *MLL3* promoter methylation as a novel circulating epigenetic biomarker in non-small cell lung cancer (NSCLC). Our data indicate for the first time that the detection of *MLL3* promoter methylation in plasma-ctDNA provides important prognostic information for NSCLC patients.

Finally, we evaluated the methylation status of tumor-suppressor genes in CTCs of head and neck cancer patients (HNSCC), isolated using the microfluidic-based Parsortix system. *SOX17*, *RASSF1A* and *MLL3* were found to be methylated in CTCs at various percentages, confirming the presence of heterogeneity, even in CTCs isolated from the same patient.

**KEY WORDS:** liquid biopsy, DNA methylation, preanalytical parameters, quality control, circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), cancer biomarkers

*Στους γονείς μου,  
Σύλλα και Ελένη...*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, στο Τμήμα Χημείας, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε. Λιανίδου.

Η διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα IMI-CANCER-ID (αρ. συμβολαίου 115749): “Cancer treatment and monitoring through identification of circulating tumour cells and tumour related nucleic acids in blood” (<https://www.cancer-id.eu/>), ενώ μέρος αυτής καλύφθηκε από τη ΓΓΕΤ μέσω χορήγησης υποτροφίας στο πλαίσιο της Δράσης: «1η Προκήρυξη ΕΛΙΔΕΚ για υποψήφιους διδάκτορες» (κωδικός υποτροφίας: 2162).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια Ε. Λιανίδου, αρχικά για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος και στη συνέχεια για τη διαρκή υποστήριξη, την άποψη συνεργασία και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για την ηθική συμπαράστασή της, την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε, τις συμβουλές της και την αδιάκοπη προσπάθειά της για τη γενικότερη επιστημονική μου κατάρτιση και εξέλιξη.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Αναπλ. Καθηγήτρια Γ. Σωτηροπούλου και Αναπλ. Καθηγήτρια Α. Ψυρρή για τις σημαντικές παρατηρήσεις τους και την άμεση ανταπόκρισή τους σε οτιδήποτε χρειάστηκε. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή Ογκολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Β. Γεωργούλια, για την ευγενική προσφορά των δειγμάτων ασθενών με καρκίνο μαστού και πνεύμονα, καθώς και των κλινικών δεδομένων που συνόδευαν τα δείγματα αυτά. Εξαιρετικά σημαντική ήταν και η προσφορά των δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο μαστού και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, τα οποία συλλέχθηκαν από την Αναπλ. Καθηγήτρια Α. Ψυρρή από το Π.Γ.Ν. «Αττικόν». Επίσης, ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη, του τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, στο εργαστήριο της οποίας έγιναν οι καλλιέργειες όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Α. Κλινάκη, Ερευνητή Β', ΙΙΒΕΑΑ για την αγαστή συνεργασία που ξεκίνησε με αφορμή την εκπόνηση της διατριβής.

Η παρούσα διατριβή δεν θα ήταν η ίδια, χωρίς τη στήριξη, την αγάπη και τη βοήθεια των μελών του εργαστηρίου μας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, λοιπόν, οφείλω στη Δρ. Α. Στρατή και Δρ. Α. Μάρκου για την σημαντική βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Παράλληλα, ευχαριστώ ιδιαίτερος την Μ. Ζαβρίδου, την Ε. Τζανίκου, την Α. Ντζιφά, την Λ. Γιαννοπούλου και την Κ. Παρίση για την άποψη συνεργασία και την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και την Δρ. Μ. Χειμωνίδου για την εκπαίδευση και την κατάρτισή μου στο θέμα της μεθυσίας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Γιώργο και στους παντοτινούς μου φίλους Κώστα, Νάντιες, Ηλία και Ελένη για την κατανόηση, την υπομονή και την υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Κλείνοντας, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου, για την αγάπη τους και την ψυχολογική στήριξη που μου παρέχουν σε κάθε νέο μου βήμα. Χωρίς εκείνους, τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1. Εισαγωγή.....	- 1 -
1.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs).....	- 3 -
1.2.1. Ιστορική αναδρομή-ορισμός .....	- 3 -
1.2.2. Τεχνικές απομόνωσης και εμπλουτισμού των CTCs.....	- 6 -
1.2.3. Τεχνικές ανίχνευσης και μοριακού χαρακτηρισμού των CTCs.....	- 16 -
1.3. Ανίχνευση μεθυλίωσης στα CTCs .....	- 18 -
1.4. Εξωκυττάριο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA).....	- 20 -
1.4.1. Ιστορική αναδρομή/ορισμός .....	- 20 -
1.4.2. Βιολογική προέλευση του ctDNA.....	- 21 -
1.4.3. Ανάλυση του ctDNA.....	- 23 -
1.5. Συνδυαστική μελέτη CTCs και ctDNA στην υγρή βιοψία .....	- 26 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....</b>	<b>- 28 -</b>
2.1. Ιστορική αναδρομή/ορισμός .....	- 28 -
2.2. Φυσιολογικός ρόλος της μεθυλίωσης .....	- 30 -
2.3. Μεθυλίωση DNA και γονιδιακή ρύθμιση.....	- 31 -
2.4. Μεθυλίωση του DNA και καρκίνος.....	- 35 -
2.4.1. Υπομεθυλίωση DNA και καρκίνος.....	- 36 -
2.4.2. Υπερμεθυλίωση DNA και καρκίνος .....	- 38 -
2.5. Τεχνικές ανίχνευσης μεθυλίωσης του DNA .....	- 40 -
2.5.1. Pyrosequencing .....	- 42 -
2.5.2. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) .....	- 43 -
2.5.3 Single-Molecule Real Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS) .....	- 44 -
2.5.4. Human methylation 450k BeadChip .....	- 45 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>- 47 -</b>
<b>ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ .....</b>	<b>- 47 -</b>
3.1. Εισαγωγή.....	- 47 -
3.2. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο μαστού.....	- 49 -



3.3. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο του πνεύμονα.....	- 53 -
3.4. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου .....	- 57 -
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>- 64 -</b>
4.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση (μέθοδος φικόλης) .....	- 64 -
4.1.1. Αρχή μεθόδου.....	- 64 -
4.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 65 -
4.1.3. Πειραματική πορεία .....	- 65 -
4.2. Εμπλουτισμός επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.....	- 66 -
4.2.1. Αρχή μεθόδου.....	- 66 -
4.2.2 Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 67 -
4.2.3. Πειραματική πορεία .....	- 67 -
4.3. Απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος Parsortix (ANGLE plc, UK).....	- 69 -
4.3.1. Αρχή μεθόδου.....	- 69 -
4.3.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 71 -
4.3.3. Πειραματική πορεία .....	- 71 -
4.4. Απομόνωση και καταμέτρηση CTCs με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος CellSearch® (Menarini Diagnostics, Italy).....	- 71 -
4.4.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 73 -
4.4.3. Πειραματική πορεία .....	- 74 -
4.5. Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα .....	- 75 -
4.6. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη και φρέσκους κατεψυγμένους ιστούς .....	- 75 -
4.6.1. Απομόνωση gDNA από καρκινικούς ιστούς μαστού εγκλεισμένους σε παραφίνη με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA FFPE .....	- 76 -
4.6.2. Απομόνωση gDNA από καρκινικούς και φυσιολογικούς παρακείμενους φρέσκους ιστούς πνεύμονα με τη χρήση του εμπορικώς διαθέσιμου κιτ DNeasy Blood and Tissue Kit-78 -	
4.7. Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα .....	- 80 -
4.7.1 Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ High Pure Viral Nucleic Acid.....	- 80 -
4.7.2 Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp Circulating Nucleic Acid .....	- 81 -

4.8. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS .....	- 84 -
4.8.1. Αρχή μεθόδου.....	- 84 -
4.8.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 85 -
4.8.3. Πειραματική πορεία .....	- 85 -
4.9. Απομόνωση DNA με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA Micro.....	- 86 -
4.9.1. Αρχή μεθόδου.....	- 86 -
4.9.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 86 -
4.9.3. Πειραματική πορεία .....	- 87 -
4.10. Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA .....	- 88 -
4.10.1. Αρχή μεθόδου.....	- 88 -
4.10.2. Πειραματική πορεία .....	- 89 -
4.11. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο.....	- 89 -
4.11.1. Αρχή μεθόδου.....	- 89 -
4.11.2. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ EZ DNA Methylation Gold .....	- 91 -
4.11.3. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ EpiTect Fast Bisulfite .....	- 92 -
4.11.4. Οργανολογία .....	- 95 -
4.12. Μέθοδος ενζυμικού πολλαπλασιασμού ολόκληρου του επιγονιδιώματος (WGA-Whole Genome Amplification) με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου EpiTect Whole Bisulfite Kit...-	96 -
4.12.1. Αρχή μεθόδου.....	- 96 -
4.12.2. Αντιδραστήρια/υλικά .....	- 97 -
4.12.3. Πειραματική πορεία .....	- 97 -
4.13. In silico σχεδιασμός εκκινητών.....	- 98 -
4.13.1. Γενικά.....	- 98 -
4.13.2. In silico σχεδιασμός εκκινητών για real-time MSP .....	- 98 -
4.14. Real-Time Methylation Specific PCR.....	- 101 -
4.14.1. Αρχή μεθόδου.....	- 101 -
4.14.2. Οργανολογία .....	- 104 -
4.15. Κυτταρικές σειρές, δείγματα ελέγχου και πρότυπα δείγματα.....	- 107 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....</b>	<b>- 108 -</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ ΚΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....</b>	<b>- 108 -</b>

5.1. Εισαγωγή.....	- 108 -
5.2. Πειραματική πορεία .....	- 109 -
5.2.1. Κλινικά δείγματα.....	- 109 -
5.2.3. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) .....	- 110 -
5.2.3. Ενίσχυση ολόκληρου του επιγονιδιώματος με ενζυμικό πολλαπλασιασμό (Whole Genome Amplification, WGA) .....	- 111 -
5.2.4. Real-time MSP .....	- 111 -
5.2.5. Στατιστική ανάλυση .....	- 114 -
5.3. Αποτελέσματα.....	- 114 -
5.3.1. Έλεγχος ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία ανάλυσης βιοδεικτών μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας.....	- 114 -
5.3.2. Σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα κατά την φύλαξη .....	- 116 -
5.3.3. Σταθερότητα του χημικά επεξεργασμένου με όξινο θειώδες νάτριο DNA (SB-treated DNA).....	- 118 -
5.3.4. Σύγκριση δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων κιτ για επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο και αξιολόγηση συμβατότητας για επακόλουθη ενίσχυση με ενζυμικό πολλαπλασιασμό (WGA) .....	- 120 -
5.4. Συμπεράσματα-συζήτηση .....	- 122 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....</b>	<b>- 125 -</b>
<b>ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ <i>ESR1</i> ΣΕ CTCs ΚΑΙ ctDNA: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....</b>	<b>- 125 -</b>
6.1. Εισαγωγή.....	- 125 -
6.2. Πειραματική πορεία .....	- 126 -
6.2.1. Κλινικά δείγματα.....	- 127 -
6.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς ιστούς μαστού εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPEs).....	- 132 -
6.2.3. Απομόνωση DNA από EpCAM+ CTC-κλάσμα και κυτταρικές σειρές με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS .....	- 132 -
6.2.4. Απομόνωση ctDNA από πλάσμα .....	- 132 -
6.2.5. Απομόνωση gDNA από φύσιγγες CellSearch® .....	- 132 -
6.2.6. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) .....	- 133 -
6.2.7. Real-time MSP .....	- 133 -
6.2.8. Στατιστική ανάλυση .....	- 135 -
6.3. Αποτελέσματα.....	- 135 -

6.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας για τη μελέτη μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> με real-time MSP.....	- 135 -
6.3.2. Ομάδα ελέγχου: αξιολόγηση της μεθόδου real-time MSP για τη μελέτη μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε πρωτοπαθείς όγκους, ErCAM+ CTC-κλάσματα και ctDNA.....	- 137 -
6.3.3. Ανεξάρτητη ομάδα: Μεθυλίωση του <i>ESR1</i> σε CTCs και ctDNA πλάσματος του ίδιου ασθενούς.....	- 138 -
6.3.4. Κλινική αξιολόγηση της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> στα CTCs ασθενών με ER <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup> προχωρημένου σταδίου καρκίνου μαστού, υπό ενδοκρινή θεραπεία .....	- 142 -
6.4. Συμπεράσματα-συζήτηση .....	- 145 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 .....</b>	<b>- 148 -</b>
<b>ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>MLL3</i> ΩΣ ΝΕΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΟ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (NSCLC) .....</b>	<b>- 148 -</b>
7.1. Εισαγωγή.....	- 148 -
7.2. Πειραματική πορεία .....	- 150 -
7.2.1. Κλινικά δείγματα.....	- 151 -
7.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς και φυσιολογικούς παρακείμενους φρέσκους ιστούς πνεύμονα .....	- 152 -
7.2.3. Απομόνωση ctDNA από πλάσμα .....	- 152 -
7.2.4. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) .....	- 153 -
7.2.5. Real-time MSP .....	- 153 -
7.2.6. Στατιστική ανάλυση .....	- 155 -
7.3. Αποτελέσματα .....	- 155 -
7.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας για τη μελέτη μεθυλίωσης του <i>MLL3</i> με real-time MSP.....	- 155 -
7.3.2. Αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας της μεθυλίωσης του <i>MLL3</i> στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα .....	- 157 -
7.4. Συμπεράσματα-συζήτηση .....	- 159 -
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 .....</b>	<b>- 162 -</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC) .....</b>	<b>- 162 -</b>
8.1. Εισαγωγή.....	- 162 -
8.2. Πειραματική πορεία .....	- 163 -
8.2.1. Κλινικά δείγματα.....	- 164 -
8.2.2. Απομόνωση των CTCs με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος Parsortix....	- 164 -
8.2.3. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS .....	- 165 -
8.2.4. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) .....	- 165 -

8.2.5. Real-time MSP .....	- 165 -
8.3. Αποτελέσματα .....	- 167 -
8.3.1. Μεθυλίωση του υποκινητή του <i>SOX17</i> σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου .....	- 167 -
8.3.2. Μεθυλίωση του υποκινητή του <i>RASSF1A</i> σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου .....	- 168 -
8.3.3. Μεθυλίωση του υποκινητή του <i>MLL3</i> σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου .....	- 168 -
8.4. Συμπεράσματα-συζήτηση .....	- 169 -
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>- 172 -</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>- 177 -</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>- 179 -</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Σύγκριση κλασικής βιοψίας με υγρή βιοψία .....	- 3 -
Σχήμα 1.2. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης CTCs.....	- 7 -
Σχήμα 1.3. Το σύστημα DEParray για την απομόνωση μονήρων CTC .....	- 13 -
Σχήμα 1.4. In vivo συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs .....	- 16 -
Σχήμα 1.5. Βασικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTC -	18 -
Σχήμα 1.6. Η προέλευση του ctDNA και οι οι σχετιζόμενες με τον όγκο αλλοιώσεις του που ανιχνεύονται με μοριακή ανάλυση.....	- 23 -
Σχήμα 1.7. Διαφορετικές μορφές του ctDNA που αποτελούν στόχοι στην ποιοτική ανάλυσή του -	24 -
Σχήμα 1.8. Κλινικές εφαρμογές της συνδυαστικής μελέτης CTCs και ctDNA στην υγρή βιοψία -	27 -
Σχήμα 2.1. Τα δυο κύρια χαρακτηριστικά του επιγενετικού κώδικα: η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών .....	- 29 -
Σχήμα 2.2. Ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων (-CH <sub>3</sub> ) στο 5'-άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης και ο επακόλουθος σχηματισμός της 5'-μεθυλοκυτοσίνης (5mC). -	30 -
Σχήμα 2.3. Ρόλος των DNMTs στη διατήρηση της μεθυλίωσης: α) Η de novo μεθυλίωση του μη μεθυλιωμένου DNA με συμμετοχή των DNMT3A και DNMT3B και β) διατήρηση της μεθυλίωσης στα ημιμεθυλιωμένα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA .....	- 33 -
Σχήμα 2.4. Επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων: ένζυμα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς μεθυλίωσης του DNA και τροποποιήσεων των ιστονών .....	- 34 -
Σχήμα 2.5. Σφαιρική υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση υποκινητών γονιδίων ως πρότυπα μεθυλίωσης του καρκίνου .....	- 36 -
Σχήμα 2.6. Υπομεθυλίωση ρετροτρανσποζονίων της οικογένειας LINE.....	- 38 -
Σχήμα 2.7. Γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν στην απενεργοποίηση γονιδίων, σύμφωνα με την υπόθεση των δυο πληγμάτων του Knudson.....	- 39 -
Σχήμα 2.8. Βασική αρχή του Pyrosequencing και εικόνα εξόδου .....	- 42 -
Σχήμα 2.9 Τα πρώτα βήματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου COBRA και οι αλλαγές που προκύπτουν στην αλληλουχία του DNA.....	- 44 -
Σχήμα 2.10. Αρχή μεθόδου SMRT DNA αλληλούχισης. Ανάλυση φθορισμού που θα καθορίσει την DNA αλληλουχία και δυναμικής-χρόνου της αντίδρασης PCR που θα καθορίσει την παρουσία ή όχι μεθυλίωσης του DNA .....	- 45 -
Σχήμα 2.11. Αρχή μεθόδου τεχνικής Human methylation 450k BeadChip.....	- 46 -
Σχήμα 4.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα (PBMC) με διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση .....	- 66 -
Σχήμα 4.2. Απομόνωση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. ....	- 67 -
Σχήμα 4.3. Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix. ....	- 70 -

Σχήμα 4.4. Πορεία εφαρμογής λογισμικών κατά τη χρήση του συστήματος απομόνωσης Parsorix.....	- 71 -
Σχήμα 4.5. Το σύστημα απομόνωσης και καταμέτρησης CTCs CellSearch® .....	- 73 -
Σχήμα 4.6. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης του γενωμικού DNA από δείγματα ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη με τη χρήση του QIAamp DNA FFPE της Qiagen .....	- 78 -
Σχήμα 4.7. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης ctDNA από δείγματα πλάσματος με τη χρήση του QIAamp Circulating Nucleic Acid της Qiagen .....	- 84 -
Σχήμα 4.8. α) Φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 UV-Vis β )Χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA .....	- 89 -
Σχήμα 4.9. Χημική αντίδραση της μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη.....	- 90 -
Σχήμα 4.10. Επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο .....	- 91 -
Σχήμα 4.11. α) Θάλαμος προετοιμασίας αντιδράσεων PCR (PCR hood), β) Θερμικός κυκλοποιητής DNA (Mastercycler® pro, Eppendorf) .....	- 96 -
Σχήμα 4.12. Σχηματική παράσταση της in silico μετατροπής της προς μελέτη αλληλουχίας στην αλληλουχία που προκύπτει μετά την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. ....	- 99 -
Σχήμα 4.13. Κινητική της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο .....	- 101 -
Σχήμα 4.14. Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης τήξης.....	- 102 -
Σχήμα 4.15. Η αρχή μεθόδου για τη χημική μετατροπή του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο και την ανίχνευσή του με Methylation Specific PCR.....	- 103 -
Σχήμα 4.16. Αρχή Λειτουργίας ανιχνευτή Taqman .....	- 104 -
Σχήμα 4.17. Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler® 1.5 της Roche και β) της οργανολογίας του .....	- 105 -
Σχήμα 4.18. Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler® 2.0 της Roche και β) της οργανολογίας του .....	- 106 -
Σχήμα 4.19. α) Ο αναλυτής Cobas z480, β) Λογισμικό LightCycler® 480 .....	- 107 -
Σχήμα 5.1. Διάγραμμα πειραματικής πορείας για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων μεθυλίωσης του DNA στην υγρή βιοψία .....	- 115 -
Σχήμα 5.2. Γραφήματα Levey-Jennings. Έλεγχος ποιότητας της αναλυτικής διαδικασίας σε κάθε βήμα για το 100% μεθυλιωμένο DNA (εξωτερικό πρότυπο), την MCF7 (10 <sup>6</sup> κύτταρα) και την SKBR3 (10 <sup>6</sup> κύτταρα). ....	- 116 -
Σχήμα 5.3. Πειραματική πορεία για τη μελέτη σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα. ....	- 117 -
Σχήμα 5.4. Αποτελέσματα real-time MSP για την <i>ACTB</i> και <i>SOX17</i> κατά την αποθήκευση πλάσματος στους -70°C για χρονικό διάστημα 8 μηνών .....	- 117 -
Σχήμα 5.5. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη σταθερότητας του SB-treated DNA .....	- 119 -
Σχήμα 5.6. Αποτελέσματα real-time MSP για την <i>ACTB</i> και <i>BRMS1</i> κατά την αποθήκευση SB-treated DNA στους -20°C και -70°C για χρονικό διάστημα 1 έτους.....	- 119 -

Σχήμα 6.1. Διάγραμμα ροής για τη ομάδα ελέγχου ασθενών: Μελέτη μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε πρωτοπαθείς όγκους, EpCAM+ CTC-κλάσματα και ctDNA, σε δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού.....	- 129 -
Σχήμα 6.2. Διάγραμμα ροής για την ανεξάρτητη ομάδα ασθενών: Μελέτη μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε CTCs και αντίστοιχο ctDNA του ίδιου ασθενούς.....	- 130 -
Σχήμα 6.3. Διάγραμμα ροής ομάδας ασθενών για την αξιολόγηση της κλινικής χρησιμότητας της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε δείγματα υγρής βιοψίας.....	- 131 -
Σχήμα 6.1. Αναλυτική ειδικότητα <i>ESR1</i> real-time MSP .....	- 136 -
Σχήμα 6.2. Αναλυτική ευαισθησία <i>ESR1</i> real-time MSP .....	- 137 -
Σχήμα 6.3. Ομάδα ελέγχου: Μεθυλίωση του <i>ESR1</i> σε πρωτοπαθείς όγκους, EpCAM <sup>+</sup> CTC-κλάσματα, ctDNA πλάσματος και υγείς αιμοδοτές.....	- 138 -
Σχήμα 6.4. Ανεξάρτητη ομάδα.....	- 140 -
Σχήμα 6.5. Προφίλ μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> για κάθε ασθενή σε σειριακά δείγματα CTC ασθενών με καρκίνο μαστού υπό αγωγή με everolimus/exemestane, σε διαφορετικές στιγμές κατά τη θεραπεία, σε συνάρτηση με τον αριθμό των ανιχνευμένων CTCs. ....	- 143 -
Σχήμα 6.7. Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με καρκίνο μαστού υπό αγωγή με ενδοκρινή θεραπεία everolimus/exemestane .....	- 144 -
Σχήμα 7.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου <i>MLL3</i> σε δείγματα ασθενών με NSCLC.....	- 151 -
Σχήμα 7.2. Αναλυτική ευαισθησία <i>MLL3</i> real-time MSP .....	- 156 -
Σχήμα 7.3. Heatmap για τη μεθυλίωση του <i>MLL3</i> σε δείγματα φρέσκων ιστών, παρακείμενων-μη καρκινικών ιστών και αντίστοιχο πλάσμα ασθενών με χειρουργήσιμο NSCLC. ....	- 157 -
Σχήμα 7.4. Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με χειρουργήσιμο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (N=48).....	- 158 -
Σχήμα 7.5. Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα προχωρημένου σταδίου (N=91) .....	- 159 -
Σχήμα 8.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη μεθυλίωσης των γονιδίων <i>SOX17</i> , <i>RASSF1A</i> και <i>MLL3</i> σε δείγματα ασθενών με HNSCC.....	- 164 -
Σχήμα 8.2. Heatmap για τη μεθυλίωση του <i>SOX17</i> , <i>RASSF1A</i> και <i>MLL3</i> σε δείγματα CTCs από ασθενείς με HNSCC.....	- 169 -



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1. Εμπορικά διαθέσιμα κιτ βιοδεικτών για την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA με τα χαρακτηριστικά τους (172). .....	- 48 -
Πίνακας 3.2. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού-	50 -
Πίνακας 3.3. Προτεινόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού-	51 -
Πίνακας 3.4. Προτεινόμενοι προβλεπτικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού-	52 -
Πίνακας 3.5. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του πνεύμονα-	55 -
Πίνακας 3.7. Προτεινόμενοι προβλεπτικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του πνεύμονα-	56 -
Πίνακας 3.8. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου .....	- 58 -
Πίνακας 3.9. Προτεινόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου .....	- 59 -
Πίνακας 4.1. Οι κυριότεροι υποπληθυσμοί των κυττάρων του αίματος και ο τυπικός αριθμός τους/mL αίματος. ....	- 65 -
Πίνακας 4.3. Χαρακτηριστικά εκκινητών και ανιχνευτών από προηγούμενες εργασίες. ....	- 100 -
Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>ACTB</i> .....	- 112 -
Πίνακας 5.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ACTB</i> .....	- 112 -
Πίνακας 5.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ACTB</i> .....	- 112 -
Πίνακας 5.4. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>SOX17</i> .....	- 113 -
Πίνακας 5.5. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>SOX17</i> .....	- 113 -
Πίνακας 5.6. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>BRMS1</i> .....	- 113 -
Πίνακας 5.7. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>BRMS1</i> .....	- 114 -
Πίνακας 5.4. Αξιολόγηση της συμβατότητας δύο διαφορετικών κιτ για επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο σε συνδυασμό με επακόλουθο WGA: real-time MSP για το <i>SOX17</i> .....	- 121 -
Πίνακας 6.1. Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	- 134 -
Πίνακας 6.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	- 134 -
Πίνακας 6.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	- 135 -
Πίνακας 6.4. Σύγκριση της έκφρασης του ER (IHC) και της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού, CTCs, ctDNA και σε αντιστοιχισμένα δείγματα ctDNA-CTCs από ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού .....	- 141 -
Πίνακας 7.1. Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο <i>MLL3</i> .....	- 154 -
Πίνακας 7.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>MLL3</i> .....	- 154 -
Πίνακας 7.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>MLL3</i> .....	- 155 -
Πίνακας 8.1. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF1A</i> .....	- 167 -
Πίνακας 8.2. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF1A</i> .....	- 167 -



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

#### 1.1. Εισαγωγή

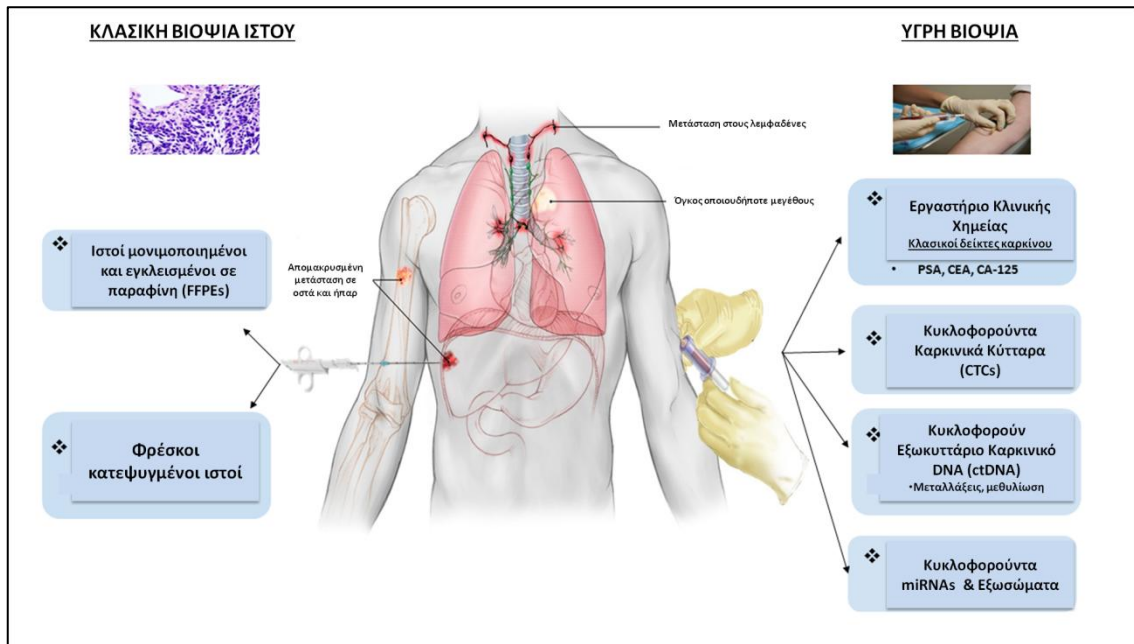
Είναι πλέον γνωστό ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων δεν είναι στατικό, αλλά δυναμικό και μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η προσέγγιση της κλασικής βιοψίας δεν επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης του πρωτοπαθούς όγκου, ενώ παράλληλα μειονεκτεί σε περιπτώσεις όπου η δειγματοληψία από της μεταστατικές εστίες για πρακτικούς λόγους δεν καθίσταται δυνατή. Ο όρος «υγρή βιοψία» (**liquid biopsy**) αναφέρεται σε δοκιμασίες στο περιφερικό αίμα, που βασίζονται στην απόκτηση της μοριακής πληροφορίας για την εξέλιξη του όγκου, έπειτα από λεπτομερή ανάλυση του γενετικού υλικού. Κύριες πηγές της υγρής βιοψίας αποτελούν τα **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTC)**, το **εξοκυττάριο καρκινικό DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)**, τα **κυκλοφορούντα miRNAs (circulating miRNAs)** και τα **εξωσώματα (exosomes)** (Σχήμα 1.1). Η υγρή βιοψία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των γενετικών μεταβολών κατά την εξέλιξη της νόσου και παρακολούθησης των ασθενών, μέσω απλών επαναλαμβανόμενων αιμοληψιών (1). Οι έντονες προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνονται στην ανάπτυξη στοχευμένων μοριακών δοκιμασιών μέσω ανάλυσης του περιφερικού αίματος, με πιθανή χρησιμότητα ως συνοδές διαγνωστικές εξετάσεις για την παρακολούθηση της νόσου ή ακόμη και για την έγκαιρη ανίχνευσή της (2).

Η αναλυτική και κλινική σημασία των βασισμένων σε αίμα δοκιμασιών έχουν αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις μέχρι τώρα, ενώ η κλινική επικύρωσή της βρίσκεται σε εξέλιξη μέσω των συνεχιζόμενων μελετών σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου. Σε κάποιες περιπτώσεις, ιδιαίτερα στα πλαίσια της μελέτης μηχανισμών αντίστασης σε στοχευμένες θεραπείες, υπάρχουν ολόένα και περισσότερες ενδείξεις ότι η υγρή βιοψία πλεονεκτεί έναντι της κλασικής ανάλυσης του πρωτοπαθούς όγκου μέσω βιοψίας, καθώς παρέχει πληροφορίες βοηθητικές για τη λήψη κλινικών αποφάσεων. Η υγρή βιοψία μας δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης των ασθενών σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της θεραπείας, μέσω της μελέτης του μοριακού προφίλ των CTCs ή του ctDNA. Η συνδυαστική γενετική ανάλυση των CTCs και του ctDNA, μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που προκαλούν αντίσταση και στην καθοδήγηση των θεραπευτικών στρατηγικών, ώστε να ξεπεραστούν αυτοί οι μηχανισμοί. Σε κάθε περίπτωση, η ανάλυση με βάση την υγρή βιοψία δεν περιορίζεται ως ο καθρέφτης της κλασικής βιοψίας ιστού, αλλά ως ένα εργαλείο που μπορεί να ανιχνεύσει και να παρέχει

μοναδικές πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της μοριακής ταυτότητας του όγκου κάθε ασθενούς ατομικά, όπου η κλασική βιοψία δεν μπορεί (1).

Μία άλλη πρόκληση για την υγρή βιοψία, αποτελεί η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων που επιβιώνουν κατόπιν λήψης στοχευμένων θεραπειών οι οποίες έχουν, θεωρητικά, εξουδετερώσει της πιο κυρίαρχους κλώνους, οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου. Υπάρχουν βάσιμες ελπίδες ότι η προσέγγιση της υγρής βιοψίας μπορεί να υποδείξει στρατηγικές συνδυασμού φαρμάκων, που από τη μία στοχεύουν σε κυρίαρχους μεταλλαγμένους πληθυσμούς, ενώ από την άλλη αναστέλλουν την εξέλιξη των συγκεκριμένων και επιλεγμένων υποκλώνων. Η παραπάνω προσέγγιση συνεισφέρει σημαντικά στην αντιμετώπιση της **ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease, MRD)**, αφού παρέχει της κλινικούς γιατρούς τη δυνατότητα να προβλέψουν τον κίνδυνο υποτροπής σε ασθενείς πρώιμου σταδίου νόσου, όπου έχει προηγηθεί χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Η πιο συναρπαστική εφαρμογή των βασισμένων σε αίμα δοκιμασιών, αποτελεί η πρώιμη διάγνωση της νόσου, κάτι που από πολλούς έχει χαρακτηριστεί ως το «άγιο δισκοπότηρο» στο πεδίο έρευνας του καρκίνου (1).

Για όλους της παραπάνω λόγους, η υγρή βιοψία αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την επιλογή στοχευμένης θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο. Παρόλα αυτά, η υιοθέτησή της στην κλινική ρουτίνα δεν έχει ακόμα κατοχυρωθεί. Κάποιες από τις παραμέτρους που αποτελούν πιθανή εξήγηση, είναι οι εξής: (I) υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων τεχνικών για την ανίχνευση κυκλοφορούντων βιοδεικτών, αλλά καμία αναλυτική συναίνεση για την ιδανική τεχνική προσέγγιση, (II) υπάρχει συνεχώς αυξανόμενος αριθμός πιθανών βιοδεικτών για την αξιολόγηση σε CTCs και ctDNA, (III) απαιτούνται καλά σχεδιασμένες μελέτες σύγκρισης μεταξύ CTCs και ctDNA στα ίδια κλινικά δείγματα, (IV) υπάρχει δυσκολία στον έλεγχο της προαναλυτικής φάσης για τη λήψη ισχυρών και αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων και (V) το υψηλό κόστος των διαθέσιμων μέχρι σήμερα τεχνικών, οι οποίες περιορίζουν την προσβασιμότητα της ασθενείς (1). Σε κάθε περίπτωση, η βελτίωση και η επικύρωση αναλυτικά ευαίσθητων κι ανθεκτικών (robust) μεθοδολογιών, αποτελούν απαραίτητα βήματα για την καθιέρωση των αναλύσεων της υγρής βιοψίας στην καθημερινή κλινική πράξη.



Σχήμα 1.1. Σύγκριση κλασικής βιοψίας με υγρή βιοψία (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. and Hoon D.) (1)

## 1.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

### 1.2.1. Ιστορική αναδρομή-ορισμός

Τα CTCs αναφέρθηκαν για πρώτη φορά περίπου 150 χρόνια πριν, από τον Thomas Ashworth, ο οποίος ανέφερε την ύπαρξή τους το 1869 (3). Οι Ευρωπαίοι ερευνητές ήταν οι πρώτοι που έδειξαν καθαρά το 2005 την κλινική σημασία των **διασπειρόμενων καρκινικών κυττάρων (Disseminated tumor cells, DTCs)** στον μυελό των οστών από ασθενείς με καρκίνο μαστού (4). Παρόλα αυτά, η ανάλυση των DTCs στο μυελό των οστών είναι εξαιρετικά επεμβατική και όχι εύκολα αποδεκτή για επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες.

Τα CTC είναι σπάνια κύτταρα τα οποία προέρχονται από πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους, έχουν καταφέρει να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω αυτής να ταξιδέψουν και να εγκατασταθούν σε διαφορετικά όργανα. Από αυτά, μόνο ένα μικρό κλάσμα των CTCs θα καταφέρει να εξελιχθεί σε μεταστάσεις. Τα CTCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέγγιση της υγρής βιοψίας και μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο σχετικά με την κατάσταση της νόσου. Η μετάσταση του καρκίνου είναι η κύρια αιτία θανάτου σχετιζόμενη με τη νόσο, και η διασπορά των καρκινικών κυττάρων μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο βήμα για τη μετάβαση από τοπική σε συστηματική νόσο (5). Η έγκαιρη ανίχνευση και χαρακτηρισμός των CTCs είναι πολύ σημαντικά

για την παρακολούθηση και πρόληψη του μεταστατικού καταρράκτη αντιδράσεων, ενώ η διαδοχική ανάλυση και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους μπορεί να δώσει κλινικά σημαντικές πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα των στοχευμένων και συστηματικών θεραπειών (π.χ. χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονικές ή στοχευμένες θεραπείες με αντισώματα ή αναστολείς) (5).

Τα CTCs αποτελούν επίσης μία σημαντική πηγή πληροφοριών για την κατανόηση της βιολογίας και των μηχανισμών διασποράς των καρκινικών κυττάρων, γι' αυτό και ο μοριακός τους χαρακτηρισμός προσφέρει μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση στην κατανόηση της αντίστασης σε καθιερωμένες θεραπείες και στη διασαφήνιση της πολύπλοκης μεταστατικής διαδικασίας (6). Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης και στον προσδιορισμό νέων θεραπευτικών στόχων, ιδίως μετά την αποσαφήνιση της σχέσης των CTCs με τα **καρκινικά βλαστοκύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs)**. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να μεταφραστεί σε εξατομικευμένες στοχευμένες θεραπείες και να απαλλάξει τους ασθενείς με καρκίνο από τις άσκοπες και αναποτελεσματικές θεραπείες (7).

Η μετάσταση εμφανίζεται ως ένας καταρράκτης γεγονότων που ξεκινούν με καρκινικά κύτταρα τα οποία αποκτούν «κυτταρική πλαστικότητα», μετά από μερική ή πλήρη **μετάβαση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)** (8), διαφεύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή του λεμφικού συστήματος δημιουργούν απομακρυσμένες εστίες (9). Ενόσω τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται στην κυκλοφορία, η αμφίδρομη φλεβική και αρτηριακή πίεση, οι υψηλές ταχύτητες, η ανοσοεπιτήρηση και η φυσιολογική διαδικασία της απόπτωσης, αποτελούν παράγοντες καταστροφής τους (10). Τα επιζώντα κύτταρα, από την άλλη, μπορούν να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένους ιστούς, όπου παραμένουν σε κατάσταση **ληθάργου (dormancy)** ή μέσω της μικρομετάστασης δημιουργούν δευτεροπαθή όγκο (11). Τα CTCs κυκλοφορούν είτε ως μονήρη κύτταρα, είτε σε συστοιχίες κυττάρων (clusters), γεγονός που ονομάζεται **μικροεμβολισμός του όγκου (circulating tumour microemboli, CTM)** και παρουσιάζει υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό (12).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η μορφολογία των CTCs διαφέρει ανάλογα με τη νόσο, τον χρόνο διάγνωσης και τη φάση (προ/μετά) της θεραπείας. Στις περισσότερες μελέτες, τα CTCs ορίζονται ως θετικά για το **μόριο προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM)**, τις **κυτταροκερατίνες 8, 18, 19 (cytokeratins, CK)** και αρνητικά για το CD45 (13). Μια σημαντική ανακάλυψη για την ανίχνευση CTCs ήταν ότι το EpCAM εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι σε κύτταρα αίματος. Ωστόσο, νέα

στοιχεία δείχνουν ότι εξακολουθεί να επικρατεί μεγάλη ετερογένεια στους υποπληθυσμούς των CTCs. Η ετερογενής φύση αυτή, συνίσταται από επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, EMT κύτταρα, υβριδικά καρκινικά κύτταρα (επιθηλιακά/EMT<sup>+</sup>), μη αναστρέψιμα EMT<sup>+</sup> καρκινικά κύτταρα και **κυκλοφορούντα καρκινικά βλαστοκύτταρα (Circulating Tumor Stem Cells, CTSCs)** (14). Οι παραπάνω ανακαλύψεις υποδεικνύουν έναν διαφορετικό τρόπο για τον προσδιορισμού των CTCs, ανεξάρτητο του EpCAM.

Αν και έχει σημειωθεί αρκετή πρόοδος όσον αφορά στην ανίχνευση και στον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs, αρκετές προκλήσεις οι οποίες πρέπει να ξεπεραστούν, αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες στην κλινική εφαρμογή αυτής της προσέγγισης. Η παρουσία των CTCs στο περιφερικό αίμα έχει συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση και πρόωμη υποτροπή σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως αυτό έχει ήδη δειχθεί από πολυάριθμες κλινικές μελέτες (15). Ήδη από το 2002, η ελληνική ερευνητική ομάδα, παρουσίασε πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία την προγνωστική σημασία της ανίχνευσης του mRNA της κυτταροκερατίνης-19 (CK-19) στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού (16–19). Λίγα χρόνια μετά, βασισμένο στον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζουν τα CTCs στην μεταστατική εξάπλωση του όγκου, το FDA εξέδωσε την έγκριση του συστήματος CellSearch για καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη (20).

Το γεγονός ότι τα CTCs είναι πολύ σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου προς ανάλυση δείγματος είναι πολύ περιορισμένη, παραμένει μια τεράστια αναλυτική και τεχνική πρόκληση. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs, περιλαμβάνουν μεθόδους που βασίζονται σε **ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR, RT-qPCR)**, σε απεικονιστικές μεθόδους και σε απομόνωση μέσω μικροφίλτρων και μικροτσιπ. Σήμερα, οι εξαιρετικά ευαίσθητες πλατφόρμες ανίχνευσης των CTCs, επιτρέπουν την παρακολούθηση της νόσου και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (21). Ωστόσο, συγκριτικές μελέτες που βασίζονται σε διαφορετικά συστήματα ανάλυσης για την απομόνωση, την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs, παρουσιάζουν σημαντική μεταβλητότητα στο ποσοστό θετικών δειγμάτων σε σχέση με τις υπάρχουσες τεχνικές ανίχνευσης (9). Πράγματι, η άμεση σύγκριση των διαφόρων μεθοδολογιών για την ανίχνευση CTCs σε δείγματα αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, αποκάλυψε τη ύπαρξη σημαντικών διακυμάνσεων στα ποσοστά ανίχνευσης (22,23). Επιπλέον, υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα για τη βιολογία των CTCs, τη βέλτιστη μέθοδο για την απομόνωση και τον μοριακό χαρακτηρισμό τους, καθώς και τη διερεύνηση της κλινικής σημασίας των διαφορετικών συστημάτων (24).

Οι στόχοι γύρω από την έρευνα των CTC, περιλαμβάνουν: α) την εκτίμηση του κινδύνου για τη μεταστατική υποτροπή ή εξέλιξη της νόσου, β) την ταξινόμηση των ασθενών και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας σε πραγματικό χρόνο, γ) την ταυτοποίηση θεραπευτικών στόχων και μηχανισμών αντίστασης και δ) την κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης μετάστασης (15). Πριν, όμως, από τον καθορισμό του ρόλου των CTCs στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, είναι σημαντικό οι αναλύσεις που χρησιμοποιούνται για τη μέτρησή τους, να είναι αναλυτικά και κλινικά επικυρωμένες (25). Εν κατακλείδι, οι δυνατότητες που παρέχει η ανάλυση των CTCs, έχουν πλέον επιβεβαιωθεί και η υγρή βιοψία αποτελεί σήμερα ένα από τα πιο ενδιαφέροντα θέματα στην μεταφραστική έρευνα του καρκίνου (26).

### 1.2.2. Τεχνικές απομόνωσης και εμπλουτισμού των CTCs

Η απομόνωση και η περαιτέρω ανάλυση ενός καθαρού πληθυσμού CTCs είναι ένα πολύ σημαντικό, αλλά δύσκολο έργο, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι εξαιρετικά σπάνια και ως σπάνια γεγονότα ακολουθούν την κατανομή Poisson (27). Για το λόγο αυτό, στις περισσότερες περιπτώσεις ένας πληθυσμός CTC συναπομονώνεται μαζί με **μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)**. Ο συνδυασμός αυτοματοποιημένων τεχνολογιών απομόνωσης υψηλής απόδοσης με τη δυνατότητα εφαρμογής μοριακών ή κυτταρολογικών προσδιορισμών στα απομονωμένα CTCs, είναι καίριος για την ενσωμάτωση της ανάλυσης των CTCs στην καθιερωμένη κλινική διαχείριση των ασθενών με καρκίνο.

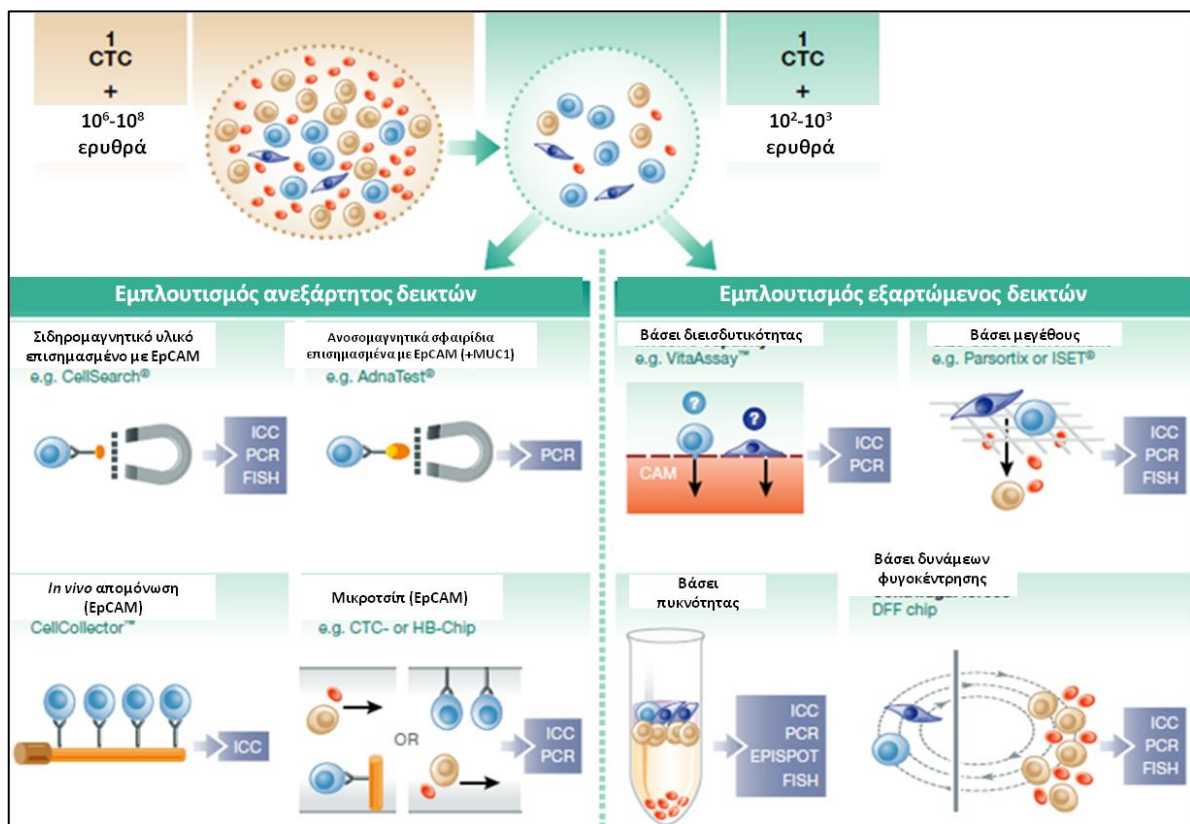
Η ανάλυση των CTCs περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: α) απομόνωση/εμπλουτισμός, β) αντίχνευση, γ) καταμέτρηση και δ) μοριακός χαρακτηρισμός. Η πλειοψηφία των τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί, δίνουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τα CTC, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα CTCs ακόμα και του ίδιου ασθενούς, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (1,28).

Οι κύριες στρατηγικές για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs πραγματοποιούν διαχωρισμό που βασίζεται στην πυκνότητα, το μέγεθος και τα ηλεκτρικά φορτία των CTC και στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην κυτταρική τους επιφάνεια. Μία συνοπτική εικόνα των συστημάτων απομόνωσης CTCs παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2. Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία συσκευών μικροροών και διήθησης για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των CTCs. Τα συστήματα αυτά βρίσκονται υπό κλινική αξιολόγηση. Πολύ πρόσφατα, επίσης, έχουν



χρησιμοποιηθεί προηγμένες τεχνολογίες για την *in-vivo* απομόνωση των CTCs καθώς και για την απομόνωση καθαρών και βιώσιμων μονήρων CTCs.

Τα συστήματα ανίχνευσης των CTC βασίζονται κυρίως σε απεικονιστικές προσεγγίσεις ανοσοφθορισμού, μέσω της ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών δεικτών, καθώς και σε μοριακούς προσδιορισμούς μέσω της ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων. Πρόσφατα, η εφαρμογή της τεχνολογίας **μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (massive parallel sequencing, MPS)** για το μοριακό χαρακτηρισμό των CTC σε συνδυασμό με την αξιόπιστη απομόνωση μονήρων CTC, δημιουργεί νέες προοπτικές στη διαχείριση των ασθενών με καρκίνο (1).



Σχήμα 1.2. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης CTCs βιοψία (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. And Hoon D.) (1)

Παρακάτω, παρατίθενται τα κύρια αναλυτικά συστήματα απομόνωσης που χρησιμοποιούνται σήμερα για την απομόνωση/εμπλουτισμό, ανίχνευση, καταμέτρηση και μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs.

### 1.2.2.1. Το σύστημα CellSearch®

Το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> (Menarini Diagnostics, Italy) θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση CTCs, καθώς αποτέλεσε τη βάση πολλών κλινικών μελετών που συσχετίζουν τον αριθμό των CTCs με την πρόγνωση σε μεταστατικούς ασθενείς (29,30). Αυτή η τεχνολογία μπορεί να ανιχνεύσει και να καταμετρήσει CTCs επιθηλιακού χαρακτήρα σε περιφερικό αίμα, μέσα σε υπόβαθρο εκατομμυρίων λευκοκυττάρων και βασίζεται σε ανοσομαγνητικό διαχωρισμό βασισμένο στο EpCAM. Αυτό το σύστημα έχει λάβει έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ήδη από το 2005 για την πρόγνωση και παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη, όμως εξακολουθεί να είναι το μόνο FDA-εγκεκριμένο σύστημα (31). Στο CellSearch<sup>®</sup>, ένας συνδυασμός ανοσοκυτταροχημείας (IHC) και ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση (enumeration) των CTCs, με βάση ειδικούς δείκτες όπως οι κυτταροκερατίνες (8, 18 και 19), το CD45 και η 4'6 -διαμιδινο-2-13 φαινυλινδόλη (πυρηνική χρώση) (DAPI). Το σύστημα αυτό βασίζεται σε ένα συνδυασμό θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού των CTC και αυτοματοποιημένης ψηφιακής μικροσκοπίας (υποκεφάλαιο 4.4).

Τα βασικά πλεονεκτήματα αυτού του συστήματος είναι η ευκολία χρήσης και η υψηλή αναπαραγωγικότητα. Το κύριο πλεονέκτημά του είναι ότι τα περισσότερα από τα αναλυτικά βήματα που χρησιμοποιούνται είναι καλά ελεγχόμενα και αυτοματοποιημένα, όπως συμβαίνει και σε έναν τυποποιημένο βιοχημικό αναλυτή. Επιπλέον, η προαναλυτική φάση της ανάλυσης των CTCs είναι απόλυτα ελεγχόμενη, καθώς τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέγονται σε ειδικά σωληνάρια που περιέχουν ένα συντηρητικό, το οποίο επιτρέπει την ασφαλή μεταφορά και σταθερότητα του δείγματος. Το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> μπορεί να ανιχνεύσει 1 CTC ανά 7,5mL περιφερικού αίματος, με υψηλή αναπαραγωγικότητα. Η αναλυτική ακρίβεια, γραμμικότητα και η διαγνωστική του ευαισθησία, επικυρώθηκαν για πρώτη φορά το 2004 (32). Οι Riethdorf et al διενήργησαν μια μελέτη επικύρωσης μέσω ενός αυστηρού προγράμματος κλινικών δοκιμών (30) και έδειξαν ότι οι μετρήσεις των CTC παρέμειναν σταθερές για 72h μετά τη συλλογή των δειγμάτων αίματος, ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια ομάδα έδειξε επίσης ότι τα καταμετρούμενα CTC δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των νοσοκομείων, γεγονός που υποδηλώνει την υψηλή αναπαραγωγικότητα της καταμέτρησης.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα του συστήματος, πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη κάποιοι περιορισμοί, όπως το γεγονός ότι τα CTCs είναι πολύ ετερογενή, ένα εύρημα που δείχνει την αναγκαιότητα χρήσης πολλαπλών και συμπληρωματικών τεχνολογιών για την απομόνωση όλων των υποπληθυσμών CTCs. Το κύριο μειονέκτημα του CellSearch<sup>®</sup> είναι ότι βασίζεται εξ ολοκλήρου στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη EpCAM. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούν να

ανιχνευθούν υποπληθυσμοί CTCs που βρίσκονται απόλυτα σε κατάσταση EMT και άρα δεν εκφράζουν το EpCAM (33). Ένα άλλο μειονέκτημα, είναι ότι δεν επιτρέπονται οι μελέτες γονδιακής έκφρασης σε CTCs που απομονώνονται με το CellSearch<sup>®</sup>, καθώς το συντηρητικό των κυττάρων που χρησιμοποιείται αποτελεί αναστολέα για την περαιτέρω μοριακή ανάλυση σε επίπεδο RNA.

Οι Coumans et al. πρόσφατα αξιολόγησαν τη μείωση του αριθμού των CTCs μετά τη χορήγηση της θεραπείας με τη χρήση του συστήματος CellSearch<sup>®</sup> (34). Αξιολόγησαν διαφορετικά μέσα για να εκφράσουν τις μεταβολές στις μετρήσεις CTCs σε σχέση με την ολική επιβίωση και διαπίστωσαν ότι ο σωστός καθορισμός του ελάχιστου αριθμού CTCs βάσει του οποίου θα λαμβάνονται κλινικές αποφάσεις (cut-off), είναι η καλύτερη προσέγγιση για τον καθορισμό ή μη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, απαιτείται περίοδος 10 έως 12 εβδομάδων θεραπείας για να γίνει ορατό το αποτέλεσμα της θεραπείας μέσω των CTCs. Η ίδια ομάδα ανέπτυξε έναν αυτοματοποιημένο αλγόριθμο για την εξάλειψη των διακυμάνσεων στην καταμέτρηση των CTCs, τον επικύρωσε με εφαρμογή του σε εικόνες CTC από ασθενείς με καρκίνο προστάτη, μαστού και παχέος εντέρου κι έπειτα διερεύνησε περαιτέρω τον ρόλο των μορφολογικών παραμέτρων στην καταμέτρησή τους. Με τη χρήση αυτής της προσέγγισης, τα CTCs μπορούν να ταυτοποιηθούν και να πραγματοποιηθούν συσχετίσεις των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών με τα κλινικά αποτελέσματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη (35). Η κλινική σημασία των CTCs έχει αξιολογηθεί σε πολλούς τύπους όγκων (36,37). Τέλος, ο αριθμός των καταμετρημένων CTCs από το CellSearch<sup>®</sup> έχει συσχετισθεί με το ελεύθερο υποτροπής διάστημα (PFS) και την ολική επιβίωση (OS) σε περιπτώσεις μεταστατικού (20,38) και πρώιμου (39,40) καρκίνου μαστού.

#### **1.2.2.2. Συστήματα εμπλουτισμού για την απομόνωση CTCs**

Εκτός από τον χαμηλό αριθμό CTCs που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα (1 CTC ανάμεσα σε  $10^6$ - $10^8$  κύτταρα του περιφερικού αίματος), πρόκληση αποτελεί και η μεγάλη ετερογένεια που τα διακρίνει, ακόμα και στον ίδιο ασθενή. Για τους παραπάνω λόγους, έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια στην ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών για την ευαίσθητη και εξειδικευμένη απομόνωση των CTCs. Οι μέθοδοι που είναι εμπορικά διαθέσιμοι, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, βάσει των διαφορετικών ιδιοτήτων των CTCs οι οποίες τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα αιμοποιητικά κύτταρα: α) τα συστήματα που είναι ανεξάρτητα των δεικτών που εκφράζονται σε CTCs και βασίζονται σε φυσικές ιδιότητες των κυττάρων όπως το μέγεθος, η πυκνότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, οι φυγόκεντρες δυνάμεις και η πλαστικότητα τους και β) τα

συστήματα τα οποία εξαρτώνται απόλυτα από την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών στην επιφάνεια των CTCs και βασίζονται σε βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων. Οι τελευταίες, περιλαμβάνουν συστήματα διαχωρισμού με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια, με θετική/αρνητική επιλογή ή συνδυασμό των δύο. Η αύξηση της απόδοσης της απομόνωσης, επιτυγχάνεται με συνδυασμό των δύο κατηγοριών (1).

### 1.2.2.3. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού εξαρτώμενα από δείκτες

#### ▪ **Θετική επιλογή**

Η θετική επιλογή είναι η πιο κοινή μέθοδος απομόνωσης/εμπλουτισμού των CTCs. Στηρίζεται στην απομόνωση των CTCs μέσω χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ειδικών επιθηλιακών δεικτών που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη των CTCs, αλλά όχι των PBMCs. Χρησιμοποιούνται, έτσι, μαγνητικά σφαιρίδια (διαμέτρου: 0,5–5μm) ή νανοσφαιρίδια (διαμέτρου: 50–250nm) επισημασμένα με ειδικό αντίσωμα (41,42) τα οποία εκτίθενται στη συνέχεια σε μαγνητικό πεδίο. Διάφορα αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs. Ανάμεσά τους, το EpCAM είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, καθώς έχει αποδείξει πολλαπλές φορές κλινική σημασία των απομονωμένων με αυτό τον τρόπο CTCs (1). Παρόλα αυτά, παρουσιάζεται το μειονέκτημα τους απώλειας κυττάρων που υποβάλλονται σε EMT διαδικασία (33). Για να ξεπεραστεί το παραπάνω πρόβλημα, έχει προταθεί η χρήση κι άλλων ειδικών για τον όγκο δεικτών, τους οι CEA, EGFR, PSA, HER-2, MUC-1, EphB4, IGF-1R, cadherin-11 και TAG-72 (13,43). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι τους βιμεντίνης, ειδικό για CTCs σε EMT φάση (44). Μάλιστα, σε πρόσφατη μελέτη εφαρμογής του για απομόνωση EMT-CTCs από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, ο αριθμός των απομονωμένων CTCs συσχετίστηκε με το θεραπευτικό αποτέλεσμα (44). Τέλος, το MagSweeper χρησιμοποιεί ανοσομαγνητικά σφαιρίδια έναντι δεικτών της επιφάνειας επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία προστίθενται απευθείας σε δείγματα αίματος. Έπειτα, πραγματοποιείται ο εμπλουτισμός των CTCs και η απομάκρυνση των αδέσμευτων κυττάρων με χρήση φυγόκεντρων δυνάμεων (28,45).

#### ▪ **Αρνητική επιλογή**

Αυτή η προσέγγιση απομόνωσης είναι εντελώς ανεξάρτητη από τον φαινότυπο των CTCs και βασίζεται στην αφαίρεση των μη καρκινικών κυττάρων του περιφερικού αίματος, αρχικά με λύση των **ερυθρών αιμοσφαιρίων (Red Blood Cells, RBCs)** και μετέπειτα χρήση ειδικών

δεικτών για τα **λευκά αιμοσφαίρια (White Blood Cells, WBCs)** τους το CD45 ή CD61 (46,47). Μια άλλη παραλλαγή του εμπλουτισμού των CTCs με αρνητική επιλογή είναι το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα RosetteSep™ (STEMCELL Technologies, Canada), το οποίο χρησιμοποιεί ένα μίγμα αντισωμάτων που συνδέουν τα RBC αρχικά μεταξύ τους και μετά με τα WBCs. Με τον τρόπο αυτό, αφαιρείται η πλειοψηφία των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων, εμπλουτίζοντας έτσι το δείγμα περιφερικού αίματος με CTCs, εάν υπάρχουν. Το σύστημα RosetteSep™, έχει επιδείξει καλύτερα αποτελέσματα, συγκρινόμενο με τη μέθοδο φυγοκέντρησης διαβαθμισμένης πυκνότητας (48).

#### ▪ **Τεχνολογίες βασισμένες σε κυτταρομετρία ροής**

Οι κυτταρομετρικές μέθοδοι απομονώνουν και καταγράφουν μεμονωμένα τα κύτταρα βασισμένες στην έκφραση των ειδικών αντιγόνων επιφανείας τους. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι είναι εφικτή η απομόνωση καθαρών πληθυσμών CTCs από περιφερικό αίμα μέσω τους **ενεργοποιημένες με φθορισμό διαλογής κυττάρων (Fluorescence-activating cell sorting, FACS)** και η περαιτέρω ανάλυση γονιδιακής έκφρασης σε αυτά (49,50). Επιπλέον, πρόσφατα σε CTCs απομονωμένα από το CellSearch, μέσω κυτταρικής διαλογής, πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση υψηλής ευκρίνειας σε επίπεδο του ενός κυττάρου (51). Το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η δυνατότητα λήψης μορφολογικών πληροφοριών, αλλά και περαιτέρω χαρακτηρισμού των κυττάρων όσον αφορά στην έκφραση συγκεκριμένων βιολογικών δεικτών. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα για την ευρύτερη εφαρμογή τους στην κλινική πράξη, είναι η έλλειψη ειδικών αντισωμάτων και η μειωμένη ευαισθησία.

#### **1.2.2.4. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού ανεξάρτητα δεικτών**

##### ▪ **Συστήματα βάσει πυκνότητας**

Η φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας διαχωρίζει τα PBMCs –στο κλάσμα των οποίων θεωρείται ότι συμπεριλαμβάνονται και τα CTCs- από τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (granulocytes), συγκεντρώνοντάς τα σε ένα μεσοδακτύλιο (21). Τα κύτταρα του μεσοδακτυλίου συλλέγονται και χρησιμοποιούνται για περαιτέρω ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων. Η πρότυπη μέθοδος φυγοκέντρησης διαβαθμισμένης πυκνότητας είναι αυτή της φικόλης (Ficoll, Histopaque) (52), ενώ έχουν αναπτυχθεί και άλλα μέσα, όπως είναι το OncoQuick (Greiner BioOne, Germany) (53) και το **διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων**

(**red cell lysis buffer, RCL**). Τα ποσοστά ανάκτησης CTCs, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από πειράματα σε κυτταρικές σειρές, ήταν όπως τάξεως του 80-90% (54).

#### ▪ **Συστήματα βάσει μεγέθους**

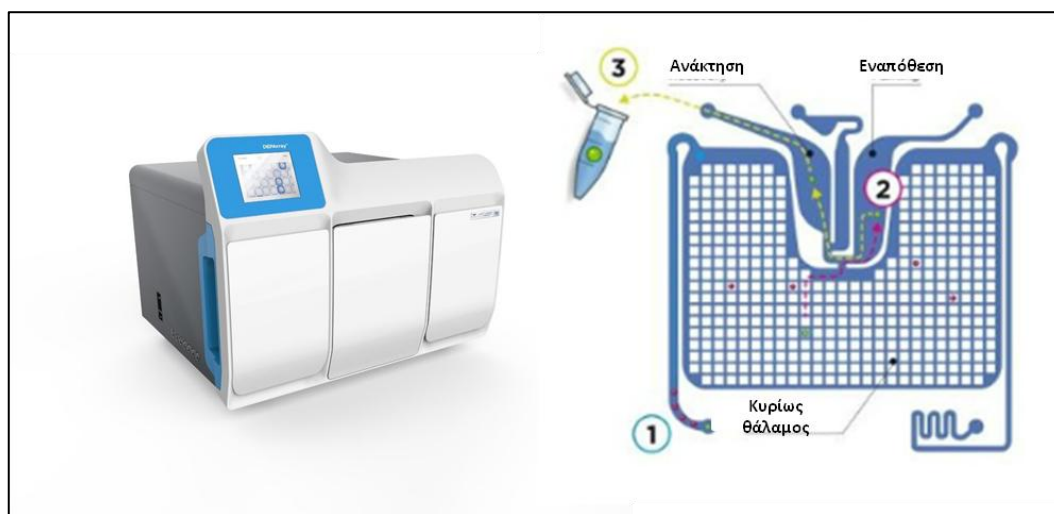
Τα συστήματα απομόνωσης με βάση το μέγεθος, διαχωρίζουν άμεσα τα CTCs λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους όπως (~6,5-10μm) από τα λευκά αιμοσφαίρια. Η πρώτη συσκευή φίλτραρίσματος περιγράφηκε από τους Vona et al, το 2000 και χρησιμοποιείται έως σήμερα (55). Πρόκειται για το Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET) σύστημα (RareCells, France), το οποίο είναι ικανό να ανιχνεύσει ένα κύτταρο σε 1mL αίματος, με απλό και γρήγορο τρόπο (55). Τα απομονωμένα μέσω του ISET CTCs μπορούν να ανακτηθούν από το φίλτρο και να αξιολογηθούν με ανοσοφθορισμό, FISH ή μοριακή γενετική ανάλυση (56). Το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση ALK-θετικών (57) και ROS-θετικών (58) CTCs με επιθηλιακό/μεσεγχυματικό φαινότυπο σε ασθενείς με **μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC)**.

Ένα άλλο παρόμοιο, εμπορικά διαθέσιμο φίλτρο, είναι το ScreenCell (Screencell SA, France), το οποίο επιτρέπει την απομόνωση ζωντανών ή μονιμοποιημένων σε παρα-φορμαλδεΰδη CTCs (59). Πρόσφατα αξιολογήθηκε η εφαρμογή του στον καρκίνο του πνεύμονα (60). Τέλος, το σύστημα Cellsieve (CREATV microtech, US), βασίζεται στη χρήση ειδικών φίλτρων για την επιτυχή απομόνωση CTCs αλλά και μεγάλου μεγέθους κυττάρων (25-300μm), συγκεκριμένα των **κυκλοφορούντων μακροφάγων που σχετίζονται με καρκίνο (cancer-associated macrophage-like cells, CAMLs)**, τα οποία κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο κι έχει διερευνηθεί η κλινική τους σημασία (61).

#### ▪ **Συστήματα βάσει ηλεκτρικού φορτίου/απομόνωση μονήρων CTC**

Τα CTCs διαφέρουν πολύ από τα PBMCs σε σχέση με τη μορφολογία και τις διηλεκτρικές τους ιδιότητες. Η **διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP)** είναι μια αρκετά νέα τεχνολογία για την απομόνωση των CTC. Οι διηλεκτρικές ιδιότητες (πολικότητα) των κυττάρων εξαρτώνται από τη διάμετρο, τη μεμβράνη, την πυκνότητα, την αγωγιμότητα και τον όγκο. Ανάλογα με τον φαινότυπο και τη μορφολογία όπως, τα διαφορετικά κύτταρα έχουν διαφορετικές διηλεκτρικές ιδιότητες κι αυτή αποτελεί τη βασική αρχή για την «ηλεκτροκινητική» απομόνωση των CTCs (62).

Σχετικά πρόσφατα αναπτύχθηκε και το σύστημα DEParray (Menarini Diagnostics, Italy), το οποίο επιτρέπει μέσω διηλεκτροφόρησης, την απομόνωση μονήρων και απολύτως καθαρών CTC από προ-εμπλουτισμένα δείγματα αίματος (Σχήμα 1.3) (63). Αυτή η τεχνολογία είναι εντελώς ανεξάρτητη από την έκφραση αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και αξιολογείται, επί του παρόντος, σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες, θέλοντας να προάγει δυνατότητες ανάλυσης μονήρων CTC (64). Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τεχνολογίες, όπως το CellSearch για περαιτέρω μοριακό χαρακτηρισμό των μονήρων CTCs (65,66).



**Σχήμα 1.3.** Το σύστημα DEParray για την απομόνωση μονήρων CTC (<http://www.siliconbiosystems.com/deparray-system>)

#### 1.2.2.5. Συστήματα μικροροών σε συνδυασμό με ανοσοδιαχωρισμό

Τα συστήματα μικροροών για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs, αναπτύχθηκαν την τελευταία δεκαετία και κύριο πλεονέκτημά τους αποτελεί το γεγονός ότι είναι πλήρως αυτοματοποιημένα και ξεπερνούν τυχόν προβλήματα των κλασικών τεχνικών απομόνωσης, όπως η συγγένεια πρόσδεσης των αντισωμάτων (67). Κύρια μειονεκτήματά τους αποτελούν ο μεγάλος χρόνος ανάλυσης κάθε δείγματος και η έλλειψη ευελιξίας στον αρχικό όγκο περιφερικού αίματος τους ανάλυση. Η λογική τους βασίζεται στον συνδυασμό μιας καθορισμένης τοπογραφίας από μικροδομές (παγίδες) με εφαρμογή νηματώδους ροής σε μικροδιαύλους (68).

Η πρώτη συσκευή που χρησιμοποίησε τεχνολογία μικροροών για την απομόνωση των CTC περιγράφηκε το 2007. Το λεγόμενο CTC-Chip ήταν ένας θάλαμος πυριτίου που περιείχε 78.000 μικροπόρους επιστρωμένους με EpCAM αντίσωμα, όπου τα παγιδευμένα στους μικροπόρους

CTCs, γίνονται ορατά με χρώση έναντι τους κυτταροκερατίνης ή άλλων ειδικών δεικτών. Η ανάκτηση του συστήματος, όπως προέκυψε από εμβολιασμό καρκινικών κυττάρων σε ολικό αίμα, ήταν ~60% και το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου ήταν η πληθώρα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν σε δείγματα υγιούς πληθυσμού (69). Η ίδια ομάδα, ανέπτυξε στη συνέχεια το HB-chip, το οποίο ήταν καταλληλότερο για μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και αποτελούνταν από μία πιο «αξιόπιστη» επίστρωση της εσωτερικής επιφάνειας με αντισώματα. Επιπλέον, τα υλικά κατασκευής του τσιπ, επέτρεπαν την οπτικοποίηση των CTCs με υψηλής διακριτικής ικανότητας απεικονιστικές μεθόδους (70). Η τελευταία εξέλιξη του τσιπ που προέρχεται από την παραπάνω ομάδα, είναι το CTC-iChip, μια άλλη πλατφόρμα απομόνωσης CTCs από ολικό αίμα, με ταχύτητα ροής  $10^7$  κύτταρα/s. Ο τρόπος απομόνωσης CTCs με το CTC-iChip είναι είτε εξαρτώμενος, είτε ανεξάρτητος από δείκτες, επομένως έχει τη δυνατότητα εφαρμογής σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου (71).

Όπως παρατηρούμε, οι περισσότερες από τους παραπάνω συσκευές μικροροών βασίζονται σε τρισδιάστατες δομές, επομένως είναι περιοριστικές για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό ή την καλλιέργεια των CTCs. Η ερευνητική ομάδα της Pr. S. Nagrath, ξεπέρασε αυτό το πρόβλημα αναπτύσσοντας ειδικές τεχνολογίες, που επέτρεπαν την καλλιέργεια των CTCs πάνω στο τσιπ, προσομοιάζοντάς το με το μικροπεριβάλλον του όγκου (72–74). Πρόσφατα, ένα άλλο τρισδιάστατο σύστημα βασισμένο σε τεχνολογία μικροροών, ονόματι ClearCell<sup>®</sup> FX1 (ClearBridge Biomedics, Singapore) αναπτύχθηκε για έναν ανεξάρτητο δεικτών τρόπο εμπλουτισμό των CTCs και επικυρώθηκε κλινικά. Τα ανακτηθέντα κύτταρα ήταν μη επισημασμένα και βιώσιμα, επιτρέποντας την περαιτέρω ανάλυση σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας τεχνικές μαζικής παράλληλης αλληλούχισης ή πρωτεωμικής (75). Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί το HER2 ως εναλλακτικό του EpCAM σε μια νέα συσκευή μικροροών, για την απομόνωση CTCs από περιφερικό αίμα ασθενών με συμπαγείς όγκους που εκφράζουν HER2 (76).

Η πλατφόρμα απομόνωσης Parsortix (ANGLE plc, UK) βασίζεται σε σύστημα μικροροών για την απομόνωση των CTCs με βάση το μέγεθός τους. Το σύστημα επιτρέπει τον μοριακό χαρακτηρισμό των υψηλής καθαρότητας απομονωμένων κυττάρων με ανοσοφθορισμό αλλά και την μελέτη με μοριακές τεχνικές (77–79). Η πλατφόρμα αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα αφενός γιατί μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους καρκίνου με τρόπο ανεξάρτητο ειδικού δείκτη και αφετέρου διότι η αυτοματοποιημένη του μορφή μειώνει σημαντικά τα προ-αναλυτικά σφάλματα (80). Το βασικό πλεονέκτημα του συστήματος Parsortix είναι ότι διαχωρίζει τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος ανεξάρτητα από το αν

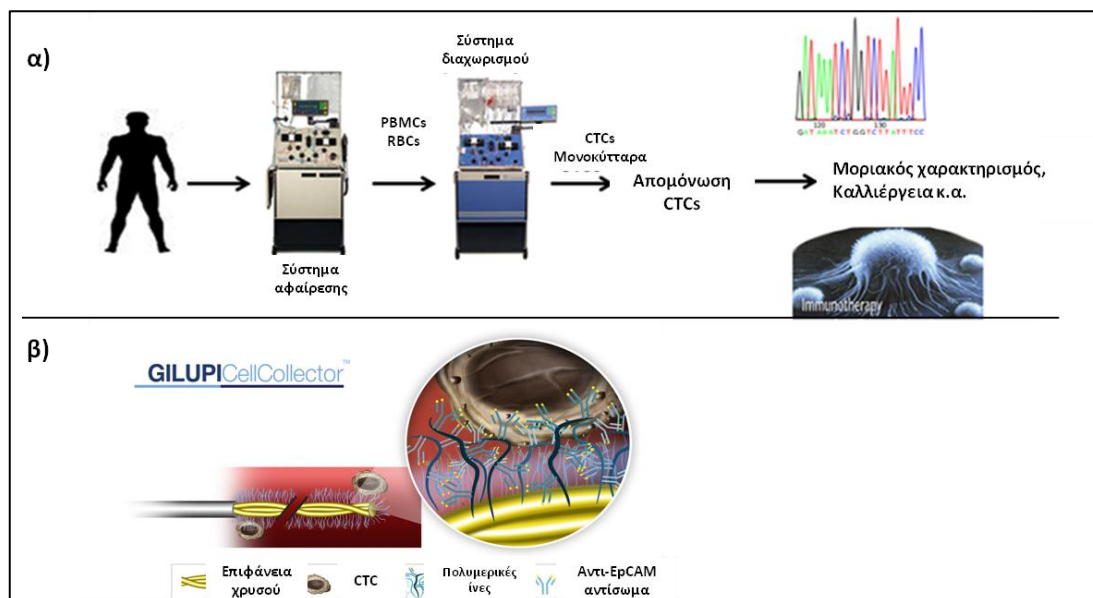


εκφράζεται η πρωτεΐνη EpCAM στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Τέλος, ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι τα τελευταία χρόνια και η πλατφόρμα Vortex (Vortex Biosciences, US) (81,82).

#### 1.2.2.6. *In vivo* συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs

Τα συστήματα αυτά αποσκοπούν στο να ξεπεραστούν τα προβλήματα μικρού όγκου δειγμάτων ολικού αίματος, που προκύπτουν κατά τις *ex-vivo* τεχνικές απομόνωσης. Η **διαγνωστική λευκαφαίρεση (Diagnostic Leukapheresis, DLA)** είναι μια εργαστηριακή διαδικασία στην οποία τα WBCs ή τα βλαστοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBSCs) διαχωρίζονται από το αίμα. Κατά τη διάρκεια της λευκαφαίρεσης, το αίμα του ασθενούς διέρχεται μέσα από ένα μηχάνημα που αφαιρεί τα WBCs ή τα PBSCs και στη συνέχεια επιστρέφει την ισορροπία του αίματος πίσω στον ασθενή (Σχήμα 1.4α). Το προϊόν της λευκαφαίρεσης, μπορεί επίσης να περιέχει CTCs. Οι Fischer et al εξέτασαν τα προϊόντα της LA που παράγονται από έως και 25L αίματος ανά ασθενή σε δύο ανεξάρτητες μελέτες και διαπίστωσαν ότι τα CTCs ανιχνεύονται σε περισσότερο από το 90% των μη μεταστατικών ασθενών με καρκίνο μαστού (83).

Ένα άλλο καινοτόμο *in-vivo* σύστημα απομόνωσης CTC είναι το CellCollector (Gilupi GmbH, Germany). Το CellCollector είναι ένας νανοκαθετήρας (nanowire), που είναι επικαλυμμένος στην άκρη του (μήκους 2cm) με νανοσφαιρίδια χρυσού, πάνω στα οποία δεσμεύονται ομοιοπολικά τα χημικά αντισώματα έναντι του EpCAM (Σχήμα 1.4β). Το CellCollector τοποθετείται στη φλέβα του ασθενούς και επιτρέπει την *in-vivo* σύλληψη σπάνιων CTCs, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η προσέγγιση αυτή, επιτρέπει την απομόνωση μεγαλύτερου αριθμού CTCs για περαιτέρω προσδιορισμούς, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές που χρησιμοποιούν αρχικό όγκο δείγματος 7 έως 10mL. Επιπλέον, θα μπορούσε ενδεχομένως να αυξήσει τις πιθανότητες απομόνωσης CTCs στα αρχικά στάδια της νόσου, όπου αναμένουμε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα (84).



Σχήμα 1.4. *In vivo* συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs: α) διαγνωστική λευκαφαίρεση (DLA) και β) CellCollector (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. and Hoon D.) (1)

### 1.2.3. Τεχνικές ανίχνευσης και μοριακού χαρακτηρισμού των CTCs

Η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, βασίζεται κυρίως σε: α) απεικονιστικές μεθόδους όπως ο ανοσοφθορισμός, β) μοριακές μεθόδους βασισμένες σε ανάλυση νουκλεϊκών οξέων από τα CTCs, όπως η RT-qPCR, multiplex RT-PCR ή συνδυασμό απεικονιστικών και μοριακών μεθόδων και γ) ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα CTCs (EPISPOT μεθοδολογία) (Σχήμα 1.5)(1).

#### 1.2.3.1. Απεικονιστικές μέθοδοι

Η ανίχνευση επιθηλιακής προέλευσης CTCs με ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιεί αντισώματα έναντι των CK (8, 18, 19), επιτρέπει τον μορφολογικό χαρακτηρισμό των CTCs και μέχρι στιγμής αποτελεί την πιο καλά επικυρωμένη και προτυποποιημένη απεικονιστική τεχνική. Η τεχνολογία DyLight, χρησιμοποιώντας πολλαπλά αντισώματα (cytokeratin, Her2/neu, ALDH1, CD44 και CD24) επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες διαφορετικών χρωμάτων, επιτρέπει την ανάλυση πολλαπλών δεικτών στα CTCs, μέσω λήψης φασμάτων φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος (85). Μία άλλη τεχνολογία, η κυτταρομετρία ροής με χρήση λέιζερ (laser scanning cytometer, LSC), αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο ποσοτικής μικροσκοπίας, που όμως χαρακτηρίζεται από μειωμένη ειδικότητα καθώς μεγάλος αριθμός κυττάρων ανιχνεύονται και στους υγιείς (86). Το Ariol (Leica Biosystems) είναι ένα αυτοματοποιημένο απεικονιστικό σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την υψηλής ανάλυσης απεικόνιση

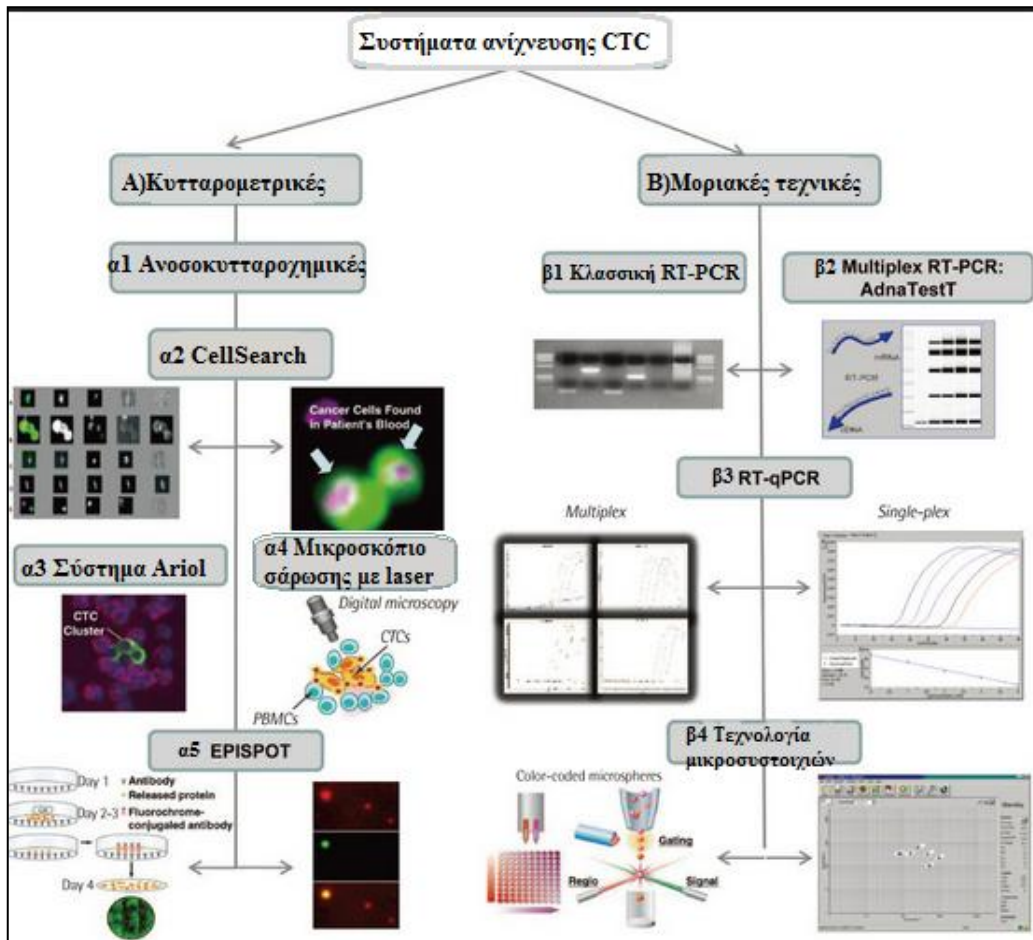
των CTCs. Τέλος η **υψηλής ευκρίνειας μεθοδολογία CTC (High-definition circulating tumor cell, HD-CTC)**, προσδιορίζει τα CTCs χωρίς να έχει προηγηθεί εμπλουτισμός με ειδικούς πρωτεϊνικούς δείκτες (87,88).

### **1.2.3.2. Μοριακές μέθοδοι**

Οι μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs εκμεταλλεύονται την εξαιρετική ευαισθησία και την εξειδίκευση της PCR και το υψηλό δυναμικό του MPS. Μέχρι στιγμής, έχουν εφαρμοστεί ευρέως και είναι πολύ ελπιδοφόρες για το πεδίο ανάλυσης μονήρων CTC. Οι μοριακές αναλύσεις βασίζονται στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων στα CTCs και διακρίνονται επίσης σε: RT-qPCR, πολλαπλή RT-qPCR, ειδική για μεθυλίωση PCR (MSP), ARMS-PCR, FISH, array-CGH και MPS. Τα κύρια πλεονεκτήματα των μοριακών προσδιορισμών είναι η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία και η ευχέρεια λήψης πληροφοριών τόσο σε επίπεδο RNA όσο και DNA. Σε αντίθεση με τις απεικονιστικές μεθόδους, οι αναλύσεις μέσω μοριακών μεθόδων είναι αντικειμενικές, ποσοτικές και δεν υπόκεινται σε προσωπικές εκτιμήσεις. Επιπλέον, παρουσιάζουν σχετικά χαμηλό κόστος ανάλυσης, υψηλή απόδοση και μπορούν να ενταχθούν ευκολότερα σε συστήματα ελέγχου ποιότητας. Τα κύρια μειονεκτήματα των μοριακών ποσοτικών προσδιορισμών αφορούν στα προαναλυτικά στάδια σχετικά με τη σταθερότητα των CTCs, καθώς και του γενετικού υλικού επίσης κατά τη μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων. Τέλος, σημαντικό ζήτημα αποτελεί επίσης το γεγονός ότι οι λαμβανόμενες πληροφορίες λαμβάνονται σε επίπεδο συνολικού αριθμού μεταγράφων, χωρίς να υπάρχει διαχωρισμός για το αν προέρχονται από το ίδιο κύτταρο ή διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (1).

### **1.2.3.3. Ανίχνευση CTCs με βάση εκκρινόμενες πρωτεΐνες (EPISPOT μεθοδολογία)**

Η μεθοδολογία EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT) αναπτύχθηκε για την ανίχνευση ειδικών καρκινικών πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από βιώσιμα CTCs. Με την τεχνική αυτή, ανιχνεύονται πρωτεΐνες που εκκρίνονται/απελευθερώνονται/ αποβάλλονται από τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Έπειτα, τα κύτταρα καλλιεργούνται για μικρό χρονικό διάστημα σε ειδική μεμβράνη επικαλυμμένη με αντισώματα που συλλαμβάνουν τις εκκρινόμενες/ απελευθερωμένες/ αποβληθείσες πρωτεΐνες, οι οποίες ανιχνεύονται από δευτερογενή αντισώματα επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Το EPISPOT έχει εφαρμοστεί μέχρι σήμερα σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως μαστού, παχέος εντέρου, προστάτη κ.α. (89,90).



Σχήμα 1.5. Βασικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTC (A) κυτταρομετρικές τεχνικές: (α1) κλασσική ανοσοκυτταροχημική (α2) Σύστημα CellSearch (εγκεκριμένο από FDA) (α3) Σύστημα Ariol (α4) κυτταρομετρία ροής (α5) δοκιμασία EPISPOT (ανίχνευση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα) (B) Μοριακός χαρακτηρισμός με βάση την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων σε CTC: (β1) κλασσική-συμβατική RT-PCR (β2) multiplex RT – PCR-AdnaTest (β3) RT - qPCR (β4) τεχνολογία μικροσυστοιχιών (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. and Markou A.) (91)

### 1.3. Ανίχνευση μεθυλίωσης στα CTCs

Με την πάροδο των ετών, οι ερευνητικές προσπάθειες για τον καρκίνο επικεντρώθηκαν στη γενετική βάση της ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου, εντοπίζοντας μεταλλάξεις και χαρακτηρίζοντας μονοπάτια που ενεργοποιούν ογκογονίδια και απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει στραφεί και στις επιγενετικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την έναρξη και εξέλιξης της νόσου (92). Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στα CTCs παρέχει πληροφορίες για την μοριακή και βιολογική φύση αυτών των κυττάρων. Η επιγενετική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τη ρύθμιση του μεταστατικού δυναμικού του όγκου (93). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμβάλλουν, επίσης, στην κυτταρική πλαστικότητα

κατά την εξέλιξη του όγκου (94) και στον σχηματισμό καρκινικών βλαστοκυττάρων (CTSCs) (95).

Η ερευνητική μας ομάδα, ήταν η πρώτη διεθνώς που απέδειξε ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να λάβουν χώρα και στα CTCs (96) και ανέδειξε την κλινική σημασία της μελέτης του προφίλ μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών και κατασταλτικών της μετάστασης γονιδίων στα CTCs (96–100). Το 2011, οι Chimonidou et al, αξιολόγησαν το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *CST6*, *BRMS1* και *SOX17* σε δείγματα περιφερικού αίματος 56 ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού, 27 ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση και 23 υγιών αιμοδοτών (96). Τα ποσοστά μεθυλίωσης στα CTCs και των δύο διαφορετικών ομάδων ασθενών, διαφοροποιούνταν σημαντικά από εκείνα των υγιών αιμοδοτών, υποδεικνύοντας ότι η μελέτη των επιγενετικών αλλαγών δημιουργεί νέα προοπτική στον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs (96). Δύο χρόνια μετά, οι Chimonidou et al, σύγκριναν το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή του *SOX17* σε 114 αντιστοιχισμένα δείγματα CTCs και ctDNA από τον ίδιο ασθενή, όπου βρέθηκε μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανίχνευσης μεθυλίωσης μεταξύ CTCs και ctDNA σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (97). Την ίδια χρονιά, Chimonidou et al, διερεύνησαν το προφίλ μεθυλίωσης του *BRMS1* ταυτόχρονα με την έκφραση της πρωτεΐνης *BRMS1* μέσω του συστήματος αυτόματης ανίχνευσης με ανοσοφθορισμό *ARIOL*, υποδεικνύοντας την ετερογένεια των CTCs και την ανίχνευση μεθυλίωσης σε δείγματα με απουσία έκφρασης (98). Πολύ πρόσφατα, η ίδια ομάδα αξιολόγησε εάν το προφίλ μεθυλίωσης στα CTCs και στο ctDNA αντικατοπτρίζει το προφίλ μεθυλίωσης του πρωτοπαθούς όγκου (99). Για να το πετύχει αυτό, σύγκρινε το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *SOX17*, *CST6* και *BRMS1* σε πρωτοπαθείς όγκους και αντιστοιχισμένα δείγματα CTCs και ctDNA από 153 ασθενείς με καρκίνο μαστού, καθώς και υγιείς αιμοδοτές. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν να μεν την συσχέτιση της μεθυλίωσης του *SOX17* μεταξύ CTCs και ctDNA καθώς και με την έκφραση της *CK-19*, αλλά όχι τη συσχέτιση με το προφίλ μεθυλίωσης του πρωτοπαθούς όγκου. Επιπλέον, η μεθυλίωση του *SOX17* στα CTCs ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού βρέθηκε να σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση (99). Τέλος, στο εργαστήριό μας έχει αναπτυχθεί κι επικυρωθεί σε κλινικά δείγματα CTCs και ctDNA, μεθοδολογία πολλαπλής PCR ειδικής για μεθυλίωση (multiplex methylation-specific PCR) στο σύστημα Luminex (Luminex Corporation, US), για την ταυτόχρονη ανίχνευση μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *SOX17*, *CST6* και *BRMS1* (100).

Πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα των Pixberg et al, ανέπτυξαν πρωτόκολλο βασισμένο σε πολλαπλή PCR, για τη μελέτη μεθυλίωσης γονιδίων που σχετίζονται με το EMT, σε μονήρη

CTC (single-CTC). Πιο συγκεκριμένα, μελέτησαν της μεθυσίωση των υποκινητών των miR-200c/141, miR-200b/a/429 και CDH1 σε 159 single CTCs απομονωμένα με το CellSearch, από 11 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού και 6 ασθενείς με μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Τα αποτελέσματά τους επιβεβαίωσαν την ετερογένεια που επικρατεί μεταξύ των CTCs και υποδεικνύει την επιγενετική ρύθμιση των σχετιζόμενων με EMT γονιδίων κατά τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων (101).

#### 1.4. Εξωκυττάριο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA)

##### 1.4.1. Ιστορική αναδρομή/ορισμός

Αναφορά του **εξωκυτταρίου DNA (cell-free DNA, cfDNA)** έγινε για πρώτη φορά το 1948 από τους Mandel και Metais, οι οποίοι εντόπισαν νουκλεϊκά οξέα να κυκλοφορούν ελεύθερα στο ανθρώπινο πλάσμα. Δυστυχώς, το έργο τους δεν προσέλκυσε αρκετή προσοχή τη δεδομένη στιγμή, λόγω έλλειψης κατανόησης αυτής της καινοτόμου ιδέας (102). Τα τελευταία χρόνια η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του **εξωκυτταρίου καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)** αποτελεί μια αναδυόμενη μη επεμβατική προσέγγιση υγρής βιοψίας που συμβάλλει στην αξιολόγηση, την πρόγνωση, τη διάγνωση και την ανταπόκριση στην θεραπεία ασθενών με καρκίνο.

Γενικά, η ποσότητα του ctDNA αυξάνεται ανάλογα με το καρκινικό φορτίο και κυμαίνεται από το 1% του ολικού cfDNA στην πρόιμη νόσο, έως το 40% στη νόσο τέταρτου σταδίου (103). Έτσι, είναι ικανό να προβλέψει έγκαιρα μια πιθανή υποτροπή [48, 49]. Το ctDNA είναι ένας πολύτιμος βιοδείκτης, ο οποίος χρησιμοποιείται ήδη για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία ή για την έγκαιρη ανίχνευση της υποτροπής (104). Επιπλέον, η ανάλυση του ctDNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο, μπορεί να καθορίσει την επιλογή κατάλληλης θεραπείας (π.χ. μεταλλάξεις EGFR) (105). Τέλος, με την εγκεκριμένη από το FDA δοκιμασία ανίχνευσης των μεταλλάξεων του EGFR (Cobas, Roche Diagnostic, USA), η ανάλυση του ctDNA έλαβε το ορόσημο της συνοδού διαγνωστικής εξέτασης (Companion diagnostic, CDx). Συγκεκριμένα, η παραπάνω δοκιμασία χρησιμοποιείται ως CDx για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα με Erlotinib (106).

Ως εκ τούτου το ctDNA αποτελεί μια πρόσθετη συμπληρωματική με τα CTC πηγή πληροφοριών που συμβάλλει στην συνεχή παρακολούθηση των ασθενών με μη επεμβατικό τρόπο. Η ταχεία πρόοδος στην τεχνολογία και η ανάπτυξη ιδιαίτερα ευαίσθητων τεχνικών ανάλυσης του ctDNA

είναι απαραίτητα για τη βελτιωμένη και ακριβέστερη παρακολούθηση ασθενών μέσω της υγρής βιοψίας (1).

#### 1.4.2. Βιολογική προέλευση του ctDNA

Σχεδόν σε κάθε αναφορά για το cfDNA στη βιβλιογραφία, ως κύρια πηγή προέλευσής του ορίζεται η απόπτωση ή και η νέκρωση κυττάρων. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης, είναι η σταδιακή αποικοδόμηση του DNA κατά την οποία αρχικά το χρωμοσωμικό DNA διασπάται σε μεγάλα θραύσματα των 50-300kbp και ακολούθως σε μικρότερα τμήματα, πολλαπλάσια των νουκλεοσωμικών μονάδων της τάξης των 180-200bp. Η διακύμανση του μεγέθους των θραυσμάτων DNA έχει αποδειχθεί με εφαρμογές ηλεκτροφορητικών τεχνικών του cfDNA και συχνά αποτελεί ένδειξη της προέλευσής του στον ορό ή το πλάσμα από τον μηχανισμό του φυσιολογικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Επιπρόσθετα, αυτό το χαρακτηριστικό μοτίβο θραυσμάτων DNA μπορεί να παρατηρηθεί μετά από φαγοκυττάρωση αποπίπτοντος κυττάρου. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσλαμβάνονται ταχέως από φαγοκύτταρα ή άλλα γειτονικά κύτταρα, μέσω μηχανισμών που δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, και εν συνεχεία μέσω της DNAσης II των λυσοσωμάτων, το DNA υπόκειται σε πέψη και θραυσματοποιείται. Με βάση την θεωρία αυτή, τα θραύσματα DNA που απελευθερώνονται κατά την απόπτωση, απομακρύνονται πριν την εμφάνισή τους στην κυκλοφορία, με την συμβολή των φαγοκυττάρων. Σε περίπτωση βλάβης του μηχανισμού της φαγοκυττάρωσης ή αυξημένου κυτταρικού θανάτου με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του κυκλοφορούντος DNA, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης φλεγμονώδους αντίδρασης και αυτοανοσίας (107).

Το ctDNA ανευρίσκεται σε μια ποικιλία βιολογικών δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένου του αίματος, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), των πτυέλων, των κοπράνων και των ούρων μεταξύ άλλων. Εμφανίζεται υπό την μορφή διαφόρων δομών στο αίμα, όπως ελεύθερο DNA, υπό μορφή νουκλεοσωμάτων (δεσμευμένο και προστατευμένο με πρωτεΐνες) ή μέσα σε εξωσώματα και τέλος δεσμευμένο σε μικροκυτίδια (όπως τα ιϊκά καψίδια). Σε συμπαγείς όγκους, το ctDNA μπορεί να προέρχεται από νέκρωση, αυτοφαγία, απόπτωση και άλλους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από το στρες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την χημειοθεραπεία. Δεδομένου ότι κατά την εξέλιξη της νόσου, το καρκινικό «φορτίο» αυξάνεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού θανάτου και της συγκέντρωσης του ctDNA. Εντούτοις, η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία, και άλλες αντικαρκινικές θεραπείες προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης με αποτέλεσμα την ανεύρεση λιγότερης ποσότητας ctDNA σε ασθενείς με καρκίνο

μετά από την θεραπεία. Πιθανή εξήγηση της παρατήρησης αυτής είναι η ανασταλτική επίδραση της θεραπείας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, σε πρώιμο καρκινικό στάδιο, παρά το γεγονός ότι η συχνότητα κυτταρικού θανάτου είναι μικρή, τα επίπεδα συγκέντρωσης του ctDNA είναι σημαντικά αυξημένα εν συγκρίσει με την συγκέντρωση του σε ένα φυσιολογικό αιμοδότη (108).

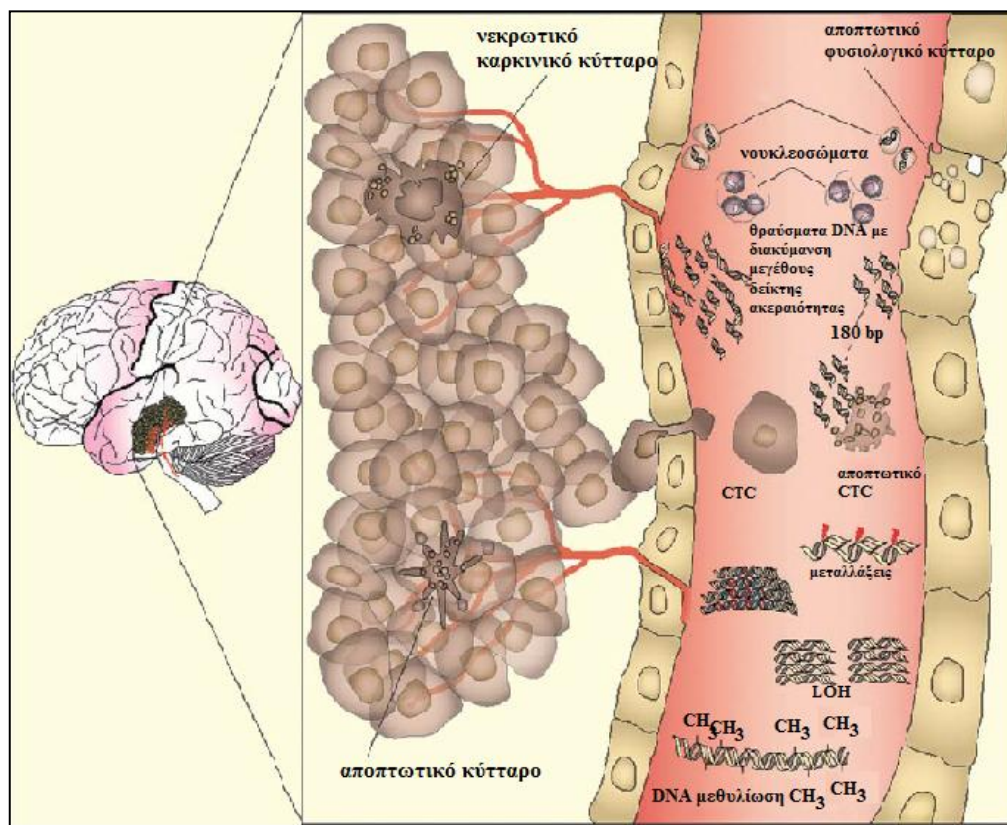
Σε αντίθεση με τον μηχανισμό της απόπτωσης, η νέκρωση θεωρείται μια παθολογική διεργασία, κατά την οποία παράγονται μεγαλύτερα θραύσματα DNA λόγω ελλιπούς και τυχαίας πέψης του γενωμικού DNA. Το μήκος και η ακεραιότητα του cfDNA αποτελεί ενδεικτικό χαρακτηριστικό διάκρισης μεταξύ των νεκρών κυττάρων αποπτωτικής και νεκρωτικής προέλευσης. Επιπλέον από τις δύο αναφερθείσες θεωρίες προέλευσης του cfDNA από κυτταρικό θάνατο υπάρχει και τρίτος προτεινόμενος μηχανισμός ενεργούς αποβολής ελεύθερου κυττάρου DNA από εν ζωή κύτταρα. Σε *in vitro* πειράματα κατά τα οποία καλλιεργήθηκαν λεμφοκύτταρα έχει δειχθεί ότι, ανεξάρτητα της απόπτωσης των κυττάρων, ζωντανά κύτταρα απελευθερώνουν νεοσυντιθέμενες DNA αλληλουχίες ως μέρος του μηχανισμού ομοιόστασης του συστήματος. Ανεξάρτητες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η διέγερση των λεμφοκυττάρων, οδηγεί στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων DNA απουσία των διαδικασιών κυτταρικού θανάτου (108).

Τέλος, στο αίμα υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο, έχει ανιχνευθεί **εξοκυττάριο DNA απελευθερωμένο από μιτοχόνδρια (mitochondrial-derived cfDNA, cf-mtDNA)** (102). Το μιτοχονδριακό DNA απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και του μηχανισμού αυτοφαγίας των μιτοχονδρίων (102). Οι ακριβείς δομές του cf-mtDNA δεν είναι απολύτως γνωστές, φαίνεται όμως να βρίσκεται είτε δεσμευμένο σε εσωτερικά και εξωτερικά θραύσματα μιτοχονδριακής μεμβράνης είτε ως άθικτο mtDNA (109). Το cf-mtDNA φαίνεται να είναι μία σημαντική πηγή του cfDNA και η μεγάλη ποσότητά του στο αίμα (πολλές δεκάδες χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο), καθιστά πιο εύκολη την ανίχνευση και ανάλυσή του (110).

Ο μηχανισμός της απομάκρυνσης και κάθαρσης του DNA από το πλάσμα παραμένει άγνωστος παρά το γεγονός ότι το cfDNA αποτελεί πεδίο έρευνας για περισσότερα από 30 χρόνια. Η αύξηση του επιπέδου συγκέντρωσης του ctDNA στο αίμα των ασθενών μπορεί να αντανακλά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της ενεργού απελευθέρωσης από εν ζωή κύτταρα και του κυτταρικού θανάτου. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του ctDNA σε υγιή άτομα αποτελούν ένδειξη χαμηλότερου ρυθμού αποβολής του DNA από τα κύτταρα ή την ταχεία απομάκρυνση του DNA κατά τον μηχανισμό της κάθαρσης. Αύξηση του ctDNA στον ορό ή στο πλάσμα μπορεί να παρατηρηθεί κάτω από διάφορες συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες αυτές δεν



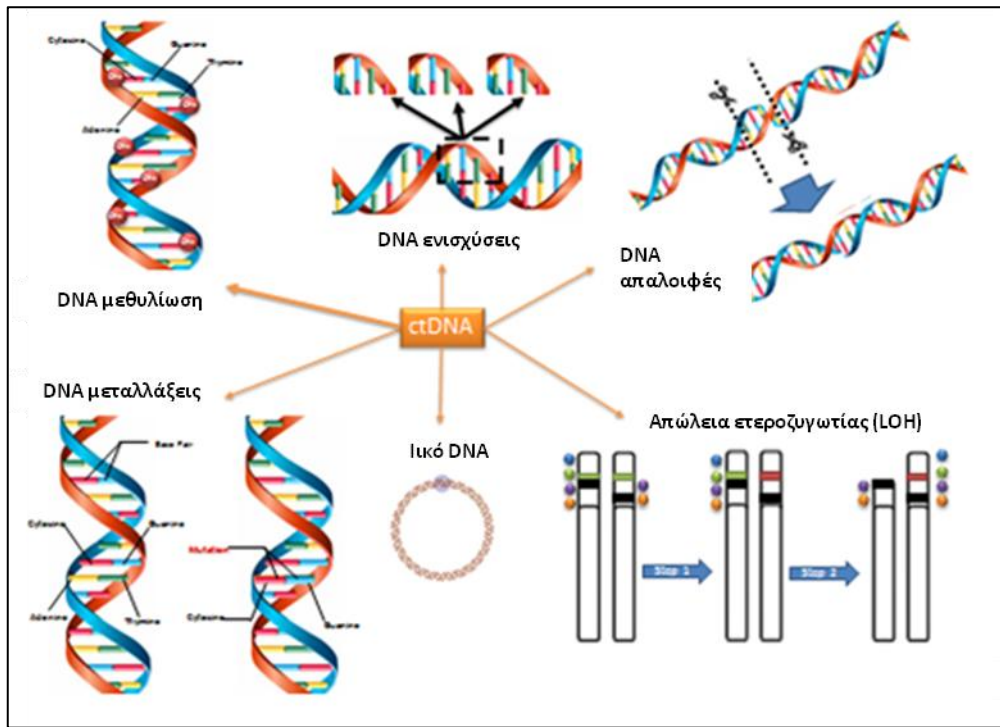
συνδέονται μεταξύ τους, γίνεται μια προσπάθεια συσχέτισης τους με σκοπό να διαπιστωθεί ένας πιθανός κοινός μηχανισμός της αύξησης του ctDNA. Ενόψει του πρωταγωνιστικού ρόλου που διαδραματίζει τα τελευταία χρόνια το ctDNA, η απάντηση των ερωτημάτων αυτών μπορεί να συνδράμει στην εξήγηση του ρόλου του τόσο στην έναρξη της νεοπλασματικής νόσου όσο στην μετάσταση (Σχήμα 1.6) (110).



Σχήμα 1.6. Η προέλευση του ctDNA και οι οι σχετιζόμενες με τον όγκο αλλοιώσεις του που ανιχνεύονται με μοριακή ανάλυση (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Marzese DM et al.) (107)

### 1.4.3. Ανάλυση του ctDNA

Το ctDNA αποτελεί μια μοναδική πηγή πληροφοριών γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που εμφανίζονται σε ένα υποπληθυσμό καρκινικών κυττάρων. Η ανάλυση του περιλαμβάνει την μελέτη της ακεραιότητας του DNA, την ανίχνευση μεταλλάξεων, τις **μεταβολές σε επίπεδα αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNVs)**, την ενίσχυση γονιδίων, τη **μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI)**, την **απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH)** και την μελέτη του επιγενετικού προφίλ σημαντικών για τον κυτταρικό κύκλο γονιδίων (105,111,112) (Σχήμα 1.7). Στα παρακάτω υποκεφάλαια θα γίνει αναφορά στη μελέτη μεταλλάξεων και μεθυλίωσης στο ctDNA, από τις οποίες έχει αποκομιστεί σημαντικό κλινικό όφελος.



Σχήμα 1.7. Διαφορετικές μορφές του ctDNA που αποτελούν στόχοι στην ποιοτική ανάλυσή του (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. And Hoon D.) (1)

#### 1.4.3.1. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο ctDNA

Η ανίχνευση ογκοειδικών μεταλλάξεων αποτελεί τον πιο συχνό τύπο μελετών σε επίπεδο ctDNA της ασθενείς με καρκίνο. Πέρα από της μεθόδους αναφοράς για την ανάλυση μεταλλάξεων, όπως η qPCR και η μαζική παράλληλη αλληλούχιση (MPS), νέες υψηλής ευαισθησίας τεχνολογίες αποτελούν οι droplet-digital PCR και το BEAMing (111). Η **αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS)** έχει ήδη αποδείξει την αξία της για την ανάλυση του ctDNA στην υγρή βιοψία (συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης των mRNA και miRNA) (113). Πρόσφατα, η εταιρεία Guardant Health (US) κατάφερε να εκτελέσει παράλληλη ψηφιακή αλληλούχιση σε ιστούς παραφίνης και αντίστοιχο πλάσμα διαφορετικών ασθενών με καρκίνο για μία ομάδα 70 γονιδίων με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία (114).

Αρκετές από της μεταλλάξεις γονιδίων στο ctDNA έχουν δείξει εξαιρετική συσχέτιση με ανταπόκριση σε στοχευμένες θεραπείες. Στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα οι απαλοιφές στο εξόνιο 19 και η υποκατάσταση της αργινίνης με λευκίνη στο εξόνιο 21 του γονιδίου *EGFR*, λαμβάνει χώρα στο 17% των ασθενών με NSCLC (115–118). Οι παραπάνω γενετικές αλλαγές, προκαλούν την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης (*EGFR*) κι έτσι το 78% των ασθενών

ανταποκρίνονται σε αναστολείς του *EGFR* (TKI), όπως είναι το gefitinib και το erlotinib. Επιπλέον, η παρουσία της μετάλλαξης *EGFR* L858R στο ctDNA ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα υπό erlotinib, έχει συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένο διάστημα επιβίωσης, ενώ οι απαλοιφές στο εξόνιο 19, με αυξημένο διάστημα ολικής επιβίωσης (119). Για αυτούς τους ασθενείς, η ανίχνευση της μετάλλαξης T790M στο ctDNA, αποτελεί δείκτη αντίστασης στην anti-EGFR θεραπεία (120). Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η διαδοχική αιμοληψία ασθενών με καρκίνο μπορεί να ορίσει το είδος και της αποτελεσματικότητας της λαμβανόμενης θεραπείας, κατά την εξέλιξη της νόσου.

#### 1.4.3.2. Ανίχνευση μεθυλίωσης στο ctDNA

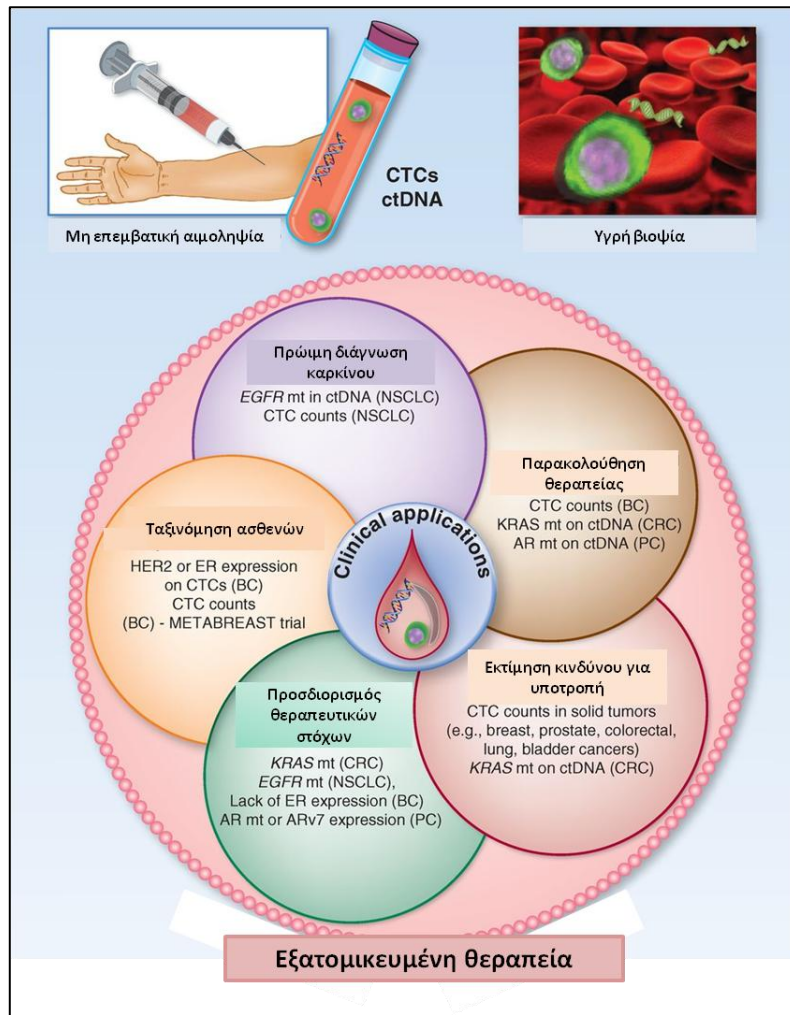
Η ανίχνευση μεθυλιωμένων γονιδίων στο ctDNA ασθενών με καρκίνο, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την πρόωμη ανίχνευση της νόσου, αλλά και για την παρακολούθηση της θεραπείας. Γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο όπως τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα ογκογονίδια, παρουσιάζουν μεταβολές στο προφίλ μεθυλίωσής τους, γεγονός που ρυθμίζει την έκφρασή τους. Οι τεχνικές ανίχνευσης της μεθυλίωσης ποικίλουν και περιλαμβάνουν την ειδική για μεθυλίωση PCR (Methylation-specific PCR, MSP), το MassArray, το PyroSequencing και τα methyl arrays κ.α. (1). Κάθε τεχνική από τις παραπάνω παρουσιάζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, που θα συζητηθούν περαιτέρω στο επόμενο κεφάλαιο. Πολύ πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα πιθανοτικό μοντέλο που μπορεί με πολύ υψηλή ευαισθησία να ανιχνεύει μεθυλίωση του ctDNA, χρησιμοποιώντας δεδομένα από sequencing. Το λεγόμενο CancerDetector, εφαρμόστηκε σε δείγματα πλάσματος και με μεγάλη ειδικότητα κατάφερε να συσχετίσει τα αποτελέσματα για τη μεθυλίωση του DNA, με το μέγεθος του όγκου και την κλινική εξέλιξη των ασθενών, καθιστώντας το ένα μειωμένου κόστους διαγνωστικό εργαλείο (121).

Οι βιοδείκτες μεθυλίωσης στο ctDNA ποικίλουν και είναι παρόντες σε παραπάνω από έναν τύπο καρκίνου, γεγονός που τους καθιστά μη-ειδικούς. Η επιλογή του κατάλληλου βιοδείκτη πραγματοποιείται με βάση τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχει και την συμβολή του στην μετεξέλιξη ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, δηλαδή, ογκογονίδια (*TMEFF2*, *HPP1* και *PGR*), ογκοκατασταλτικά γονίδια (*TIG1*, *APC*, *RASSF1A*, *SOX17* και *DAPK*), γονίδια που συνδέονται με τον κυτταρικό κύκλο (*p16INK4*, *14-3-3δ*, *GSTP1*, *p15*, *p16*, *RAR-β* και *SEPT9*), μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (*CDH1* και *CDH13*), γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*ESR1*, *myoD* και *PTGS2*), γονίδια που έχουν σχετιστεί με την διήθηση του όγκου (*Timpr3*, *E-cadherin*) και την μετάσταση (*CST6* (122)), και άλλα (*hMLH1*, *NGFR*, *AR*, *MGMT*, *HLTF* και *TPEE*) (123).

Αρκετά πρόσφατα, η μεθυλίωση της *σεπτίνης 9* (*SEPT9*) στο ctDNA απέδειξε το ρόλο της ως διαγνωστικό βιοδείκτη σε ασυμπτωματικά, ενδιάμεσου κινδύνου άτομα για την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου (124). Μάλιστα, η Epigenomics AG (Berlin, Germany), προχώρησε στην παραγωγή εμπορικά διαθέσιμου κιτ, το οποίο αποτέλεσε το πρώτο τεστ για ανίχνευση μεθυλίωσης στην υγρή βιοψία που έλαβε έγκριση από τον FDA το 2016 .

### **1.5. Συνδυαστική μελέτη CTCs και ctDNA στην υγρή βιοψία**

Ο συνδυασμός CTCs και ctDNA στην προσέγγιση της υγρής βιοψίας, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ακριβή εκτίμηση της κατάστασης των ασθενών με καρκίνο. Μελέτες έχουν δείξει ότι και τα δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν από κοινού για την καλύτερη εκτίμηση της κατάστασης των ασθενών (1). Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το καθένα είναι διαφορετικής φύσης, όμως το καθένα δρα συμπληρωματικά με το άλλο για την πρόιμη διάγνωση του καρκίνου, την παρακολούθηση της θεραπείας σε πραγματικό χρόνο, την εκτίμηση του κινδύνου για υποτροπή και μετάσταση, τον προσδιορισμό θεραπευτικών στόχων και μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία και, τέλος, την ταξινόμηση των ασθενών με ίδιο τύπου καρκίνου (125). Οι πιθανές κλινικές εφαρμογές που μπορούν να προκύψουν από την συνδυαστική ανάλυση των CTCs και του ctDNA, συνοψίζονται στο σχήμα 1.8.



Σχήμα 1.8. Κλινικές εφαρμογές της συνδυαστικής μελέτης CTCs και ctDNA στην υγρή βιοψία (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Alix-Panabieres et al.) (125)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

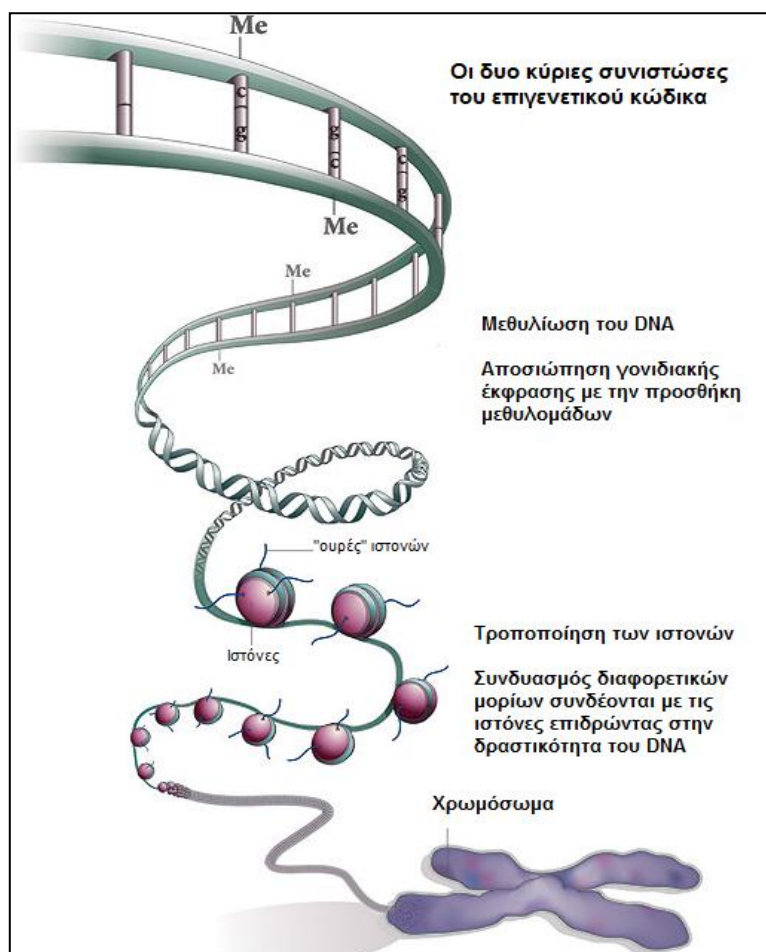
#### 2.1. Ιστορική αναδρομή/ορισμός

Με τον όρο επιγενετική χαρακτηρίζεται το σύνολο των αναστρέψιμων αλλαγών στο DNA, που μεταβάλλουν την γονιδιακή έκφραση χωρίς καμία αλλαγή στην πρωτοταγή αλληλουχία βάσεων του γενετικού υλικού. Διαφέρει ως εκ τούτου από την γενετική στο σημείο ότι επικεντρώνεται στις αλλαγές που μπορεί να υποστεί το γενετικό υλικό κατά τη διάρκεια της ζωής αποκαλύπτοντας έτσι την ύπαρξη ενός κώδικα που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων μας. Ωστόσο παρά τη διαφοροποίηση αυτή, τα τελευταία χρόνια καθίσταται σαφές ότι μεταξύ των δύο πεδίων υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη, καθώς οι αναπτυξιακές διαδικασίες ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις επιγενετικές οι οποίες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών κυττάρων (126).

Η επιγενετική ρύθμιση συμβάλει στην χημική σηματοδότηση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα στο μυϊκό κύτταρο, το γονίδιο που κωδικοποιεί την μυοσίνη, σημαντικό συστατικό του εν λόγω κυττάρου και του μυϊκού ιστού, τροποποιείται για να είναι συνεχώς ενεργό. Ομοίως στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, τα γονίδια Oct4 και Nanog, που είναι απαραίτητα για την ταυτότητα των βλαστικών κυττάρων, έχουν ένα συγκεκριμένο τύπο επιγενετικής υπογραφής. Η αρχική ιδέα της επιγενετικής εκφράστηκε από τον Conrad Waddington ο οποίος αναφέρεται στην αιτιολογική ανάλυση των βιολογικών μεταβάσεων που οδηγούν από το ζυγωτό στο έμβρυο και τέλος στον ενήλικα. Σύμφωνα με την θεωρία του Waddington το κύτταρο διανύει ένα «ταξίδι» διαφοροποίησης η κατάληξη του οποίου εξαρτάται από τις επιμέρους διαδρομές που θα καθορίσουν την μη αναστρέψιμη οριστική του μορφή (126).

Οι κύριοι μηχανισμοί ρύθμισης του επιγενετικού κώδικα είναι η μεθυλίωση του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και η τροποποίηση της έκφρασης των micro-RNAs (Σχήμα 2.1). Διαταραχή στην ισορροπία των επιγενετικών μηχανισμών μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη δομή της χρωματίνης και στη μεταγραφική δραστηριότητα. Οι επιγενετικές μεταβολές μπορούν να γεφυρώσουν με τον καλύτερο τρόπο την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και το γενετικό υπόστρωμα στη διαδικασία της καρκινογένεσης (126).

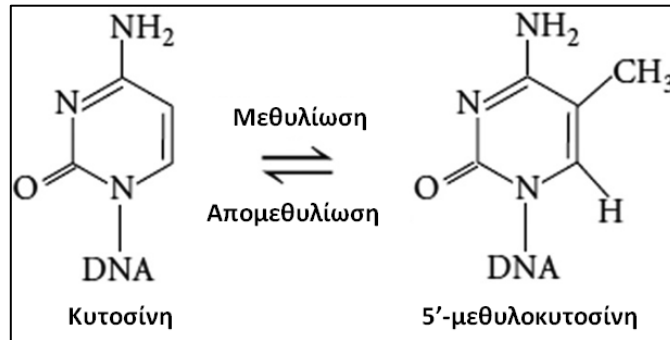




Σχήμα 2.1. Τα δυο κύρια χαρακτηριστικά του επιγενετικού κώδικα: η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα του Qiu J.) (127)

Η μεθυλίωση του DNA, αποτελεί την πιο καλά μελετημένη επιγενετική τροποποίηση και αποτελεί την ομοιοπολική τροποποίηση του DNA, κατά την οποία μια μεθυλομάδα μεταφέρεται από το δότη S-αδενοσυλομεθειονίνη (S-adenosyl- methionine, SAM) στη θέση της κυτοσίνης από μια οικογένεια ενζύμων, τις DNA-μεθυλοτρανσφεράσες (DNA-methyltransferases, DNMTs). Ο μηχανισμός της αντίδρασης μεθυλίωσης περιλαμβάνει την ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων (-CH<sub>3</sub>) στο 5'-άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5mC), που από πολλούς έχει χαρακτηριστεί ως η «5<sup>η</sup> βάση» του DNA (Σχήμα 2.2). Ως μόριο στόχος της μεθυλίωσης στο DNA των θηλαστικών, αποτελεί η βάση της κυτοσίνης (C) στα CpG δινουκλεοτίδια. Είναι γνωστό ότι η συχνότητα των CpG δινουκλεοτιδίων είναι πολύ μικρότερη (4-5 φορές) από την αναμενόμενη, με βάση τη συχνότητα των βάσεων κυτοσίνης (C) και γουανίνης (G) στο DNA. Από τα υπάρχοντα CpG δινουκλεοτίδια περίπου το 60-90% είναι μεθυλιωμένα και αυτή η υψηλή συχνότητα παρέχει μια πιθανή αιτιολόγηση της ελαττωμένης συχνότητας CpG: οι κυτοσίνες του DNA υπόκεινται σε αυτόματη υδρολυτική απαμίνωση προς ουρακίλη (U), μια

βάση που αναγνωρίζεται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, απομακρύνεται και αντικαθίσταται (128).



**Σχήμα 2.2.** Ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων (-CH<sub>3</sub>) στο 5'-άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης και ο επακόλουθος σχηματισμός της 5'-μεθυλοκυτοσίνης (5mC) ([https://geneticsignatures.com/methylation\\_research/](https://geneticsignatures.com/methylation_research/))

Αντίθετα, όταν η 5'-μεθυλοκυτοσίνη υφίσταται την ίδια απαμίνωση, η βάση που προκύπτει δεν είναι ουρακίλη αλλά θυμίνη (T), μια βάση που είναι μέρος της φυσιολογικής δομής του DNA και διαφεύγει από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Έτσι η χαμηλή συχνότητα των CpG δινουκλεοτιδίων πιθανώς αντανακλά τη σταδιακή τους απώλεια μέσω αυτής της διαδικασίας C→T χημικής μετάπτωσης (transition), που αποτελεί το συχνότερο πολυμορφισμό στον ανθρώπινο πληθυσμό και από τις συχνότερες μεταλλάξεις στον καρκίνο. Τα περισσότερα από τα CpG δινουκλεοτίδια που έχουν διατηρηθεί είναι διασκορπισμένα στο γονιδίωμα, κάποια όμως βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές που ονομάζονται «CpG νησίδες» (CpG islands). Πρόκειται για περιοχές του γονιδιώματος μήκους 500-2000 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) και αντιστοιχούν στις περιοχές των υποκινητών των περισσότερων εκ των μισών γονιδίων (η πλειοψηφία των CpG νησίδων σχετίζεται με γονίδια που αφορούν στη διατήρηση της κυτταρικής οργάνωσης, house-keeping genes). Στις περιοχές αυτές η συχνότητα CpG είναι παρόμοια με την αναμενόμενη με βάση τη συχνότητα των C+G βάσεων και ο λόγος CpG/GpC είναι περίπου 60%. Αυτό σημαίνει ότι στις περιοχές αυτές τα CpG δεν υπέστησαν την απώλεια που συνέβη στο υπόλοιπο γονιδίωμα, κάτι που οφείλεται στο γεγονός ότι τα CpG δινουκλεοτίδια στις περιοχές αυτές δεν είναι μεθυλιωμένα, σε αντίθεση με εκείνα που βρίσκονται διασκορπισμένα στο γονιδίωμα. Σύμφωνα με νέα δεδομένα, παρατηρείται αυξημένη μεθυλίωση σε κυτοσίνες που δεν βρίσκονται σε CpG νησίδες σε μη διαφοροποιημένα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα, φαινόμενο που μπορεί να εμπλέκεται στην διατήρηση του «πολυδύναμου» χαρακτήρα των κυττάρων αυτών (128).

## 2.2. Φυσιολογικός ρόλος της μεθυλίωσης



Η μεθυλίωση, φυσιολογικά, ελέγχει την δραστηριότητα του γονιδίου και την αρχιτεκτονική του πυρήνα των κυττάρων. Στα ανθρώπινα κύτταρα η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων είναι απενεργοποιημένα, καθώς τα περισσότερα γονίδια είναι απαραίτητα σε ορισμένα μόνο κύτταρα και εκφράζονται μόνο σε αυτά. Η μεθυλίωση διατηρεί το μεγάλο τμήμα του μη κωδικοποιούμενου DNA σε αδρανή μεταγραφικά κατάσταση.

Ο κυτταρικός τύπος και το ιστοειδικό προφίλ μεθυλίωσης καθορίζονται από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Στο μηχανισμό της *de novo* μεθυλίωσης συμμετέχουν οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3a και 3b. Ενώ το γονιδίωμα του σπερματοζωαρίου είναι ιδιαίτερα μεθυλιωμένο, το ωάριο είναι μη-μεθυλιωμένο. Μετά την γονιμοποίηση, τα γονίδια απομεθυλιώνονται και μεθυλιώνονται *de novo* πριν την εμφύτευση. Καθώς διαφοροποιούνται τα κύτταρα της εμβρυοβλάστης, τα ιστοειδικά γονίδια απομεθυλιώνονται αναλόγως του προφίλ μεθυλίωσης του ιστού, ενώ τα γονίδια βασικών λειτουργιών (house keeping genes) παραμένουν μη-μεθυλιωμένα από την γονιμοποίηση μέχρι και το τέλος της διαδικασίας σχηματισμού των ζωτικών οργάνων (129). Ο φυσιολογικός ρόλος της μεθυλίωσης σχετίζεται με πολλαπλές λειτουργίες οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

**α) η διατήρηση της μεγάλης ποσότητας του μη κωδικού DNA σε μεταγραφικά αδρανή κατάσταση:** Αυτό το υψηλού μοριακού βάρους μεθυλιωμένο DNA πολλαπλασιάζεται αργότερα από το μη μεθυλιωμένο και η όψιμη αντιγραφή του συνδέεται με το σχηματισμό αδρανοποιημένης χρωματίνης, που με τη σειρά της διευκολύνει τη μεταγραφική σίγαση των μη κωδικοποιήσιμων περιοχών. Με τον τρόπο αυτό προλαμβάνεται η μεταγραφή τμημάτων του γονιδιώματος που περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, εισερχόμενες ιϊκές αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία που θα έβλαπταν τα κύτταρα, μέσω φαινομένων ανασυνδυασμού και μεταγραφικής απορρύθμισης των παρακείμενων γονιδίων **β) η γονιδιακή καταστολή:** η μεθυλίωση σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές έχει συνδεθεί με τη μεταγραφική καταστολή. Στα φυσιολογικά κύτταρα τα εντυπωμένα γονίδια του αδρανοποιημένου X χρωμοσώματος είναι τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταγραφικής καταστολής (129).

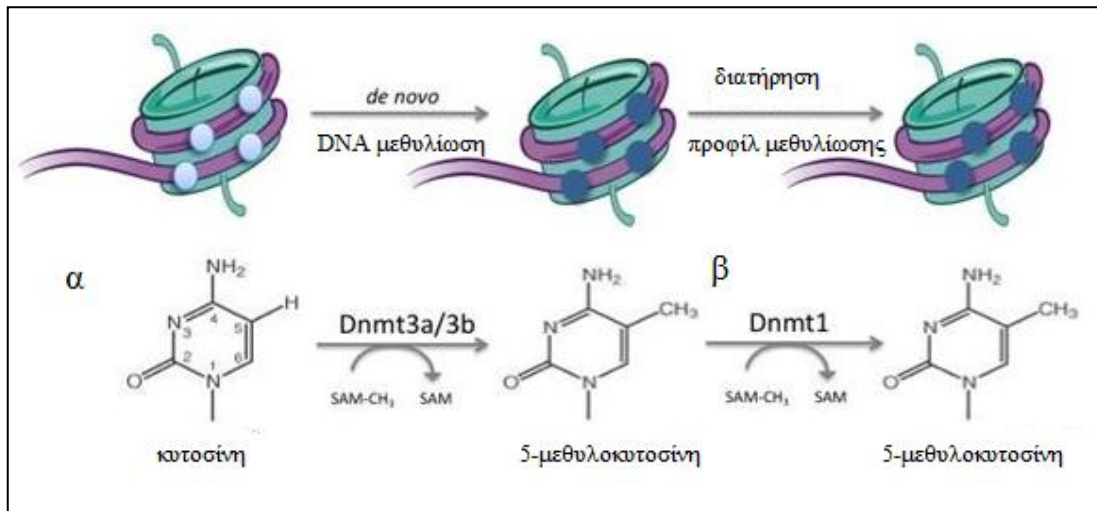
### 2.3. Μεθυλίωση DNA και γονιδιακή ρύθμιση

Στη δημιουργία και διατήρηση του προτύπου της μεθυλίωσης συμβάλλουν ειδικά ένζυμα, οι **DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA Methyltransferases, DNMTs)**. Από την οικογένεια των DNMT έχουν ταυτοποιηθεί τρία μέλη (Σχήμα 2.3). Μετά από ανάλυση αλληλούχισης των μορίων αυτών βρέθηκε ότι πρόκειται για ιδιαίτερα διατηρημένη αλληλουχία μεταξύ των

σπονδυλωτών, γεγονός που επισημαίνει τον σημαντικό ρόλο των μορίων αυτών στην ανάπτυξη (130).

Η DNMT1 είναι το πιο γνωστό και πιο πολύ μελετημένο μέλος της οικογένειας των ενζύμων αυτών. Πρόκειται για ένζυμο με δραστικότητα μεθύλασης, το οποίο ειδικεύεται στην διατήρηση της μεθυλίωσης, δηλαδή δρα μετά τον πολλαπλασιασμό του DNA και είναι υπεύθυνο για την επαναφορά στο νεοσυντιθέμενο κλώνο των ημι-μεθυλιωμένων περιοχών σε πλήρως μεθυλιωμένες. Η ανθρώπινη DNMT1 εντοπίζεται στο 19p13.2 χρωμόσωμα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 200 kDa, της οποίας η καταλυτική περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου. Έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στην διχάλα της αντιγραφής του DNA και να μεθυλιώνει το γενωμικό DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και της παραγωγής νέου κλώνου. Η μεθυλομάδα μεταφέρεται από την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) στην κυτοσίνη που βρίσκεται στο μη-μεθυλιωμένο κλώνο. Πειράματα έχουν δείξει ότι η έκφρασή της αυξάνεται κατά την διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, στην οποία η συγκέντρωση είναι μέγιστη (131).

Οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και DNMT3B θεωρούνται *de novo* μεθυλάσες που μετά το στάδιο της εμφύτευσης εγκαθιστούν τα νέα πρότυπα μεθυλίωσης, καθώς κατά την πρόιμη εμβρυογένεση έχει προηγηθεί εκτεταμένη απομεθυλίωση του γονιδιώματος (132). Λειτουργούν βάσει της ιστοειδικότητας και καθορίζουν τα πρότυπα της μεθυλίωσης κυττάρων και ιστών. Ο ρόλος τους στην *de novo* μεθυλίωση δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά σύμφωνα με προτεινόμενο μηχανισμό συνδέονται με την περικεντρική ετεροχρωματίνη και διατηρούν την μεθυλίωσή της. Η DNMT3a θεωρείται το ένζυμο που συμμετέχει στην μεθυλίωση των κυτοσινών όταν αυτή δεν λαμβάνει χώρα σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες CpGs. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μεθυλίωση σε θέσεις εκτός CpGs είναι συνηθέστερη στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα σε σχέση με τα σωματικά, με την DNMT3a να παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στα βλαστικά κύτταρα. Η DNMT3b έχει βρεθεί μεταλλαγμένη στην πλειονότητα των περιπτώσεων του συνδρόμου **ICF (Immunodeficiency, Chromosomal and Facial anomalies)**, μιας σπάνιας αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου, στην οποία η απώλεια της λειτουργίας της DNMT3B οδηγεί σε υπομεθυλίωση και αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στις περικεντρομερικές περιοχές της ετεροχρωματίνης (131).

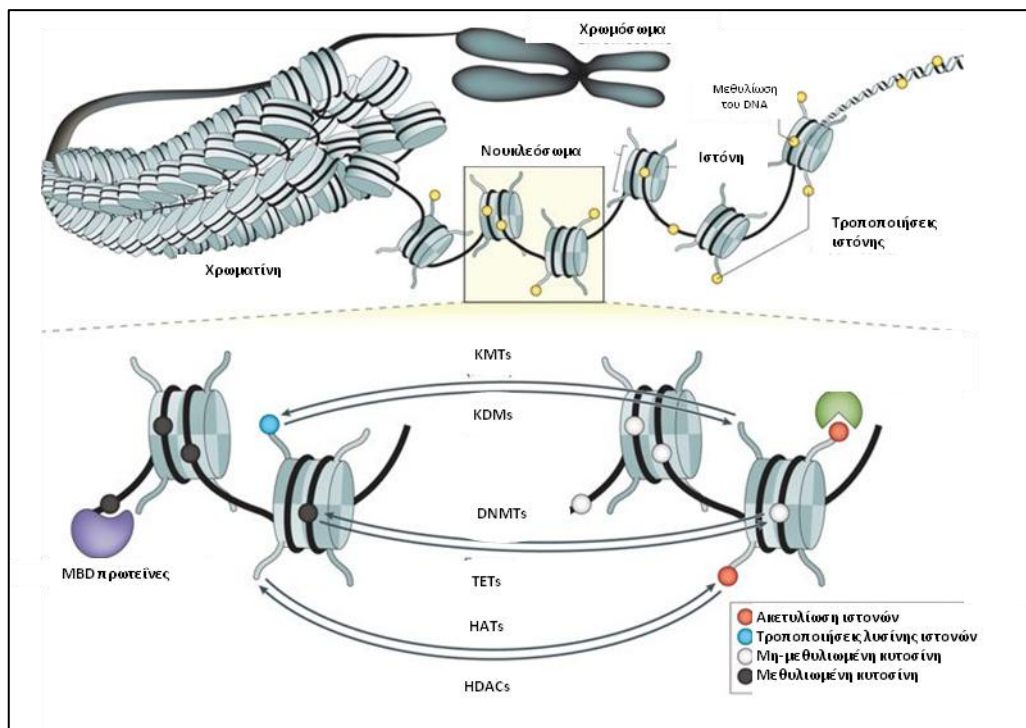


Σχήμα 2.3. Ρόλος των DNMTs στη διατήρηση της μεθυλίωσης: α) Η de novo μεθυλίωση του μη μεθυλιωμένου DNA με συμμετοχή των DNMT3A και DNMT3B και β) διατήρηση της μεθυλίωσης στα ημιμεθυλιωμένα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA (<http://www.scrb.harvard.edu/lab/550/research>)

Η ρύθμιση της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων είναι μια σύνθετη διαδικασία. Αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου οδηγούν σε μειωμένη έκφραση, ενώ μεθυλίωση στην μεταγραφόμενη περιοχή έχει ένα μεταβλητό αποτέλεσμα στην έκφραση του γονιδίου. Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί για τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται μεταγραφική καταστολή από την μεθυλίωση του DNA (Σχήμα 2.4). Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει έμμεση παρεμβολή με την αναστολή της πρόσδεσης ειδικών μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις αναγνώρισής τους στους αντίστοιχους φορείς τους. Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο AP-2, c-Myc/Myn, E2F και NFκB, αναγνωρίζουν αλληλουχίες που περιέχουν CpG κατάλοιπα και έχει δειχθεί ότι η πρόσδεσή τους αναστέλλεται με την μεθυλίωση (133).

Ο δεύτερος τρόπος καταστολής περιλαμβάνει την άμεση δέσμευση ειδικών μεταγραφικών καταστολέων σε μεθυλιωμένες αλληλουχίες DNA. Τα δύο πρώτα σύμπλοκα που ταυτοποιήθηκε ότι δεσμεύονται σε μεθυλιωμένο DNA ήταν οι πρωτεΐνες MeCP1 και MeCP2. Ωστόσο, αρκετές νέες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί πλέον, συμπεριλαμβανομένων των MBD1, MBD4 και Kaiso. Οι MeCP1, MBD1 και MBD4 προσδένονται στο 5' mCpG, σε μία θέση πρόσδεσης που ονομάζεται MBD (methyl CpG binding domain). Η Kaiso όμως, χρησιμοποιεί έναν διαφορετικό μηχανισμό, καθώς προσδένεται σε μία περιοχή με δομή "δακτυλίου ψευδαργύρου". Η MBD4 σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA, ενώ οι MBD1, MECP2 και Kaiso καταστέλλουν την μεταγραφή τόσο *in vitro* όσο και σε πειράματα κυτταρικών καλλιιεργειών, αλληλοεπιδρώντας με σύμπλοκα αποακετυλασών ιστονών (134).

Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να επηρεάσει και την τροποποίηση των ιστονών και τη δομή της χρωματίνης, η οποία με τη σειρά της μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση. Οι δομές των μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης είναι σημαντικές στην καθοδήγηση της αποακετυλίωσης των ιστονών σε συγκεκριμένα κατάλοιπα. Μέχρι στιγμής είναι γνωστή η ύπαρξη πέντε γνωστών πρωτεϊνών που διαθέτουν μεθυλο-CpG-δεσμευτική περιοχή και τέσσερις από αυτές (MECP2, MBD1, MBD2, MBD3) εμπλέκονται στην καταστολή της μεταγραφής. Τρεις από αυτές (MeCP2, MBD2, MBD3) βρίσκονται σε σύμπλοκα (MeCp-2, MeCp-1, Mi-2) που περιέχουν αποακετυλάσες ιστονών. Έρευνες σε μεθυλιωμένα γονίδια που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης και για τις τέσσερις αυτές μεθυλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες, έχουν δείξει τουλάχιστον μικρή άρση της μεταγραφικής καταστολής κατόπιν θεραπείας με τον αναστολέα αποακετυλασών ιστονών, την τριχοστατίνη A. Η μεθυλίωση της λυσίνης των ιστονών με ειδικές μεθυλάσες ιστονών, εμπλέκεται επίσης σε αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και στη γονιδιακή ρύθμιση. Μία ζώνη αποακετυλιωμένης ιστόνης H3 και μεθυλίωση της ιστόνης H3 στην λυσίνη 9 περιβάλλει τον υπερμεθυλιωμένο υποκινητή του *hMLH1*, ο οποίος όταν απομεθυλωθεί και ενεργοποιηθεί, σχετίζεται με την ακετυλιωμένη μορφή της H3 και την μεθυλίωση της H3 στη λυσίνη της θέσης 4. Αναστολή της δράσης των μεθυλοτρανσφερασών του DNA, αλλά όχι και των αποακετυλασών των ιστονών, οδηγεί αρχικά στην απομεθυλίωση του υποκινητή, η οποία ακολουθείται από γονιδιακή επανέκφραση (135).



Σχήμα 2.4. Επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων: ένζυμα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς μεθυλίωσης του DNA και τροποποιήσεων των ιστονών (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Jones PA et al) (136)

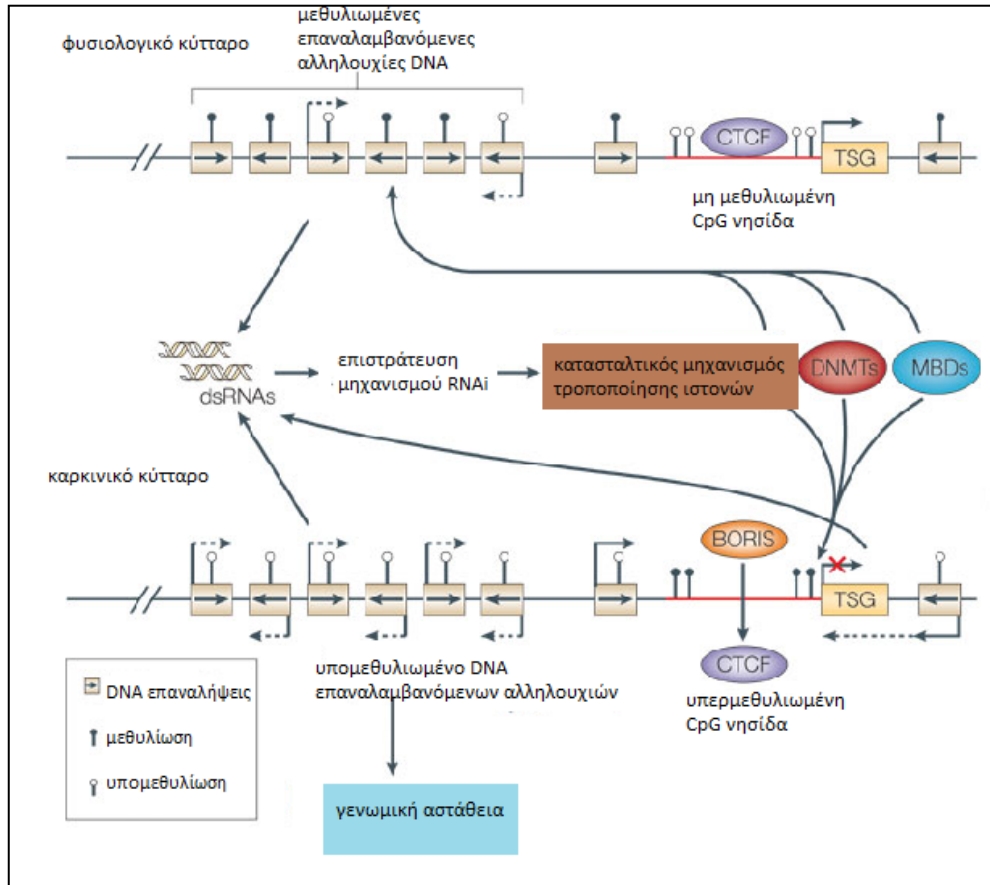
## 2.4. Μεθυλίωση του DNA και καρκίνος

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή στην μεταγραφή γονιδίων και ο ρόλος της στην καρκινογένεση αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας παγκοσμίως (137). Ο σύνδεσμος μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και του καρκίνου αποδείχτηκε για πρώτη φορά το 1983, από τους Feinberg και Vogelstein. Μετά την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση και χρησιμοποιώντας αποτύπωμα κατά Southern, ανακάλυψαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό CpG δινουκλεοτιδίων που ήταν μεθυλιωμένα στους φυσιολογικούς ιστούς ήταν μη μεθυλιωμένα στα καρκινικά κύτταρα (138).

Είναι πλέον γνωστό ότι η αλλαγή στο μοτίβο της μεθυλίωσης είναι συνήθης σε αρκετούς τύπους καρκίνου και γι' αυτό ο μηχανισμός και η συμβολή της στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα που λαμβάνονται από κλινικά δείγματα ιστών συχνά παρουσιάζουν σφαιρική υπομεθυλίωση αλλά παράλληλα στοχευμένη υπερμεθυλίωση. Η σφαιρική υπομεθυλίωση αποτελεί πρώιμο γεγονός και οφείλεται στην απώλεια μεθυλίωσης των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών παρασιτικών περιοχών του DNA, που υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μεθυλιωμένες και διατηρούνται μεταγραφικά κατεσταλμένες. Η υπομεθυλίωση των περιοχών αυτών έχει συσχετιστεί με τη χρωμοσωμική αστάθεια, χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η υπομεθυλίωση μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την απώλεια της αποτύπωσης. Εντούτοις, από όλες τις επιγενετικές τροποποιήσεις που υφίσταται το DNA, στον καρκίνο περισσότερο έχει μελετηθεί η υπερμεθυλίωση. Η υπερμεθυλίωση και η μεταγραφική σίγαση παρατηρείται κυρίως στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, όπως στην επιδιόρθωση του DNA, στην απόπτωση, στην αναδιάταξη της χρωματίνης, συμβάλλοντας στην σταδιακή μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό (Σχήμα 2.5) (139).

Εκτός της υπερμεθυλίωσης των υποκινητών των σημαντικών για τον κυτταρικό κύκλο γονιδίων, και της σφαιρικής υπομεθυλίωσης, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT1, όπως αποδείχτηκε με ανοσοϊστοχημικές μελέτες (140). Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την διατήρηση και όχι για την de novo μεθυλίωση, με αποτέλεσμα το φαινόμενο υπερέκφρασής του να γεννά ερωτήματα για τον εναλλακτικό μηχανισμό μεθυλίωσης στα καρκινικά κύτταρα. Ένα από τα σημαντικά ερωτήματα που γεννάται με την μελέτη της μεθυλίωσης και της συσχέτισής της με την καρκινογένεση είναι κατά πόσο οι αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης προκύπτουν

τυχαία ή είναι αποτέλεσμα λαθών κατά τη φυσιολογική διαδικασία μεθυλίωσης του γονιδιώματος. Επιπρόσθετα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί γιατί η μεταγραφή κάποιων γονιδίων καταστέλλεται σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, ενώ άλλα γονίδια με πανομοιότυπη λειτουργία και χαρακτηριστικά υποκινητή με CpG νησίδες παραμένουν μη μεθυλιωμένα (141).



Σχήμα 2.5. Σφαιρική υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση υποκινητών γονιδίων ως πρότυπα μεθυλίωσης του καρκίνου (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα του Robertson KD) (142)

### 2.4.1. Υπομεθυλίωση DNA και καρκίνος

Η συνολική απομεθυλίωση οφείλεται κυρίως στην υπομεθυλίωση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA και στην απομεθυλίωση εξονίων και ιντρονίων. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του νεοπλασματος, ο βαθμός υπομεθυλίωσης του συνολικού DNA αυξάνεται καθώς η βλάβη εξελίσσεται από έναν καλοήγητη πολλαπλασιασμό κυττάρων σε έναν επιθετικής μορφής καρκίνο. Έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί για να εξηγήσουν τη συμβολή της υπομεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων: δημιουργία χρωμοσωμικής αστάθειας, επανενεργοποίηση τρανσποζονίων και απώλεια γονιδιωματικής απεικόνισης. Η

υπομεθυλίωση του DNA επάγει τον μιτωτικό ανασυνδυασμό, οδηγώντας σε απαλοιφές, μετατοπίσεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις.

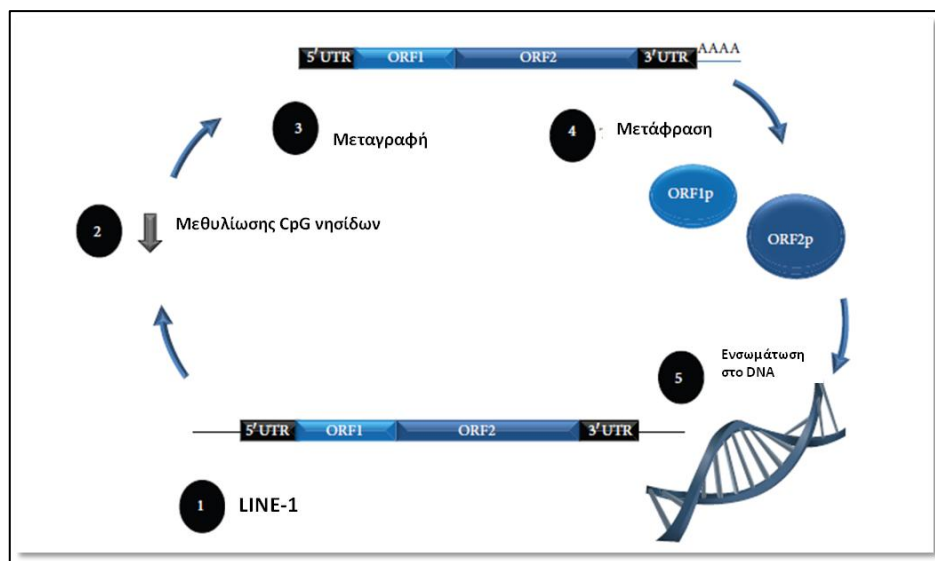
Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του DNA, αποτελούν το 55% του ανθρώπινου γονιδιώματος και είναι ιδιαίτερα επιδεκτικές σε απώλεια της 5mC. Οι αλληλουχίες αυτές, περιλαμβάνουν τα ρετροτρανσποζόνια LINE και επαναλαμβανόμενες περιοχές Alu, όπως επίσης και διάφορες κατηγορίες ενδογενών ρετροϊών (π.χ. τον ανθρώπινο ενδογενή ρετροϊό K; HERV-K) και κεντρομερείς μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Λόγω της αφθονίας τους, η μεθυλίωση των *LINE-1* ή *Arthrobacter luteus (Alu)* χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για τα επίπεδα της ολικής μεθυλίωσης του DNA. Δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA και η καταστολή της χρωματίνης για τη μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 (H3K9) συχνά συνεργάζονται για την αποσιώπηση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA είναι πιθανό ένας τρόπος για να επιτραπεί η επανενεργοποίηση της γονιδιακής τους έκφρασης (143).

Η ενεργοποίηση των *LINE-1* ίσως αποτελεί την απαρχή στη καρκινογένεση. Μελέτες αλληλούχισης του καρκινικού γονιδιώματος από εκατοντάδες ασθενείς, έδειξαν ότι οι όγκοι μεγάλου ποσοστού ασθενών παρουσίαζαν ρετροτρανσποζόνια από *LINE-1* στοιχεία (Σχήμα 2.6). Η ενεργοποίηση των *LINE-1* σχετίζεται, λοιπόν, με την υπομεθυλίωση του γονιδίου *LINE-1* και μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκινογένεση (140).

Η υπομεθυλίωση σε σχετιζόμενα με τον καρκίνο γονίδια, μπορεί εξίσου να συμβάλλει στη δημιουργία όγκου. Συγκεκριμένα, υπάρχει μια ομάδα γονιδίων που ενεργοποιείται κατά την καρκινογένεση με απώλεια της μεθυλίωσης του DNA στις περιοχές του υποκινητή. Αυτά τα γονίδια εμπίπτουν στην κατηγορία των γονιδίων που σχετίζονται με τη γαμετική σειρά και πολλά από αυτά είναι ενεργά μόνο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Αρχικά, τα παραπάνω γονίδια ανακαλύφθηκαν σε όγκους μελανώματος ως αντιγόνα που αναγνωρίζονται από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Συνολικά, υπάρχουν περισσότερα από 250 γονίδια που σχετίζονται με την γαμετική σειρά, με πολλά από αυτά να εντοπίζονται στο χρωμόσωμα X. Μία σημαντική κατηγορία αυτών των γονιδίων είναι η οικογένεια *MAGE*, η οποία διατηρείται εξελικτικά και αποτελείται από περισσότερα από 50 μέλη. Άλλα τέτοια γονίδια είναι τα *Maelstrom (MAEL)* και *Piwi-like 1 (PIWIL1)*, τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι PI3K/AKT, καθώς και τα μέλη της οικογένειας *BORIS/CTCF*, όπου η υπομεθυλίωση τους οδηγεί σε αυξημένη ρύθμιση της τελομεράσης hTERT, οδηγώντας σε αθανασία των καρκινικών κυττάρων (144).



Όσον αφορά στους ιούς, στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου η λανθάνουσα κατάσταση φαίνεται ότι οφείλεται κατά ένα μέρος στην υπερμεθυλίωση του γονιδιώματος του HPV16 (Human Papillomavirus 16), ενώ η ενεργοποίηση του γονιδιώματος του HPV και η εξέλιξη της νόσου συμβαίνουν μέσω προοδευτικής υπομεθυλίωσης σε πρόδρομες περιοχές του DNA του (145). Πολλά τοξικά καρκινογόνα δρουν, τέλος, μέσω αλλαγών στα πρότυπα μεθυλίωσης. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες όπως το αρσενικό και το σελήνιο μπορεί να προκαλέσουν υπομεθυλίωση του DNA κατά την προσπάθεια του οργανισμού για αποτοξίνωση από τις μεταλλικές ουσίες. Επίσης η έκθεση του οργανισμού στο καρκινογόνο βενζοπυρένιο σχετίζεται με την υπομεθυλίωση και την υπερακετυλίωση των ιστονών σε μοντέλο προσομοίωσης καρκίνου του μαστού (143).



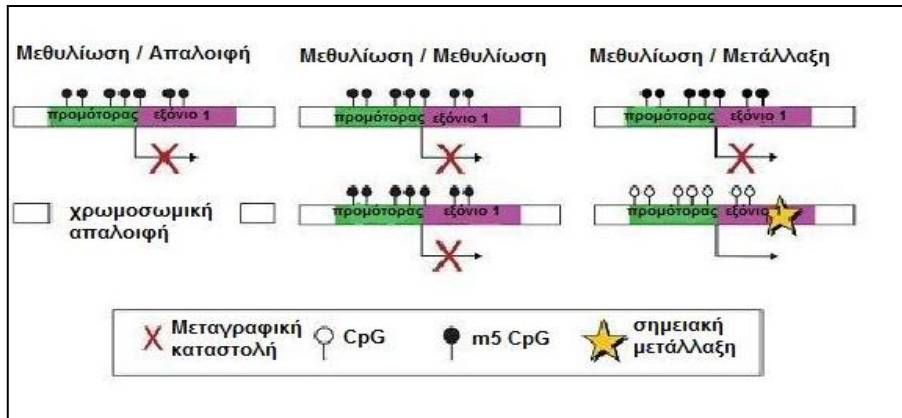
Σχήμα 2.6. Υπομεθυλίωση ρετροτρανσποζονίων της οικογένειας LINE (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Miousse I. et al) (146)

#### 2.4.2. Υπερμεθυλίωση DNA και καρκίνος

Η μεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών ορισμένων γονιδίων, κυρίως ογκοκατασταλτικών, σχετίζεται με τη σίγαση της μεταγραφής τους και αποτελεί το πρωταρχικό γεγονός κατά την έναρξη πολλών τύπων καρκίνου. Η υπόθεση των δύο πληγμάτων του Knudson (147), προβλέπει ότι οι συνέπειες στο φαινότυπο από την απώλεια ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου δε γίνονται φανερές μέχρις ότου και τα δυο αλληλόμορφα του απενεργοποιηθούν (Σχήμα 2.7). Το πρώτο πλήγμα μπορεί να είναι μια μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε στην γαμετική σειρά σε κληρονομικούς καρκίνους, είτε στη σωματική σε σποραδικού τύπου. Εναλλακτικά, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή και η επακόλουθη σίγαση της γονιδιακής μεταγραφής μπορεί να



αποτελέσει το πρώτο πλήγμα στους σωματικούς καρκίνους. Συχνά στους σωματικούς καρκίνους οι χρωμοσωμικές απαλοιφές που συμβαίνουν στο δεύτερο αντίγραφο του γονιδίου αποτελούν το δεύτερο πλήγμα που απενεργοποιεί το εναπομένον γονιδιακό αντίγραφο. Είναι σπάνιο σε αυτούς του καρκίνους να λάβουν χώρα σημειακές μεταλλάξεις που να αποτελούν τα πλήγματα και στα δυο αντίγραφα του ογκοκασταλτικού γονιδίου, όμως η υπερμεθυλίωση και των δυο αντιγράφων δεν είναι μη σύνηθες φαινόμενο. Στους κληρονομικούς καρκίνους με μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά στο ένα αντίγραφο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου, το δεύτερο πλήγμα μπορεί να είναι είτε χρωμοσωμικές απαλοιφές, είτε υπερμεθυλίωση του υποκινητή (148).



Σχήμα 2.7. Γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν στην απενεργοποίηση γονιδίων, σύμφωνα με την υπόθεση των δυο πληγμάτων του Knudson (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Grønbaek, et al) (149)

Οι πρώτες αναφορές για υπερμεθυλίωση περιγράφηκαν για το γονίδιο που κωδικοποιεί την καλσιτονίνη, στο χρωμόσωμα 11p, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πολυάριθμα γονίδια υπερμεθυλιωμένα στον καρκίνο. Περίπου το 50% των γονιδίων που προκαλούν οικογενείς μορφές καρκίνου, λόγω μετάλλαξης στη γαμετική σειρά, υπόκεινται σε αποσιώπηση μέσω μεθυλίωσης σε ποικίλες σποραδικές μορφές καρκίνου. Ωστόσο, εκτός από τα κλασικά ογκοκατασταλτικά γονίδια (*BRCA1*, *MLH1*, *APC*, και *CDKN2A*), υπερμεθυλίωση λαμβάνει χώρα και σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA (*BRCA1*, *MGMT*), την απόπτωση (*DAPK*, *TMS1*, *CASP8*, *TP73*), τη διαφοροποίηση, την αγγειογένεση, την μετάσταση (*BRMS1* (150), *CST6* (122)) και άλλα γονίδια σχετιζόμενα με τον κυτταρικό κύκλο (*p16INK4a*, *p15INK4a*, *p14ARF*) (143).

Υπερμεθυλίωση του DNA, παρατηρείται συχνά και σε γονίδια που εμπλέκονται σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Το μονοπάτι σηματοδότησης WNT προάγει την ανάπτυξη ιδιαίτερα στον βλαστοκυττάρων του εντερικού επιθηλίου, γι'αυτό και σχετίζεται με όγκους που προκύπτουν από αυτά. Υπάρχουν πολλά ανασταλτικά μόρια που μπορούν να ελέγξουν τη δραστηριότητα του μονοπατιού WNT. Ένας από αυτούς είναι το *APC*, οι ανταγωνιστές σηματοδότησης *SFRPs*, τα *DKK1*, *WIF1*, *WNT7A*, *SOX17* κ.α. Το σηματοδοτικό μονοπάτι

ογκοκατασταλτικών γονιδίων Hippo, περιορίζει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ελέγχει το μέγεθος των οργάνων. Η μεθυλίωση των υποκινητών των *MST1*, *MST2* και *RASSF1A* που συμμετέχουν στο Hippo μονοπάτι, επάγει καρκινογένεση. Μάλιστα το *RASSF1A*, προκαλεί θετική ρύθμιση του μονοπατιού και είναι ένα από τα πιο συχνά μεθυλιωμένα γονίδια σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου (143).

Η μη φυσιολογική μεθυλίωση των γονιδίων που αναφέρθηκαν πιο πάνω και η ακόλουθη σίγασή τους, μπορεί να δώσει το πλεονέκτημα επιλογής στα νεοπλασματικά κύτταρα, να αυξήσει τη γενετική τους αστάθεια και να οδηγήσει σε μετάσταση (151). Σε όγκους μάλιστα, με καθορισμένη πορεία, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου η μη φυσιολογική μεθυλίωσή τους είναι ανιχνεύσιμη σε πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις, υποδηλώνοντας ότι συμβάλλει άμεσα στον κακοήθη μετασχηματισμό των κυττάρων και δεν είναι όψιμο γεγονός που προκαλείται από γενετικές αλλαγές (152). Εκτός από την μη φυσιολογική μεθυλίωση των υποκινητών και την μεταγραφική καταστολή σημαντικών γονιδίων, η μεθυλίωση της κυτοσίνης μπορεί να συμβάλει στην ογκογένεση και με άλλους μηχανισμούς. Αυτό συμβαίνει διότι η 5-μεθυλοκυτοσίνη παρουσιάζει η ίδια μεταλλαξογόνο δράση (153). Μπορεί να απαμινωθεί αυθόρμητα μέσω υδρόλυσης και να προκαλέσει έτσι την μετάλλαξη από κυτοσίνη σε θυμίνη. Αυτή η ενισχυμένη μεταλλαξογένεση παρατηρείται στην γαμετική σειρά όλων των οργανισμών που μεθυλιώνουν το DNA τους. Επιπλέον, περίπου το 50% των σημειακών μεταλλάξεων που οδηγούν σε απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* στα σωματικά κύτταρα συμβαίνει σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες (154). Η παρουσία μεθυλιωμένων CpG νησίδων στην κωδικοποιούσα περιοχή αυτού του γονιδίου αυξάνει πολύ το ποσοστό των μεταλλάξεων που επάγονται από την υπερϊώδη ακτινοβολία UV κατά την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί αυτής της ενίσχυσης έχουν πλέον γίνει κατανοητοί. Η μεθυλομάδα μετατοπίζει το φάσμα απορρόφησης της κυτοσίνης στην περιοχή του ορατού. Οι μεθυλιωμένες CpG νησίδες είναι επίσης προτιμώμενοι στόχοι για G→T μεταλλάξεις. Έτσι η μεθυλίωση που γίνεται στη μεταγραφόμενη περιοχή του *p53*, αυξάνει την ευαισθησία σε αυθόρμητη απαμίνωση και UV-επαγόμενες μεταλλάξεις. Το γεγονός ότι οι περισσότερες κωδικοποιήσιμες αλληλουχίες περιέχουν αφθονία μεθυλιωμένων CpG δινουκλεοτιδίων σημαίνει ότι, μέσω της επιγενετικής ρύθμισης, πιθανώς αυξάνεται η πιθανότητα για κληρονομούμενες αλλαγές (155).

## 2.5. Τεχνικές ανίχνευσης μεθυλίωσης του DNA

Οι τεχνικές για τη μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης του DNA χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία στρατηγικών. Οι ποικίλες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται διαφέρουν σε μέγεθος και σε εύρος εξαγόμενων δεδομένων, καθώς και σε κόστος. Η προσεκτική εξέταση των παραπάνω

παραμέτρων, είναι κρίσιμη για τη λήψη της σωστής απόφασης κατά το σχεδιασμό ενός διαγνωστικού και προγνωστικού αλγορίθμου για τον καρκίνο. Για διδακτικούς σκοπούς, οι τεχνικές για τη μελέτη μεθυλίωσης του DNA μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό και την κατανομή των θέσεων CpG που αξιολογούνται (156). Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής:

**A) Προσεγγίσεις που βασίζονται στον ποσοτικό προσδιορισμό της 5mC:** Οι τεχνικές αυτής της κατηγορίας έχουν σαν αρχή μεθόδου τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου 5mC στο γονιδίωμα. Αρχικά, οι στρατηγικές ποσοτικού προσδιορισμού των 5mC βασίστηκαν στην υγρή χρωματογραφία (HPLC) και στην ενσωμάτωση ραδιενεργών μεθυλομάδων. Πιο πρόσφατα, αυτές οι προσεγγίσεις έχουν επικαιροποιηθεί σε φασματομετρία μάζας συζευγμένης με τετράπολο TOF, αντισώματα 5mC για ανοσοϊστοχημεία και αναλύσεις ELISA (methDNA-ELISA). Γενικά, οι παραπάνω προσεγγίσεις αξιολογούν τις αλλαγές σε επίπεδο ολικής μεθυλίωσης του DNA, με σχετικά μικρό κόστος. Ωστόσο, ο κύριος περιορισμός τους είναι ότι δεν μπορεί να αναλυθεί η μεθυλίωση του DNA σε ειδικές περιοχές-στόχους (156).

**B) Προσεγγίσεις που βασίζονται στην ανίχνευση της τοποειδικής μεθυλίωσης του DNA (Locus-specific DNA methylation approaches):** Κατά την προσέγγιση αυτή, εξετάζονται περιοχές με μεταβλητό αριθμό CpG, που όμως πάντα περιορίζεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο. Οι εν λόγω μεθοδολογίες έχουν σχετικά χαμηλό κόστος και παράγουν δεδομένα εύκολα ερμηνεύσιμα. Έτσι, αποτελούν μια οικονομικά αποδοτική προσέγγιση που είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν η στοχευμένη περιοχή περιέχει καλά επικυρωμένους βιοδείκτες (156). Στις μεθοδολογίες αυτές, χρησιμοποιούνται δύο κύριες στρατηγικές που βοηθούν στην ανίχνευση της τοποειδικής μεθυλίωσης:

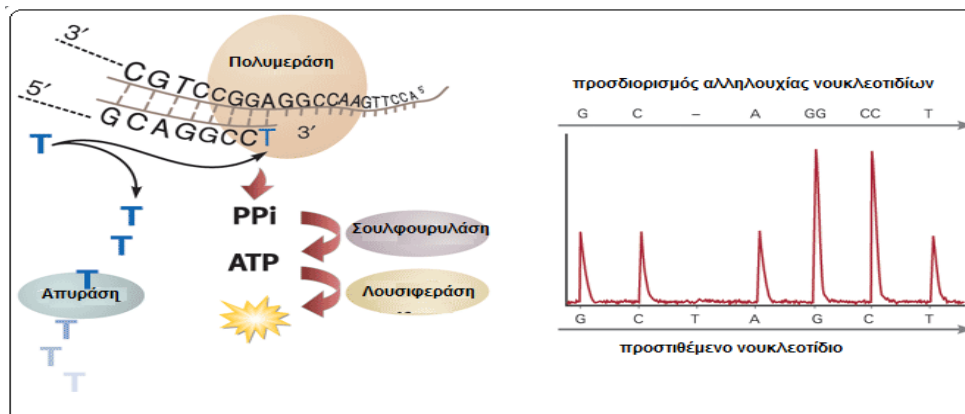
- i. Η χημική επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (Sodium Bisulfite treatment, SB), που εφαρμόζεται στις μεθόδους αναφοράς MSP, real-time MSP, MethyLight (Κεφάλαιο 4.13-4.14) και στο pyrosequencing.
- ii. Η χρήση περιοριστικών ενζύμων ειδικών για τη μεθυλίωση, που εφαρμόζεται στη μέθοδο COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis).

**Γ) Προσεγγίσεις που βασίζονται στην ανίχνευση μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide DNA methylation approaches):** Οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε NGS, επιτρέπουν την ευρύτερη προσέγγιση ανίχνευσης μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Οι μεθοδολογίες αυτές, περιλαμβάνουν την ειδική ανοσοκαταβύθιση της 5mC (5mC-specific immunoprecipitation, IP), την πέψη MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme), την SBM (Sodium Bisulfite Modification), και τεχνολογίες αλληλούχισης 3<sup>ης</sup> γενιάς (Third-

**Generation Sequencing, TGS).** Με εξαίρεση τις TGS τεχνολογίες, για την καθεμία από τις παραπάνω προσεγγίσεις μπορεί να εφαρμοστούν οι τεχνικές microarrays ή NGS (156).

### 2.5.1. Pyrosequencing

Με εφαρμογή του pyrosequencing, η ευαισθησία στην ανίχνευση της μεθυλίωσης μπορεί να φτάσει σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Η τεχνική βασίζεται στη χημική επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο και στηρίζεται στο ότι κάθε μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μετατρέπεται κατά την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο σε ουρακίλη (157). Πρόκειται για μια εναλλακτική προσέγγιση από την μέθοδο αναφοράς αλληλούχιση του Sanger, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού PPI. Κατά την μέθοδο αυτή, γίνεται ποσοτική ανάλυση της μεθυλίωσης στις CpG νησίδες του τροποποιημένου με όξινο θειώδες νάτριο DNA. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ανίχνευση του εκπεμπόμενου φωτός κατά την διάρκεια της σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA από την DNA πολυμεράση. Κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων, ελευθερώνεται PPI και μετατρέπεται σε ATP από ειδικό ένζυμο (Σχήμα 2.8). Το ATP μόριο είναι απαραίτητο για την δράση του ενζύμου λουσιφεράση και την εκπομπή ακτινοβολίας. Στο pyrosequencing χρησιμοποιούνται εκκινητές για την ενίσχυση τόσο των μεθυλιωμένων όσο και μη μεθυλιωμένων μορίων (158). Η διαδικασία της αλληλούχισης μπορεί να επαναληφθεί για το ίδιο πρότυπο για την ανάλυση άλλων CpGs στο ίδιο προϊόν PCR. Ποσοτικός χαρακτηρισμός της μεθυλίωσης του επιγονιδιώματος δειγμάτων επιτυγχάνεται σε 4h για έως και 96 δείγματα χημικά τροποποιημένου DNA (159).



**Σχήμα 2.8.** Βασική αρχή του Pyrosequencing και εικόνα εξόδου. Η διπλάσιου ύψους κορυφή υποδηλώνει την ενσωμάτωση στην αλυσίδα DNA δυο ίδια νουκλεοτίδια στη σειρά (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των England R. et al) (160)

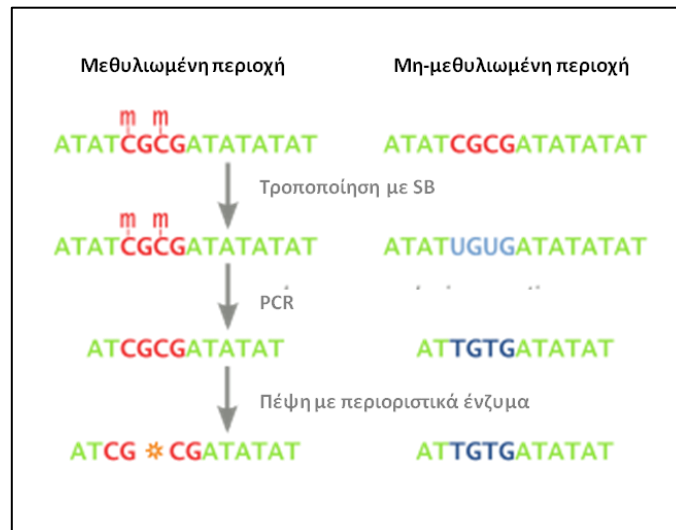
### 2.5.2. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

Πρόκειται για τεχνική που εκμεταλλεύεται τις διαφορές στις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν περιοριστικά ένζυμα μεταξύ μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου DNA, αφού έχει προηγηθεί κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. Η μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες μπορεί να οδηγήσει τόσο στη δημιουργία νέων θέσεων αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα όσο και στη διατήρηση των ήδη υπαρχουσών. Έπειτα από την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο η αλληλουχία στόχος ενισχύεται με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που δε διακρίνουν μεταξύ των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων αλληλομόρφων, με αποτέλεσμα τα PCR προϊόντα να αντιπροσωπεύουν ένα μίγμα από μεθυλιωμένα και μη αλληλόμορφα. Στη συνέχεια τα PCR προϊόντα πέπτονται από ένα ένζυμο περιορισμού που στην αλληλουχία αναγνώρισης περιέχει κυτοσίνες εντός CpG δινουκλεοτιδίων, έτσι ώστε να γίνει η διαφοροποίηση των δυο αλληλουχιών με βάση τις διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης στα δυο μόρια DNA (μεθυλιωμένο και μη) και τον σχηματισμό διαφόρου μήκους ολιγονουκλεοτιδίων (159). Για παράδειγμα, το ένζυμο TaqI πέπτει την αλληλουχία TCGA, η οποία διατηρείται ως έχει όταν η κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένη, αλλά μετατρέπεται σε TTGA όταν η κυτοσίνη δεν είναι μεθυλιωμένη (σχήμα 2.9).

Τα προϊόντα της πέψης μπορούν να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ενώ για ημιποσοτική ανάλυση μπορούν να αποδιαταχθούν, να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικό και στη συνέχεια, μεταφερόμενα σε μεμβράνη με ηλεκτροστύπωμα να υβριδοποιηθούν με ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια. Σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ένα phosphorimager και το ποσοστό των πλήρως μεθυλιωμένων θέσεων στο γενωμικό δείγμα να υπολογιστεί ως ο λόγος του PCR προϊόντος που έχει υποστεί πέψη προς τη συνολική ποσότητα του PCR προϊόντος (161).

Η τεχνική COBRA επιτρέπει τον καθορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης ειδικών τόπων σε μικρές ποσότητες γενωμικού DNA (0,1–1,0μg), με την προϋπόθεση ότι το DNA δεν έχει υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση κατά την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. Ωστόσο, η ατελής μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε θυμίνες και το συστηματικό σφάλμα της PCR επηρεάζουν την αξιοπιστία της. Ένα πρόσθετο μειονέκτημα της τεχνικής COBRA είναι ότι περιορίζεται μόνο στις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων, με αποτέλεσμα να μην

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της μεθυλίωσης όλων των δυνατών CpG θέσεων, επίσης η τεχνική αυτή δεν είναι κατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.



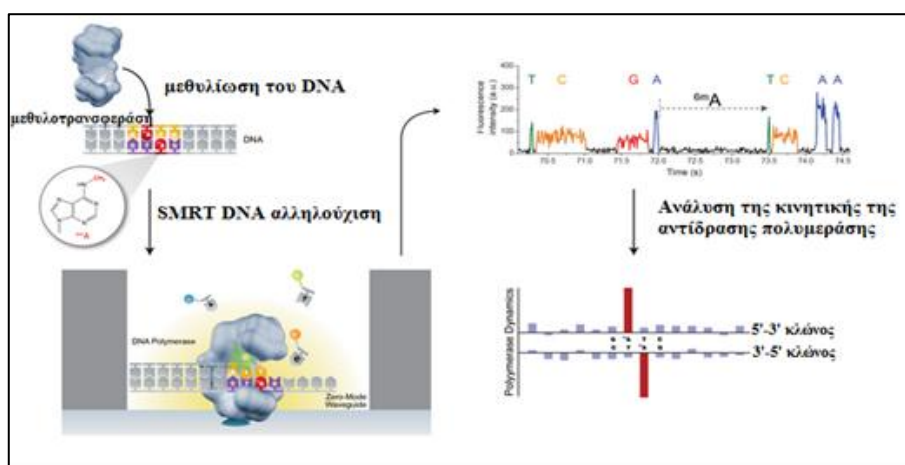
**Σχήμα 2.9** Τα πρώτα βήματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου COBRA και οι αλλαγές που προκύπτουν στην αλληλουχία του DNA (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Varlini H. et al) (162)

### 2.5.3 Single-Molecule Real Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS)

Κατά την εφαρμογή της SMRT, πραγματοποιείται άμεση ανίχνευση της μεθυλίωσης του DNA, μετά την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, με βάση την τεχνική πραγματικού χρόνου αλληλούχισης. Στην τεχνική αυτή, DNA πολυμεράσες καταλύουν την ενσωμάτωση των σηματοδοτημένων με φθορίζοντα μόρια νουκλεοτιδίων στον συμπληρωματικό κλώνο εκμαγείο. Οι χρόνοι ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων αλλά και η διάρκεια των παλμών φθορισμού που παρατηρούνται, αποτελούν μέρος της παρακολούθησης της κινητικής της πολυμεράσης και ως εκ τούτου συμβάλλουν στην ανίχνευση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων στα μόρια DNA, συμπεριλαμβανομένων της N6-μεθυλαδενίνης, της 5-μεθυλοκυτοσίνης και της 5-ύδροξυ μεθυλοκυτοσίνης. Η SMRT-BS μπορεί να ανιχνεύσει τη μεθυλίωση σε CpG δινουκλεοτίδια που εδρεύουν σε περιοχές ~1,5 kb, χωρίς προηγούμενη κλωνοποίηση των PCR προϊόντων (163).

Οι μετρήσεις της κινητικής της αντίδρασης ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων είναι ένα σημαντικό μέρος της τεχνικής SMRT sequencing και επιτρέπει την ανάγνωση της αρχικής μορφής, τροποποιημένης ή μη, του DNA μορίου. Οι διάφορες επιγενετικές αλλαγές, τροποποιήσεις, του DNA επιφέρουν διαφορετική αλλαγή στην κινητική της πολυμεράσης, επιτρέποντας την διάκριση τους. Η ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου ανιχνεύεται ως παλμός φθορισμού, του οποίου το μήκος κύματος δηλώνει την ταυτότητα του. Ο παλμός φθορισμού, του σηματοδοτημένου στο άκρο του με φθορίζουσα ουσία νουκλεοτιδίου, τελειώνει όταν η

πολυμεράση ενσωματώνει το νουκλεοτίδιο αυτό και πριν μεταφερθεί για την ενσωμάτωση του επόμενου (Σχήμα 2.10). Οι παλμοί φθορισμού στην τεχνική SMRT sequencing χαρακτηρίζονται όχι μόνο από το φάσμα εκπομπής αλλά και από την διάρκεια και το χρονικό διάστημα μεταξύ των παλμών και ως εκ τούτου την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων. Οι μετρήσεις αυτές είναι βασικές στην κινητική της αντίδρασης της πολυμεράσης. Το εύρος του παλμού αποτελεί πληροφορία για όλα τα στάδια της κινητικής μετά την προσθήκη του νουκλεοτιδίου, ενώ η διάρκεια μεταξύ των παλμών δίνει την εικόνα του σταδίου ενσωμάτωσης του μορίου στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA (164).

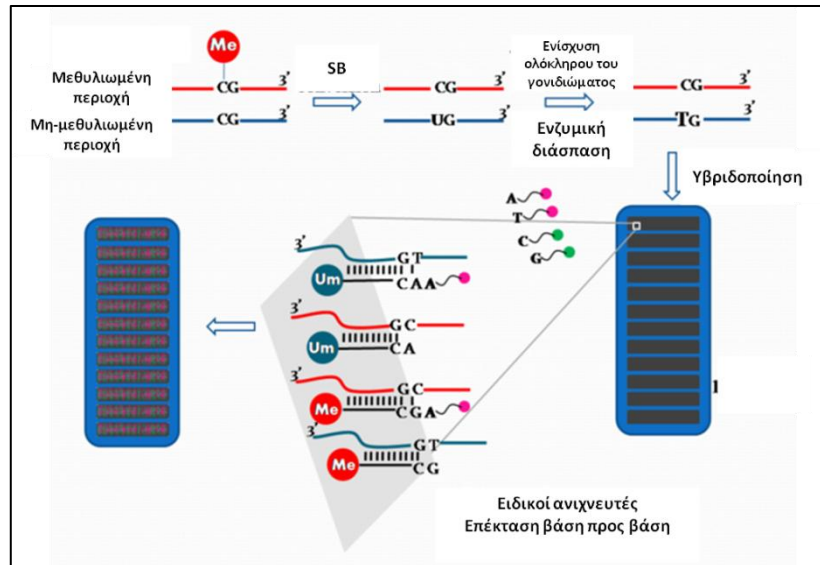


Σχήμα 2.10. Αρχή μεθόδου SMRT DNA αλληλούχισης. Ανάλυση φθορισμού που θα καθορίσει την DNA αλληλουχία και δυναμικής-χρόνου της αντίδρασης PCR που θα καθορίσει την παρουσία ή όχι μεθυλίωσης του DNA (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Flusberg B. et al) (165)

#### 2.5.4. Human methylation 450k BeadChip

Το Human methylation 450k BeadChip είναι μια επέκταση των προηγουμένως κλινικά επικυρωμένων GoldenGate και Human Methylation 27k BeadChips. Αυτή η τεχνική προσδιορίζει ποσοτικά τα επίπεδα μεθυλίωσης με ανάλυση σε επίπεδο μίας βάσης. Το γενομικό DNA έχει προηγουμένως τροποποιηθεί με όξινο θειώδες νάτριο και πραγματοποιείται ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τα προϊόντα εν συνεχεία διασπώνται ενζυμικά, καθαρίζονται και υβριδοποιούνται στο BeadChip (Σχήμα 2.11). Οι ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτίδια που περιέχονται σε αυτή την πλακέτα, είναι ικανοί να ανιχνεύσουν το επίπεδο μεθυλίωσης πάνω από 485.000 κυτοσινών (482.169 CpG δινουκλεοτίδια και 3.343 CpNpG τρινουκλεοτίδια). Παρόλο που αυτές οι θέσεις CpG αντιπροσωπεύουν μόνο το 1,73% όλων των CpGs, ο σχεδιασμός καλύπτει 21.231 (99%) γονίδια με μέσο όρο 17,2 ανιχνευτών ανά γονίδιο και είναι κατανομημένες σε όλο τον υποκινητή, το 5'UTR και το πρώτο εξόνιο (166). Το HM450K έχει αποδείξει ότι είναι μία από τις πιο οικονομικά αποδοτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό του προφίλ μεθυλίωσης του DNA

στον καρκίνο. Μέχρι στιγμής, η βάση TCGA έχει τα περισσότερα δεδομένα καταγεγραμμένα με χρήση της τεχνικής αυτής, σε πάνω από 10.000 βιολογικά δείγματα (167). Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιοι τεχνικοί περιορισμοί που περιορίζουν την ειδικότητα της μεθόδου: 1) αρκετοί ανιχνευτές (~30.000), υβριδοποιούνται διασταυρούμενα με αλληλουχίες DNA που δεν αποτελούν στόχους και 2) η περιοχή αναγνώρισης πολλών ανιχνευτών (~70.000) περιέχουν γνωστούς πολυμορφισμούς (SNPs), ενισχύοντας τα ποσοστά των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (168).



Σχήμα 2.11. Αρχή μεθόδου τεχνικής Human methylation 450k BeadChip (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Morris T. et al) (166)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

#### 3.1. Εισαγωγή

Το **National Cancer Institute (NIH, US)** ορίζει ως **βιοδείκτη καρκίνου (tumor biomarker)** οποιοδήποτε βιολογικό μόριο ανιχνεύεται στο αίμα, στα βιολογικά υγρά και σε ιστούς και αποτελεί σήμα φυσιολογικής ή μη φυσιολογικής διαδικασίας ή της κατάστασης μιας νόσου. Οι βιοδείκτες καρκίνου προσφέρουν σημαντική βοήθεια στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και παρέχουν πληροφορίες από την έναρξη και κατά την εξέλιξη της νόσου (169). Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον ιδανικό βιοδείκτη καρκίνου, καθώς είναι μία χημικά και βιολογικά σταθερή τροποποίηση του DNA, ανιχνεύεται σε ποικιλία βιολογικών υγρών και οι τεχνικές για την ανίχνευσή της είναι σχετικά απλές, ευαίσθητες και ειδικές (170). Οι επιγενετικοί βιοδείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την πρόιμη διάγνωση (διαγνωστικοί βιοδείκτες), παρέχουν πληροφορίες για την πρόγνωση των ασθενών κατά την εξέλιξη της νόσου (προγνωστικοί βιοδείκτες) και αποτελούν δείκτες ανταπόκρισης σε στοχευμένες θεραπείες (προβλεπτικοί βιοδείκτες) (171).

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις αλλαγές του προφίλ μεθυλίωσης εξειδικευμένων γονιδίων στον καρκίνο, έχει οδηγήσει σε έναν υψηλό αριθμό ερευνητικών δημοσιεύσεων. Από τις μελέτες αυτές, έχουν προκύψει 1.800 υποψήφιοι βιοδείκτες, εκ των οποίων μόνο οι 14 έχουν συμπεριληφθεί μέχρι στιγμής σε κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες. Επιπρόσθετα, μόνο δύο από αυτούς έχουν λάβει έγκριση από τον FDA: η μεθυλίωση των *NDRG4* και *BMP3* σε δείγματα κοπράνων για την πρόιμη διάγνωση του καρκίνου παχέος εντέρου και η μεθυλίωση του *SEPT9* σε πλάσμα για τον ίδιο τύπο καρκίνου (172). Τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ βιοδεικτών για την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA με τα χαρακτηριστικά τους, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Το χάσμα μεταξύ πληθώρας μελετών και ουσιαστικής εφαρμογής βιοδεικτών μεθυλίωσης στην κλινική πράξη, εγείρει ερωτήματα σχετικά με τους παράγοντες που δυσχεραίνουν την κλινική επικύρωση των προτεινόμενων δεικτών καρκίνου. Από την ανακάλυψη μέχρι και την επικύρωση ενός βιοδείκτη, υπάρχουν πολλά μεθοδολογικά βήματα που είναι σημαντικά και πρέπει να ολοκληρωθούν πριν την τελική αξιολόγηση της κλινικής αξίας του. Κάποια από αυτά είναι η λανθασμένη επιλογή ασθενών προς εξέταση και ερμηνεία αποτελεσμάτων, ο λανθασμένος σχεδιασμός των μελετών, τα προαναλυτικά σφάλματα

και η έλλειψη προτυποποίησης και αναλυτικής επικύρωσης των εφαρμοζόμενων μεθοδολογιών (172).

**Πίνακας 3.1. Εμπορικά διαθέσιμα κιτ βιοδεικτών για την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA με τα χαρακτηριστικά τους (172).**

Γονίδιο	Κλινική χρησιμότητα	Συσχέτιση με γονιδιακή έκφραση	Περιοχή υποκινητή γονιδίου	CpG νησίδα	Κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες	Έγκριση από FDA
<b>Confirm MDx (<a href="https://mdxhealth.com/confirmmdx-prostate-cancer">https://mdxhealth.com/confirmmdx-prostate-cancer</a>)</b>						
<i>GSTP1</i>	Διάγνωση και πρόγνωση στον καρκίνο του προστάτη	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
<i>APC</i>		Όχι	Όχι	Όχι		
<i>RASSF1</i>		Όχι	Ναι	Ναι		
<b>Cologuard (<a href="https://www.cologuardtest.com/">https://www.cologuardtest.com/</a>)</b>						
<i>NDRG4</i>	Πρώιμη ανίχνευση καρκίνου του παχέος εντέρου	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<i>BMP3</i>		Ναι	Ναι	Ναι		
<b>Epi proColon (<a href="http://www.epiprocolon.com/us/">http://www.epiprocolon.com/us/</a>)</b>						
<i>SEPT9</i>	Πρώιμη ανίχνευση καρκίνου του παχέος εντέρου	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Epi proLung (<a href="http://www.epigenomics.com/products/epi-prolung/">http://www.epigenomics.com/products/epi-prolung/</a>)</b>						
<i>SHOX2</i>	Πρώιμη ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι
<b>AssureMDx (<a href="https://mdxhealth.com/assuremdx-bladder-cancer-test">https://mdxhealth.com/assuremdx-bladder-cancer-test</a>)</b>						
<i>TWIST1</i>	Κίνδυνος για καρκίνο της ουροδόχου κύστης για ασθενείς με αιματοουρία	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
<i>OTX1</i>		Ναι	Όχι	Ναι		
<i>ONECUT2</i>		Ναι	Όχι	Ναι		
<b>PredictMDx (<a href="https://mdxhealth.com/pharmacomdx">https://mdxhealth.com/pharmacomdx</a>)</b>						
<i>MGMT</i>	Δείκτης ανταπόκρισης στο temozolomide στο γλοιοβλάστωμα	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
<b>Colvera (<a href="https://clinicalgenomics.com/colvera/">https://clinicalgenomics.com/colvera/</a>)</b>						
<i>BCAT1</i>	Πρώιμη ανίχνευση υποτροπής στον καρκίνο του παχέος εντέρου	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
<i>IKZF1</i>		Ναι	Ναι	Ναι		

### 3.2. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο μεταξύ των γυναικών, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Σύμφωνα με τα πρόσφατα στατιστικά στοιχεία που δημοσιεύτηκαν από την American Cancer Society, εκτιμάται ότι κατά τη διάρκεια του 2018 θα διαγνωσθούν περίπου 252.710 νέες περιπτώσεις διηθητικού και 63.410 νέες περιπτώσεις *in situ* καρκινώματος μαστού μεταξύ των γυναικών, ενώ αναμένονται συνολικά 40.610 θάνατοι γυναικών από αυτή την αιτιολογία (173).

Έρευνες επιβεβαιώνουν ότι ο καρκίνος του μαστού είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεγάλου αριθμού γενετικών μεταλλάξεων αλλά και επιγενετικών αλλαγών, που διαταράσσουν το σύνολο των εσωτερικών μηχανισμών σηματοδότησης στον κυτταρικό κύκλο. Οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, απορρυθμίζουν το σύστημα ελέγχου του κυττάρου με αποτέλεσμα το κύτταρο να λειτουργεί αυτόνομα με ένα ακανόνιστο και μη φυσιολογικό τρόπο. Ο πολλαπλασιασμός των μεταλλαγμένων κυττάρων στα οποία επιπλέον διατηρείται και το διαταραγμένο προφίλ μεθυλίωσης ως τις επόμενες γενιές κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποικίας καρκινικών κυττάρων (166).

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού πραγματοποιείται, μέχρι στιγμής, με χρήση της μαστογραφίας, η οποία παρουσιάζει 70% ευαισθησία και 85% ειδικότητα για μεγάλου μεγέθους όγκους. Αντίθετα, για όγκους μικρότερους του 1cm, η ευαισθησία μειώνεται σημαντικά και οι βιοδείκτες μεθυλίωσης, ως πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση, μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στη διάγνωση της νόσου (174). Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, έχει ξεκινήσει εδώ και χρόνια την κατάδειξη της σημασίας της μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών και άλλων γονιδίων ως βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού (175–177). Από το 2009, οι Kioulafa et al, μελέτησαν την μεθυλίωση της *KLK10* (176), του *RASSF1A* (177) και της *CST6* (175) σε δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και απέδειξαν τον προγνωστικό τους ρόλο ως βιοδείκτες.

Η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στη διερεύνηση μεθυλίωσης σε δείγματα υγρής βιοψίας, ως έναν απλό και μη-επεμβατικό τρόπο διάγνωσης. Στον πίνακα που ακολουθεί, λοιπόν, θα παρατεθούν οι κυριότερες μελέτες που αναφέρονται στη χρησιμότητα της μεθυλίωσης του DNA ως διαγνωστικό βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού (Πίνακας 3.2)

Πίνακας 3.2. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Διαγνωστική ευαισθησία/ειδικότητα
Hagrass et al, 2014 (178)	<i>ERa</i>	πλάσμα	qMSP	120	100	75%/70%
Liu et al, 2015 (179)	<i>FHIT</i>	πλάσμα	qMSP και ανάλυση καμπυλών τήξης	36	60	-/-
Yamamoto et al, 2012 (180)	<i>GSTP1</i>	πλάσμα	qMSP	159	87	75%/98%
Shan et al, 2016 (181)	<i>hMLH1</i>	πλάσμα	MethyLight	268	481	AUC = 0,727 (BCa* versus υγιείς), AUC = 0,789 (BCa* versus καλοήθειες)
Shan et al, 2016 (181)	<i>HOXD13</i>	πλάσμα	MethyLight	268	481	AUC = 0,727 (BCa* versus υγιείς), AUC = 0,789 (BCa versus καλοήθειες)
Guerrero et al, 2014 (182)	<i>KIF1</i>	πλάσμα	qMSP	502	684	AUC=0,51
Shan et al, 2016 (181)	<i>P16</i>	πλάσμα	MethyLight	268	481	AUC = 0,727 (BCa* versus υγιείς), AUC = 0,789 (BCa* versus καλοήθειες)
Yamamoto et al, 2012 (180)	<i>RARb2</i>	πλάσμα	MSP	159	87	-/-
Shan et al, 2016 (181)	<i>RASSF1A</i>	πλάσμα	qMSP	268	481	AUC = 0,727 (BCa* versus υγιείς), AUC = 0,789 (BCa* versus καλοήθειες)
Shan et al, 2016 (181)	<i>SFN</i>	πλάσμα	MethyLight	268	481	82,4%/78,1%

\*BCa=breast cancer, καρκίνος μαστού, AUC= area under curve (περιοχή κάτω από την καμπύλη) για καμπύλες ROC (receiver operating characteristic)

Αναφορικά με την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνου του μαστού, μελέτες για βιοδείκτες μεθυλίωσης έχουν πραγματοποιηθεί ως επί το πλείστον σε δείγματα ιστού, ενώ ελάχιστες έχουν

συμπεριλάβει πλάσμα ως βιολογικό υλικό αναφοράς. Οι παραπάνω μελέτες, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3 και αφορούν σε δημοσιευμένες εργασίες που συσχετίζουν τη μεθυλίωση του DNA συγκεκριμένων γονιδίων με το ελεύθερο υποτροπής διάστημα και τη συνολική επιβίωση.

**Πίνακας 3.3. Προτεινόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Στατιστική ανάλυση
<b>Xu et al, 2013</b> (183)	<i>BRCA1</i>	ιστός	-	842 (μετα-ανάλυση)	-	P=0,009 (DFS)
<b>Lu et al, 2012</b> (184)	<i>HOTAIR</i>	ιστός	qMSP	348	-	P=0,016 (DFS)/ P=0.022 (OS)
<b>Van Hoesel et al, 2012</b> (185)	<i>MINT17,</i> <i>MINT31,</i> <i>RARb2</i>	ιστός	qMSP	222	-	P=0,001 (OS και DFS)
<b>Lo Nigro et al, 2012</b> (186)	<i>NT5E</i>	ιστός	MSP και pyrosequencing	157	-	P=0,001 (OS και DFS)
<b>Sheng et al, 2017</b> (187)	<i>PITX2</i>	Ιστός και πλάσμα	-	1892 (μετα-ανάλυση)	-	P=0,004 (OS)/<0,001 (PFS)
<b>Li et al, 2014</b> (188)	<i>PTPRO</i>	ιστός	MSP και bisulfite sequencing	98	30	P=0,023 (OS)
<b>Jiang et al, 2012</b> (189)	<i>RASSF1A</i>	Ιστός και πλάσμα	MSP και qMSP	1439 (μετα-ανάλυση)	-	HR= 2.54 (95% CI 1.77– 3.66) (DFS)/ HR=3.35 (95% CI 1.14– 9.85) (OS)
<b>Chimonidou et al, 2017</b> (99)	<i>SOX17</i>	EpCAM+ CTC κλάσμα, πλάσμα	MethyLight	153 EpCAM+ CTC κλάσματα αντιστοιχισμένα με 153 δείγματα πλάσματος	23 EpCAM+ CTC κλάσματα και 49 δείγματα πλάσματος υγιών	P=0,044 (OS, πρώιμος BCa)/P=0,016 (OS, μεταστατικός BCa)

OS=Overall Survival (συνολική επιβίωση), DFS=Disease-Free Survival (ελεύθερο νόσου διάστημα), PFS=Progression-Free Survival (ελεύθερο υποτροπής διάστημα)

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία ετερογενής νόσος με ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις που προσφέρουν διαφορετικά κλινικά οφέλη για τους ασθενείς. Μέχρι στιγμής, συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης γονιδίων (π.χ. MammaPrint, OncoType, EndoPredict, Prosigna κ.α.) χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση των υποτύπων στον καρκίνο του μαστού, για την πρόγνωση και για την εκτίμηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης (190). Δεδομένης της εμπλοκής της μεθυλίωσης του DNA σε καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια για τον καρκίνο, καθώς και της συσχέτισής της με την αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων, αρκετές μελέτες έχουν προτείνει βιοδείκτες μεθυλίωσης ως δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία (191). Οι πιο πρόσφατες από αυτές, παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4. Προτεινόμενοι προβλεπτικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του μαστού**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Προβλεπτική αξία	Στατιστική ανάλυση
<b>Sharma et al, 2012</b> (192)	<i>BRCA1</i>	πλάσμα	MSP	40	30	Ανταπόκριση σε εισαγωγική χημειοθεραπεία	P=0,02
<b>Foedermayr et al, 2014</b> (193)	<i>BRCA1</i>	ιστός	qMSP	24	-	Ανταπόκριση σε νέο-επικουρική θεραπεία βασισμένη σε ταξάνες	P=0,047
<b>Brianese et al, 2018</b> (194)	<i>BRCA1</i>	ιστός	NGS και MLPA	131	-	Ανταπόκριση σε θεραπεία με PARP αναστολείς για τους τριπλά αρνητικούς ασθενείς	P=0,046
<b>Klajic et al, 2014</b> (195)	<i>CDKN2A</i> / <i>p16</i>	ιστός	Pyrosequencing	124	-	Ανταπόκριση σε δοξορουβικίνη και 5-φθοροουρακίλη	P=0,001 (δοξορουβικίνη)/P=0,002 (5-φθοροουρακίλη)
<b>Avraham et al, 2012</b> (196)	<i>RASSF1</i>	πλάσμα	MS-HRMA	52	-	Ανταπόκριση σε εισαγωγική χημειοθεραπεία	P=0,02

**MLPA= Multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-HRMA= Methylation-specific High Resolution Melting Analysis**

### 3.3. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει ως η πρώτη αιτία θνησιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο και για τους άντρες και για τις γυναίκες, παγκοσμίως, με 234.000 εκτιμώμενες νέες περιπτώσεις και 154.000 θανάτους λόγω νόσου, το 2018 (197). Ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC), αποτελεί την κύρια υποκατηγορία καρκίνου του πνεύμονα και διαιρείται σε περαιτέρω υπότυπους που περιλαμβάνουν το αδenoκαρκίνωμα (AD), το πλακώδες καρκίνωμα (SCC) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (198). Οι δύο κυρίαρχοι φαινότυποι NSCLC, το αδenoκαρκίνωμα (AD, αντιπροσωπεύοντας το ~50% των περιπτώσεων) και το πλακώδες καρκίνωμα (SCC, ~40% των περιπτώσεων) παρουσιάζουν διακριτά ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, ικανά για να διαχωριστούν από την τρέχουσα παθολογική ταξινόμηση (199).

Η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα θα μπορούσε να αλλάξει την έκβαση της νόσου και να οδηγήσει σε ραγδαία αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών. Στην προσπάθεια να βελτιωθούν οι πρακτικές για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου, έχουν εφαρμοστεί πολλές απεικονιστικές μέθοδοι και κυτταρολογικές τεχνικές. Ωστόσο, καμία δεν ανταποκρίθηκε στις προσδοκίες, κυρίως λόγω της περιορισμένης ευαισθησίας και του τεράστιου κόστους που επιφέρουν στα συστήματα δημόσιας υγείας. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι απαιτείται ένα επιδημιολογικό μοντέλο εκτίμησης κινδύνου για την κατηγοριοποίηση του πληθυσμού που πρέπει να υποβληθεί σε εξέταση αξονικής τομογραφίας (CT), με στόχο την έγκαιρη ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα. Εκτός από την CT, μία από τις σημαντικότερες κλινικές ανάγκες είναι τώρα η συμπερίληψη νέων μοριακών βιοδεικτών που ανιχνεύονται σε κλινικά δείγματα χρησιμοποιώντας μη-επεμβατικές διαδικασίες, για να βοηθήσουν την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη απόκρισης στη θεραπεία (200). Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών στον καρκίνο του πνεύμονα και η εστίαση στη μοριακή τους ετερογένεια είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων. Την τελευταία δεκαετία, μια πληθώρα μοριακών παραγόντων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα, έχουν αξιολογηθεί ως βιοδείκτες (201).

Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στο αναπνευστικό επιθήλιο. Οι μεταλλάξεις και οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων διαδραματίζουν γνωστό ρόλο στην ογκογένεση, αν και οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι στην πραγματικότητα συχνότερες από τις σωματικές μεταλλάξεις στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα. Κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής εξέλιξης από υπερπλασία σε

αδενοκαρκίνωμα, η μεθυλίωση του υποκινητή ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και ο συνολικός αριθμός υπερμεθυλιωμένων γονιδίων φαίνεται να αυξάνεται. Η υπερμεθυλίωση του DNA σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να ανιχνευθεί σε μια πληθώρα βιολογικών δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των βρογχοσκοπικών εκπλυμάτων (BALs), των πτυέλων και του αίματος (πλάσμα και ορός), τα οποία είναι λιγότερο επεμβατικά για τον ασθενή απ'ότι η κλασική βιοψία του όγκου (202). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι η εφαρμογή ενός πάνελ 4 γονιδίων σε υψηλού κινδύνου πληθυσμό, οδήγησε στην πιο ευαίσθητη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα σε σχέση με την καθιερωμένη πρότυπη κυτταρολογική εξέταση (203). Έτσι, η ανίχνευση των βιοδεικτών μεθυλίωσης στο αίμα μπορεί να αποτελέσει συμπληρωματική διαδικασία του συστηματικού ελέγχου των ασθενών, όχι μόνο για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου, αλλά και για την παρακολούθηση της εξέλιξής της (201).

Οι πίνακες 3.5 και 3.6 συνοψίζουν τις πιο πρόσφατες μελέτες για την αξιολόγηση της μεθυλίωσης του DNA ειδικών γονιδίων, ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.



Πίνακας 3.5. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του πνεύμονα

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Διαγνωστική ευαισθησία/ειδικότητα
Dietrich et al, 2012 (204)	<i>SHOX2</i>	αναροφήματα	real-time MSP	125	125	78%/96%
Lee et al, 2012 (205)	<i>TMEFF2</i>	ορός	MSP	316	50	9,2%/100%
Ponomaryova et al, 2013 (206)	<i>RASSF1A</i> και <i>RARβ2</i>	πλάσμα	qMSP	60	32	87%/75%
Powrózek et al, 2014 (207)	<i>SEPT9</i>	πλάσμα	real-time MSP	70	100	44,3%/92,3%
Diaz-Lagares et al, 2016 (203)	<i>BCAT1</i> , <i>CDO1</i> , <i>TRIM58</i> και <i>ZNF177</i>	Ιστός, αναροφήματα, εκπλύματα, πτύελα	Pyrosequencing	122 ιστοί, 51 αναροφήματα, 82 εκπλύματα, 72 πτύελα Ανεξάρτητη ομάδα: 293 ιστοί	79 ιστοί, 29 αναροφήματα, 29 εκπλύματα, 26 πτύελα Ανεξάρτητη ομάδα: 25 ιστοί	84,6%/81%
Pu et al, 2016 (208)	<i>CDH13</i>	Ιστός, ορός	MSP-qMSP	1206 συνολικά(μετα-ανάλυση): 1113 ιστοί 93 οροί	644 συνολικά: 589 ιστοί 55 οροί φυσιολογικών	AUC=0,791
Han et al, 2016 (209)	<i>hMLH1</i>	ιστός	MSP, COBRA, MethyLight	912 (μετα-ανάλυση)	666	OR: 10,61 (95% CI 2,71–41,54, P=0,0007)
Konecny et al, 2016 (210)	<i>SHOX2</i>	πλάσμα	real-time MSP	38	31	92%/71%
Powrózek et al, 2016 (211)	<i>DCLK1</i>	πλάσμα	qMSP	65	95	49,2%/91,6%
Qin et al, 2017 (212)	<i>hOGG1</i>	Περιφερικό αίμα (PBMCs)	MSP	121	121	OR: 2,247; (95% CI 1,067-4,734, P=0,03)
Zhang et al, 2017 (213)	<i>SHOX2</i> και <i>RASSF1A</i>	Εκπλύματα	real-time MSP, sanger sequencing	284	35 από καλοήθειες του πνεύμονα	81%/97,4%

AUC= area under curve (περιοχή κάτω από την καμπύλη) για καμπύλες ROC (receiver operating characteristic), OR= Odds ratio

Αρκετές είναι και οι μελέτες εκείνες που έχουν αναφέρει την ανίχνευση μεθυλίωσης ειδικών γονιδίων στο πλάσμα, για την παρακολούθηση ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία (Πίνακας 3.7). Τέλος, οι ελπιδοφόρες ενδείξεις της συνδυαστικής επιγενετικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, συνιστούν ότι η ανίχνευση της μεθυλίωσης στο ctDNA

σύντομα θα έρθει στο προσκήνιο για την παρακολούθηση της δράσης των παραγόντων απομεθυλίωσης. (202).

**Πίνακας 3.6. Προτεινόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του πνεύμονα**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Στατιστική ανάλυση
<b>Balgkouranidou et al, 2014</b> (214)	<i>BRMS1</i>	πλάσμα	real-time MSP	122	24	P=0,048 (DFS, P=0,007 (OS) (χειρουργήσιμος NSCLC)/P=0,003 (OS) (προχωρημένου σταδίου NSCLC)
<b>Zhang et al, 2015</b> (215)	<i>PAX6</i>	ιστός	MSP	143	143 παρακείμενοι ιστοί	P=0,018 (OS)
<b>Liu et al, 2015</b> (216)	<i>TMEM196</i>	ιστός	MSP, BGS	85	20	P=0,009 (OS)
<b>Yan et al, 2016</b> (217)	<i>FHIT</i>	ιστός	MSP, real-time MSP	735 (μετα-ανάλυση)	708	P=0,02 (OS)
<b>Villalba et al, 2016</b> (218)	<i>TPRSS4</i>	ιστός	BGS, pyrosequencing	88	66	P=0,008 (DFS)
<b>Balgkouranidou et al, 2016</b> (219)	<i>SOX17</i>	πλάσμα	MSP	122	49	P=0,012 (OS) (προχωρημένου σταδίου NSCLC)
<b>Powrozek et al, 2016</b> (211)	<i>DCLK1</i>	πλάσμα	qMSP	32	8	P<0,001 (OS)
<b>Schlenzog et al, 2018</b> (220)	<i>SFRP3</i>	ιστός	real-time MSP, pyrosequencing	11	11	P=0,021 (OS)/ P=0,032 (DFS)

BGS=Bisulfite Genomic Sequencing, OS=Overall Survival (συνολική επιβίωση), DFS=Disease-Free Survival (ελεύθερο νόσου διάστημα),

**Πίνακας 3.7. Προτεινόμενοι προβλεπτικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο του πνεύμονα**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Προβλεπτική αξία	Στατιστική ανάλυση
<b>Wang et al, 2015</b> (221)	<i>APC</i> και <i>RASSF1A</i>	πλάσμα	qMSP	316	-	Ανταπόκριση ασθενών προχωρημένου σταδίου στη χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα	P<0,001
<b>Schmidt et al, 2015</b> (222)	<i>SHOX2</i>	πλάσμα	qMSP	31	-	Ανταπόκριση ασθενών προχωρημένου σταδίου στη συστηματική θεραπεία	P<0,001
<b>Hiddinga et al, 2016</b> (223)	<i>MGMT</i>	πλάσμα	qMSP	25	-	Ανταπόκριση στο temozolomide	P=0,03

### 3.4. Μεθυλίωση του DNA ως βιοδείκτης στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

Οι επιγενετικοί βιοδείκτες έχουν τη δυνατότητα να χρησιμεύσουν ως δείκτες για πρώιμα στάδια καρκίνου για την ταυτοποίηση όγκων με υψηλότερες πιθανότητες να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία ή με μεγάλες πιθανότητες να παράγουν τοπικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των αλλαγών στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA και της εξέλιξης του **καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)** (224).

Πολλές από τις μελέτες, δείχνουν ότι το *p16INK4a* είναι ένα από τα πιο συχνά υπερμεθυλωμένα γονίδια στον HNSCC (225–227). Κάποιες μελέτες έχουν συστήσει ότι η υπερμεθυλίωση του *p16INK4a* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης πρόγνωσης της κακοήθους εξαλλαγής, καθώς σχετίζεται με την μετάσταση και την κακή πρόγνωση στον HNSCC (228). Επιπλέον, η αποσιώπηση του *p15INK4b (CDKN2B)* σχετίζεται με μεθυλίωση του *p16INK4a* και παρατηρείται σε προκαρκινικούς ιστούς της στοματικής κοιλότητας, συνιστώντας ότι το η μεθυλίωση του γονιδίου αποτελεί πρώιμο γεγονός (229). Επιπρόσθετα, η υπερμεθυλίωση της *E-καδερίνης* και άλλων επιδιορθωτικών γονιδίων, οδηγεί στην εξέλιξη του όγκου και με επιθετικής μορφή καρκίνο. Η αποσιώπηση της έκφρασης της *E-καδερίνης* μέσω μεθυλίωσης, επάγει την απορρύθμιση των βασικών λειτουργιών των κυττάρων, όπως η προσκόλληση, η πολικότητα και η μορφογένεση, με αποτέλεσμα την αυξημένη κινητικότητα και την επιθετική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων στο πλακώδες καρκίνωμα του στόματος (OSCC). Από την άλλη, η υπερμεθυλίωση γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA, όπως το *MGMT* το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο επιδιόρθωσης, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόπτωση και αυξημένη αντοχή των καρκινικών κυττάρων έναντι παραγόντων αλκυλίωσης (230).

Ένας από τους πιο ελκυστικούς τομείς της έρευνας σχετικής με επιγενετικές τροποποιήσεις, είναι η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός των βιοδεικτών. Η ανακάλυψη βιοδεικτών με μελέτες σε βιολογικά υγρά, βελτιώνει σημαντικά την ακρίβεια της ανίχνευσης και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Για τον καρκίνο της κεφαλής και τραχήλου, το σάλιο και το επίχρισμα της στοματικής κοιλότητας έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγές DNA από το στοματικό επιθήλιο με σκοπό την ανάλυση του προφίλ μεθυλίωσης του DNA (231). Μεταξύ των δυνητικών βιοδεικτών για τη διάγνωση καρκίνου του στόματος, το *HOXA9* και το *NID2* φαίνονται πολλά υποσχόμενα, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς τους. Επιπλέον μεθυλωμένα γονίδια, όπως τα *HS3ST2*, *NPY*, *EYA4*, *WT1*, και ο συνδυασμός της μελέτης μεθυλίωσης στα *E-καδερίνη*, *TMEFF2* και *MGMT*, θα μπορούσαν επίσης να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την έγκαιρη

ανίχνευση του HNSCC (224). Τέλος, η μεθυλίωση του *CHFR* αποτελεί όψιμο γεγονός στον HNSCC, υποδηλώνοντας μία πιθανή χρήση του ως βιοδείκτη προχωρημένου σταδίου, για την εξέλιξη της νόσου (229).

Παρακάτω, στους πίνακες 3.8 και 3.9, συνοψίζονται οι διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης στον HNSCC, αντίστοιχα, όπως καταγράφηκαν από την πρόσφατη βιβλιογραφία.

**Πίνακας 3.8. Προτεινόμενοι διαγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Διαγνωστική ευαισθησία/ειδικότητα
Zhang et al, 2012 (232)	<i>EBNA1, LMP1, RASSF1A, DAPK</i>	ιστός	Multiplex MSP	49	20	98%/100%
Nagata et al, 2012 (233)	<i>ECAD, TMEFF2, RARβ, MGMT, FHIT, WIF-1, DAPK, p16, HIN-1, TIMP3, p15, APC, SPARC</i>	σάλιο	MSP	34	20	<i>ECAD, TMEFF2, RARβ, MGMT</i> : 100%/87,5% <i>ECAD, TMEFF2, MGMT</i> : 97.1%/91.7%
Ovchinnikov et al, 2012 (234)	<i>RASSF1A, p16, DAPK1</i>	σάλιο	MSP	143	31	87%/80%
Schussel et al, 2013 (235)	<i>DCC, EDNRB</i>	σάλιο	qMSP	48	113	46%/72%
You et al, 2013 (236)	CDK10	πλάσμα	MSP, BGS	40	40	37,5%/100%
Rettori et al, 2013 (237)	<i>CCNA1, DAPK, MGMT, SFRP1, TIMP3</i>	ιστός	qMSP	68	60	41%/96%
Tian et al, 2013 (238)	<i>RASSF1A, CDKN2A, DLEC1, DAPK1, UCHL1</i>	πλάσμα	MSP	40	41	85%/95,1%
Bhatia et al, 2014 (239)	<i>p16</i>	Ιστός/πλάσμα	MSP	76	70	P<0,001 (OSCC versus υγιείς)
Kis et al, 2014 (240)	<i>p16</i>	σάλιο	MSP	60	48	P=0,001 (OSCC versus υγιείς)
Arantes et al, 2015 (241)	<i>TIMP3, DCC, DAPK, CCNA1, AIM1, MGMT, CDH1,</i>	σάλιο	Qmsp	40	40	92,5%/92,5%

	<i>HIC1</i>					
<b>Nawaz et al, 2015 (242)</b>	<i>EBNA1, LMP1, RASSF1A, DAPK, ITGA9, P16, WNT7A, CHFR, CYB5R2, WIF1, RIZ1, FSTL1</i>	ιστός	Multiplex MSP	44	18	89%/90%
<b>Ferlazzo et al, 2017 (243)</b>	<i>p16 και MGMT</i>	σάλιο	MSP	58	90	P<0,0001 (OSCC versus υγιείς) OR: 48.66 (2.82–840.7)

**Multiplex MSP= Πολλαπλή MSP, OSCC=Oral Squamous Cell Carcinoma (Πλακώδες καρκίνωμα στοματικής κοιλότητας), OR: Odds Ratio**

**Πίνακας 3.9. Προτεινόμενοι προγνωστικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου**

Μελέτη	Γονίδιο	Είδος δείγματος	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός υγιών	Στατιστική ανάλυση
<b>Dong et al, 2012 (244)</b>	<i>p16</i>	ιστός	MSP	30	-	P=0,021 (OS)
<b>Lin et al, 2013 (245)</b>	<i>DAPK</i>	ιστός	MSP	44	-	P=0,002 (DFS)
<b>Yang et al, 2016 (246)</b>	<i>SOX21-AS1</i>	ιστός	COBRA	43	43 παρακείμενοι ιστοί	P=0,002 (DFS)
<b>Ribeiro et al, 2016 (247)</b>	<i>GATA5</i>	ιστός	MS-MLPA	93	-	P=0,032 (OS)
<b>Shen et al, 2017 (248)</b>	<i>CLDN11</i>	ιστός	qMSP	91	91 παρακείμενοι ιστοί	P=0,007 (OS)
<b>Shen et al, 2017 (249)</b>	<i>SHISA3</i>	ιστός	MSP	93	93 παρακείμενοι ιστοί	P=0,024 (OS)

**MS-MLPA: methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, OS=Overall Survival (συνολική επιβίωση), DFS=Disease-Free Survival (ελεύθερο νόσου διάστημα),**



## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ήταν η ανάπτυξη, επικύρωση και κλινική αξιολόγηση μεθοδολογιών, για την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας ασθενών με καρκίνο. Για να διασφαλισθεί η αξιοπιστία και η ορθότητα των αποτελεσμάτων, πριν την οποιαδήποτε εφαρμογή των μεθοδολογιών σε κλινικά δείγματα, προηγήθηκε μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων αναφορικά με την σταθερότητα των δειγμάτων και την πιστότητα και ακρίβεια της ενίσχυσης του επιγονιδιώματος.

Ο πρώτος άξονας της διατριβής περιελάμβανε τη μελέτη σταθερότητας: α) της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα σε διαδοχικές χρονικές στιγμές για συνολικό διάστημα έως και 8 μήνες και β) του χημικά τροποποιημένου DNA (SB-treated DNA) σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης για συνολικό διάστημα 1 έτους. Έπειτα από τη χημική τροποποίηση του DNA, προχωρήσαμε σε ενίσχυση με real-time MSP του SB-treated DNA και ελέγχθηκε η συμφωνία των αποτελεσμάτων πριν και μετά την αντίδραση ενίσχυσης. Γενικότερα, προτείνουμε μία ολοκληρωμένη διαδικασία ελέγχου ποιότητας για κάθε βήμα που συμπεριλαμβάνεται στην πειραματική πορεία ανάλυσης βιοδεικτών μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας.

Δεύτερο άξονα της διατριβής, αποτέλεσε η ανάπτυξη, επικύρωση και κλινική αξιολόγηση μεθοδολογίας για την μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου που εκφράζει τον υποδοχέα των οιστρογόνων (*ESR1*) σε δείγματα υγρής βιοψίας. Αρχικά, πραγματοποιήσαμε ανάπτυξη μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *ESR1*. Για την κλινική επικύρωση της μεθοδολογίας, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές ομάδες ασθενών, ενώ για την αξιολόγηση της κλινικής της χρησιμότητας, η μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε τρίτη ομάδα ασθενών με διακριτά χαρακτηριστικά. Σκοπός μας ήταν η αξιολόγηση της μεθυλίωσης του *ESR1* ως πιθανού βιοδείκτη υγρής βιοψίας, για την παρακολούθηση των ασθενών με ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο μαστού και την πρόβλεψη της ανταπόκρισής τους σε ενδοκρινή θεραπεία.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής, αναπτύξαμε και αξιολογήσαμε κλινικά, μεθοδολογία για τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MLL3*, ως νέου επιγενετικού βιοδείκτη στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Για το λόγο αυτό, η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε δύο διαφορετικές ομάδες ασθενών και διερευνήθηκε ο ρόλος του γονιδίου ως προγνωστικού βιοδείκτη με ανάλυση αποκλειστικά και μόνο δειγμάτων υγρής βιοψίας.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε δείγματα υγρής βιοψίας ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Η επιλογή των προς εξέταση γονιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση το διαφορετικό ρόλο που επιτελούν στον καρκίνο και στόχο μας αποτέλεσε η κατοχύρωση επιγενετικών βιοδεικτών υγρής βιοψίας στην περίπτωση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, όπου η λήψη υλικού για κλασική βιοψία παρουσιάζει τεράστια δυσκολία.





# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση (μέθοδος φικόλης)

##### 4.1.1. Αρχή μεθόδου

Για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας κατά τη διαδικασία της αιμοληψίας, τα πρώτα 5mL απορρίπτονται. Έπειτα το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάρια συλλογής αίματος, τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Το περιφερικό αίμα επιστοιβάζεται σε διάλυμα φικόλης (Ficoll-Histopaque-1077, Sigma) και φυγοκεντρείται. Το διάλυμα Ficoll-Histopaque-1077 είναι ένα διάλυμα πολυσακχαρόζης, το οποίο έχει την κατάλληλη πυκνότητα και οσμωτικότητα για την απλή και γρήγορη απομόνωση PBMC από το περιφερικό αίμα. Στον **Πίνακα 4.1** παρουσιάζονται οι κυριότεροι υποπληθυσμοί των κυττάρων του αίματος και ο τυπικός αριθμός τους/mL αίματος. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, ο αριθμός των CTCs είναι απειροελάχιστος (μόλις 1-100 κύτταρα/mL), γεγονός που καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την ανίχνευσή τους.

Η διαφορετική ταχύτητα μετανάστευσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία στοιβάδων που περιέχουν διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (**Σχήμα 4.1**). Η κατώτερη στοιβάδα περιέχει τα ερυθροκύτταρα, τα οποία έχουν συσσωματωθεί από την πολυσακχαρόζη και έτσι καθιζάνουν πλήρως. Η αμέσως ανώτερη στοιβάδα αυτή των ερυθροκυττάρων περιέχει κατά κύριο λόγο τα κοκκιοκύτταρα, τα οποία υπό την οσμωτική πίεση του διαλύματος της φικόλης αποκτούν σημαντική πυκνότητα, ικανή ώστε να μεταναστεύσουν δια μέσου της στοιβάδας του διαλύματος της φικόλης. Λόγω της μικρότερής τους πυκνότητας, τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται στην επιφάνεια επαφής του πλάσματος και του διαλύματος της φικόλης μαζί με άλλα κύτταρα (αιμοπετάλια και μονοκύτταρα), που καθιζάνουν αργά.

**Πίνακας 4.1.** Οι κυριότεροι υποπληθυσμοί των κυττάρων του αίματος και ο τυπικός αριθμός τους/mL αίματος.

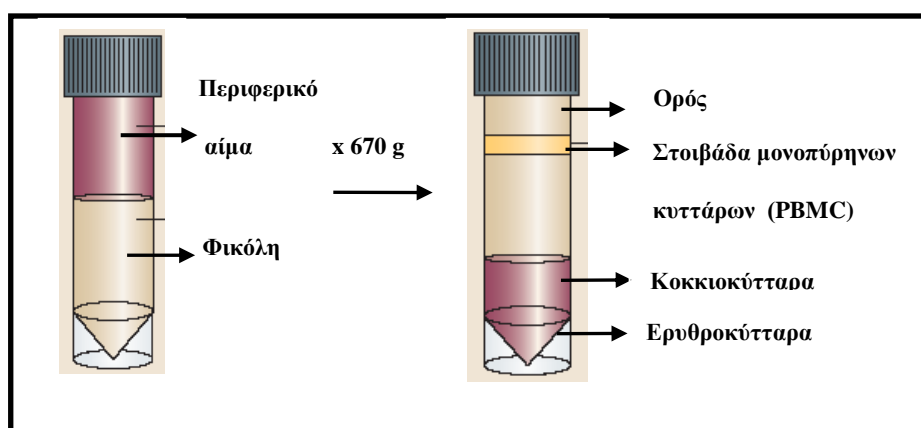
Τύπος κυττάρου	Κυτταρικοί υπότυποι	Κύτταρα /mL αίματος
<i>Ερυθρά αιμοσφαίρια</i>		<b>5 x 10<sup>9</sup></b>
<i>Αιμοπετάλια</i>		<b>3 x 10<sup>8</sup></b>
<i>Λευκά αιμοσφαίρια</i>	<b><i>Λεμφοκύτταρα:</i></b>	
	B κύτταρα	<b>2 x 10<sup>5</sup></b>
	T κύτταρα	<b>1 x 10<sup>6</sup></b>
	<b><i>Κοκκιοκύτταρα:</i></b>	
	Ουδετερόφιλα	<b>5 x 10<sup>6</sup></b>
	Ηωσινόφιλα	<b>2 x 10<sup>5</sup></b>
	Βασεόφιλα	<b>4 x 10<sup>4</sup></b>
	<b><i>Μονοκύτταρα:</i></b>	<b>4 x 10<sup>5</sup></b>
	<b><i>NK κύτταρα:</i></b>	<b>1 x 10<sup>5</sup></b>
<i>Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, CTCs</i>		<b>1-100</b>

#### 4.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- K<sub>2</sub>EDTA σωληνάρια συλλογής αίματος (BD Vacutainer, UK)
- Histopaque – 1077 (Sigma Aldrich, Germany)
- PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM και NaCl 137 mM, pH 7,3).

#### 4.1.3. Πειραματική πορεία

Είκοσι mL (20mL) περιφερικού αίματος συλλεγμένου παρουσία EDTA (0,5M, 2mL) ως αντιπηκτικού αραιώνονται με ίσο όγκο διαλύματος PBS. Το αραιωμένο αίμα (40mL) μοιράζεται σε δύο κωνικά σωληνάρια τύπου Falcon των 50mL. Τα πρώτα 20mL αραιωμένου αίματος επιστοιβάζονται προσεκτικά σε 15mL φικόλης που έχουν προστεθεί σε άλλο σωληνάριο τύπου Falcon. Τα υπόλοιπα 20mL αραιωμένου αίματος επιστοιβάζονται επίσης σε δεύτερο σωληνάριο Falcon. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας στα 670g για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-22° C), όπου διαχωρίζονται σε στοιβάδες ο ορός, τα μονοπύρρηνα κύτταρα, η φικόλη και τα ερυθροκύτταρα (Σχήμα 4.1). Απομακρύνεται η ανώτερη στοιβάδα του ορού με μια σύριγγα και συλλέγεται ο μεσοδακτύλιος των PBMC σε ξεχωριστό αποστειρωμένο σωληνάριο Falcon. Ακολούθως τα PBMC εκπλένονται δύο φορές με 50mL διαλύματος PBS με φυγοκέντρηση στα 530g, για 10min, στους 4°C. Τέλος, το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και το ίζημα των κυττάρων χρησιμοποιείται αμέσως προς απομόνωση του ολικού RNA.



Σχήμα 4.1. Απομόνωση μονοπύρρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα (PBMC) με διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση

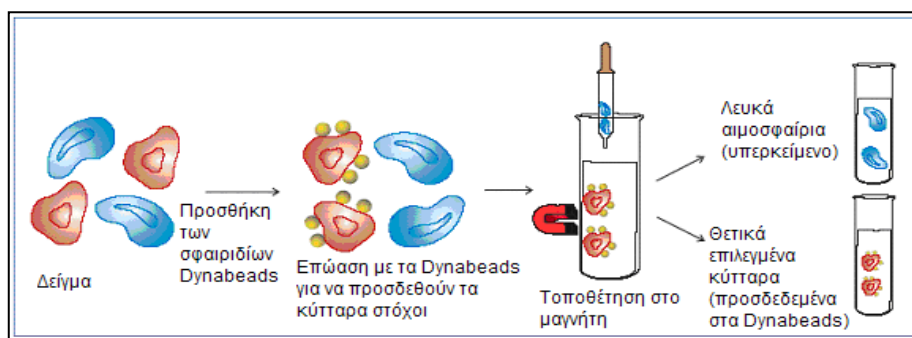
## 4.2. Εμπλουτισμός επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων

### 4.2.1. Αρχή μεθόδου

Για την ανοσομαγνητική απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκαν τα παραμαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich (DynaL, Oslo, Norway) (Σχήμα 4.2). Τα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν απευθείας από ολικό αίμα ή από το κλάσμα των μονοπύρρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος PBMC, τα οποία έχουν απομονωθεί με διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση. Κατά τη διάρκεια μιας μικρής

περιόδου επώασης τα επιθηλιακά κύτταρα προσδένονται στα παραμαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads και ακολούθως τα προσδεδεμένα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν και να εκπλυθούν χρησιμοποιώντας ένα μαγνήτη ενώ τα μη προσδεδεμένα στα σφαιρίδια κύτταρα απομακρύνονται με τις εκπλύσεις. Τα εμπλουτισμένα κύτταρα είναι βιώσιμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε διάφορες ερευνητικές εφαρμογές, όπως απομόνωση γενωμικού DNA, ολικού RNA και ακολούθως ενίσχυση με PCR. Τα σφαιρίδια είναι αδρανή και δεν παρεμβαίνουν σε τέτοιες ακόλουθες διαδικασίες.

Τα σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich είναι ομοιόμορφα, υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια από πολυστυρένιο (4.5  $\mu\text{m}$  σε διάμετρο) καλυμμένα με ένα IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (mAb Ber-EP4) ειδικό για δύο γλυκοπολυπεπτιδικά μεμβρανικά αντιγόνα (34 και 39 kDa) του επιθηλιακού δείκτη EpCAM, τα οποία εκφράζονται στους περισσότερους φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ανθρώπινους επιθηλιακούς ιστούς. Το mAb Ber-EP4 είναι τοποθετημένο πάνω σε ένα δευτερογενές αντίσωμα για βέλτιστο προσανατολισμό του Ber-EP4 πάνω στα σφαιρίδια. Αυτό το προϊόν είναι ειδικά σχεδιασμένο για τον εμπλουτισμό κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο περιφερικό αίμα.



Σχήμα 4.2. Απομόνωση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια.

#### 4.2.2 Αντιδραστήρια/υλικά

- Σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich (Dyna, Norway) σε μορφή εναιωρήματος με συγκέντρωση  $4 \times 10^8$  σφαιρίδια /mL PBS (pH 7,4) το οποίο περιέχει επίσης 0,1% BSA, και 0,02% νατραζίδιο ( $\text{NaN}_3$ ) ως συντηρητικό
- Διάλυμα έκπλυσης (PBS, το οποίο περιέχει επίσης 1% FBS, και 0,6% κιτρικό νάτριο)
- Μαγνητική συσκευή διαχωρισμού Dynal (Magnetic Particle Concentrator, MPC)

#### 4.2.3. Πειραματική πορεία

**Προετοιμασία του εναιωρήματος των PBMC:** Τα PBMC απομονώνονται από 20mL περιφερικού αίματος με διαβαθμιζόμενη φυγοκέντρηση με χρήση φικόλης, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.1. Μετά το τέλος των εκπλύσεων των μονοπύρηνων κυττάρων με PBS, καθορίζεται ο αριθμός των κυττάρων με μέτρησή τους σε αιματοκυτόμετρο τύπου Malasseze. Ακολούθως προσαρμόζεται η συγκέντρωση των PBMC στα  $1-2 \times 10^7$  κύτταρα/mL διαλύματος έκπλυσης PBS, το οποίο περιέχει 1% FBS, 0,6% κιτρικό νάτριο σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Προετοιμασία των σφαιριδίων Dynabeads Epithelial Enrich:** Για κάθε 1,00mL κυτταρικού εναιωρήματος χρησιμοποιούνται 25,0μL ( $1 \times 10^7$  σφαιρίδια) από το εναιώρημα των σφαιριδίων. Μεταφέρονται τα σφαιρίδια που απαιτούνται για όλα τα δείγματα σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5mL και εκπλένονται 2 φορές με 1mL διαλύματος έκπλυσης κάθε φορά χρησιμοποιώντας τον μαγνήτη Dynal MPC. Τέλος τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε διάλυμα έκπλυσης ίσου όγκου με αυτόν που αφαιρέθηκε αρχικά από το εναιώρημα των σφαιριδίων.

### Διαδικασία

- Προστίθενται 25,0μL από τα σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich, που είναι αναδιαλυμένα σε διάλυμα έκπλυσης, για κάθε 1,00mL εναιωρήματος PBMC και τα δείγματα τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα (Dynal) για 30min στους 2-8°C, ώστε να λάβει χώρα η πρόσδεση των καρκινικών κυττάρων στα σφαιρίδια
- Τα σωληνάρια τοποθετούνται στο μαγνήτη για 2-3min στους 2-8°C, ώστε τα μαγνητικά σφαιρίδια, όπου έχουν προσδεθεί τα κύτταρα, να μετακινηθούν στο τοίχωμα του κάθε σωληναρίου. Μετά το πρώτο λεπτό αναποδογυρίζεται ο μαγνήτης με το tube και λαμβάνονται πιθανές σταγόνες από το καπάκι
- Αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα προσεκτικά με την πιπέτα χωρίς να διαταραχθεί το αδιάλυτο των μαγνητικών σφαιριδίων. Το υπερκείμενο αυτό διάλυμα περιέχει όλα τα φυσιολογικά κύτταρα και αποτελεί το PBMC κλάσμα του κάθε δείγματος. Προστίθενται 1mL διαλύματος έκπλυσης (4°C), αφαιρούνται τα σωληνάρια από το μαγνήτη και αναδιαλύονται τα μαγνητικά σφαιρίδια, που φέρουν τα προσδεδεμένα κύτταρα, με πολλή προσοχή
- Τα υπόλοιπα σωληνάρια επανατοποθετούνται στο μαγνήτη για 3min, αφαιρείται το υπερκείμενο με προσοχή και προστίθενται εκ νέου 1mL διαλύματος έκπλυσης (4°C). Τα σωληνάρια αφαιρούνται και πάλι από το μαγνήτη και τα σύμπλοκα κυττάρων – σφαιριδίων αναδιαλύονται με προσοχή με πιπέτα, σε 1mL διαλύματος έκπλυσης (4°C).

Το ανωτέρω βήμα επαναλαμβάνεται για άλλες 3 φορές, ώστε συνολικά οι εκπλύσεις να είναι 5

- Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο μετά την προσθήκη του τελευταίου διαλύματος έκπλυσης και απομακρύνεται το υπερκείμενο
- Στο σωληνάριο με τα σύμπλοκα κυττάρων-σφαιριδίων προστίθεται 1mL αντιδραστηρίου Trizol LS (Invitrogen, USA) και ακολουθεί αναδιάλυση με την πιπέτα ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων
- Το σωληνάριο επανατοποθετείται στον μαγνήτη για 3min και αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο αποχύνεται σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf
- Αποθήκευση του δείγματος στους  $-70^{\circ}\text{C}$  προς μελλοντική απομόνωση του RNA και DNA (υποκεφάλαιο 4.8)

**Για το PBMC κλάσμα:** Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 500g, απόχυση του εναιρήματος και αναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας σε 1mL διαλύματος Trizol LS

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στα ακόλουθα:

- Κατά τη διάρκεια των διαδικασιών επώασης και έκπλυσης, είναι πολύ σημαντικό να διατηρείται κρύο το εναιώρημα των κυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) αλλά και το διάλυμα έκπλυσης, ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη μη ειδική σύνδεση φαγοκυττάρων – που φέρουν Fc υποδοχείς – στα μονοκλωνικά αντισώματα που φέρουν τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Ο χειρισμός των προσδεδεμένων κυττάρων στα σφαιρίδια πρέπει να γίνεται με πάρα πολλή προσοχή και έτσι το περιττό πιπετάρισμα πρέπει να αποφεύγεται.

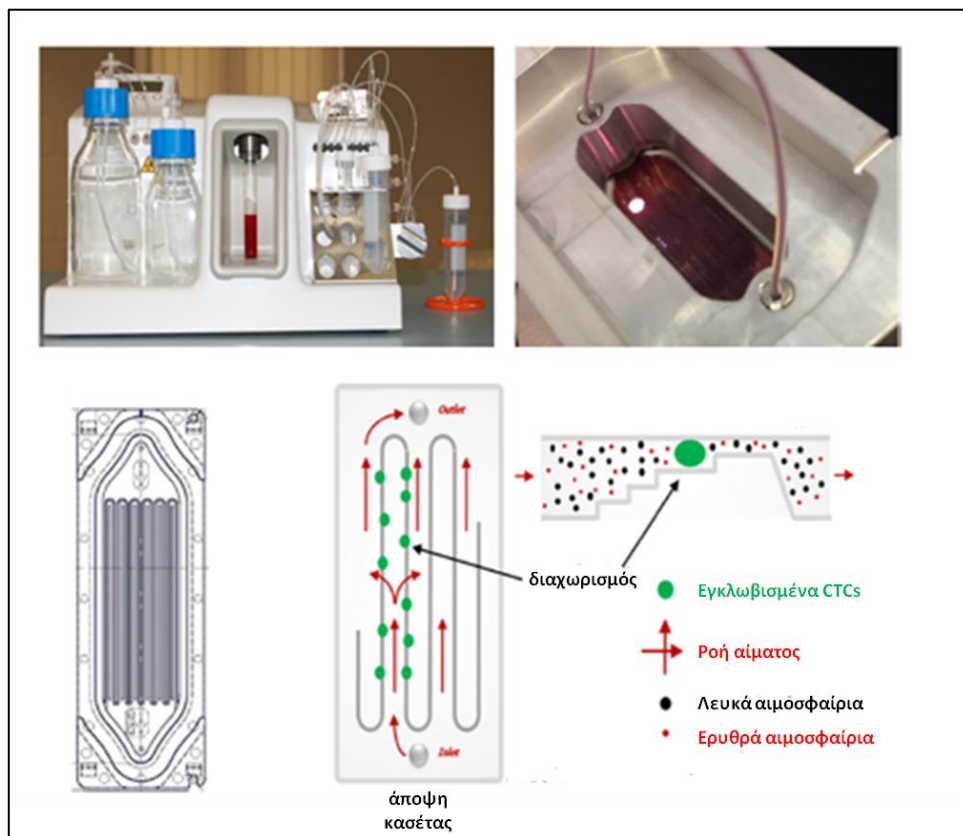
### **4.3. Απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος Parsortix (ANGLE plc, UK)**

#### **4.3.1. Αρχή μεθόδου**

Η πλατφόρμα απομόνωσης Parsortix βασίζεται σε σύστημα μικροροής (microfluidics) για την απομόνωση των CTCs με βάση το μέγεθός τους. Το σύστημα επιτρέπει τον μοριακό χαρακτηρισμό των κυττάρων με ανοσοφθορισμό αλλά και την μελέτη με μοριακές τεχνικές (77–79). Η πλατφόρμα αυτή φέρει την CE-IVD σήμανση και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα αφενός γιατί μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους καρκίνου ανεξάρτητα από την έκφραση των επιθηλιακών αντισωμάτων και αφετέρου διότι η αυτοματοποιημένη του μορφή μειώνει σημαντικά τα προ-αναλυτικά σφάλματα. Το βασικό πλεονέκτημα του συστήματος

Parsortix είναι ότι διαχωρίζει τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος ανεξάρτητα από το αν εκφράζεται ή όχι, η πρωτεΐνη EpCAM στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Σήμερα έχειδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης (Epithelial Mesenchymal Transition EMT) στην εξέλιξη της μεταστατικής διαδικασίας. Κατά την EMT, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν διαφύγει από τον πρωτοπαθή όγκο έχουν χάσει μέρος του επιθηλιακού τους χαρακτήρα και έχουν μετατραπεί μερικώς σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Η EMT η διαδικασία οδηγεί στην απορρύθμιση των επιθηλιακών δεικτών όπως είναι το EpCAM και αυξάνει την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών. Όμως, αυτός ο περιορισμός μπορεί να περιοριστεί με την απομόνωση των CTCs με μεθοδολογίες που βασίζονται στις φυσικές ιδιότητες των κυττάρων όπως είναι η πυκνότητα και το μέγεθός τους (250).

Η κασέτα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση, έχει μία δομή διαχωρισμού που περιλαμβάνει πολλαπλά κανάλια απ'τα οποία τα κύτταρα ωθούνται να διέλθουν και να οδηγηθούν σε μία τερματική διχάλα διαμέτρου 6,5μm. Τα περισσότερα κύτταρα του περιφερικού αίματος -λόγω μικρού μεγέθους- διέρχονται από αυτή την τερματική διχάλα, ενώ τα κύτταρα των οποίων το μέγεθος και η ακαμψία είναι απαγορευτική για τη διάμετρο των 6,5μm, συκρατούνται στην κασέτα. Η βασική αρχή απομόνωσης των CTCs με το σύστημα Parsortix δίνεται στο **σχήμα 4.3**.



**Σχήμα 4.3.** Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix (<http://www.angleplc.com>).

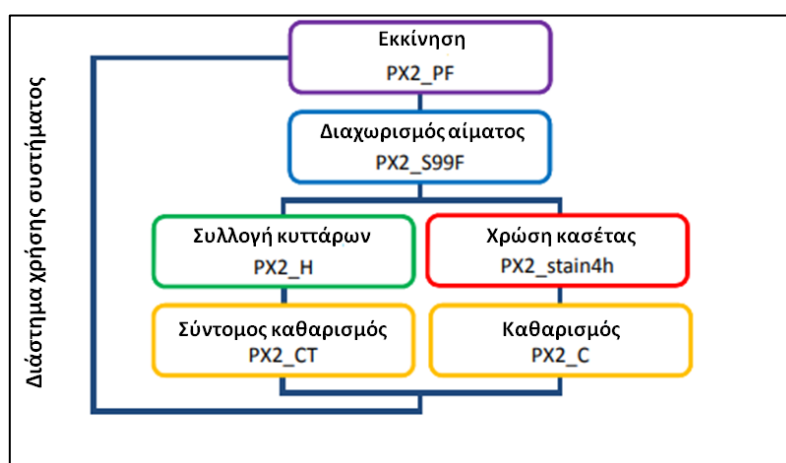


### 4.3.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Διάλυμα έκπλυσης (PBS, το οποίο περιέχει επίσης 1% FBS, και 0,6% κιτρικό νάτριο)
- Διάλυμα NaClO (10%)
- Διάλυμα έκπλυσης Decon Decomatic (10%)
- Απόλυτη αιθανόλη (100% v/v)
- Κασέτα διαχωρισμού
- Κασέτα έκπλυσης

### 4.3.3. Πειραματική πορεία

Ο εμπλουτισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσα στο σύστημα Parsortix, με χρήση λογισμικού που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Η γενική πειραματική πορεία που ακολουθείται είναι η διέλευση 10mL ολικού αίματος μέσα από την κασέτα διαχωρισμού με μία επακόλουθη έκπλυση. Αφού το δείγμα εμπλουτιστεί, πραγματοποιείται εφαρμογή ανάστροφης ροής (harvest) και τα κύτταρα αραιωμένα με 200μL διαλύματος PBS, συλλέγονται σε σωληνάριο συλλογής τύπου Eppendorf. Το πρόγραμμα συλλογής περιλαμβάνει την εφαρμογή 20 σύντομων παλμών, ώστε να απεγκλωβίσει τα δεσμευμένα στην κασέτα κύτταρα. Τέλος, τα απομονωμένα CTCs αναδιαλύονται σε 1mL διαλύματος Trizol LS (Invitrogen, USA) και αποθηκεύονται στους -70°C προς μελλοντική απομόνωση του RNA και DNA. Η σχηματική πειραματική πορεία που περιλαμβάνει τα λογισμικά της πλατφόρμας Parsortix, παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4. Πορεία εφαρμογής λογισμικών κατά τη χρήση του συστήματος απομόνωσης Parsortix

## 4.4. Απομόνωση και καταμέτρηση CTCs με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος CellSearch® (Menarini Diagnostics, Italy)

#### 4.4.1. Αρχή μεθόδου

Το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> αποτελεί μέχρι στιγμής το μοναδικό σύστημα καταμέτρησης και απομόνωσης των CTCs που έχει λάβει έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τον μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου. Με χρήση του IVD kit CELLSEARCH<sup>®</sup> Circulating Tumor Cell Kit (σχήμα 4.5α), πραγματοποιείται η καταμέτρηση CTCs επιθηλιακής προέλευσης (CD45-, EpCAM+ και CK8, 18 ή/και 19+) σε ολικό αίμα. Το σύστημα CELLTRACKS<sup>®</sup> AUTOPREP<sup>®</sup> (σχήμα 4.5α) έχει σχεδιαστεί για την τυποποίηση και αυτοματοποίηση του πρωτοκόλλου προετοιμασίας και ανάλυσης των δειγμάτων αίματος με χρήση του CELLSEARCH<sup>®</sup> Circulating Tumor Cell Kit, ενώ η ανάλυση και καταμέτρηση των CTCs πραγματοποιείται με το CELLTRACKS ANALYZER II<sup>®</sup> (σχήμα 4.5β), ένα ημιαυτόματο μικροσκόπιο φθορισμού. Το CELLSEARCH<sup>®</sup> Circulating Tumor Cell Kit περιέχει ένα αντιδραστήριο απομόνωσης των CTCs που αποτελείται από σιδηρομαγνητικό υλικό και αντιδραστήρια ανοσοφθορισμού. Το αντιδραστήριο αυτό, συνίσταται από σφαιρίδια με μαγνητικό πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από πολυμερές στρώμα επισημασμένο με αντ σώματα έναντι του EpCAM, για την απομόνωση των CTCs. Μετά την ανοσομαγνητική απομόνωση κι εμπλουτισμό, προστίθενται τα αντιδραστήρια φθορισμού που είναι επισημασμένα με αντι-CK φυκοερυθρίνη (PE, έναντι της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης CK), DAPI (για χρώση του κυτταρικού πυρήνα) και αντι-CD45 αλλοφυκοκυανίνη (APC, ειδική για λευκά αιμοσφαίρια). Το μείγμα αντιδραστηρίου/δείγματος συλλέγεται από το σύστημα CELLTRACKS<sup>®</sup> AUTOPREP<sup>®</sup> σε μία φύσιγγα (CellSearch<sup>®</sup> cartridge) που έχει εισαχθεί σε ειδική βάση (MAGNEST<sup>®</sup>). Το ισχυρό μαγνητικό πεδίο της βάσης MAGNEST<sup>®</sup> έλκει τα μαγνητικά επισημασμένα επιθηλιακά κύτταρα στην επιφάνεια της φύσιγγας. Το CELLTRACKS ANALYZER II<sup>®</sup> σαρώνει, στη συνέχεια, ολόκληρη της επιφάνεια της φύσιγγας, λαμβάνει εικόνες και μέσω ειδικού λογισμικού εμφανίζει ως συμβάν στον χρήστη όπου εντοπίζεται ταυτόχρονος φθορισμός των CK-PE και DAPI. Οι εικόνες παρουσιάζονται στον χρήστη σε μορφή έκθεσης (gallery) για τελική ταξινόμηση και καταμέτρηση από τον ίδιο. Ένα κύτταρο χαρακτηρίζεται ως καρκινικό, όταν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του συμβαδίζουν με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά καρκινικού κυττάρου και παρουσιάζεται φαινότυπος EpCAM+, CK+, DAPI+ I·E CD45-.



**Σχήμα 4.5.** Το σύστημα απομόνωσης και καταμέτρησης CTCs CellSearch®. α) Το σύστημα CELLTRACKS® AUTOPREP® και το CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit, β) το σύστημα CELLTRACKS ANALYZER II® και η έκθεση (gallery) εικόνων CTCs και γ) τα ειδικά σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος CellSave Preservative Tubes (<http://www.cellsearchctc.com>).

#### 4.4.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος CellSave Preservative Tubes (περιέχουν 300μL Na<sub>2</sub>EDTA και ειδικό συντηρητικό της μορφολογίας των κυττάρων)
- 3,0mL σιδηρομαγνητικό υγρό αντι-EpCAM: περιέχει εναιώρημα μαγνητικών σφαιριδίων 0,022% συζευγμένων με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντι-EpCAM, ρυθμιστικό διάλυμα BSA 0,03% και ProClin®300 0,05% ως συντηρητικό
- 3,0mL αντιδραστήριο χρώσης: περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού 0,0006% αντι-CK συζευγμένων με PE, αντι-CD45 0,0012% συζευγμένο με APC, ρυθμιστικό διάλυμα BSA 0,5% νατραζίδιο (NaN<sub>3</sub>) 0,1% ως συντηρητικό
- 3,0mL χρωστική DNA: περιέχει 4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 0,005% και ProClin®300 0,05% ως συντηρητικό
- 3,0mL ενισχυτικό αντιδραστήριο σύλληψης: περιέχει 0,02% ειδικού αντιδραστηρίου για την ελεγχόμενη συσσώρευση σιδηρομαγνητικού υγρού, BSA 0,5% και NaN<sub>3</sub> ως συντηρητικό
- 3,0mL αντιδραστήριο διαπερατότητας: περιέχει 0,011% ειδικό αντιδραστήριο διαπερατότητας και NaN<sub>3</sub> 0,1% ως συντηρητικό σε ρυθμιστικό διάλυμα
- 3,0mL αντιδραστήριο μονιμοποίησης κυττάρων: περιέχει 25% υλικά μονιμοποίησης, BSA 0,1% και NaN<sub>3</sub> 0,1% σε ρυθμιστικό διάλυμα
- 2x110mL αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα: περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα με NaN<sub>3</sub> 0,1%

- 16 κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης (15mL) και πώματα σωλήνων
- 16 φύσιγγες (CellSearch<sup>®</sup> cartridges) και πώματα φύσιγγων
- 20L ρυθμιστικό διάλυμα οργάνου CELLTRACKS<sup>®</sup> AUTOPREP<sup>®</sup>
- Διάλυμα NaClO 10%
- ddH<sub>2</sub>O
- CELLSEARCH<sup>®</sup> Circulating Tumor Cell Control Kit: περιέχει δύο πληθυσμούς μονιμοποιημένων κυττάρων SKBR3 σε φικόλη Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, Germany), 5% BSA και 0,1% NaN<sub>3</sub>. Τα κύτταρα έχουν δεχθεί χρώση με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες και χωρίζονται σε δύο υποπληθυσμούς, τον πληθυσμό υψηλής συγκέντρωσης που περιλαμβάνει περίπου 1000 κύτταρα/τεστ και χαμηλής συγκέντρωσης των 50 κυττάρων/τεστ

#### 4.4.3. Πειραματική πορεία

Αρχικά, το περιφερικό αίμα συλλέγεται σε ειδικά σωληνάρια CellSave Preservative Tubes των 10mL, τα οποία περιέχουν ειδικό συντηρητικό και καθιστούν δυνατή την ανάλυση έως και 96h από την αιμοληψία (σχήμα 4.5γ). Μετά την αιμοληψία, συνίσταται η αναστροφή των σωληναρίων οκτώ φορές, προς αποφυγή θρομβώσεων. Τα δείγματα μεταφέρονται στο εργαστήριο εντός 72h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα δείγματα ελέγχονται οπτικά για παρουσία θρόμβωσης, σε περίπτωση που συμβεί κάτι τέτοιο δεν προχωρά η ανάλυση.

- Αρχικά, αναμιγνύεται το αίμα στο σωληνάριο CellSave Preservative Tube, με αναστροφή πέντε φορές και αφαιρείται το ελαστικό πώμα
- Μεταφορά 7,5mL ολικού αίματος από το CellSave Preservative Tube σε αντίστοιχα σημασμένο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα φυγοκέντρωσης
- Προσθήκη 6,5mL αραιωτικού διαλύματος ανάδευσης και ανάμειξη με αναστροφή πέντε φορές
- Τοποθέτηση πώματος στον δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκέντρωση στα 800g για 10min με απενεργοποιημένο φρένο, σε φυγόκεντρο ταλαντευόμενου κάδου
- Εντωμεταξύ, πραγματοποιείται ανάδευση με vortex του CELLSEARCH<sup>®</sup> Circulating Tumor Cell control, με ακόλουθη αναστροφή πέντε φορές
- Ποσοτική μεταφορά του εναιωρήματος σε νέο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα που φέρει ετικέτα σε μορφή barcode. Λαμβάνεται με πιπέτα όλο το περιεχόμενο από το φιαλίδιο.

- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης του δείγματος, πραγματοποιείται οπτικός έλεγχος για τον πλήρη διαχωρισμό πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων
- Τοποθέτηση των κωνικών σωληνίων του δείγματος, του δείγματος ελέγχου και των φύσιγγων (CellSearch<sup>®</sup> cartridges) στο σύστημα CELLTRACKS<sup>®</sup> AUTOPREP<sup>®</sup> και εφαρμογή των αυτοματοποιημένων οδηγιών χρήσης
- Μετά την αυτόματη ανάλυση από το CELLTRACKS<sup>®</sup> AUTOPREP<sup>®</sup>, λαμβάνεται το συλλεγμένο δείγμα και control στα CellSearch<sup>®</sup> cartridges, τα οποία επωάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι για τουλάχιστον 20min
- Στη συνέχεια, η βάση MAGNEST<sup>®</sup> με τις φύσιγγες, τοποθετείται στο σύστημα CELLTRACKS ANALYZER II<sup>®</sup>, όπου λαμβάνονται οι εικόνες των συμβάντων και η τελική ταξινόμηση των κυττάρων από το χρήστη
- Η πρώτη αξιολόγηση γίνεται στο control, όπου ελέγχεται εάν η καταμέτρηση βρίσκεται εντός των ορίων αποδεκτών τιμών και κατόπιν πραγματοποιείται ο χαρακτηρισμός του δείγματος. Σε περίπτωση μη αποδεκτών τιμών του δείγματος ελέγχου, δεν προχωρά η καταμέτρηση κυττάρων του δείγματος ασθενούς και η ανάλυση απορρίπτεται
- Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως αριθμός CTCs/7,5mL ολικού αίματος. Για το μεταστατικό καρκίνο μαστού και προστάτη, τιμή μεγαλύτερη ή ίση των 5CTCs/7,5mL ολικού αίματος θεωρείται θετική, ενώ για το μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, θετικό δείγμα αναφέρεται εκείνο που έχει τιμή μεγαλύτερη ή ίση των 3CTCs/7,5mL αίματος
- Τέλος, μετά το πέρας της ανάλυσης, τα CellSearch<sup>®</sup> cartridges φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C, για μετέπειτα απομόνωση DNA

#### **4.5. Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα**

Τα δείγματα ολικού αίματος συλλέγονται σε σωληνάρια συλλογής αίματος K<sub>2</sub>EDTA (BD Vacutainer, UK) και ακολουθεί η ανάδευσή τους. Το πλάσμα απομονώνεται σε χρονικό διάστημα 2-4h από την στιγμή της αιμοληψίας και φυγοκεντρώνονται στα 530g για 10min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το διακριτό διαχωρισμό πλάσματος-ερυθρών αιμοσφαιρίων, το πλάσμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2mL κι επαναφυγοκεντρείται στα 2000g για 10min. Ακολουθεί η λήψη του υπερκείμενου υγρού και η μεταφορά του σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2mL. Τέλος, τα aliquots πλάσματος καταψύχονται στους -70°C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν.

#### **4.6. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη και φρέσκους κατεψυγμένους ιστούς**

### **4.6.1. Απομόνωση gDNA από καρκινικούς ιστούς μαστού εγκλεισμένους σε παραφίνη με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA FFPE**

#### **4.6.1.1. Αρχή μεθόδου**

Η απομόνωση του gDNA από τους εγκλεισμένους σε παραφίνη ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Germany). Εξαιτίας των διαδικασιών μονιμοποίησης και εγκλεισης, τα νουκλεϊκά οξέα στα δείγματα παραφινών είναι συνήθως κατακερματισμένα και χημικά τροποποιημένα από τη φορμαλδεΰδη. Έτσι, τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται συνήθως από δείγματα ιστών σε παραφίνη έχουν μικρότερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα που απομονώνονται από φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα ιστών. Ο βαθμός κατακερματισμού εξαρτάται από τον τύπο και την ηλικία του δείγματος καθώς και τις συνθήκες μονιμοποίησης, εγκλεισμού σε παραφίνη και φύλαξης του δείγματος. Παρόλο που οι χημικές τροποποιήσεις που προκαλούνται από την φορμαλδεΰδη δεν μπορούν να ανιχνευθούν, παρεμβαίνουν σημαντικά και επηρεάζουν τις μοριακές αναλύσεις των δειγμάτων. Το QIAamp DNA FFPE κιτ έχει σχεδιαστεί ώστε να αναστρέφει στο μέγιστο δυνατό τις χημικές τροποποιήσεις που έχει υποστεί το δείγμα ενώ οι βελτιστοποιημένες συνθήκες λύσης του δείγματος επιτρέπουν την ελαχιστοποίηση του περαιτέρω θρυμματισμού του DNA κατά την διαδικασία του καθαρισμού και της απομόνωσης. Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε gDNA από τομές παραφίνης πάχους 10mm, οι οποίες περιείχαν >80% ποσοστό καρκινικών κυττάρων.

#### **4.6.1.2. Αντιδραστήρια/ Υλικά**

Τα διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA από ιστούς μονιμοποιημένους και εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPEs) με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA FFPE της Qiagen ήταν τα εξής:

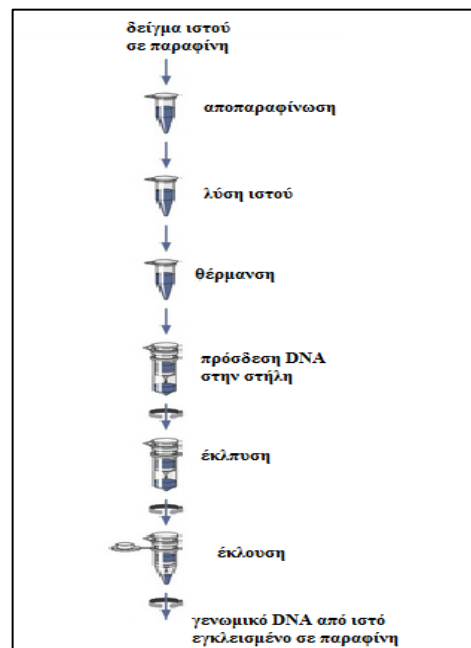
- Απόλυτη (100 % v/v) αιθανόλη
- Ξυλόλιο
- Πρωτεΐνωση K
- Διάλυμα λύσης AL (περιέχει ένυδρο χλωρίδιο της γουανιδίνης)
- Διάλυμα έκπλυσης AW1
- Διάλυμα έκπλυσης AW2
- Διάλυμα έκλυσης ATE

- Στήλες καθαρισμού (QIAamp MinElute Columns)
- Σωληνάρια συλλογής

#### 4.6.1.3. Πειραματική πορεία

- Τοποθέτηση 26-50mg ιστού σε παραφίνη σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1.5mL
- Εμβάπτιση σε ξυλόλιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min
- Εμβάπτιση διαδοχικά σε αιθανόλη 100%, 80%, 60%, 40% και τελικά σε απεσταγμένο νερό
- Πρόσθηση 200μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ιστού
- Προσθήκη 40μL διαλύματος ανασυσταμένης πρωτεΐνης K και ανάμειξη των περιεχομένων του σωληναρίου με vortex
- Ολονύχτια επώαση του σωληναρίου σε υδατόλουτρο στους 37°C
- Προσθήκη 2μL διαλύματος ανασυσταμένης πρωτεΐνης K
- Επώαση του σωληναρίου για 1h στους 55°C, όπου πραγματοποιείται η λύση του ιστού
- Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης και καλή ανάμειξη με vortex
- Επώαση του σωληναρίου για 10min στους 72°C
- Προσθήκη 100μL ισοπροπανόλης και ανάμειξη με vortex
- Μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου σε μικροστήλη συνδεδεμένη με σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
- Σύνδεσης της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
- Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα.
- Σύνδεσης της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα

- Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση σε 13.000g για 10s και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
- Τοποθέτηση της μικροστήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL
- Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης στη μικροστήλη, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70°C
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1min και συλλογή του DNA στο σωληνάριο Eppendorf.



Σχήμα 4.6. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης του γενωμικού DNA από δείγματα ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη με τη χρήση του QIAamp DNA FFPE της Qiagen

#### 4.6.2. Απομόνωση gDNA από καρκινικούς και φυσιολογικούς παρακείμενους φρέσκους ιστούς πνεύμονα με τη χρήση του εμπορικός διαθέσιμου κιτ DNeasy Blood and Tissue Kit

##### 4.6.2.1. Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του gDNA από τους ιστούς πνεύμονα (καρκινικούς και παρακείμενους μη καρκινικούς) έγινε με το Dneasy Blood & Tissue Kit της Qiagen και συγκεκριμένα με το πρωτόκολλο Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol). Τη στιγμή του χειρουργείου, όλα τα δείγματα ιστών εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους. Ο τύπος και το στάδιο του όγκου προσδιορίστηκαν ιστολογικά και οι τομές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA περιείχαν >80% ποσοστό καρκινικών κυττάρων.



#### 4.6.2.2. Αντιδραστήρια/ Υλικά

Τα διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση gDNA από φρέσκους κατεψυγμένους ιστούς, ήταν τα εξής:

- Διάλυμα λύσης (ALT)
- Πρωτεΐνάση K [600 mAU/ ml διαλύματος]
- Αιθανόλη (100% v/v)
- Διάλυμα εργασίας (AL) [περιέχει χαστροπικό άλας]
- Διάλυμα έκπλυσης 1 (AW1)
- Διάλυμα έκπλυσης 2 (AW2)
- Διάλυμα έκλουσης (AE) [10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH=9.0]
- Στήλες καθαρισμού (DNeasy Mini Spin Columns)
- Σωληνάρια συλλογής

#### 4.6.2.3. Πειραματική πορεία

- Ομογενοποιούμε ένα κομμάτι κατεψυγμένου ιστού (περίπου 25mg).
- Μεταφέρουμε τον ομογενοποιημένο ιστό σε σωληνάρια τύπου erpendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 180μL ALT buffer, 20μL πρωτεΐνάση K, ακολουθεί καλή ανάμειξη.
- Ακολουθεί επώαση στους 56°C για 1h, μέχρι να έχουμε πλήρη λύση του ιστού.
- Ανάδευση για 15s.
- Προσθέτουμε 200μL AL buffer και κάνουμε εκ νέου ανάδευση.
- Προσθέτουμε 200μL αιθανόλης (96-100%) και αναδεύουμε.
- Το μίγμα μεταφέρεται σε Dneasy μικροστήλη η οποία προηγουμένως έχει συνδεθεί με σωληνάριο συλλογής 2ml.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000g για 1min.
- Αποσυνδέουμε τη στήλη από το σωληνάριο συλλογής και συνδέουμε με καθαρό σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 500μL AW1 buffer.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000g για 1min.
- Αποσυνδέουμε τη στήλη από το σωληνάριο συλλογής και συνδέουμε με καθαρό σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 500μL AW2 buffer.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 20.000g για 3min.

- Αποσυνδέουμε τη στήλη από το σωληνάριο συλλογής και συνδέουμε με καθαρό eppendorf 1.5ml.
- Προσθέτουμε 200μL AE buffer κατευθείαν στη Dneasy μεμβράνη.
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000g (8.000 rpm) για 1min.

#### **4.7. Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα**

##### **4.7.1 Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ High Pure Viral Nucleic Acid**

###### **4.7.1.1. Αρχή μεθόδου**

Για την απομόνωση εξωκυττάριου καρκινικού DNA από πλάσμα ή ορό, είναι εμπορικά διαθέσιμα αρκετά κιτ αντιδραστηρίων τα οποία στηρίζονται στη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης με ακινητοποίηση σε μεμβράνη πυριτίου για τον καθαρισμό και την ανάκτηση του ctDNA. Το κιτ High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics, Switzerland), αρχικά είχε σχεδιασθεί για την απομόνωση ιικού DNA. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση ctDNA από 200μL αρχικού όγκου πλάσματος.

###### **4.7.1.2. Αντιδραστήρια/ Υλικά**

Διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ctDNA από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ High Pure Viral Nucleic Acid της Roche.

- Απόλυτη (100% v/v) αιθανόλη
- Πρωτεΐνάση K
- PolyA
- Ρυθμιστικό διάλυμα αναστολέα (Inhibitor Buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (Binding buffer)
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης (Elution Solution)
- Στήλες καθαρισμού
- Σωληνάρια συλλογής

### 4.7.1.3. Πειραματική πορεία

Πριν την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης απαιτείται η παρασκευή του διαλύματος εργασίας (ανά 6 δείγματα) κατά την οποία σε ένα αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου Eppendorf προστίθενται 1.250μL διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer) και 25μL polyA και ακολουθεί καλή ανάδευση.

- Προσθήκη 200μL πλάσματος και 200μL διαλύματος εργασίας σε αποστειρωμένο Eppendorf
- Ανάδευση σε vortex
- Προσθήκη 50μL Πρωτεΐνάσης K και ανάδευση σε vortex
- Επώαση στους 72°C σε θερμομπλόκ για 10min
- Προσθήκη 100μL διαλύματος πρόσδεσης και ανάδευση σε vortex
- Ποσοτική μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου στην ειδική στήλη δέσμευσης, η οποία έχει τοποθετηθεί στο σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1 min
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη καινούργιου
- Προσθήκη 500μL διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέα (Inhibitor Removal Buffer)
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1min
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη νέου
- Προσθήκη 450μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer)
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1min
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη νέου
- Προσθήκη 450μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer)
- Φυγοκέντρηση στα 8.000g για 1min
- Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf
- Προσθήκη 50μL διαλύματος έκλυσης στο κέντρο της μεμβράνης με προσοχή χωρίς να αγγίξει το ρύγχος της πιπέτας
- Φυγοκέντρηση για 1min στα 8.000g, συλλογή του διηθήματος (το οποίο περιέχει το DNA) και φύλαξη στους -20°C.

### 4.7.2 Απομόνωση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp Circulating Nucleic Acid

#### 4.7.2.1. Αρχή μεθόδου

Το κιτ QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Germany) επιτυγχάνει την αποτελεσματική απομόνωση και καθαρισμό κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιώντας ως αρχικό όγκο 1, 2 ή 3mL δειγμάτων πλάσματος ή ορού. Η τεχνολογία του στηρίζεται στη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης με ακινητοποίηση σε μεμβράνη πυριτίου, εφαρμόζοντας πίεση  $-800$  έως  $-900\text{mbar}$  μέσω αντλίας κενού. Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε ctDNA από 2mL πλάσματος.

#### 4.7.2.2. Αντιδραστήρια/ Υλικά

Διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση cfDNA από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp Circulating Nucleic Acid της Qiagen.

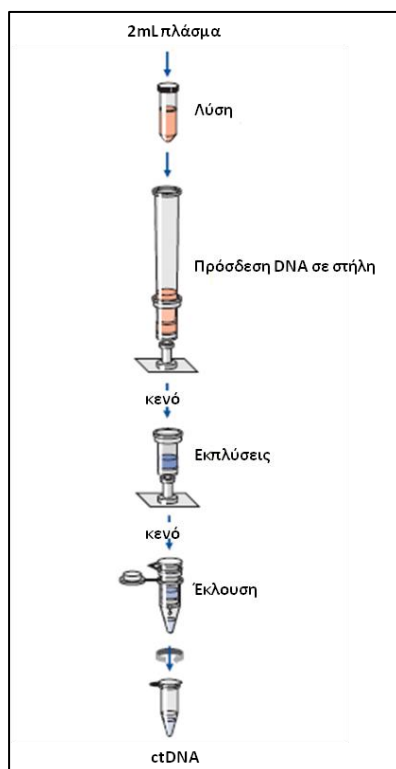
- Απόλυτη (100% v/v) αιθανόλη
- Πρωτεΐνάση K
- Carrier RNA
- Διάλυμα λύσης ACL\*
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης ACB\*
- Διάλυμα έκπλυσης ACW1\*
- Διάλυμα έκπλυσης ACW2
- Διάλυμα έκλουσης AVE
- Στήλες καθαρισμού (QIAamp® Mini columns)
- Σωληνάρια επέκτασης
- Σωληνάρια συλλογής

\*Περιέχουν χαοτροπικό άλας (ένυδρο χλωρίδιο της γουανιδίνης)

#### 4.7.2.3. Πειραματική πορεία

- Προσθήκη 200μL πρωτεΐνάσης K σε σωλήνα φυγοκέντρησης 50mL τύπου falcon
- Προσθήκη 2mL πλάσματος και 1,6mL διαλύματος λύσης ACL στον ανωτέρω σωλήνα
- Ανάδευση σε vortex και επώαση σε υδρόλουτρο στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 30min
- Προσθήκη 3,6mL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης ACB και ανάδευση σε vortex για 15-30sec
- Τοποθέτηση του σωλήνα τύπου falcon στον πάγο για 5min

- Σύνδεση της στήλης καθαρισμού με το σωληνάριο επέκτασης και εφαρμογή τους στην αντλία κενού
- Μεταφορά του περιεχομένου του σωλήνα τύπου falcon στο σωληνάριο επέκτασης και άνοιγμα της αντλίας
- Όταν όλο το περιεχόμενο διέλθει από το σωληνάριο επέκτασης και τη μικροστήλη καθαρισμού, κλείσιμο της αντλίας και επαναφορά της πίεσης στα 0mbar
- Ακολουθεί απόρριψη του σωληναρίου επέκτασης, προσθήκη 600μL διαλύματος έκπλυσης ACW1 στην στήλη και εκ νέου άνοιγμα της αντλίας
- Όταν όλο το περιεχόμενο διέλθει από τη μικροστήλη καθαρισμού, κλείσιμο της αντλίας και εκτόνωση της πίεσης στα 0mbar
- Προσθήκη 750μL διαλύματος έκπλυσης ACW2 στην στήλη και εκ νέου άνοιγμα της αντλίας
- Όταν όλο το περιεχόμενο διέλθει από τη μικροστήλη καθαρισμού, κλείσιμο της αντλίας και εκτόνωση της πίεσης στα 0mbar
- Προσθήκη 750μL απόλυτης αιθανόλης στην στήλη και εκ νέου άνοιγμα της αντλίας
- Επαναφορά της πίεσης στα 0mbar, αποσύνδεση της στήλης καθαρισμού από την αντλία και τοποθέτησή της σε σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρωση στα 20.000g για 3min, επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής και επώαση στους 56°C σε θερμομπλόκ για 10min με ανοιχτό καπάκι
- Τοποθέτηση της μικροστήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 30μL διαλύματος έκπλυσης AVE στο κέντρο της μεμβράνης, χωρίς να ακουμπήσει το ρύγχος της πιπέτας
- Επώαση για 3min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στα 20.000g για 1min, συλλογή του διηθήματος (το οποίο περιέχει το ctDNA) και αποθήκευσή του στους -70°C.



Σχήμα 4.7. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης ctDNA από δείγματα πλάσματος με τη χρήση του QIAamp Circulating Nucleic Acid της Qiagen

## 4.8. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS

### 4.8.1. Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του ολικού RNA, τόσο από τα κύτταρα που έχουν προσδεθεί στα ανοσομαγνητικά σφαιρίδια όσο και από τα φυσιολογικά κύτταρα που υπάρχουν στο υπερκείμενο, πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol. Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη. Κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων του δείγματος το αντιδραστήριο Trizol διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ λύνει τα κύτταρα και διαλύει τα κυτταρικά συστατικά. Η ισοθειοκυανική γουανιδίνη, η οποία είναι ένας ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας, συμβάλλει στη λύση των κυττάρων, βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA και ταυτόχρονα αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή επιτρέπει την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Η προσθήκη χλωροφορμίου ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση διαχωρίζει το διάλυμα σε μία υδατική φάση και σε μία οργανική φάση. Το RNA έχει την ιδιότητα να παραμένει αποκλειστικά στην υδατική φάση σε ένα διάλυμα που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη υπό την παρουσία μίας οργανικής φάσης

από φαινόλη/χλωροφόρμιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA (50b – 10Kb) βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση. Στην παρούσα εργασία, η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση DNA από EpCAM+ κλάσματα κυττάρων περιφερικού αίματος, DNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix και DNA από τις κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7, SKBR3 και MDA-MB-231.

#### 4.8.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen, USA)
- 100% v/v αιθανόλη
- 75% v/v αιθανόλη (σε DEPC-H<sub>2</sub>O)
- 0,1M κιτρικό νάτριο σε 10% v/v αιθανόλη
- 8mM NaOH

#### 4.8.3. Πειραματική πορεία

Παρακάτω παρατίθεται αναλυτικά η πειραματική πορεία της απομόνωσης DNA από Trizol:

##### ➤ Καταβύθιση DNA

1. Αφαίρεση του υδατικού διαλύματος που περιέχει το RNA (αποθήκευση στους -70°C και περαιτέρω αξιοποίηση για μελέτες RNA).
2. Προσθήκη 300μL 100 % v/v αιθανόλης για 1mL Trizol. Ανάδευση
3. Επώαση στους 15-30°C για 2-3 min
4. Φυγοκέντρηση για 5min στα 2.000g στους 4°C

##### ➤ Έκπλυση DNA

5. Προσεκτική απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης (φαινόλης/αιθανόλης) και φύλαξη αυτής για απομόνωση πρωτεΐνης
6. Πλύση με 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη. Χρήση 1mL κιτρικού νατρίου για κάθε 1mL Trizol. Καλή ανάμειξη
7. Επώαση στους 15-30°C για 30 min με περιοδική ανακίνηση
8. Φυγοκέντρηση για 5 min στα 2.000g στους 4°C. Απόχυση του υπερκείμενου
9. Επανάληψη των σταδίων 6-8
10. Ανασύσταση του ιζήματος σε 75% αιθανόλης (1mL 75% αιθανόλης για 1mL Trizol)
11. Επώαση στους 15-30°C για 15-20 min με περιοδική ανακίνηση
12. Φυγοκέντρηση στα 2.000g για 5 min στους 4°C.

Μια επιπλέον πλύση με 0,1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη απαιτείται για μεγάλα ιζήματα που περιέχουν >200mg DNA ή για μεγάλες ποσότητες από μη DNA υλικό.

➤ Διαλυτοποίηση DNA

13. Απομάκρυνση της αιθανόλης έκπλυσης. Τοποθέτηση του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε θερμικό μπλοκ στους 56°C με ανοιχτό καπάκι, μέχρι να εξατμισθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης.

14. Ανασύσταση του ιζήματος σε 30μL NaOH 8mM.

15. Φυγοκέντρωση στα 12.000g για 10min στους 4°C.

16. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το DNA σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5ml.

17. Αποθήκευση του υλικού στους -70°C.

## 4.9. Απομόνωση DNA με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA Micro

### 4.9.1. Αρχή μεθόδου

Το κιτ QIAamp DNA Micro (Qiagen, Germany) έχει σχεδιασθεί για την απομόνωση και καθαρισμό gDNA από δείγματα μικρού όγκου, εκμεταλλευόμενο τις ιδιότητες πρόσδεσης σε μεμβράνη πυριτίου. Στην παρούσα εργασία, το κιτ χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση gDNA από CTCs και WBCs (προ-επισημασμένα με αντισώματα έναντι των CD45, pan-CK και DAPI), τα οποία λήφθηκαν από τα CellSearch® cartridges, καθώς και gDNA από τις κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7 και SKBR3. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στα παραπάνω δείγματα είναι το Isolation of Genomic DNA from Small Volumes of Blood.

### 4.9.2. Αντιδραστήρια/υλικά

Διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση gDNA από CTCs με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA Micro της Qiagen.

- Απόλυτη (100% v/v) αιθανόλη
- Πρωτεΐνάση K
- Carrier RNA
- Διάλυμα λύσης ATL
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης AL\*
- Διάλυμα έκπλυσης AW1



- Διάλυμα έκπλυσης AW2
  - Διάλυμα έκλουσης AVE
  - Στήλες καθαρισμού (QIAamp MinElute® columns)
  - Σωληνάρια συλλογής
- \*Περιέχουν χαοτροπικό άλας (ένυδρο χλωρίδιο της γουανιδίνης)

#### 4.9.3. Πειραματική πορεία

- Μεταφορά του περιεχομένου του CellSearch® cartridge σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL
- Προσθήκη Buffer ATL μέχρι τον τελικό όγκο των 100  $\mu$ L.
- Προσθήκη 10 $\mu$ L πρωτεΐνάσης K
- Προσθήκη 100 $\mu$ L Buffer AL και ανάδευση με vortex έως ότου σχηματιστεί ομογενές διάλυμα
- Επώαση στους 56°C για 10min, με ενδιάμεση ανάδευση του διαλύματος
- Σύντομη φυγοκέντρηση του σωληναρίου για την απόρριψη εναπομείνοντων σταγόνων από το καπάκι
- Προσθήκη 50 $\mu$ L απόλυτης αιθανόλης (100%) και ανάδευση για 15s. Ακολουθεί επώαση για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σύντομη φυγοκέντρηση του σωληναρίου για την απόρριψη εναπομείνοντων σταγόνων από το καπάκι
- Προσεκτική μεταφορά του εναιωρήματος στη μικροστήλη τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση στα 6.000g για 1min.
- Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500 $\mu$ L Buffer AW1 χωρίς να διαβραχεί το χείλος της
- Φυγοκέντρηση στα 6.000g για 1min και επανατοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής.
- Προσθήκη 500 $\mu$ L Buffer AW2 χωρίς να διαβραχεί το χείλος της στήλης και φυγοκέντρηση στα 6.000g για 1min.
- Τοποθέτηση της μικροστήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση στα 20.000g για 3min, ώστε η μεμβράνη να στεγνώσει τελείως
- Μεταφορά της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 30 $\mu$ L Buffer AE.

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρηση στα 20.000g για άλλο 1min και συλλογή του διηθήματος
- Αποθήκευση του υλικού στους  $-70^{\circ}\text{C}$ .

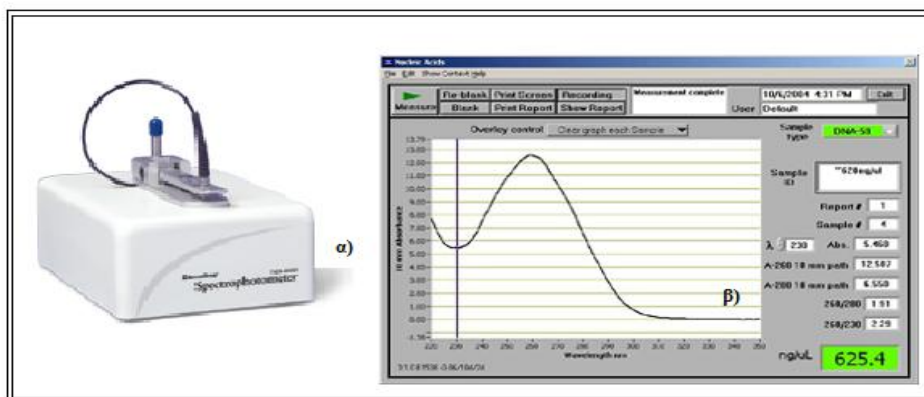
## 4.10. Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA

### 4.10.1. Αρχή μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA έγινε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer. Το Nanodrop-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) είναι ένα φασματοφωτόμετρο (220-275nm) ειδικό για μέτρηση DNA/RNA καθώς σε βιολογικά δείγματα απαιτεί 1μL δείγματος για να μετρήσει με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Με την χρήση του Nanodrop καταργείται η χρήση των κυψελίδων, καθώς έχει την ικανότητα να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις, χωρίς να χρειάζεται αραιώση του δείγματος (50X μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο) κι επιπλέον δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης του δείγματος (σχήμα 4.8α). Το όριο ανίχνευσης είναι 2ng/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 ο λόγος  $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ , για το DNA, ενώ μία αναλογία  $\sim 2.0$  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. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA φαίνεται στο σχήμα 4.8β.

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το ND-1000 είναι τα ακόλουθα:

1. Είναι σχεδιασμένο ώστε να αναλύει μικρή ποσότητα δείγματος (1μL).
2. Διαθέτει μεγάλο δυναμικό εύρος: 2-3.700ng/μL (dsDNA) σε ένα μόνο δείγμα.
3. Έχει την δυνατότητα μέτρησης υψηλών τιμών απορρόφησης με αξιοπιστία.
4. Ευρύ φάσμα μέτρησης απορρόφησης (200-750nm).
5. Η ταχύτητα μέτρησης διαρκεί μόλις 10s.
6. Δεν χρησιμοποιούνται κυψελίδες και τριχοειδή σωληνάκια.
7. Επανακτάται το προϊόν.
8. Έχει μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να εγκατασταθεί σε οποιοδήποτε πάγκο εργασίας.



Σχήμα 4.8. α) Φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 UV-Vis β) Χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA

#### 4.10.2. Πειραματική πορεία

- Τοποθετείται 1μL από το δείγμα με προσοχή για αποφυγή φυσαλίδων στην κατάλληλη θέση
- Το δείγμα συγκρατείται στη θέση του εξαιτίας της επιφανειακής τάσης που αναπτύσσεται μεταξύ της ειδικής θέσης και του βραχίονα του μηχανήματος
- Ακολουθεί η απορρόφηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA στο δείγμα.
- Στη συνέχεια καθαρίζεται η θέση και εισάγεται το επόμενο δείγμα
- Το μηχάνημα αυτόματα ανιχνεύει την συγκέντρωση του DNA στο δείγμα.

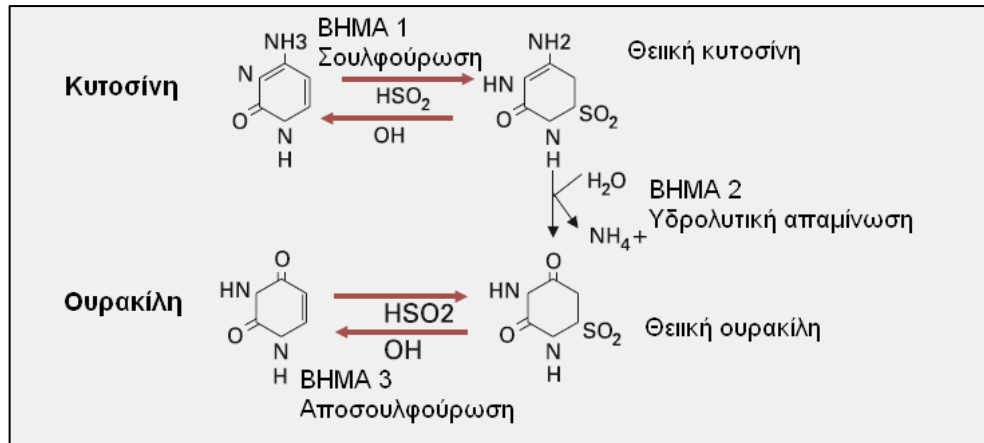
Συνίσταται η ετήσια βαθμονόμηση του οργάνου με το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρότυπο διάλυμα CF-1 (υδατικό διάλυμα  $K_2Cr_2O_7$ ).

#### 4.11. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

##### 4.11.1. Αρχή μεθόδου

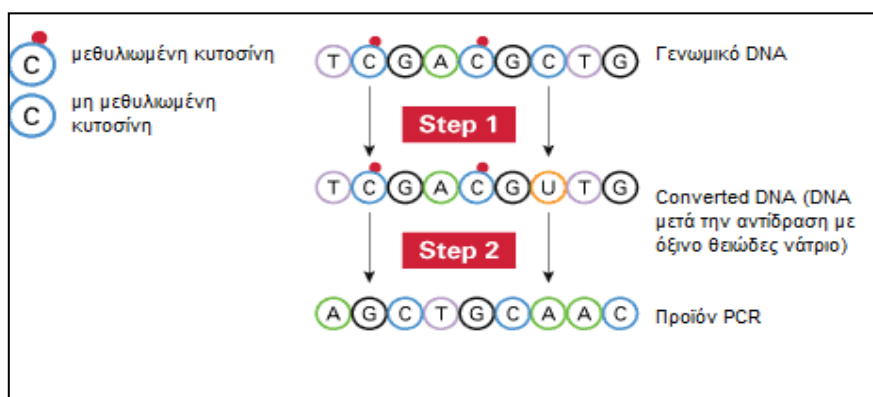
Κατά την επεξεργασία του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο, οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες (C) μετατρέπονται σε ουρακίλες (U), ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες (σχήμα 4.9). Με βάση την αρχή αυτή προκύπτει ότι μετά την χημική μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο το DNA παύει να είναι δίκλωνο αφού δεν είναι πλέον συμπληρωματικό με τον άλλο κλώνο. Στην συνέχεια με ενίσχυση μέσω ειδικής PCR για ανίχνευση μεθυλίωσης (Methylation-specific PCR, MSP), οι ουρακίλες αντικαθίστανται από θυμίνες και οι μεθυλοκυτοσίνες αντικαθίστανται από κυτοσίνες. Η προκύπτουσα ακολουθία του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της μεθυλίωσης στο αρχικό, μη επεξεργασμένο με όξινο θειώδες νάτριο DNA. Είναι σημαντικό ότι όλες οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε

αυτήν την πορεία. Επομένως, οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες που δεν βρίσκονται σε νησίδες CpG μετατρέπονται σε ουρακίλες και εν συνεχεία σε θυμίνες.



Σχήμα 4.9. Χημική αντίδραση της μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη.

Μέσω κατάλληλων εκκινήτων η PCR μπορεί τότε να σχεδιαστεί να ενισχύσει επιλεκτικά μια από τις δυο αλυσίδες του DNA και όχι και τις δυο. Ως εκ τούτου, η ενίσχυση της μιας αλυσίδας του DNA απαιτεί διαφορετικούς εκκινήτες από την ενίσχυση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA στην ίδια περιοχή. Δεδομένου ότι οι νησίδες CpG είναι παλίνδρομες, πληροφορίες για τη μεθυλίωση μπορούν να εξαχθούν από την ανάλυση καθεμιάς από τις δυο αλυσίδες, ή και των δυο σε ξεχωριστές αντιδράσεις. Έτσι, η μια αλυσίδα θα είναι αντίστοιχη της αρχικής γενωμικής ακολουθίας του DNA και θα είναι πλούσια σε βάσεις G:T σε περίπτωση που η αρχική ακολουθία ήταν πλούσια σε G:C. Η άλλη αλυσίδα του προϊόντος της PCR θα είναι πλούσια σε βάσεις A ή πλούσια σε C:A (σχήμα 4.10). Στην παρούσα εργασία μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο έγινε, ως επί το πλείστον με το EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του παραπάνω kit με το EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) και χρήση και των δύο για τη μελέτη της ακρίβειας κι επαναληψιμότητας αλληλούχισης του επιγονιδιώματος. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των πρωτοκόλλων απαιτείται πολύ μεγάλη προσοχή και τήρηση ειδικών συνθηκών προφύλαξης, καθώς υπάρχει πάντα ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό, η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, που είναι αποκλειστικής χρήσης για την προετοιμασία της αντίδρασης αυτής. Επίσης, για τον έλεγχο της καθαρότητας των αντιδραστηρίων χρησιμοποιείται κάθε φορά ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου ( $\text{H}_2\text{O}$ ), το οποίο έπειτα χρησιμοποιείται ως αρνητικό δείγμα ελέγχου στην αντίδραση της PCR.



**Σχήμα 4.10.** Επεξεργασία με όξινοθειώδες νάτριο : 1) Το όξινοθειώδες νάτριο μετατρέπει τη μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη σε ουρακίλη 2) Ενίσχυση με PCR οδηγεί στην αντικατάσταση της ουρακίλης από θυμίνη

#### 4.11.2. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινοθειώδες νάτριο με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ EZ DNA Methylation Gold

Τα δείγματα καρκίνου μαστού, μη-μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα, κεφαλής και τραχήλου, καθώς και οι κυτταρικές σειρές/πρότυπα για τη μελέτη σταθερότητας τροποποιήθηκαν χημικά με χρήση του EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA).

##### 4.11.2.1. Αντιδραστήρια/υλικά

Η συσκευασία περιλαμβάνει τα έτοιμα προς χρήση ακόλουθα διαλύματα και αναλώσιμα υλικά:

- Αντιδραστήριο μετατροπής CT
- Διάλυμα αραίωσης
- Διάλυμα διαλυτοποίησης
- Διάλυμα πρόσδεσης
- Διάλυμα έκπλυσης
- Διάλυμα αποσουλφονίωσης
- Διάλυμα έκλυσης
- Στήλες καθαρισμού (Zymo-Spin IC)
- Σωληνάρια συλλογής

##### 4.11.2.2. Πειραματική πορεία

Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου απαιτείται η παρασκευή του αντιδραστηρίου μετατροπής CT. Πιο συγκεκριμένα, στο παρεχόμενο CT Conversion reagent (σε στερεά μορφή σε δέκα σωληνάρια που καθένα επιτρέπει δέκα αντιδράσεις μετατροπής) προσθέτουμε 900μL ύδατος

DNA-free, 50μL διαλύματος διαλυτοποίησης και 300μL διαλύματος αραίωσης και ανακινούμε για 10min.

- Προσθέτουμε 130μL CT Conversion Reagent solution σε 20μl του δείγματος DNA σε σωληνάκια (η συγκέντρωση του DNA μπορεί να είναι 500pg μέχρι 2μg, με βέλτιστη συγκέντρωση τα 200-500ng)
- Αν το δείγμα έχει όγκο μικρότερο των 20μL συμπληρώνουμε με H<sub>2</sub>O DNA-free (water for injections)
- Ακολουθεί ανάμειξη
- Τοποθετούμε το δείγμα σε θερμικό κυκλοποιητή με το παρακάτω σύντομο πρόγραμμα που αναγράφεται στις οδηγίες του κατασκευστή
  - 98°C για 10min
  - 64°C για 150min
  - Αποθήκευση στους 4°C
- Ακολουθεί προσθήκη 600μL M-Binding Buffer σε μικροστήλη Zymo-Spin IC, προσθήκη του δείγματος και ανάμειξη με περιστροφή του σωληναρίου αρκετές φορές
- Φυγοκέντρωση στα 12.100g για 30s και απορρίπτουμε το διήθημα
- Προσθέτουμε 200μL διαλύματος απομάκρυνσης των θειωδών ιόντων στη μικροστήλη και το αφήνουμε να σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (20°C – 30°C) για 15-20min
- Φυγοκεντρούμε στα 12.100g για 30s
- Προσθέτουμε 200μL διαλύματος έκπλυσης στη μικροστήλη.
- Φυγοκέντρωση στα 12.100g για 30s
- Προσθέτουμε εκ νέου 200μL διαλύματος έκπλυσης στη μικροστήλη.
- Φυγοκέντρωση στα 12.100g για 30s
- Προσθέτουμε 10μL διαλύματος έκλουσης στη μικροστήλη και την τοποθετούμε σε νέο σωληνάριο των 1,5mL
- Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 30sec, ώστε να συλλέξουμε το DNA
- Ακολουθεί αποθήκευση του δείγματος στους -70°C για μετέπειτα χρήση

#### **4.11.3. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ EpiTect Fast Bisulfite**

Το EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) χρησιμοποιήθηκε, στην παρούσα διατριβή, για τη μελέτη συμβατότητας με εμπορικά διαθέσιμο κιτ το οποίο πραγματοποιεί αλληλούχηση του

επιγονιδιώματος. Τα δείγματα που τροποποιήθηκαν με αυτό το κιτ είναι κυτταρικές σειρές μαστού και τα εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα placental DNA και 100% μεθυλιωμένο DNA.

#### 4.11.3.1. Αντιδραστήρια/υλικά

- 100% v/v αιθανόλη
- Carrier RNA
- Διάλυμα όξινου θειώδους νατρίου (αντιδραστήριο μετατροπής)
- Ρυθμιστικό διάλυμα προστατευτικό για το DNA (περιέχει δείκτη)
- Διάλυμα BL (περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη)
- Διάλυμα έκπλυσης BW
- Διάλυμα BD (περιέχει NaOH)
- Διάλυμα έκλουσης EB
- Στήλες καθαρισμού (MinElute® DNA spin columns)
- Σωληνάρια συλλογής

#### 4.11.3.2. Πειραματική πορεία

Το πρωτόκολλο αυτό επιτρέπει την χημική κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο σε ποσότητες DNA από 1ng–2μg σε συνολικό όγκο 20μL (υψηλές συγκεντρώσεις) ή 1–500ng σε συνολικό όγκο 40μL (χαμηλές συγκεντρώσεις). Η διαδικασία που ακολουθείται για τα υψηλών συγκεντρώσεων ή χαμηλών συγκεντρώσεων δείγματα διαφοροποιείται μόνο στη ρύθμιση του όγκου της αρχικής αντίδρασης μετατροπής (Πίνακας 4.2). Όλα τα υπόλοιπα στάδια του πρωτοκόλλου παραμένουν ίδια.

Πίνακας 4.2. Ρύθμιση αρχικού όγκου αντίδρασης μετατροπής

Αντιδραστήριο	Υψηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων (1ng–2μg)	Χαμηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων (1–500ng)
	Όγκος ανά αντίδραση (μL)	Όγκος ανά αντίδραση (μL)
DNA	Μεταβλητός (μέγιστο 20 μL)	Μεταβλητός (μέγιστο 40 μL)

H <sub>2</sub> O (RNAase-free)	Μεταβλητός	Μεταβλητός
Διάλυμα όξινου θειώδους νατρίου	85	85
Ρυθμιστικό διάλυμα προστασίας DNA	35	15
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>140</b>	<b>140</b>

- Προετοιμασία του αρχικού όγκου αντίδρασης σε σωληνάρια PCR των 200μL και ανάμειξη μέχρι το χρώμα του διαλύματος από πράσινο να γίνει μπλε
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθέτηση του δείγματος σε θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με το παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα:
  - 95°C για 5min
  - 60°C για 20min
  - 95°C για 5min
  - 60°C για 20min
  - Αποθήκευση στους 20°C
- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση των PCR σωληναρίων και μεταφορά του εναιωρήματος σε καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL
- Προσθήκη 310μL διαλύματος BL που περιέχει 10μg/ml carrier RNA, ανάδευση με vortex και σύντομη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη 250μL απόλυτης αιθανόλης, ανάδευση με vortex για 15sec και σύντομη φυγοκέντρηση για την απόρριψη σταγόνων από το καπάκι
- Μεταφορά όλου του εναιωρήματος στη μικροστήλη καθαρισμού και φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min
- Απόχυση του διηθήματος και τοποθέτηση νέου σωληναρίου συλλογής
- Προσθήκη 500μL διαλύματος έκπλυσης BW και φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min
- Απόχυση του διηθήματος και τοποθέτηση νέου σωληναρίου συλλογής
- Προσθήκη 500μL διαλύματος BD και επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου με κλειστό το καπάκι της στήλης ώστε να αποφευχθεί οξείδωση
- Φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min, απόχυση του διηθήματος και τοποθέτηση σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη 500μL διαλύματος έκπλυσης BW και φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min
- Επανάληψη του παραπάνω βήματος



- Προσθήκη 250μL απόλυτης αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min
- Επανατοποθέτηση των στηλών σε νέα σωληνάρια συλλογής κι επαναφυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min για απομάκρυνση όλων των υγρών
- Τοποθέτηση της μικροστήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL και επώαση στους 60°C για 5min με ανοιχτό καπάκι
- Τοποθέτηση της μικροστήλης σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL και προσθήκη 10μL διαλύματος έκλουσης EB στο κέντρο της μεμβράνης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρηση στα 12.100g για 1min, ώστε να συλλέξουμε το DNA
- Αποθήκευση του δείγματος στους -70°C για μετέπειτα χρήση

#### 4.11.4. Οργανολογία

Όλη η προετοιμασία της τροποποίησης του DNA με όξινο θειώδες νάτριο λαμβάνει χώρα σε ειδικό χώρο (PCR hood), όπως αυτή στο παρακάτω σχήμα (4.11.α), όπου αποστειρώνονται τα μικροσιφόνια (πιπέτες), τα σωληνάρια PCR των 200μL και ρύγχι πιπετών (filter tips) μέσω της UV ακτινοβολίας.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιείται θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler<sup>®</sup> pro, Eppendorf). Η μονάδα αυτή διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια PCR των 0,2mL (μέγιστος αριθμός σωληναρίων 96) και μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των +4°C και 99°C, χωρίς τη χρήση εξωτερικών παροχών εκτός του βασικού ενισχυτή ηλεκτρικού ρεύματος. Το Mastercycler<sup>®</sup> προγραμματίζεται μέσω ψηφιακού πληκτρολογίου και έκθεσης εικόνας LCD και έχει τη δυνατότητα αποθήκευσης πάνω από 700 προγράμματα. Ο ρυθμός ψύξης και θέρμανσης ποικίλλει και προσδιορίζεται είτε σε °C ή Fahrenheit ανά λεπτό. Το συγκεκριμένο μοντέλο διαθέτει θερμαινόμενο κάλυμμα, το οποίο συγχρονίζεται άριστα με την κυρίως βάση, ώστε να αποφεύγεται ενδεχόμενη εξάτμιση των δειγμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες (σχήμα 4.11.β).



Σχήμα 4.11. α) Θάλαμος προετοιμασίας αντιδράσεων PCR (PCR hood), β) Θερμικός κυκλοποιητής DNA (Mastercycler® pro, Eppendorf)

#### 4.12. Μέθοδος ενζυμικού πολλαπλασιασμού ολόκληρου του επιγονιδιώματος (WGA-Whole Genome Amplification) με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου EpiTect Whole Bisulfite Kit

##### 4.12.1. Αρχή μεθόδου

Το EpiTect Whole Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) παρέχει την εξαιρετικά ομοιόμορφη ενίσχυση του SB-treated DNA με αξιόπιστο τρόπο. Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνολογία ενίσχυσης πολλαπλών μεταθέσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA), με χρήση DNA πολυμεράσης που είναι ικανή να αναδιπλασιάζεται μέχρι 100kb χωρίς να διαχωρίζεται από το εκμαγείο. Οι τεχνικές ισοθερμικής ενίσχυσης περιλαμβάνουν την ενίσχυση πολλαπλών μεταθέσεων (Multiple Displacement Amplification, MDA) που βασίζεται στις ιδιότητες ενίσχυσης μετατόπισης κλώνου της Φ29 DNA πολυμεράσης παρουσία τυχαίων εξαμερών εκκινήτων. Βασίζεται στην υβριδοποίηση τυχαίων εξαμερών εκκινήτων στο αποδιαταγμένο DNA, η οποία ακολουθείται από συνεχή αντικατάσταση των συντιθέμενων κλώνων από νέες σε σταθερή θερμοκρασία με αποτέλεσμα να αυξάνεται σταδιακά ο αριθμός των γεγονότων εκκίνησης, να δημιουργείται ένα δίκτυο διακλαδισμένων δομών και να παράγονται μόρια υψηλού μοριακού βάρους. Η ισόθερμη αντίδραση, όπου πραγματοποιείται η ενίσχυση, καταλύεται από το ένζυμο Φ29 DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση προσθέτει κατά μέσο όρο 70.000 νουκλεοτίδια κάθε φορά που συνδέεται στον εκκινήτη και στο εκμαγείο. Η φ29 παρέχει μία υψηλής πιστότητας αντιγραφή εξαιτίας της δράσης της 3'-5' εξωνουκλεάσης και της ικανότητας επιδιόρθωσης με πολύ χαμηλό ποσοστό σφάλματος. Η μέθοδος MDA έχει χαμηλότερο σφάλμα ενίσχυσης σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδιώματος που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα (251).

Κατά την χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, οι μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, όμως η ποιότητα του λαμβανόμενου SB-treated DNA διακυβεύεται λόγω θραυσματοποίησης. Το EpiTect Whole Bisulfite Kit, έχει σχεδιασθεί για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ακόμα και μικρότερου μεγέθους θραυσμάτων DNA, διατηρώντας πιστή την αντιγραφή τέτοιου είδους αλληλουχιών, όπως για παράδειγμα το SB-treated DNA. Οι λαμβανόμενες ποσότητες DNA μετά την ενίσχυση, κυμαίνονται από 1-3μg/αντίδραση. Το ποσό του ενισχυμένου SB-treated DNA που προκύπτει, είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί σε 100-300 αντιδράσεις real-time MSP, εφόσον ο όγκος του αρχικού υλικού που προστίθεται στην αντίδραση PCR είναι 10ng.

#### 4.12.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- REPLI-g<sup>®</sup> Midi DNA Πολυμεράση
- EpiTect WBA Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
- H<sub>2</sub>O ελεύθερο RNAσών
- Σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf (των 0,2mL)

#### 4.12.3. Πειραματική πορεία

Το πρωτόκολλο είναι βελτιστοποιημένο για την ενίσχυση >50ng SB-treated DNA. DNA χαμηλής ποιότητας ή μικρότερης ποσότητας, οδηγεί σε λήψη <1μg ενισχυμένου DNA και απώλεια πιστότητας της αντιγραφής. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Τοποθέτηση 2μL SB-treated DNA σε σωληνάριο συλλογής τύπου Eppendorf (των 0,2mL) και αραίωση του υλικού μέχρι τα 10μL με H<sub>2</sub>O ελεύθερο RNAσών
- Διατήρηση της REPLI-g<sup>®</sup> Midi DNA Πολυμεράσης στον πάγο και απόψυξη του EpiTect WBA Ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου
- Προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης στον πάγο ως εξής: ανάμιξη 29μL EpiTect WBA Ρυθμιστικού διαλύματος με 1μL REPLI-g<sup>®</sup> Midi DNA Πολυμεράσης, ελαφριά ανάδευση με vortex και σύντομη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη των 30μL του μίγματος της αντίδρασης στα 10μL του αναμεμιγμένου με H<sub>2</sub>O SB-treated DNA
- Επώαση για 8h στον θερμικό κυκλοποιητή Mastercycler<sup>®</sup> pro (Eppendorf) στους 28°C με ταυτόχρονη ρύθμιση της θερμοκρασίας του καλύμματος στους 70°C Ακολουθεί απενεργοποίηση της DNA Πολυμεράσης στους 95°C για 5min.
- Αποθήκευση των ενισχυμένων SB-treated DNA δειγμάτων στους -70°C προς μελλοντική χρήση

### 4.13. In silico σχεδιασμός εκκινητών

#### 4.13.1. Γενικά

Ως in silico μελέτη ονομάζουμε την υπολογιστική μελέτη που γίνεται για την επιλογή των βέλτιστων αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων, με σκοπό την τέλεια εξειδίκευση της PCR. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, USA). 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  $T_m$  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, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη.

#### 4.13.2. In silico σχεδιασμός εκκινητών για real-time MSP

Πρώτο βήμα στον σχεδιασμό εκκινητών για τη real-time MSP είναι η μετατροπή της αλληλουχίας του γενωμικού DNA όπως τη λαμβάναμε από την GenBank στην αντίστοιχη αλληλουχία που είχε υποστεί μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο. Για το σκοπό αυτό θεωρήσαμε ότι στην προς μελέτη περιοχή των γονιδίων έχουν μεθυλιωθεί όλες οι βάσεις κυτοσίνης που εντοπίζονται σε δινουκλεοτίδια CpG. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την in silico μετατροπή της αλληλουχίας του γονιδίου στην αλληλουχία που προκύπτει μετά την κατεργασία με όξινο

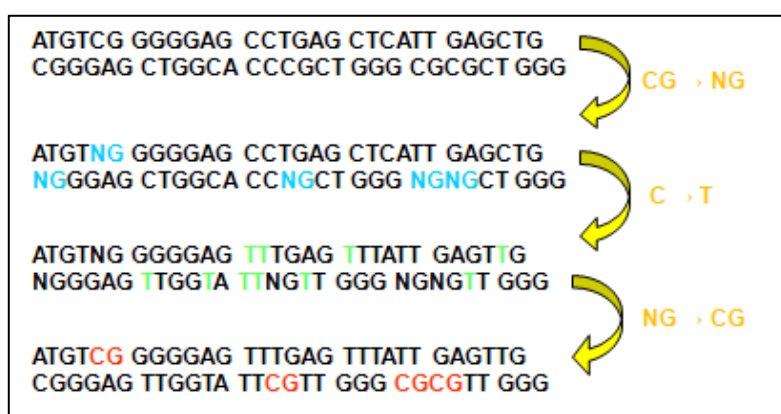
θειώδες νάτριο απεικονίζεται στο σχήμα 4.12. Η πορεία αυτή περιλαμβάνει τρία βήματα, σε πρόγραμμα επεξεργασίας κειμένου (MS WORD):

1<sup>ο</sup>: Μετατροπή όλων των CG δινουκλεοτιδίων σε NG

2<sup>ο</sup>: Μετατροπή όλων των κυτοσινών (C) σε θυμίνες (T)

3<sup>ο</sup>: Επαναμετατροπή όλων των NG σε CG

Με τον τρόπο αυτό όλες οι κυτοσίνες που εντοπίζονται σε CG δινουκλεοτίδια προστατεύονται και δεν μετατρέπονται σε ουρακίλες και επακόλουθα σε θυμίνες από την πολυμεράση, κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης με MSP.



Σχήμα 4.12. Σχηματική παράσταση της *in silico* μετατροπής της προς μελέτη αλληλουχίας στην αλληλουχία που προκύπτει μετά την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών (primers) για την αντίδραση ενίσχυσης του DNA αφού έχει προηγηθεί επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο πρέπει να ληφθούν υπόψη οι παρακάτω παράγοντες:

- Το DNA μετά τη επεξεργασία του με όξινο θειώδες νάτριο παύει να είναι συμπληρωματικό και δίκλωνο. Οι εκκινητές σχεδιάζονται για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA της μιας εκ των δυο αλυσίδων και είναι διαφορετικοί από τους εκκινητές που ενισχύουν τον άλλο κλώνο. Σήμερα υπάρχουν ειδικά προγράμματα για τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινητών για χρήση στη real-time MSP, όπως είναι το MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)
- Οι εκκινητές πρέπει να καλύπτουν αρκετές κυτοσίνες που δεν είναι τμήμα των CpG δινουκλεοτιδίων της αρχικής αλληλουχίας και επομένως μετατρέπονται σε ουρακίλες από το όξινο θειώδες νάτριο. Ο συνυπολογισμός αυτών των βάσεων κατά τον σχεδιασμό του εκκινητή μας βοηθά να μην ενισχύσουμε τυχόν υπολείμματα μη τροποποιημένου DNA.

- Ο ένας εκκινητής πρέπει να περιέχει ένα CpG στο 3'-άκρο, έτσι ώστε να μπορεί να διακρίνεται το μεθυλιωμένο από το μη μεθυλιωμένο μόριο μέσω της υβριδοποίησης και της δημιουργίας κενού αντίστοιχα. Ο άλλος εκκινητής πρέπει να περιέχει δυο non-CpG κυτοσίνες στο 3'-άκρο του έτσι ώστε να μπορεί να διακρίνεται το DNA που έχει υποστεί τις αναμενόμενες αλλαγές και αυτό που παρέμεινε αναλλοίωτο κατά την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο.

Συμπερασματικά ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί καθοριστικό βήμα, καθώς θα πρέπει να διακρίνεται όχι μόνο το μεθυλιωμένο από το μη μεθυλιωμένο, αλλά το χημικά τροποποιημένο DNA από το DNA που δεν έχει υποστεί τροποποίηση με το όξινο θειώδες νάτριο.

1. Στην παρούσα διατριβή, σχεδιάσθηκαν εκκινητές για τα γονίδια της *ACTB*, *ESR1* και *MLL3*. Οι αλληλουχίες δίνονται στα αντίστοιχα κεφάλαια. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες του εργαστηρίου αναφορικά με τη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *SOX17*, *BRMS1* και *RASSF1A*. Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

**Πίνακας 4.3. Χαρακτηριστικά εκκινητών και ανιχνευτών από προηγούμενες εργασίες.**

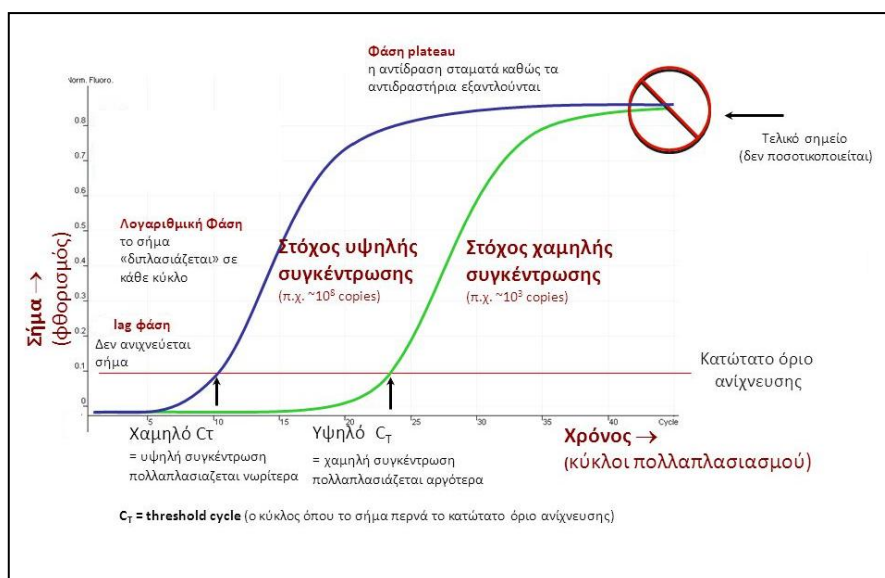
Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>SOX17</i> (99)	Πρόσθιος	GTTGCGTTAGTCGTTTGC GTT	22	62,5	<b>76</b>
	Ανάστροφος	AACGAATCCCGTATCCGACG	20	62,2	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	F- AGTTTATATTATGAAAG+C+GTTTAT+C+G+GT -Q	28		
<i>BRMS1</i> (99)	Πρόσθιος	TAGATGTTTTACGTTATTCGGTGC	24	58,8	<b>130</b>
	Ανάστροφος	ATTAATCTTACTCCTCCTACCCGTA	25	57,8	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	F-ACAAATAAAA+C+A+A+CT+A+C+AAC-Q	20		
<i>RASSF1A</i> (252)	Πρόσθιος	GTTGGTATTCGTTGGGCGC	19	61,1	<b>163</b>
	Ανάστροφος	ATCGCACCCAGTATACGTAACG	22	60,5	

+Θέση LNA-τροποποιημένου νουκλεοτιδίου

## 4.14. Real-Time Methylation Specific PCR

### 4.14.1. Αρχή μεθόδου

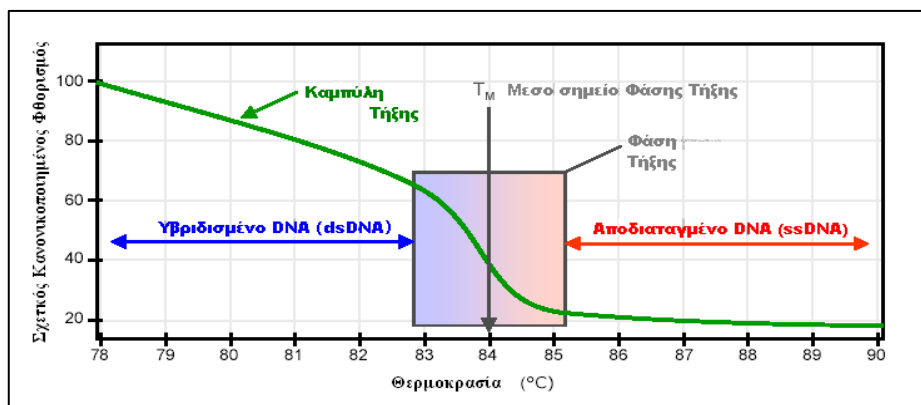
Η PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ο οποίος και αποτελεί το δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Το όλο σύστημα βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό μιας φθορίζουσας ουσίας αναφοράς. Για την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε χρησιμοποιήσαμε χρωστική φθορισμού δέσμησης του dsDNA (LC Green 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. Στο σχήμα 4.13 απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα του εκπεμπόμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της PCR.



**Σχήμα 4.13. Κινητική της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο**

Οι κύριες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες στις αντιδράσεις real-time PCR είναι οι SYBR Green I και LC Green. Η τελευταία χρωστική είναι εμπορικά διαθέσιμη ως LC Green I και LC Green Plus, για τις οποίες αναφέρονται κοινά χαρακτηριστικά με μοναδική διαφορά το υψηλότερο σήμα φθορισμού της LC Green Plus. 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. Η φθορίζουσα χρωστική, έχει την ικανότητα να προσδένεται στην διπλή έλικα του DNA και κατά την πρόσδεσή του στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου, 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. 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, δεν απαιτούνται εξειδικευμένα μόρια ή ολιγονουκλεοτίδια για την επισήμανση του παραγόμενου DNA. Την άρση του παραπάνω μειονεκτήματος, έρχεται να δώσει η ανάλυση καμπυλών τήξης, όπου κατά την αποδιάταξη του dsDNA, η ένταση του φθορισμού μειώνεται, αφού τα φθορίζοντα μόρια αποδεσμεύονται από το DNA. 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. Μετά την αντίδραση, μια καμπύλη τήξης παράγεται από τη θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR παρουσία της χρωστικής, κατά την οποία προκύπτουν μεταβολές στα σήματα φθορισμού όταν το προϊόν PCR αποδιατάσσεται ή «τήκεται» και το μόριο-ιχνηθέτης αποδεσμεύεται από το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού (σχήμα 4.14). Το λογισμικό των οργάνων real-time PCR, υπολογίζοντας αυτόματα την πρώτη παράγωγο  $-dF/dT$  παρουσιάζει τα λαμβανόμενα αποτελέσματα και σε μορφή κορυφών, όπου η κάθε κορυφή αντιστοιχεί στο  $T_m$  του εκάστοτε προϊόντος της PCR. Η ειδικότητα της αντίδρασης σε αυτή την περίπτωση, καθορίζεται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.

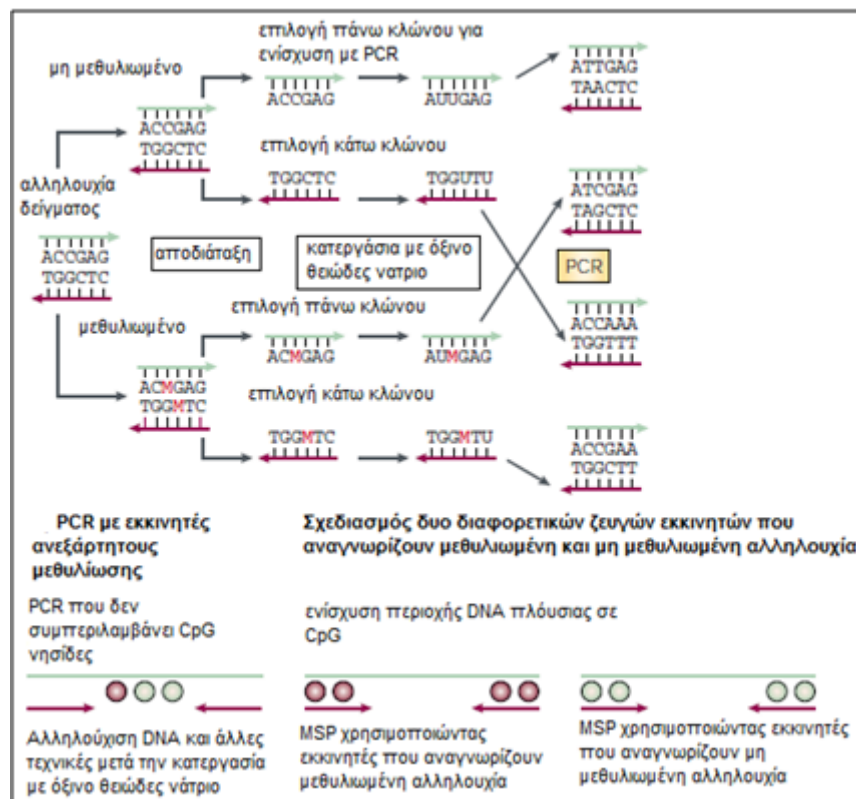


**Σχήμα 4.14. Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης τήξης.** Με πράσινο δείχνεται η μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό της αρχικής φάσης με υβριδισμένα μόρια, μέσω της δραστηκής μείωσης φθορισμού της φάσης τήξης στη φάση αποδιάταξης. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς η παρεμβλλόμενη χρωστική ουσία στο DNA 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 τήξης ( $T_m$ )

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες real-time MSP (σχήμα 4.15) για τον άμεσο ημιποσοτικό προσδιορισμό και την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της μεθυλίωσης των γονιδίων *ESR1* και *MLL3*. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα, η μέθοδος πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία ώστε να ανιχνεύει τις μικρές ποσότητες των μεθυλιωμένων αλληλουχιών, όπως στην περίπτωση διερεύνησης της μεθυλίωσης



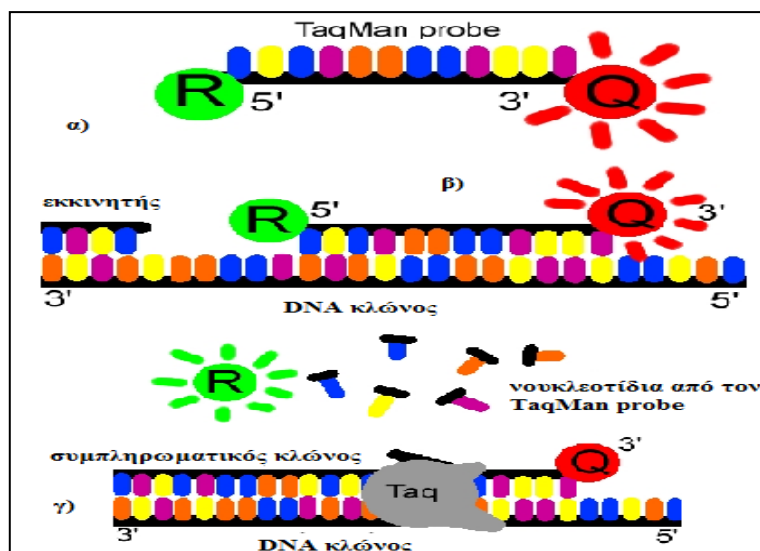
του DNA από CTC και ctDNA, αλλά και ειδικότητα ώστε να διακρίνει το μεθυλιωμένο από το μη μεθυλιωμένο DNA. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο σχεδιασμό ειδικών εκκινητών, κατάλληλων για την εκλεκτική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας (υποκεφάλαιο 4.14).



**Σχήμα 4.15.** Η αρχή μεθόδου για τη χημική μετατροπή του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο και την ανίχνευσή του με Methylation Specific PCR

Η ατελής μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο μπορεί να επιδράσει στην αξιοπιστία και την ακρίβεια της μελέτης μεθυλίωσης του DNA που βασίζεται στην PCR. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίο να αξιολογηθεί η ποιότητα του χημικά τροποποιημένου DNA μέσω σχεδιασμού ζεύγους εκκινητών σχεδιασμένους σε περιοχή ανεξάρτητη της μεθυλίωσης. Στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκαν εκκινητές για το γονίδιο της β-ακτίνης (*ACTB*) και ανιχνευτής υδρόλυσης TaqMan ως σύστημα ανίχνευσης. Στη real-time MSP, ο ανιχνευτής υδρόλυσης TaqMan, διαθέτει στο 5' άκρο ως φθορίζουσα χρωστική φλουορεσκεΐνη (F) και στο 3' άκρο τετραμεθυλοροδαμίνη (tetramethylrhodamine, TMR). Συνιστάται η αποφυγή τοποθέτησης της φλουορεσκεΐνης δίπλα σε γουανίνη, καθώς το νουκλεοτίδιο αυτό μπορεί να προκαλέσει απόσβεση του φθορισμού της χρωστικής. Το 3' άκρο προστατεύεται με φωσφορική ή άλλη ομάδα ώστε να αποφευχθεί η επιμήκυνση και για να μην μπορεί να δράσει ως εκκινητής. Συγκεκριμένα, ο τρόπος δράσης του ανιχνευτή TaqMan στηρίζεται στην ενδογενή ικανότητα της Taq (*Thermus aquaticus*) DNA πολυμεράσης να δρα ως 5'-3' εξωνουκλεάση υδρολύοντας τα τερματικά νουκλεοτίδια στο 5' άκρο της διπλής αλυσίδας του DNA απελευθερώνοντας μόνο- και

ολιγονουκλεοτίδια (σχήμα 4.16). Στην περίπτωση απουσίας PCR προϊόντος υποδηλώνεται η αποτυχία της αντίδρασης μετατροπής ή ο κατακερματισμός του DNA. Σε κάθε δοκιμασία real-time MSP περιλαμβάνονται ως δείγματα ελέγχου ένα μεθυλιωμένο DNA, σαν θετικός μάρτυρας, ένα μη μεθυλιωμένο σαν αρνητικός μάρτυρας (πλακουντιακό, 0% μεθυλιωμένο DNA) και ένα μη κατεργασμένο γενωμικό DNA.



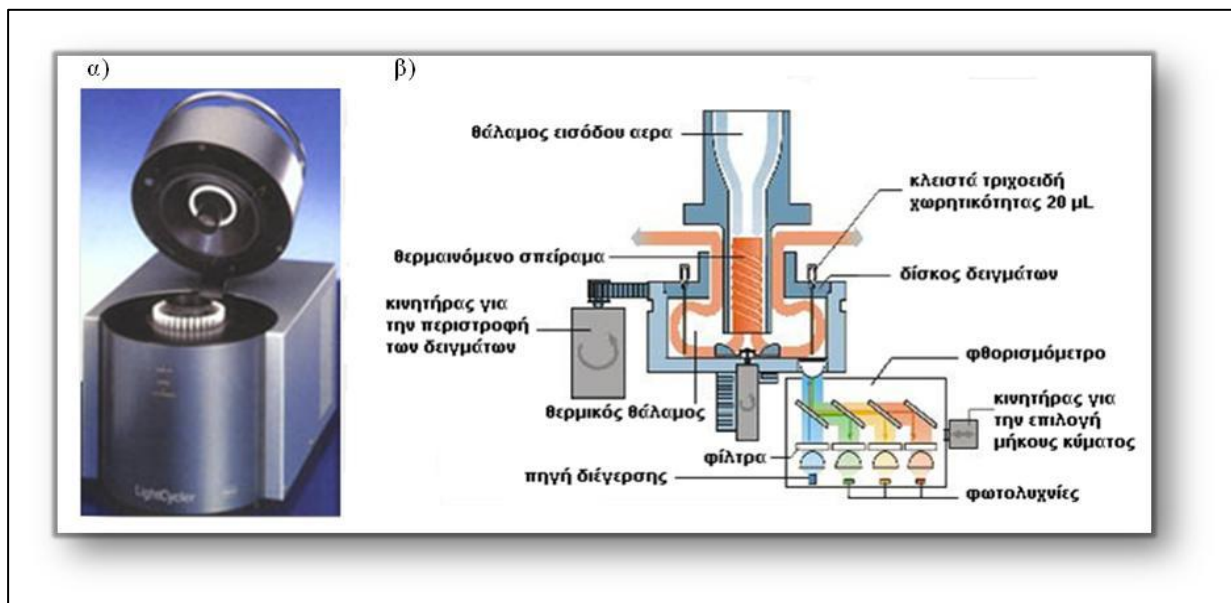
Σχήμα 4.16. Αρχή λειτουργίας ανιχνευτή Taqman. α) Ο κόκκινος κύκλος αντιπροσωπεύει τον αποσβέστη που εμποδίζει την εμφάνιση σήματος από την γειτνιάζουσα φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (πράσινος κύκλος), όταν είναι σε μικρή απόσταση. β) Ο ανιχνευτής TaqMan και ο εκκινητής υβριδοποιούνται στο DNA στόχο. Μετά την δέσμευση του εκκινητή, η Taq πολυμεράση ενισχύει το DNA, παράγοντας τον συμπληρωματικό κλώνο. γ) Η φθορίζουσα ουσία αποδεσμεύεται από το ολιγονουκλεοτίδιο ανιχνευτή με την ενζυμική δράση εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Μακριά από τον αποσβέστη, εκπέμπεται σήμα από τη χρωστική αναφοράς σε μια διεγερμένη κατάσταση [<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents>]

#### 4.14.2. Οργανολογία

##### 4.14.2.1. LightCycler<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Switzerland)

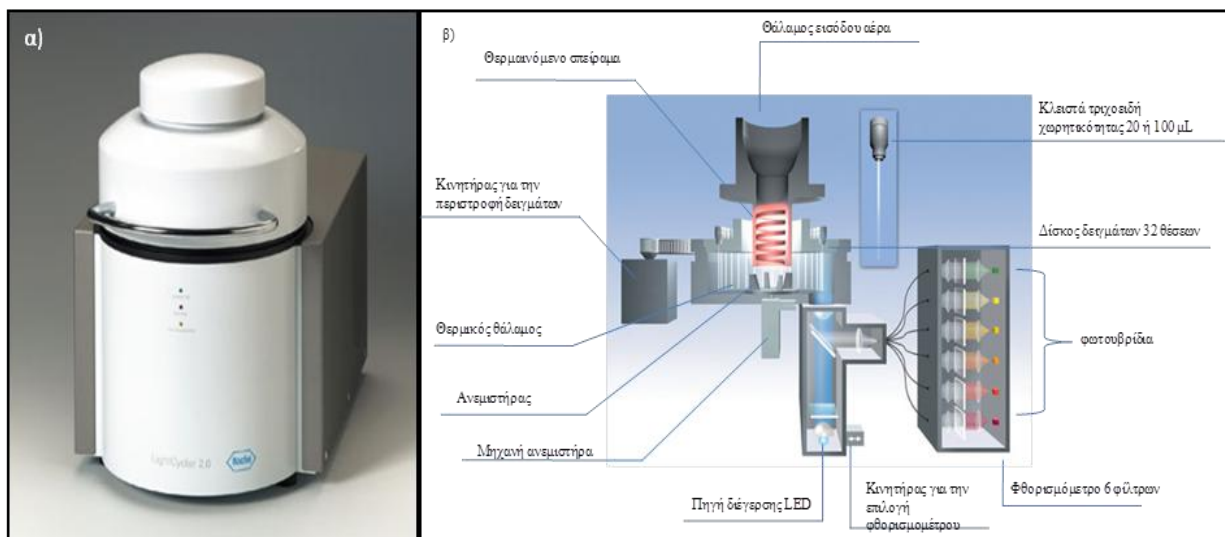
Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για όλους τους προσδιορισμούς πλην της ανάπτυξης μεθόδου για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *MLL3*, ήταν το LightCycler<sup>®</sup> 1.5 και το LightCycler<sup>®</sup> 2.0, της Roche.. Στο όργανο LightCycler<sup>®</sup> η αντίδραση PCR πραγματοποιείται μέσα σε γυάλινα τριχοειδή τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο, ενώ η θέρμανση και η ψύξη γίνεται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα. Το όργανο LightCycler 1.5 (σχήμα 4.17) χρησιμοποιεί ένα φθορισμόμετρο με τρία διαφορετικά φίλτρα για την ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού. Μια μπλε δίοδος (Light Emission Diode, LED), με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη διέγερση των δειγμάτων, ενώ ο εκπεμπόμενος φθορισμός ανιχνεύεται στα 530 nm, 640 nm και 710 nm. Οι κυριότερες χρωστικές επισήμανσης των

ανιχνευτών DNA που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler είναι η φλουορεσκεΐνη, η LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) και η LightCycler-Red 705 (LC-Red 705). Η μέγιστη εκπομπή της χρωστικής φλουορεσκεΐνης παρατηρείται στα 525 nm, περίπου, ενώ η μέγιστη απορρόφηση παρατηρείται στα 493 nm. Η μέγιστη διέγερση της χρωστικής LC-Red 640 παρατηρείται στα 625 nm ενώ η μέγιστη εκπομπή φθορισμού παρατηρείται στα 640 nm και τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής της χρωστικής LC-Red 705 είναι τα 685 nm και 705 nm, αντίστοιχα. 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. 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.



**Σχήμα 4.17.** Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler<sup>®</sup> 1.5 της Roche και β) της οργανολογίας του. Το LightCycler 2.0 (σχήμα 4.18) διακρίνεται από το LightCycler 1.5 ως προς τη δυνατότητα ανίχνευσης του εκπεμπόμενου φθορισμού σε έξι διαφορετικά μήκη κύματος. Συγκεκριμένα το φθορισμόμετρο αποτελείται από δύο μονάδες. Η μονάδα διέγερσης διαθέτει μια μπλε δίοδο (Light Emission Diode, LED), με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm που λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη διέγερση των δειγμάτων. Η ενέργεια που εκπέμπεται από την μπλε δίοδο εστιάζεται στην άκρη των γυάλινων τριχοειδών και διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές που

βρίσκονται εκεί. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός ανακλάται πίσω στο φθορισμόμετρο με την βοήθεια ενός διχρωματικού καθρέπτη. Ο ηλεκτρικός αγωγός κατανέμει το σήμα του εκπεμπόμενου φθορισμού στους 6 διαφορετικούς ανιχνευτές ανεξάρτητα από το μήκος κύματος. Στην μονάδα ανίχνευσης ο φθορισμός ευθυγραμμίζεται με έναν μη σφαιρικό φακό και ένα ειδικό οπτικό σύστημα φίλτρων, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις μετρήσεις εκπομπής φθορισμού στα 530, 555, 610, 640, 670, 705 nm. Ένας δεύτερος μη σφαιρικός φακός μεταφέρει το σήμα από κάθε ανιχνευτή σε ένα φωτουβρίδιο για τη τελική αποτίμηση. Τα σήματα των φωτουβριδίων (photohybrids) στέλνονται στο όργανο του LightCycler 2.0 μέσω μιας τμηματικής αλληλεπίδρασης.

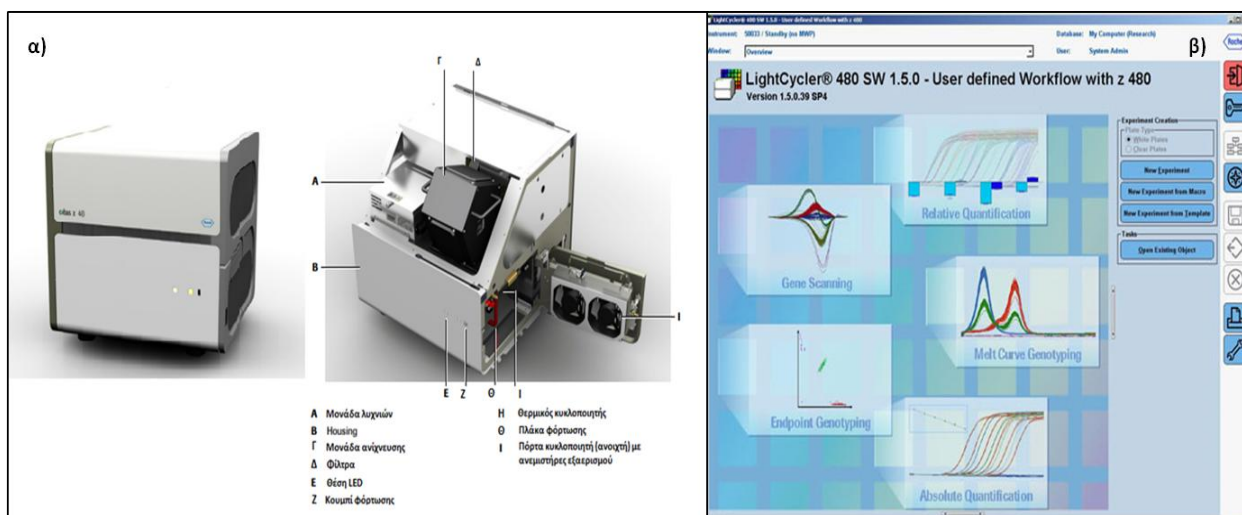


Σχήμα 4.18. Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler® 2.0 της Roche και β) της οργανολογίας του

#### 4.14.2.2. Σύστημα cobas® 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

Το cobas® 4800 σύστημα αποτελείται από τον cobas z480 αναλυτή και το LightCycler® 480 λογισμικό και επιτρέπει στην ανάπτυξη μεθοδολογιών βασισμένες σε real-time PCR, με δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης μέχρι και 96 δειγμάτων (σχήμα 4.19). Το οπτικό σύστημα που διαθέτει, περιλαμβάνει μία υψηλής έντασης μπλε δίοδο (LED) με φάσμα εκπομπής από 390-710nm και 5 φίλτρα εκπομπής (440, 465, 498, 533, 618nm), τα οποία σε συνδυασμό με τα 6 φίλτρα ανίχνευσης (488, 510, 580, 610, 640 και 660nm) διευκολύνουν τη χρήση ποικίλων φθορίζουσών ουσιών και άλλων μορφών ανίχνευσης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η ταχεία κι ακριβής αυξομείωση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται μέσω μπλοκ θερμικού κυκλοποιητή με χρήση θερμοηλεκτρικών στοιχείων Peltier, ο οποίος θερμαίνει ομοιόμορφα την

πλάκα 96-θέσεων (96-well plate). Για την παρακολούθηση της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, οι πληροφορίες των σημάτων φθορισμού, θερμοκρασίας και κύκλου της αντίδρασης, μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Η τελική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με χρήση αυτόματων αλγορίθμων του λογισμικού, παρέχοντας τη δυνατότητα για απόλυτη/σχετική ποσοτικοποίηση της αντίδρασης ή/και ανάλυση καμπύλων τήξης.



Σχήμα 4.19. α) Ο αναλυτής Cobas z480, β) Λογισμικό LightCycler® 480

#### 4.15. Κυτταρικές σειρές, δείγματα ελέγχου και πρότυπα δείγματα

Ως μοντέλο για την ανάπτυξη και αξιολόγηση της ειδικότητας και ευαισθησίας των αναπτυχθεισών μεθοδολογιών, καθώς και για τη διερεύνηση των προαναλυτικών παραμέτρων για μελέτες μεθυσίωσης του DNA, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7, SKBR3 και MDA-MB-231 στις οποίες είναι μεθυλιωμένα ως προς μελέτη γονίδια. Οι καλλιέργειες των ανωτέρω κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, του τμήματος Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Υπεύθυνη: Καθ. Ο. Τσιτσιλώνη). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα 100% μεθυλιωμένου γενωμικού DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA) και 0% μεθυλιωμένου DNA ( Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ ΚΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

#### 5.1. Εισαγωγή

Η ανάλυση του εξωκυττάριου καρκινικού DNA (ctDNA) στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο, επιτρέπει τον προσδιορισμό γενωμικών αλλαγών, την παρακολούθηση της ανταπόκρισης ή αντίστασης στη θεραπεία και την ανίχνευση της προόδου της νόσου πριν την κλινική επιβεβαίωσή της (103,253). Παρόλα αυτά, υπάρχουν σημαντικά θέματα να επιλυθούν προτού οι αναλύσεις υγρής βιοψίας περάσουν από το εργαστήριο στην κλινική πράξη. Τα ζητήματα αυτά περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την αναλυτική-κλινική εγκυρότητα και την κλινική χρησιμότητα λαμβάνοντας υπόψη τη βέλτιστη ευαισθησία των μεθοδολογιών ανίχνευσης του ctDNA και την περιορισμένη ποσότητα δείγματος (1,125). Η επίδραση των προαναλυτικών παραμέτρων στις αναλύσεις υγρής βιοψίας είναι κρίσιμη και θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγήσει τις διάφορες αποκλίσεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, την ανεπαρκή αναπαραγωγιμότητα και τις διαφορές στις διαδικασίες χειρισμού των δειγμάτων (254).

Πολλές μελέτες έχουν ήδη αξιολογήσει παραμέτρους που επηρεάζουν δυνητικά τη συγκέντρωση και τον κατακερματισμό του ctDNA και έχουν περιγράψει τις βέλτιστες προ-αναλυτικές συνθήκες χειρισμού για ανάλυση ctDNA (103,254–261). Εξίσου ποικιλομορφία παρουσιάζουν τα αποτελέσματα σύγκρισης μεταξύ διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων κιτ για την χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, για μελέτες μεθυλίωσης του ctDNA (262–264). Μέχρι σήμερα, λίγα είναι γνωστά αναφορικά με τη σταθερότητα της μεθυλοκυτοσίνης υπό διαφορετικές συνθήκες φύλαξης δειγμάτων πλάσματος. Ενώ είναι γνωστό ότι το gDNA είναι σταθερό για πολλά χρόνια όταν φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μόνο μία μελέτη έχει διερευνήσει τις μεταβολές των επιπέδων μεθυλίωσης του gDNA που απομονώνεται από ολικό αίμα μετά από αποθήκευσή του για ένα έτος. Η μελέτη αυτή διερεύνησε τα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης ολόκληρων γονιδίων χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR (265). Το gDNA αποικοδομείται σε όλες τις δοκιμασμένες συνθήκες αποθήκευσης που οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης με αυξανόμενο χρόνο αποθήκευσης. Δεδομένα υπάρχουν, επίσης, για τη σταθερότητα των μοτίβων μεθυλίωσης σε δείγματα ολικού αίματος αποθηκευμένα σε σωληνάρια συλλογής με EDTA. Χρησιμοποιώντας την τεχνική pyrosequencing, οι Schröder et al έδειξαν ότι το gDNA



αποικοδομείται σε όλες τις δοκιμασμένες συνθήκες αποθήκευσης και τα επίπεδα μεθυλίωσης αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου φύλαξης (266).

Η ενίσχυση του ολικού γονιδιώματος (Whole genome amplification, WGA) χρησιμοποιείται ευρέως για τον πολλαπλασιασμό του γενωμικού DNA προς εφαρμογή σε τεχνικές αλληλούχισης και σε αναλύσεις γονοτύπησης (genotyping). Η διαδικασία WGA μπορεί να αποδειχτεί εξαιρετικά χρήσιμη, όμως, και στην επιγενετική έρευνα ειδικά σε περιπτώσεις υγρής βιοψίας, αφού παρέχει μία μεγαλύτερη ποσότητα DNA για περαιτέρω ανάλυση. Εντούτοις, εάν χρησιμοποιηθούν τα συμβατικά WGA κιτ για την ενίσχυση του επιγονιδιώματος, η πληροφορία της μεθυλίωσης χάνεται, επομένως ως αρχικός στόχος ενίσχυσης πρέπει να ορίζεται το DNA μετά από επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treated DNA). Μία αναμενόμενη πρόκληση, λοιπόν, αποτελεί η αμερόληπτη και ακριβής ενίσχυση του SB-treated DNA (267).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν: α) η σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα σε διαδοχικές χρονικές στιγμές για συνολικό χρονικό διάστημα 8 μηνών, β) η σταθερότητα του SB-treated DNA σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες σε διαδοχικές χρονικές στιγμές και συνολικό χρονικό διάστημα 1 έτους και γ) η ακρίβεια και πιστότητα πρωτοκόλλων για ενίσχυση του SB-treated DNA. Επιπλέον, παρουσιάζεται μία προτεινόμενη διαδικασία ελέγχου ποιότητας για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας σε αναλύσεις μεθυλίωσης του DNA, πριν την κλινική εφαρμογή τους στην υγρή βιοψία.

## **5.2. Πειραματική πορεία**

Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία έλαβε χώρα σε ξεχωριστούς χώρους, με διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του DNA, η χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και η προετοιμασία των αντιδράσεων real-time MSP πραγματοποιούνται σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar-flow hoods) υπό συνθήκες ελεύθερες DNAσών.

### **5.2.1. Κλινικά δείγματα**

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από δύο υγιείς δότες σε σωληνάρια συλλογής K<sub>2</sub>EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, UK) των 10mL. Το πλάσμα απομονώθηκε εντός 2h από την αιμοληψία, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 4.5. Τα δείγματα πλάσματος διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να γίνει ο εμβολιασμός τους με την κυτταρική σειρά MCF-7.

### **5.2.2. Απομόνωση εξωκυττάριου καρκινικού DNA (ctDNA) από το πλάσμα**

Αρχικά απομονώθηκε gDNA από τις κυτταρικές σειρές MCF-7 ( $10^6$  κύτταρα), χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές περιγράφηκαν στο υποκεφάλαιο 4.9 και SKBR3 ( $10^6$  κύτταρα) με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (υποκεφάλαιο 4.8). Το απομονωμένο DNA από την SKBR3 αναδιαλύθηκε σε 30μL ρυθμιστικού διαλύματος TE 1X (ThermoFisher Scientific, USA). Οι συγκεντρώσεις των απομονωμένων gDNA προσδιορίστηκαν, στη συνέχεια, στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000 (ThermoFisher Scientific, USA)(υποκεφάλαιο 4.10). 1.000ng DNA από MCF7 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε συσκευή υπερήχων για 30min, ώστε να υποστούν θραυσματοποίηση και να ληφθεί μειωμένο σε μέγεθος DNA (μιμούμενο με αυτόν τον τρόπο το ctDNA). Ακολούθησε εμβολιασμός του θραυσματοποιημένου DNA σε τέσσερα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα από τα οποία περιείχε 2mL πλάσματος. Το κάθε σωληνάριο αποθηκεύτηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$  και αναλύθηκε σε 4 διακριτά χρονικά σημεία ( $T_0$ :0 ημέρες,  $T_1$ :1 μήνας,  $T_3$ :3 μήνες,  $T_8$ :8 μήνες). Το πρώτο aliquot πλάσματος, προχώρησε απευθείας σε απομόνωση του ctDNA ( $T_0$ ) (Σχήμα 5.3). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Germany) σύμφωνα με τα περιγραφόμενα στο εδάφιο 4.7.2.

### 5.2.3. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment)

Το ctDNA που απομονώθηκε από τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος και το gDNA που απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SKBR3, υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment). Κατά τη χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, όλες οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες παραμένουν αναλλοίωτες. Για τη μελέτη σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και για τη μελέτη σταθερότητας του SB-treated DNA, χρησιμοποιήθηκε το EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA) (υποκεφάλαιο 4.11.2). Το SB-treated DNA από την MCF-7 (εμβολιασμένη σε πλάσμα) αποθηκεύτηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι χρήσης, ενώ το SB-treated DNA από την SKBR3 διαμοιράστηκε σε aliquots και φυλάχθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-70^{\circ}\text{C}$  με σκοπό να πραγματοποιηθεί η μελέτη σταθερότητάς του σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες κατάψυξης. Για τη μελέτη ενίσχυσης ολόκληρου του επιγονιδιώματος, χρησιμοποιήθηκε το EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen, Germany), ρυθμίζοντας τον αρχικό όγκο της αντίδρασης κατάλληλα και για υψηλές (1ng-2μg) και για χαμηλές (1-500ng) συγκεντρώσεις DNA (υποκεφάλαιο 4.11.3). Τα εκλουσμένα πλακουντιακό και 100% μεθυλιωμένο πρότυπα ελέγχου, καταψύχθηκαν στους  $-70^{\circ}\text{C}$ .



### 5.2.3. Ενίσχυση ολόκληρου του επιγονιδιώματος με ενζυμικό πολλαπλασιασμό (Whole Genome Amplification, WGA)

Μετά το πέρας της χημικής αντίδρασης επεξεργασίας με όξινο θειώδες νάτριο χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα κιτ (όπως περιγράφηκε παραπάνω), ακολούθησε η ενίσχυση του SB-treated DNA με το EpiTect Whole Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) (υποκεφάλαιο 4.12). Το πρωτόκολλο αυτό έχει βελτιστοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό SB-treated DNA συγκέντρωσης >50ng. Το SB-treated DNA-στόχος, αραιώθηκε με νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 10μL. Η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (Mastercycler<sup>®</sup> pro, Eppendorf), σύμφωνα με τις ακόλουθες θερμοκρασιακές συνθήκες: 28°C για 8h, 95°C για 5min και 4°C μέχρι την αποθήκευσή του (η θερμοκρασία του καλύμματος ρυθμίστηκε στους 70°C). Μετά το WGA, το SB-treated DNA αραιώθηκε 1:10 και 1:5 για την επακόλουθη ανάλυση με real-time MSP.

### 5.2.4. Real-time MSP

Εφαρμόσαμε τις προηγούμενα σχεδιασμένες, επικυρωμένες, ειδικές και εξαιρετικά ευαίσθητες μεθοδολογίες real-time MSP για το *SOX17* και το *BRMS1* (99), με στόχο την μελέτη των προαναλυτικών παραμέτρων σταθερότητας και την αξιολόγηση πιστότητας του WGA σε μελέτες μεθυλίωσης του DNA. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο ctDNA από πλάσμα, αξιολογήθηκε εφαρμόζοντας τη real-time MSP μεθοδολογία για το *SOX17*, ενώ η σταθερότητα του SB-treated DNA αξιολογήθηκε εφαρμόζοντας τη real-time MSP μεθοδολογία για το *BRMS1*. Η απόδοση της ενίσχυσης του SB-treated DNA με WGA, αξιολογήθηκε εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα μεθοδολογία real-time MSP για τη μεθυλίωση του *SOX17*. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε πρώτα με μία real-time MSP μεθοδολογία για τη *β-ακτίνη* (*ACTB*), όπως αυτή περιγράφεται παρακάτω. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler 2.0 (IVD, Roche, Germany), με συνθήκες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL SB-converted DNA-στόχου σε 9μL μίγματος αντίδρασης. Ως δείγμα ελέγχου της αντίδρασης χημικής τροποποίησης με όξινο θειώδες νάτριο στη real-time MSP για την *ACTB* χρησιμοποιήθηκε το ανθρώπινο πλακουντιακό γενωμικό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA), ενώ σαν θετικό πρότυπο 100% μεθυλίωσης, χρησιμοποιήθηκε το Universal Methylated Human DNA Standard (ZYMO Research, USA). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών υδρόλυσης για το *SOX17* και το *BRMS1*

δίνονται στον Πίνακα 4.3, ενώ οι αλληλουχίες των εκκινητών και του ανιχνευτή υδρόλυσης για την *ACTB*, καθώς και οι συνθήκες αντίδρασης για τα 3 γονίδια παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.1-5.7.

**Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *ACTB***

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>ACTB</i>	Πρόσθιος	GGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG	23	56,9	<b>130</b>
	Ανάστροφος	CCAATAAAACCTACTCCTCCCT	22	56,6	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	F- TGTGTTTGTATTGTGTGTTGGGTGG -Q	26	65,7	

*ACTB* accession number NG\_007992.1

**Πίνακας 5.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ACTB***

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	2,94	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	3	1,5x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,2	3mM
dNTPs 10mM	0,2	0,2mM
BSA 10μg/μL	0,3	0,3μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης 3μM	0,66	0,2μM
Taq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	<b>9,0</b>	<b>-</b>
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	<b>10,0</b>	<b>-</b>

**Πίνακας 5.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ACTB***

Στάδιο real-time MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55°C/20 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/20 sec*
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

**Πίνακας 5.4.** Συστατικά της αντίδρασης *real-time* MSP για το γονίδιο *SOX17* (99)

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	3,95	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1	2,5mM
dNTPs 10mM	0,2	0,2mM
BSA 10μg/μL	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης 3μM	1	0,3μM
Ταq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	<b>9,0</b>	<b>-</b>
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	<b>10,0</b>	<b>-</b>

**Πίνακας 5.5.** Συνθήκες αντίδρασης *real-time* MSP για το γονίδιο *SOX17* (99)

Στάδιο <i>real-time</i> MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	58°C/1 min*
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

**Πίνακας 5.6.** Συστατικά της αντίδρασης *real-time* MSP για το γονίδιο *BRMS1* (99)

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	3,95	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1	2,5mM
dNTPs 10mM	0,2	0,2mM
BSA 10μg/μL	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης 3μM	1	0,3μM
Ταq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	<b>9,0</b>	<b>-</b>
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	<b>10,0</b>	<b>-</b>

**Πίνακας 5.7. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *BRMS1* (99)**

Στάδιο real-time MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	60°C/1 min*
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

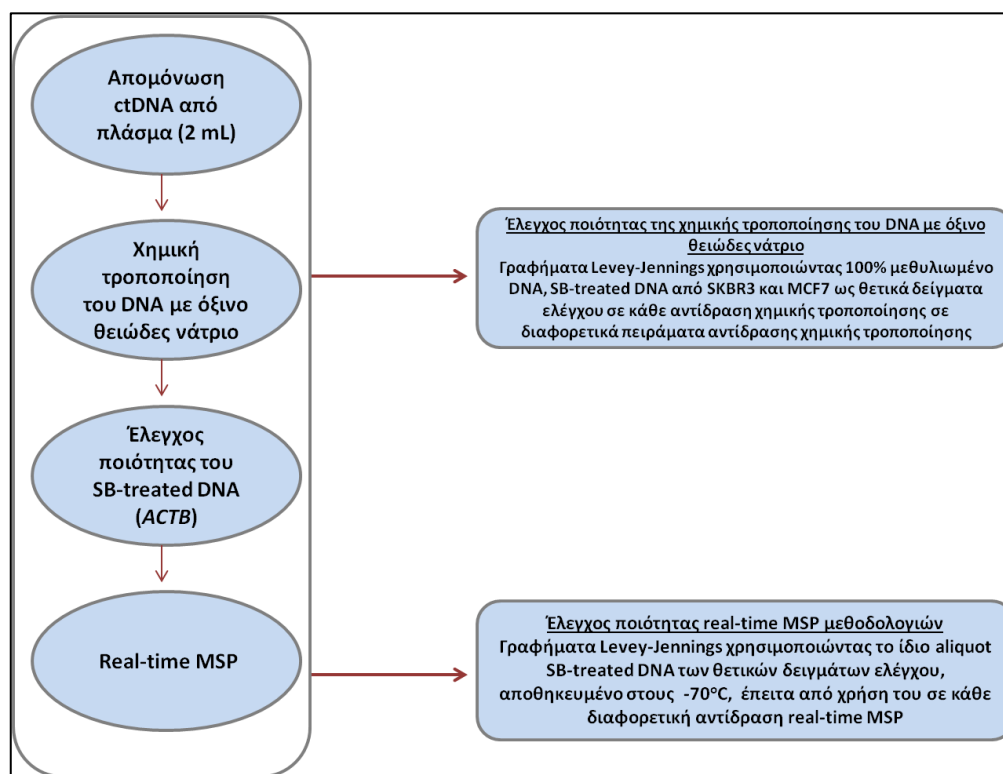
### 5.2.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL). Οι κανονικές κατανομές των δεδομένων υπολογίσθηκαν σύμφωνα με το μη-παραμετρικό τεστ Kolmogorov-Smirnov. Για την στατιστική σημαντικότητα των διαφορών των μέσων όρων ενός δείγματος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (εξαρτημένα δείγματα που ακολουθούν κανονική κατανομή), εφαρμόσαμε την παραμετρική στατιστική διαδικασία t-test. Οι τιμές  $p \leq 0,05$  θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν μέσω του MS-Excel 2010 (Microsoft Corporation, Seattle/USA) και για τα Levey-Jennings γραφήματα έγινε χρήση του λογισμικού QI Macros: SPC Software for Excel (KnowWare International, Inc., USA).

## 5.3. Αποτελέσματα

### 5.3.1. Έλεγχος ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία ανάλυσης βιοδεικτών μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας

Σε κάθε βήμα της αναλυτικής πορείας, συμπεριλάβαμε κατάλληλα θετικά και αρνητικά πρότυπα δείγματα ελέγχου, ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα και η αναπαραγωγιμότητα των ληφθέντων αποτελεσμάτων. Έτσι, σε κάθε πείραμα χημικής τροποποίησης του DNA και αντίδρασης real-time MSP, τα θετικά δείγματα ελέγχου ήταν το πρότυπο 100% μεθυλιωμένου DNA και SB-treated DNA από τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SKBR3. Σε καθένα από τα παραπάνω βήματα, δημιουργήθηκαν γραφήματα Levey-Jennings για όλα τα θετικά δείγματα ελέγχου σύμφωνα με τη χρήση τους ως controls στα εκάστοτε εξεταζόμενα γονίδια *SOX17*, *BRMS1* και *ACTB*. Το διάγραμμα της πειραματικής πορείας για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων, παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1. Διάγραμμα πειραματικής πορείας για τον έλεγχο ποιότητας των αναλύσεων μεθυλίωσης του DNA στην υγρή βιοψία

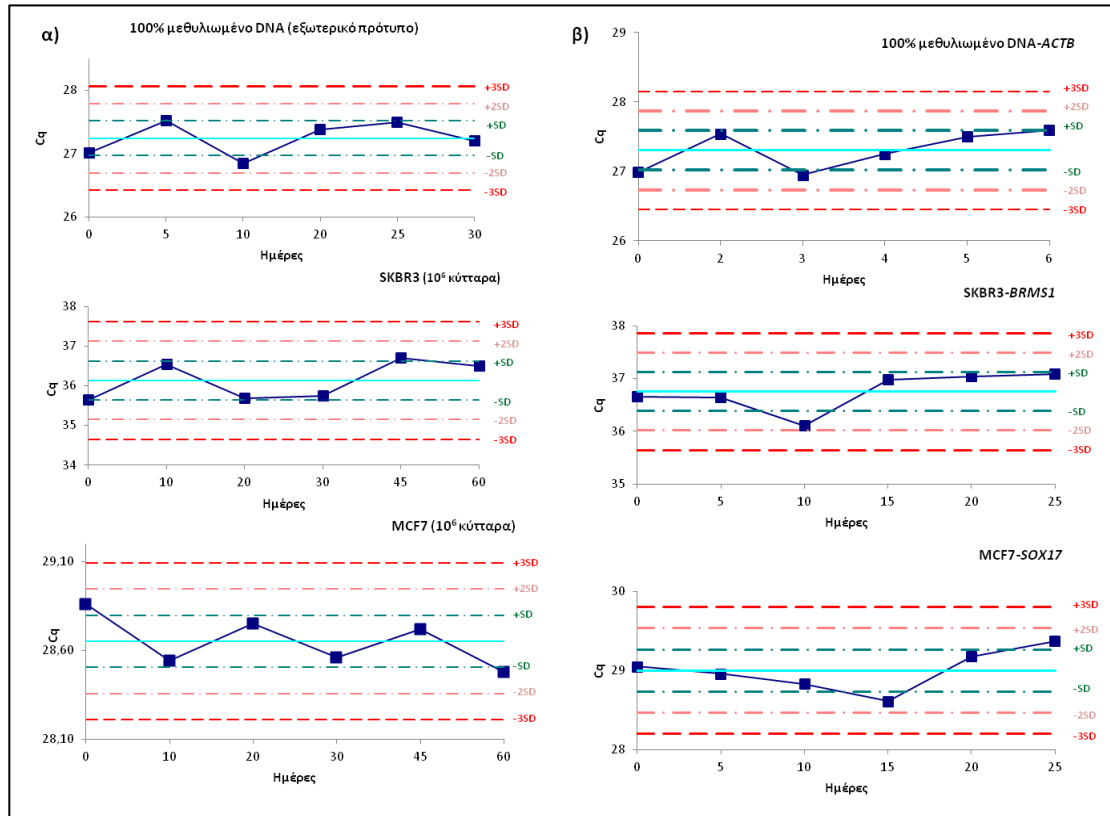
Πιο συγκεκριμένα:

#### Έλεγχος ποιότητας της χημικής τροποποίησης του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

**(SB-treatment):** Για την αξιολόγηση της ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας της όλης διαδικασίας στον χρόνο, σε διαφορετικά πειράματα αντίδρασης με όξινο θειώδες νάτριο, κατασκευάστηκαν γραφήματα Levey-Jennings για καθένα από τα τρία θετικά δείγματα ελέγχου της αντίδρασης (100% μεθυλιωμένο DNA, SB-treated DNA από SKBR3 και MCF7). Όπως φαίνεται από το σχήμα 5.2α, δεν παραβιάζεται κανένα από τα κριτήρια ποιότητας.

**Έλεγχος ποιότητας real-time MSP μεθοδολογιών:** Δημιουργήθηκαν γραφήματα Levey-Jennings που συμπεριλαμβάνουν τα θετικά controls που χρησιμοποιούνται για καθένα από τα εξεταζόμενα γονίδια στις εφαρμοζόμενες μεθοδολογίες real-time MSP, με σκοπό την καθιέρωση μίας διαδικασίας ποιοτικού ελέγχου για κάθε αναλυτικό πείραμα. Για το 100% μεθυλιωμένο θετικό πρότυπο, περίπου το 100% των τιμών βρίσκονται μεταξύ τυπικών αποκλίσεων  $\pm 1SD$ , υποδεικνύοντας ότι η αναλυτική διαδικασία βρίσκεται εντός ορίων (εξεταζόμενο γονίδιο: *ACTB*). Όσον αφορά στη χρήση του SB-treated DNA από MCF7 ως δείγμα ελέγχου, το 66.7% συνολικών τιμών από τις μετρήσεις βρίσκεται στο  $\pm 1SD$ , ενώ 2 τιμές βρίσκονται εντός των  $\pm 2SD$  από τη μέση τιμή, καταδεικνύοντας και πάλι μία αναλυτική διαδικασία εντός ορίων

(εξεταζόμενο γονίδιο: *SOX17*). Τέλος, ο έλεγχος ποιότητας για το δείγμα ελέγχου SB-treated DNA από SKBR3 (εξεταζόμενο γονίδιο: *BRMS1*), επίσης φανερώνει απουσία παραβίασης των κανόνων Westgard, αφού το 83.3% των μετρούμενων τιμών ανήκουν στο  $\pm 1SD$  και μόνο μία τιμή βρίσκεται στα όρια του  $\pm 2SD$  (σχήμα 5.2β).

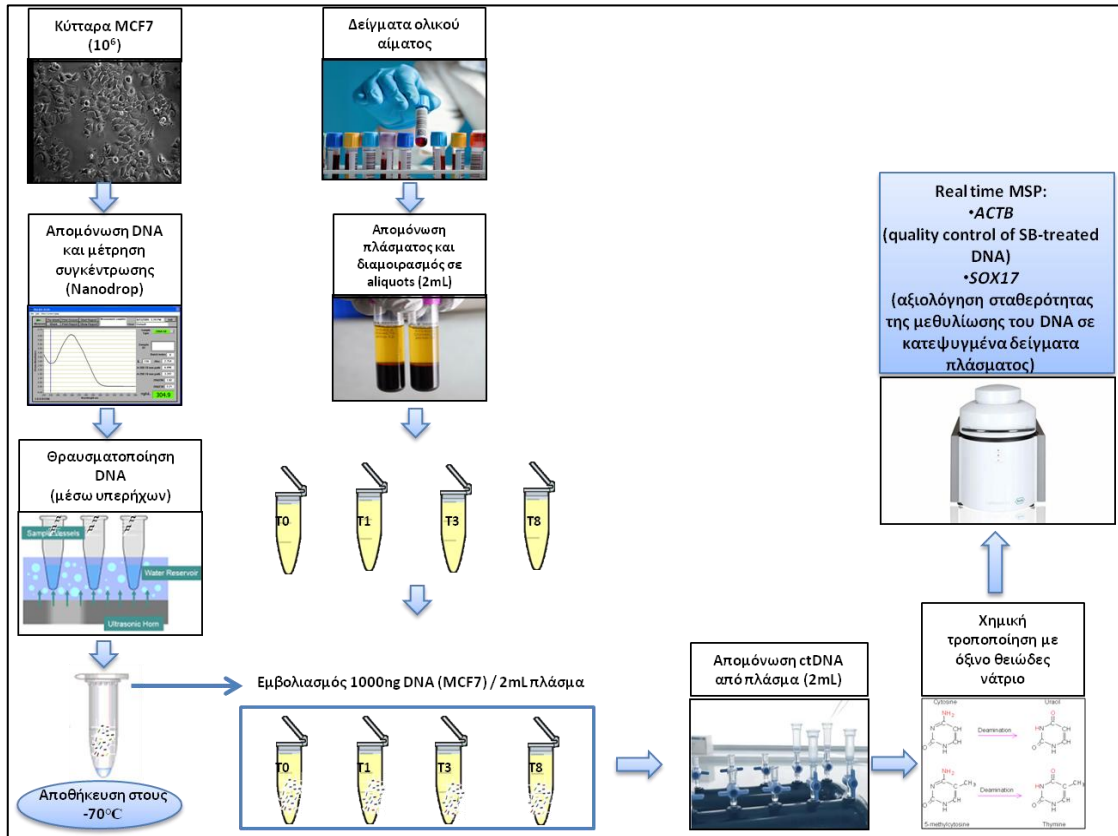


Σχήμα 5.2. Γραφήματα Levey-Jennings. Έλεγχος ποιότητας της αναλυτικής διαδικασίας σε κάθε βήμα για το 100% μεθυλιωμένο DNA (εξωτερικό πρότυπο), την MCF7 ( $10^6$  κύτταρα) και την SKBR3 ( $10^6$  κύτταρα). α) Έλεγχος ποιότητας της χημικής τροποποίησης με όξινο θειώδες νάτριο και β) Έλεγχος ποιότητας των real-time MSP μεθοδολογιών

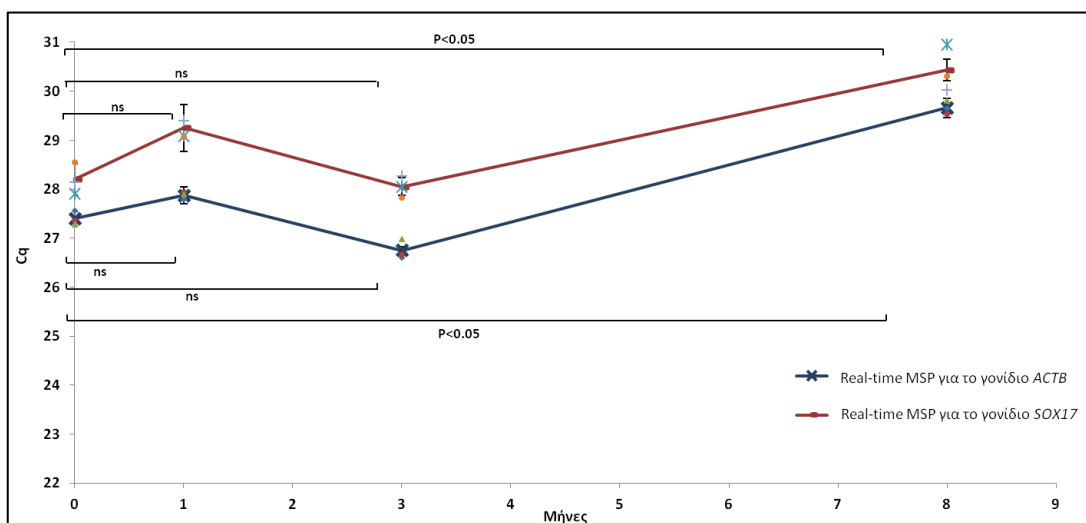
### 5.3.2. Σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα κατά την φύλαξη

Δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με DNA από την κυτταρική σειρά MCF-7, διαμοιράστηκαν σε τέσσερα aliquots τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA κατά την φύλαξη. Ένα σωληνάριο (aliquot) χρησιμοποιήθηκε άμεσα για απομόνωση ctDNA και επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο ( $T_0$ ), ενώ τα εναπομείναντα τρία aliquots αποθηκεύτηκαν στους  $-70^\circ\text{C}$  και αναλύθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές ( $T_1$ ,  $T_3$ ,  $T_8$ ) για συνολικό χρονικό διάστημα 8 μηνών (Σχήμα 5.3). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν και οι μέσες τιμές κύκλων ποσοτικοποίησης PCR ( $Cq \pm SD$ ) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζονται στο σχήμα 5.4. Εφαρμόζοντας τη στατιστική δοκιμασία 2-tailed paired t-test

μεταξύ των τιμών Cq (εις τριπλούν) της ημέρας 0 και κάθε διαφορετικής χρονικής στιγμής, τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η φύλαξη του πλάσματος στους -70°C για μία περίοδο τριών μηνών δεν επηρεάζει την ανάλυση μεθυσίωσης του ctDNA. Αντιθέτως, παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ( $p < 0.05$ ) κατά την αποθήκευση του πλάσματος για 8 μήνες.



Σχήμα 5.3. Πειραματική πορεία για τη μελέτη σταθερότητας της μεθυσίωσης του DNA στο πλάσμα.

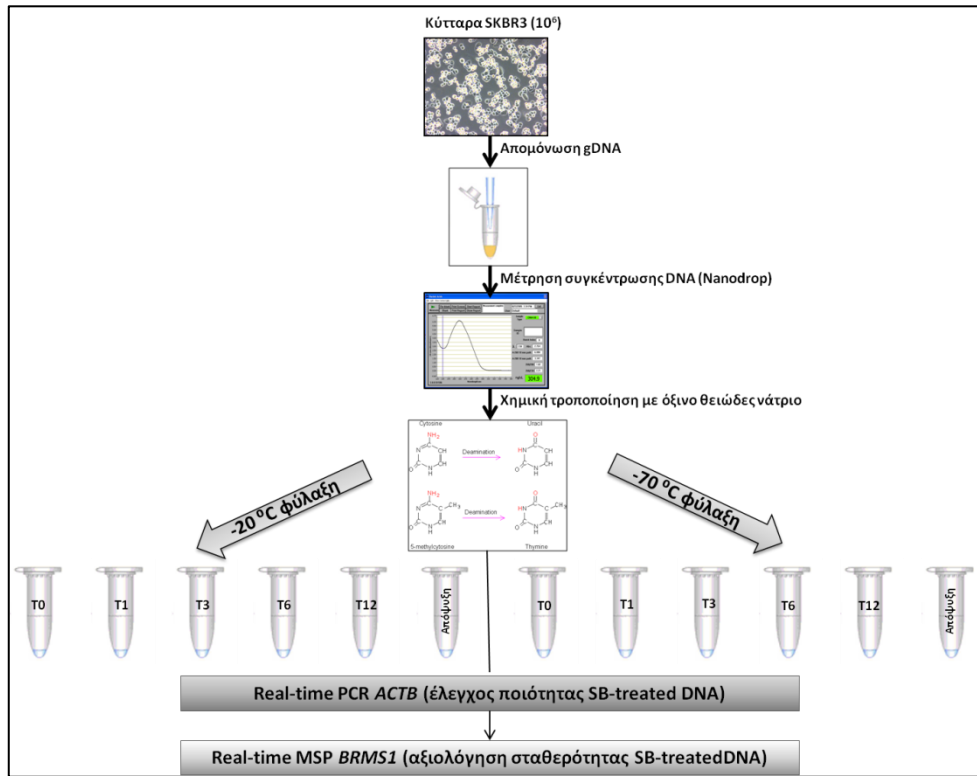


Σχήμα 5.4. Αποτελέσματα real-time MSP για την ACTB και SOX17 κατά την αποθήκευση πλάσματος στους -70°C για χρονικό διάστημα 8 μηνών: Cq (n=3) και SD τιμές για το SB-treated DNA (ns: not significant, μη σημαντικό)

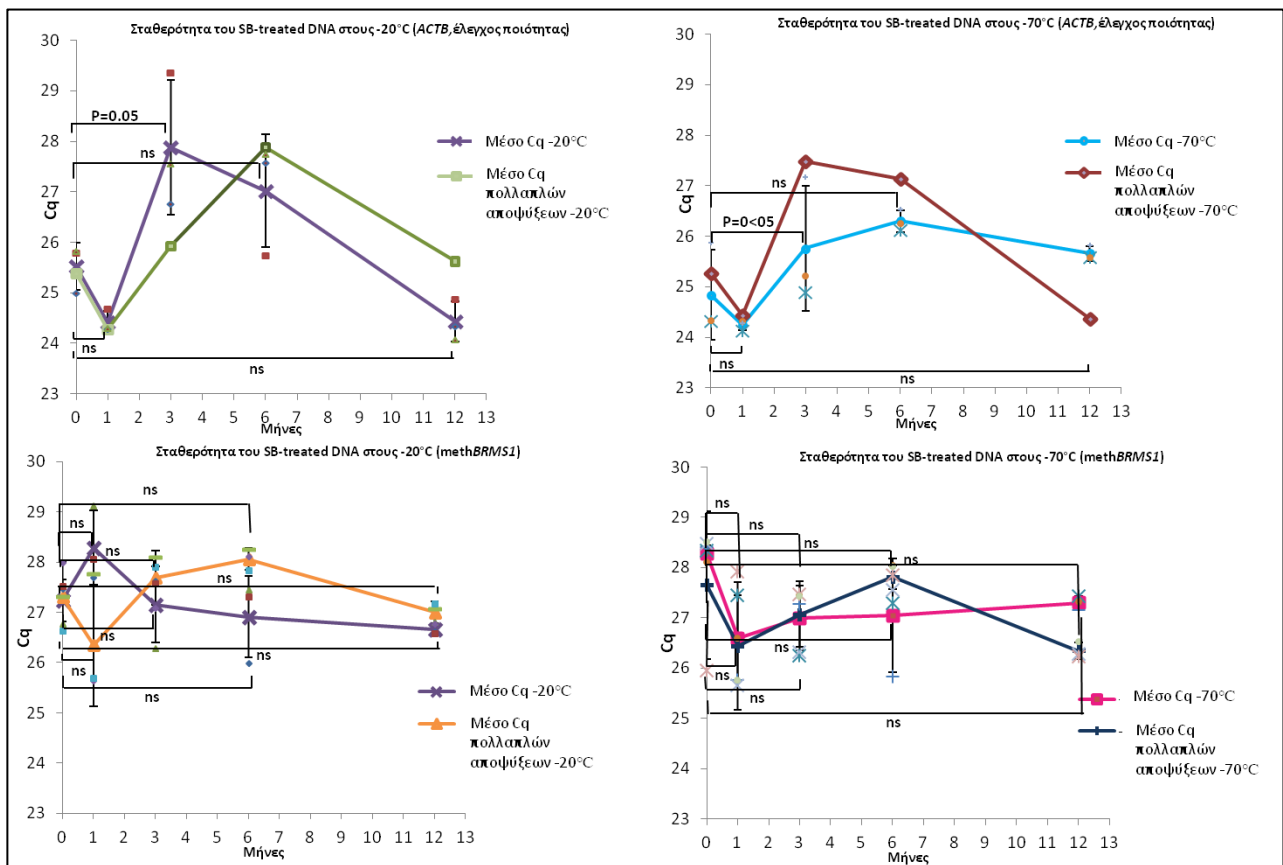
### 5.3.3. Σταθερότητα του χημικά επεξεργασμένου με όξινο θειώδες νάτριο DNA (SB-treated DNA)

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η σταθερότητα του gDNA που απομονώθηκε από  $10^6$  κύτταρα SKBR3 και προχώρησε σε επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. Το SB-treated DNA διαμοιράστηκε σε 12 aliquots και καταψύχτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-70^{\circ}\text{C}$ . Κάθε aliquot ξεπάγωνε μόνο μία φορά σε κάθε διαφορετική χρονική στιγμή ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_3$ ,  $T_6$ ,  $T_{12}$ ) για συνολικό διάστημα ενός έτους και η διερεύνηση της σταθερότητάς του SB-treated DNA πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας real-time MSP για την *ACTB* και το *BRMS1*. Η επίδραση των πολλαπλών αποψύξεων του δείγματος στους κύκλους ποσοτικοποίησης της PCR, έλαβε χώρα ταυτόχρονα, αναλύοντας ένα SB-treated DNA το οποίο ξεπάγωνε σε καθεμία από τις παραπάνω χρονικές στιγμές (Σχήμα 5.5). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν και οι μέσες τιμές  $C_q \pm SD$  παρατίθενται στο σχήμα 5.6. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, κατόπιν εφαρμογής της στατιστικής δοκιμασίας 2-tailed paired t-test μεταξύ των τιμών  $C_q$  values στη μέρα 0 και σε κάθε διαφορετική χρονική στιγμή, το SB-treated DNA είναι σταθερό υπό συνθήκες φύλαξης  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-70^{\circ}\text{C}$  για ένα χρόνο. Η τιμή  $p < 0,05$  η οποία παρατηρήθηκε στην 3<sup>η</sup> χρονική στιγμή των μετρήσεων ( $T_3$ ) για την ποιότητα του εξεταζόμενου SB-treated DNA αποδίδεται σε τυχαίο σφάλμα κατά την εφαρμογή της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο της *ACTB*. Επιπλέον, οι επαναλαμβανόμενες αποψύξεις του δείγματος δεν επηρεάζουν την σταθερότητα του SB-treated DNA. Με αυτόν τον τρόπο, τα δείγματα SB-treated DNA είτε σε καταψύκτες των  $-20^{\circ}\text{C}$  είτε των  $-70^{\circ}\text{C}$ , μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια με την πάροδο του χρόνου σε μοριακές αναλύσεις με real time MSP.





Σχήμα 5.5. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη σταθερότητας του SB-treated DNA



Σχήμα 5.6. Αποτελέσματα real-time MSP για την ACTB και BRMS1 κατά την αποθήκευση SB-treated DNA στους -20°C και -70°C για χρονικό διάστημα 1 έτους: Cq (n=3) και SD τιμές για το SB-treated DNA (ns: not significant, μη σημαντικό)

#### 5.3.4. Σύγκριση δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων κιτ για επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο και αξιολόγηση συμβατότητας για επακόλουθη ενίσχυση με ενζυμικό πολλαπλασιασμό (WGA)

Έγινε σύγκριση δύο εμπορικά διαθέσιμων κιτ (EpiTect Fast Bisulfite Kit and EZ DNA Methylation Gold Kit), σε συνδυασμό με ακόλουθη ενίσχυση του SB-treated DNA με χρήση του EpiTect Whole Bisulfite Kit (Qiagen Germany), το οποίο είναι ειδικά σχεδιασμένο για εφαρμογές με real-time MSP.

Αναφορικά με τη σύγκριση της απόδοσης των δύο κιτ, χρησιμοποιήσαμε τα τρία πρότυπα ελέγχου: α) πλακουντιακό DNA, β) SB-treated DNA από SKBR3 και γ) 100% μεθυλιωμένο DNA. Για την ελαχιστοποίηση των αναλυτικών σφαλμάτων, ως αρχικό υλικό προστέθηκε η ίδια ποσότητα DNA (500ng), από την ίδια «μήτρα» και ο τελικός όγκος έκλουσης του SB-treated DNA ήταν σε 10μL διαλύματος έκπλυσης, για όλα τα πρότυπα. Για την εκτίμηση της απόδοσης της αντίδρασης μετατροπής με όξινο θειώδες νάτριο, τα δείγματα ελέγχθηκαν για μεθυλίωση του *SOX17*. Καλύτερα αποτελέσματα επέδειξε το EZ DNA Methylation Gold Kit, αφού οι κύκλοι ποσοτικοποίησης της PCR (Cq) είχαν χαμηλότερες τιμές και για τα 3 controls στη real-time MSP για το *SOX17*. Μάλιστα, παρατηρήθηκε απώλεια τιμών όταν τα Cq ήταν κοντά στο όριο ποσοτικοποίησης και μειωμένο σήμα φθορισμού. Η εφαρμογή του EpiTect Fast Bisulfite Kit για τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση ρύθμισης του όγκου της αρχικής αντίδρασης για χαμηλής συγκέντρωσης δείγματα (40μL αραιωμένου DNA, Πίνακας 4.2).

Όσον αφορά στο WGA, κατά το συνδυασμό του EpiTect Fast Bisulfite Kit με το EpiTect Whole Bisulfite Kit, καλύτερα αποτελέσματα σημειώθηκαν κατά τη ρύθμιση αρχικού όγκου αντίδρασης με όξινο θειώδες νάτριο για υψηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων και επακόλουθη αραιώση του ενισχυμένου πλέον SB-treated DNA 1:10 με H<sub>2</sub>O. Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της real-time MSP πριν και μετά την αντίδραση ενίσχυσης για το πλακουντιακό και το 100% μεθυλιωμένο DNA, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές Cq είναι απόλυτα συγκρίσιμες όταν το δείγμα αραιωνόταν 1:10 και χρησιμοποιούταν ως στόχος της real-time MSP. Για κάθε άλλο συνδυασμό ρύθμισης όγκου της αντίδρασης χημικής τροποποίησης και αραιώσης του SB-treated DNA μετά το WGA, παρατηρήθηκαν ποικίλες διακυμάνσεις. Ο συνδυασμός, από την άλλη, του EZ DNA Methylation Gold Kit με το EpiTect Whole Bisulfite Kit, επέδειξε διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές Cq πριν και μετά το WGA, ήταν απόλυτα

συγκρίσιμες στην περίπτωση μη-αραίωσης του ενισχυμένου SB-treated DNA. Αντίθετα, η αραίωση των ενισχυμένων SB-treated DNA προτύπων ελέγχου 1:5 ή 1:10, προκάλεσε την μειωμένη επίδοση του WGA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με λεπτομέρεια στον Πίνακα 5.4.

**Πίνακας 5.4. Αξιολόγηση της συμβατότητας δύο διαφορετικών κιτ για επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο σε συνδυασμό με επακόλουθο WGA: real-time MSP για το *SOX17* (όλες οι μετρήσεις εις τριπλούν, μέσο  $C_q \pm SD$ , CV%)**

Πειραματικές συνθήκες	SB-treated DNA πρότυπο	
	Πλακουντιακό DNA	100% μεθυλιωμένο DNA
EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA)		
Πριν το WGA	33,63 ± 0,18 (CV%=0,54%)	28,51 ± 0,21 (CV%=0,74%)
Μετά το WGA χωρίς αραίωση	34,21 ± 0,26 (CV%=0,76%)	28,53 ± 0,32 (CV%=1,13%)
Μετά το WGA με αραίωση 1:5	>40,00	31,24 ± 0,17 (CV%=0,55%)
Μετά το WGA με αραίωση 1:10	>40,00	33,05 ± 0,11 (CV%=0,32%)
EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen, Germany)-Υψηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων		
Πριν το WGA	>40,00	36,06 ± 0,05 (CV%=0,15%)
Μετά το WGA χωρίς αραίωση	33,43 ± 0,15 (CV%=0,45%)	29,47±0,17 (CV%=0,56)
Μετά το WGA με αραίωση 1:5	38,19 ± 0,14 (CV%=0,35%)	32,79 ± 0,1 (CV%=0,31%)
Μετά το WGA με αραίωση 1:10	>40,00	36,2 ± ,026 (CV%=0,73%)
EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen, Germany)-Χαμηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων		
Πριν το WGA	>40,00	28,89±0,75 (CV%=2,60%)
Μετά το WGA χωρίς αραίωση	32,46±0,35 (CV%=1,08%)	30,92±0,43 (CV%=1,37%)
Μετά το WGA με αραίωση 1:5	36,82 ± 0,37 (CV%=0,99%)	32,58 ± 0,89 (CV%=2,72%)
Μετά το WGA με αραίωση 1:10	>40,00	35,19 ± 0,27 (CV%=0,78%)

#### 5.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Παρόλο που η ανάλυση του ctDNA εφαρμόζεται ήδη σε ευρεία κλίμακα ως στρατηγική υψηλής απόδοσης για την αξιολόγηση κλινικών δειγμάτων στα πλαίσια της υγρής βιοψίας, η εφαρμογή των διαγνωστικών εξετάσεων που βασίζονται σε αναλύσεις ctDNA στην κλινική πράξη εξακολουθεί να αντιμετωπίζει αρκετές τεχνικές δυσκολίες, καθώς υπάρχει πλήρης έλλειψη αναλυτικής συναίνεσης και προτυποποιημένης διαδικασίας αναλύσεων. Οι παρατηρούμενες διαφορές των αποτελεσμάτων που αναφέρονται μεταξύ ερευνητικών ομάδων, οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης και ποσοτικού προσδιορισμού του DNA. Η μελέτη SPIDIA-DNAplac, η οποία βασίστηκε στην εφαρμογή ενός εξωτερικού συστήματος ελέγχου ποιότητας για την αξιολόγηση της επίδρασης της προ-αναλυτικής φάσης στις μετρήσεις cfDNA, αποκάλυψε αξιοσημείωτες διαφορές στην προσέγγιση μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων (124).

Ειδικά στην περίπτωση μελετών μεθυλίωσης του DNA με εφαρμογές στην υγρή βιοψία, αρκετές είναι οι προαναλυτικές παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την αξιοπιστία του αποτελέσματος. Παραδείγματα αυτών αποτελούν το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί έως την απομόνωση του πλάσματος, οι συνθήκες αποθήκευσης του DNA που έχει υποστεί επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και η εγκυρότητα των WGA πρωτοκόλλων για εφαρμογή σε SB-treated DNA. Προηγούμενες μελέτες (265,266) έχουν ήδη καταδείξει ανεπιθύμητα αποτελέσματα σχετικά με τη σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA κατά τη διάρκεια διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης πλήρους αίματος με την πάροδο του χρόνου. Πιο συγκεκριμένα, ενώ αφενός διαπιστώθηκε ότι ορισμένες συνθήκες αποθήκευσης δεν έχουν επίπτωση στην ακεραιότητα και τη μεθυλίωση του DNA (29), από την άλλη, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη μεθυλίωση του DNA μετά από δέκα μήνες αποθήκευσης πλήρους αίματος (266).

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρεται στη μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων και αξιολόγησης της σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και της μεθυλίωσης του SB-treated DNA υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ( $p < 0,05$ ) μεταξύ των τιμών Cq τη χρονική στιγμή  $T_0$  και  $T_8$ , επομένως η πληροφορία της μεθυλίωσης δε διατηρείται εφόσον η απομόνωση του ctDNA πραγματοποιηθεί από δείγματα πλάσματος συντηρημένα σε βαθιά κατάψυξη ( $-70^\circ\text{C}$ ) για 8 μήνες. Αντίθετα, το SB-treated DNA μπορεί να διατηρηθεί σε καταψύκτες και των  $-20^\circ\text{C}$  και των  $-70^\circ\text{C}$  για ένα έτος, χωρίς κανένα πρόβλημα στην ανάλυση μεθυλίωσης με real-time MSP.

Πρόσφατα, οι Holmes et al, σύγκριναν την απόδοση 12 εμπορικά διαθέσιμων κιτ (262) και ανάμεσα στους 18.900 διαφορετικούς SB-treated γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν, έδειξαν ότι το EpiTect Bisulfite Kit πέτυχε απόδοση 98,7%, ενώ το EZ DNA Methylation-Gold kit 99,7% και πιο υψηλή καθαρότητα του SB-treated DNA. Βασισμένοι στα άνωθεν αποτελέσματα, αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα μόνο των δύο αυτών κιτ. Τα αποτελέσματά μας αναφορικά με την απόδοση των παραπάνω κιτ, συμφωνεί απόλυτα με τη βιβλιογραφία, καθώς το EZ DNA Methylation Gold Kit πέτυχε τις χαμηλότερες τιμές C<sub>q</sub> στην εφαρμοζόμενη real-time MSP μεθοδολογία, καθώς και υψηλότερα σήματα φθορισμού. Παρόμοιες παρατηρήσεις έρχονται να επαληθεύσουν τα αποτελέσματά μας, από την ομάδα των Izzì et al, οι οποίοι εφαρμόζοντας την τεχνική pyrosequencing σε περιοχές αντιπροσωπευτικές των διαφορετικών επιπέδων μεθυλίωσης και γενωμικού περιεχομένου, σύγκριναν την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας με όξινο θειώδες νάτριο για πέντε εμπορικά διαθέσιμα κιτ (264).

Οι Bundo et al, εξέτασαν την εγκυρότητα και τους περιορισμούς κατά την εφαρμογή WGA του SB-treated DNA χρησιμοποιώντας το EpiTect Bisulfite kit και το EpiTect Whole Bisulfite kit με την μεθοδολογία Illumina Infinium HumanMethylation 450 σε συνδυασμό με pyrosequencing (267). Οι αναλύσεις τους αποκάλυψαν ότι κατά την εφαρμογή του WGA, κρίσιμο βήμα αποτελεί η ποσότητα του αρχικού SB-treated DNA που εισάγεται. Πιο συγκεκριμένα, η σύγκριση μεταξύ των προϊόντων του WGA χρησιμοποιώντας 50ng ή 10ng αρχικού SB-treated DNA, έδειξε ξεκάθαρα περισσότερες αποκλίσεις στις αντιδράσεις των 10ng. Αναφέρουν, επίσης, ότι αν και τα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν σχετικά συντηρημένα και παρουσίασαν μικρή απόκλιση στις υπομεθυλιωμένες και υπερμεθυλιωμένες περιοχές, παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στο μεσαίο εύρος των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε την αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων κιτ για επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, σε συνδυασμό με επακόλουθο WGA χρησιμοποιώντας το EpiTect Whole Bisulfite Kit, το οποίο είναι ειδικά σχεδιασμένο για εφαρμογές real-time MSP. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι το WGA του SB-treated DNA χρησιμοποιώντας το EpiTect Whole Bisulfite Kit είναι αξιόπιστο, αφού λαμβάνουμε πανομοιότυπα αποτελέσματα πριν και μετά την αντίδραση ενίσχυσης και με τα 2 κιτ για χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο. Αυτό αποτελεί σημαντικό εύρημα, καθώς μπορεί να ξεπεράσει το πρόβλημα της περιορισμένης ποσότητας δείγματος για εφαρμογές στην υγρή βιοψία.

Εν κατακλείδι, η προτυποποίηση των προαναλυτικών παραμέτρων που εμπλέκονται σε αναλύσεις μεθυλίωσης του DNA είναι πολύ κρίσιμη για να διασφαλισθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, πριν την οποιαδήποτε κλινική εφαρμογή τους σε αναλύσεις κλινικών δειγμάτων στα πλαίσια της υγρής βιοψίας, όπου το διαθέσιμο υλικό είναι περιορισμένο. Σε κάθε περίπτωση, απαραίτητος είναι ο ποιοτικός έλεγχος σε κάθε βήμα της ανάλυσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ *ESR1* ΣΕ CTCs ΚΑΙ ctDNA: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

#### 6.1. Εισαγωγή

Οι στοχευμένες θεραπείες έχουν αλλάξει σημαντικά το πεδίο της θεραπείας του καρκίνου την τελευταία δεκαετία. Ωστόσο, περίπου όλοι οι τύποι όγκων αποκτούν αντίσταση στη συστηματική θεραπεία, ως αποτέλεσμα της ετερογένειας του όγκου, της εξέλιξης των κλώνων και της επιλογής. Ειδικά στον καρκίνο του μαστού, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου μαστού (HR+) έχει, πλέον, οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών οι οποίες έχουν βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα σε ασθενείς. Εντούτοις, η ενδοκρινική ανθεκτικότητα της νόσου, παραμένει ακόμα η κύρια αιτία θνησιμότητας στους ασθενείς με καρκίνο μαστού. Νέα ευρήματα, βασισμένα σε ολοκληρωμένη ανάλυση πρωτογενών όγκων και μεταστατικών θέσεων, έχουν αποκαλύψει την τεράστια ετερογένεια του όγκου στον καρκίνο του μαστού και την εξέλιξη του όγκου που μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια της επίκτητης αντίστασης σε συστηματικές θεραπείες (268).

Η επικουρική ενδοκρινική θεραπεία στοχεύει στην αναστολή σηματοδότησης του οιστρογονικού υποδοχέα (ER) και αντιπροσωπεύει μία αποτελεσματική θεραπεία για ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ERα-θετικό καρκίνο μαστού. Η μοναδική μεταγραφική απόκριση στα οιστρογόνα σε κάθε κυτταρικό υπότυπο ειδικό για τον ιστό ρυθμίζεται, εν μέρει, από το επιγονιδίωμα.

Η διαφοροποιημένη μεθυλίωση του DNA και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης χρησιμεύουν στην υπόδειξη της προσβασιμότητας σε λειτουργικές, ανταποκρινόμενες στα οιστρογόνα περιοχές του γονιδιώματος, κι έτσι να καθορίζουν την ενδοκρινική απόκριση. Οποιαδήποτε μη φυσιολογική ενεργοποίηση του δικτύου σηματοδότησης του *ESR1* στα επιθηλιακά κύτταρα των θηλαστικών, αποτελεί την απαρχή της ογκογένεσης και οδηγεί σε *ESR1*-θετικό καρκίνο μαστού (269). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία, η οποία συχνά αντανάκλα μια αλλαγή στην κατάσταση του ER, σε αυτούς τους ασθενείς. Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι σε ER-θετικούς όγκους, τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG είναι αντιστρόφως συνδεδεμένα με το προφίλ έκφρασης του ER, υποδηλώνοντας ότι τα CpG

δινουκλεοτίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μεταγραφής του ER (270). Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μεθυλίωση του *ESRI* σε διάφορους τύπους καρκίνου (271–275), όμως μόνο ένας περιορισμένος αριθμός από αυτές έχει αποδείξει κλινική σημασία όσον αφορά στη διάγνωση (276), στην πρόγνωση (277) και στην ανταπόκριση στη θεραπεία (278).

Στον καρκίνο του μαστού, η επισίγαση του *ESRI* γονιδίου λόγω μεθυλίωσής του, σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης, ενώ η μεθυλίωση του *ESRI* στο περιφερικό αίμα σχετίζεται σημαντικά με την έλλειψη έκφρασης του ER στον ιστό του όγκου που έχει υποστεί αφαίρεση (279). Έτσι, η αξιολόγηση της μεθυλίωσης του *ESRI*, μπορεί να προσθέσει προγνωστική αξία στην ταυτοποίηση του αυλικού υποτύπου με κακή πρόγνωση και ασθενών με δυνητικά μεγαλύτερη αντοχή στην ορμονοθεραπεία (279).

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *ESRI*. Μέσω της εφαρμογής της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας σε δείγματα ασθενών, αναφέρεται για πρώτη φορά η ύπαρξη μεθυλίωσης του *ESRI* στα CTCs και στο αντίστοιχο ctDNA ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης ER και η μεθυλίωση του γονιδίου *ESRI* βρέθηκαν να σχετίζονται αντιστρόφως σε πρωτογενείς όγκους μαστού και το προφίλ μεθυλίωσης του *ESRI* στο ctDNA από πλάσμα ασθενών, είχε πολύ υψηλή αντιστοιχία με τη μεθυλίωση του *ESRI* στα CTCs. Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε η κλινική χρησιμότητα της μεθυλίωσης του *ESRI* methylation σε CTCs απομονωμένα από διαδοχικά δείγματα περιφερικού αίματος 19 ασθενών με ER+/ HER2– μεταστατικό καρκίνο μαστού που είχαν λάβει συνδυαστική θεραπεία με everolimus/exemestane. Για πρώτη φορά, αναφέρουμε την ύπαρξη συσχέτισης της μεθυλίωσης του *ESRI* στα CTCs με τη λαμβανόμενη θεραπεία, σε πλαίσια ανταπόκρισης των ασθενών σε αυτή (280).

## 6.2. Πειραματική πορεία

Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία έλαβε χώρα σε ξεχωριστούς χώρους, με διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του DNA, η χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και η προετοιμασία των αντιδράσεων real-time MSP πραγματοποιούνται σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar-flow hoods) υπό συνθήκες ελεύθερης DNAσών. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στο NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 4.10. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα αναφορικά με τη σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και του SB-treated DNA, η απομόνωση ctDNA από δείγματα



πλάσματος πραγματοποιήθηκε εντός χρονικού διαστήματος λιγότερου των 8 μηνών και τα δείγματα SB-treated DNA αποθηκεύτηκαν στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση τους. Με τον τρόπο αυτό, προσπαθήσαμε να διασφαλίσουμε την ακεραιότητα των αποτελεσμάτων μέσω του εκμηδενισμού σφαλμάτων από τις παραπάνω προαναλυτικές παραμέτρους. Σε όλα τα βήματα της πειραματικής πορείας, πραγματοποιήθηκε ο ανάλογος έλεγχος ποιότητας, όπως αυτός περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.3.1 της παρούσας διατριβής.

### 6.2.1. Κλινικά δείγματα

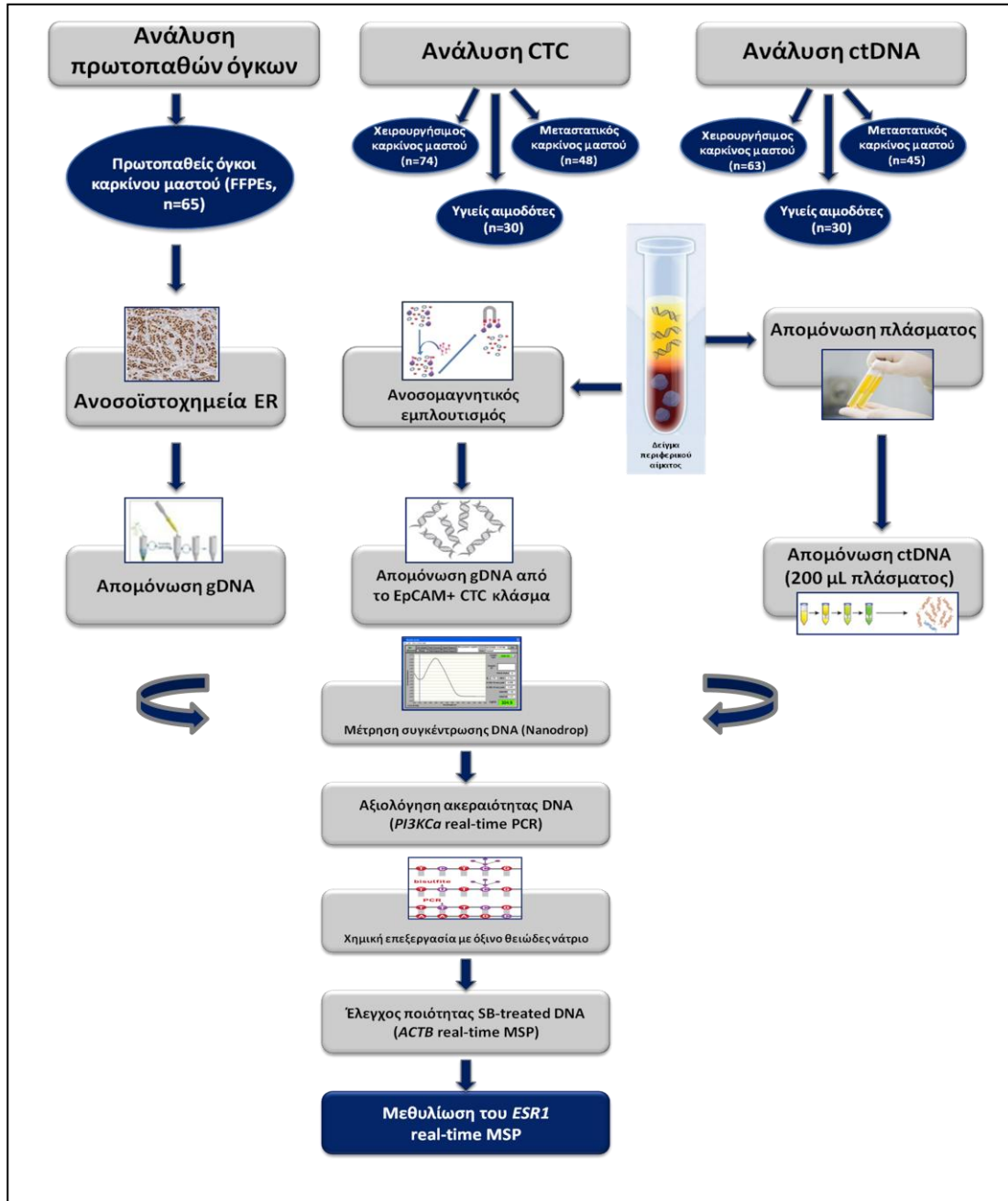
Για την κλινική επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου για ανίχνευση της μεθυλίωσης του *ESRI*, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές ομάδες δειγμάτων ασθενών: μία ομάδα ελέγχου και μία ανεξάρτητη ομάδα. 65 μονιμοποιημένοι ιστοί εγκλεισμένοι σε παραφίνη (FFPEs) από ασθενείς με καρκίνο μαστού συλλέχθηκαν από τη Γενική Κλινική «ΙΑΣΩ General» (Υπεύθυνος: Καθ. Β. Γεωργούλιας). Από το ίδιο κέντρο συλλέχθηκαν 20mL περιφερικού αίματος σε σωληνάρια συλλογής EDTA, από 122 ασθενείς με καρκίνο μαστού (74 με πρώιμη και 48 με μεταστατική νόσο) και από 30 υγιείς αιμοδότες και το ErCAM+ CTC-κλάσμα απομονώθηκε όπως περιγράφεται στα υποκεφάλαια 4.1-4.2. Το ctDNA απομονώθηκε από 200μL πλάσματος 63 ασθενών με πρώιμη νόσο και 45 ασθενών με μεταστατική νόσο, καθώς κι από 30 υγιείς αιμοδότες. Τα άνωθεν δείγματα ορίστηκαν ως η «ομάδα ελέγχου» ασθενών (Σχήμα 6.1).

Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν 58 δείγματα από ασθενείς με καρκίνο μαστού από το Π.Γ.Ν. «Αττικόν» (Υπεύθυνη: Αναπλ. Καθ. Α. Ψυρρή) και πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των CTCs χρησιμοποιώντας το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> (Menarini, Italy). Η ομάδα αυτή των ασθενών αποτελούνταν από 36 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού και 22 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, πριν από την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας. Για τους ίδιους ασθενείς, λήφθηκε το πλάσμα από την ίδια αιμοληψία και απομονώθηκε ctDNA (2mL πλάσματος). Τέλος, 54 υγιείς αιμοδότες αποτέλεσαν τον πληθυσμό ελέγχου για την ανάλυση του ctDNA. Τα παραπάνω δείγματα ορίστηκαν ως η ανεξάρτητη ομάδα και παρουσιάζονται στο σχήμα 6.2.

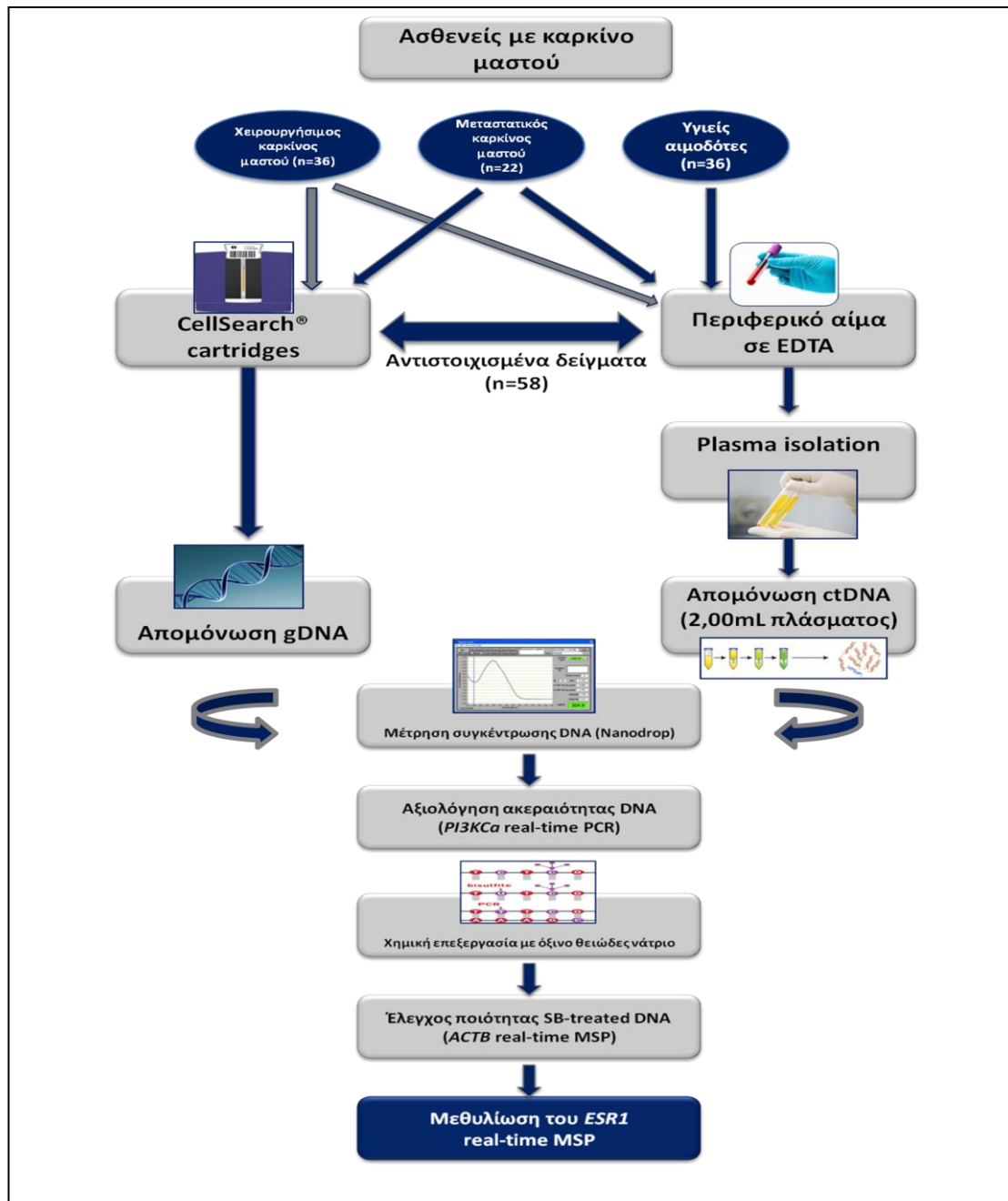
Η ομάδα που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της κλινικής χρησιμότητας της μεθυλίωσης του *ESRI* σε δείγματα υγρής βιοψίας, περιελάμβανε 19 μεταστατικούς ασθενείς με ER(+)/HER2(-) όγκους, από το Π.Γ.Ν. Ηρακλείου Κρήτης (Υπεύθυνος: Καθ. Β. Γεωργούλιας). Σε αυτή την ομάδα, οι ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα CTCs σύμφωνα με το CellSearch<sup>®</sup> και λάμβαναν θεραπεία με συνδυασμό everolimus/exemestane ως τυπική θεραπεία. Όλοι οι ασθενείς είχαν προηγουμένως λάβει Tamoxifen ως επικουρική θεραπεία, και/ή letrozol ως θεραπεία

πρώτης γραμμής. Πριν από τον κάθε κύκλο της θεραπείας, συλλέχθηκαν σειριακά δείγματα περιφερικού αίματος από τους ασθενείς και τα CTCs απομονώθηκαν και καταμετρήθηκαν μέσω της πλατφόρμας CellSearch<sup>®</sup>. Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τα CTCs των CellSearch<sup>®</sup> cartridges (υποκεφάλαιο 4.9), υποβλήθηκε σε επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (υποκεφάλαιο 4.11) και τα δείγματα αναλύθηκαν, στη συνέχεια, για ανίχνευση του προφίλ μεθυσίωσης του *ESRI* με εφαρμογή της real-time MSP. Κατά μέσο όρο, 3 δείγματα συλλέχθηκαν από τον κάθε ασθενή σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές (πριν την έναρξη της θεραπείας, μετά από τον 1<sup>ο</sup> κύκλο και κατά την υποτροπή). Συνολικά, αναλύθηκαν 58 δείγματα από την παραπάνω ομάδα ασθενών (Σχήμα 6.3)

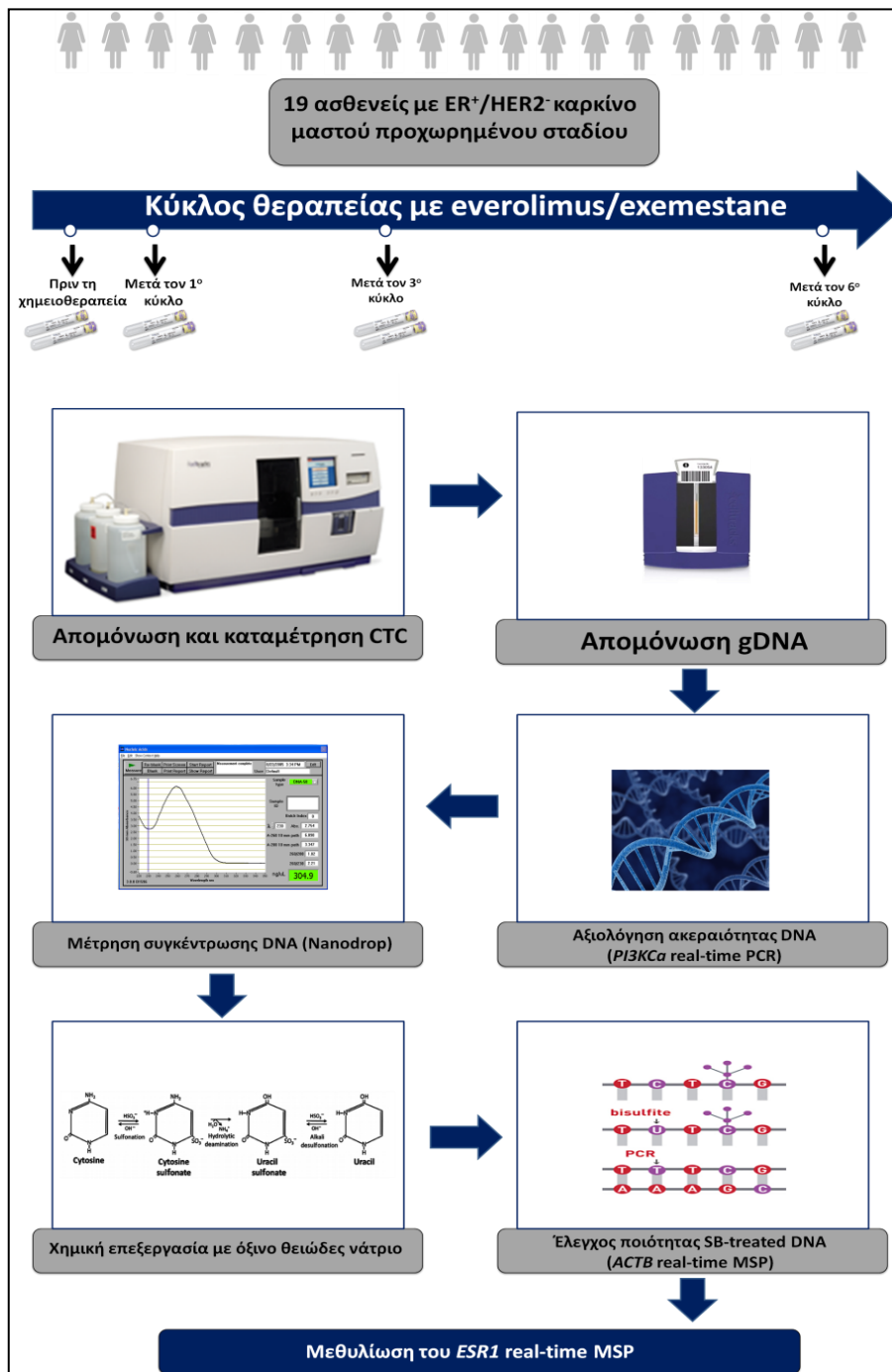
Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με την Διακήρυξη του Ελσίνκι (1964) και εγκρίθηκε από επιτροπές δεοντολογίας και ηθικής των συμμετεχόντων ιδρυμάτων. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν την υπογεγραμμένη συνειδητή συναίνεσή τους για να λάβουν μέρος στην παρούσα μελέτη.



Σχήμα 6.1. Διάγραμμα ροής για τη ομάδα ελέγχου ασθενών: Μελέτη μεθυλίωσης του *ESR1* σε πρωτοπαθείς όγκους, ErCAM+ CTC-κλάσματα και ctDNA, σε δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού



Σχήμα 6.2. Διάγραμμα ροής για την ανεξάρτητη ομάδα ασθενών: Μελέτη μεθυλίωσης του *ESR1* σε CTCs και αντίστοιχο ctDNA του ίδιου ασθενούς



Σχήμα 6.3. Διάγραμμα ροής ομάδας ασθενών για την αξιολόγηση της κλινικής χρησιμότητας της μεθυλίωσης του *ESR1* σε δείγματα γυρης βιοψίας

### **6.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς ιστούς μαστού εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPEs)**

Προς απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης 10mm που περιείχαν >80% καρκινικών κυττάρων. Το gDNA απομονώθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εδάφιο 4.6.1)

### **6.2.3. Απομόνωση DNA από EpCAM+ CTC-κλάσμα και κυτταρικές σειρές με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS**

Το gDNA απομονώθηκε από τα EpCAM+ CTC-κλάσματα και τις κυτταρικές σειρές MCF-7, SKBR3 και MDA-MB-231, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 4.8. Το απομονωμένο gDNA αναδιαλύθηκε σε 50μL NaOH 8mmol/L και αποθηκεύτηκε στους -70°C, μέχρι τη χρήση του.

### **6.2.4. Απομόνωση ctDNA από πλάσμα**

Τα δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν αντιπηκτικό EDTA, αναδεύτηκαν ελαφρώς και το πλάσμα απομονώθηκε εντός 2-4h από την συλλογή, με φυγοκέντρηση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την απομόνωση, το πλάσμα φυγοκεντρήθηκε και πάλι στα 2000g για 10min, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf και ακολούθησε η φύλαξή τους στους -70°C. Το High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Switzerland) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ctDNA από 200μL πλάσματος (εδάφιο 4.7.1) και το QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Germany) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ctDNA από 2mL πλάσματος (εδάφιο 4.7.2).

### **6.2.5. Απομόνωση gDNA από φύσιγγες CellSearch<sup>®</sup>**

Η ανάλυση με το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 4.4: για την ομάδα των ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση, χρησιμοποιήθηκαν 7,5mL περιφερικού αίματος για κάθε ασθενή, ενώ για τους ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, 3 σωληνάρια CellSave<sup>®</sup> συμπυκνώθηκαν για κάθε ασθενή (22,5mL περιφερικού αίματος). Μετά από την ανάλυση για CTC, οι φύσιγγες

(CellSearch<sup>®</sup> cartridges) τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον στους 4°C, όπου και φυλάχθηκαν μέχρι την απομόνωση του gDNA. Τα CTCs και WBCs (με χρώση από αντισώματα έναντι του CD45, pan-CK και DAPI) αναρροφήθηκαν από τα CellSearch<sup>®</sup> cartridge και ακολούθησε η απομόνωση gDNA με χρήση του QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Germany) σύμφωνα με τα προτεινόμενα από τον κατασκευαστή (υποκεφάλαιο 4.9).

### 6.2.6. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment)

Πριν προχωρήσουμε στην επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, εξετάστηκε η ακεραιότητα του gDNA για όλα τα δείγματα με εφαρμογή real-time PCR για το εξόνιο 20 του *PIK3CA* (281). Μόνο δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν στο *PIK3CA* προχώρησαν για χημική τροποποίηση, προς μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες και τη διατήρηση των μεθυλιωμένων κυτοσινών ανεπηρέαστες. Η χημική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA) (υποκεφάλαιο 4.11.2) και το SB-treated DNA αποθηκεύτηκε στους -70°C. Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, συμπεριλάβαμε dH<sub>2</sub>O και 100% μεθυλιωμένο DNA ως αρνητικό και θετικό πρότυπο ελέγχου, αντίστοιχα. Το SB-treated DNA από κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αναλυτικής ειδικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου, προτού προηγηθεί η ανάλυση των κλινικών δειγμάτων. Η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε με μεθοδολογία real-time MSP για τη *β-ακτίνη* (*ACTB*) (εδάφιο 5.2.4). Τέλος, το ανθρώπινο πλακουντιακό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control της real-time MSP μετά τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ το 100% μεθυλιωμένο DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA), ως το πλήρως μεθυλιωμένο, θετικό control της μεθοδολογίας.

### 6.2.7. Real-time MSP

Σχεδιάσαμε *in-silico* εκκινητές του γονιδίου *ESR1* για εφαρμογές MSP με χρήση του λογισμικού Primer Premier 5.00 (Premier Biosoft, USA), αποφεύγοντας τον σχηματισμό σταθερών δομών φουρκέτας, διμερών και ψευδών σημείων εκκίνησης. Για τη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων αλληλίων, και οι δύο εκκινητές περιείχαν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια. Επιπλέον, περιείχαν βάσεις θυμίνης οι οποίες έχουν προέλθει μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες κατά την αντίδραση της χημικής τροποποίησης, ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός χημικά επεξεργασμένου από μη-χημικά επεξεργασμένο DNA. Για να διαπιστωθεί η ειδικότητα της μεθόδου ως προς την ανίχνευση αποκλειστικά μεθυλιωμένων

αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικά δείγματα ελέγχου: gDNA το οποίο δεν έχει υποστεί χημική επεξεργασία, πλακουντιακό SB-treated DNA (0% methylated), SB-treated DNA που έχει προέλθει από τις κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3 και το Universal Methylated Human DNA Standard (100% μεθυλιωμένο DNA, ZYMO Research, USA). Οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, USA) και η αλληλουχία τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.1.

**Πίνακας 6.1. Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο *ESRI***

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>ESRI</i> (280)	<b>Πρόσθιος</b>	GCGTTGCGTTCGTTTTTAATTTTC	22	61,9	<b>113</b>
	<b>Ανάστροφος</b>	TAATCCGTAACCGCGAACAAA	21	61,0	

*ESRI* accession number NC\_000006.12

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο όργανο LightCycler 2.0 (Roche, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή και σε τελικό όγκο 10μL, με συστατικά που παρατίθενται στον Πίνακα 6.2 και θερμοκρασιακές συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 6.3. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία real-time MSP assay δεν είναι ποσοτική, επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε κατώφλι (cut-off) τιμών. Πιο συγκεκριμένα, ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν ανιχνεύεται σήμα ενίσχυσης στη real-time με  $C_q < 41,00$ , ενώ αρνητικό χαρακτηρίζεται το δείγμα εκείνο που δεν παρουσιάζει ενίσχυση ή καταγράφεται τιμή  $C_q > 41,00$ .

**Πίνακας 6.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ESRI* (280)**

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	5,25	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	1	0,5x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,8	2mM
dNTPs 10mM	0,15	0,15mM
BSA 10μg/μL	0,3	0,3μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,2	0,2μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,2	0,2μM
LC-Green 10x	1,0	1x
Τaq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	9,0	-
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	10,0	-



**Πίνακας 6.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ESRI* (280)**

Στάδιο real-time MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	63°C/20 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/20 sec*
	55 °C/10 sec
Ανάλυση καμπυλών τήξης	92 °C/0 sec* (ramp rate: 0,2 °C/sec)
	92 °C/1 min
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

### 6.2.8. Στατιστική ανάλυση

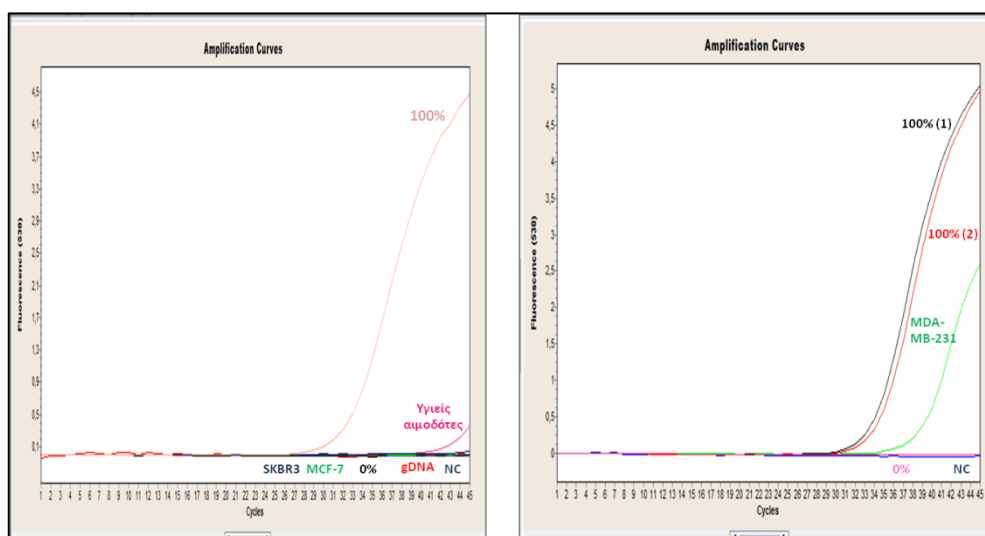
Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη σημαντικής διαφοράς μεταξύ των αναμενόμενων συχνοτήτων και των παρατηρούμενων συχνοτήτων μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών των δειγμάτων, εφαρμόσαμε τη μη-παραμετρική δοκιμασία  $\chi^2$ . Η αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ της έκφρασης του ER (ανοσοϊστοχημικά) και της μεθυσίωσης του *ESRI* στους πρωτοπαθείς όγκους μαστού καθώς και μεταξύ των αντιστοιχισμένων δειγμάτων CTCs και ctDNA, εφαρμόστηκε το Fisher exact test. Η ίδια στατιστική δοκιμασία εφαρμόστηκε και κατά τη συσχέτιση του προφίλ μεθυσίωσης του *ESRI* στα CTCs ασθενών θετικών σε ορμονικούς υποδοχείς και προχωρημένο στάδιο νόσου, με την ανταπόκριση στη θεραπεία με everolimus/exemestane. Το ελεύθερο εξέλιξης νόσου διάστημα (PFS) και η ολική επιβίωση υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kaplan Meier και οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του long rank test. Τέλος, εφαρμόστηκε μονοπαραμετρική Cox ανάλυση παλινδρόμησης, για τον προσδιορισμό του κινδύνου εξέλιξης και θανάτου σε θετικούς σε CTC ασθενείς. Οι τιμές  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 6.3. Αποτελέσματα

### 6.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας για τη μελέτη μεθυσίωσης του *ESRI* με real-time MSP

**Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών:** Οι πειραματικές συνθήκες της real-time MSP βελτιστοποιήθηκαν με λεπτομέρεια αναφορικά με τη θερμοκρασία και το χρόνο υβριδισμού των εκκινητών, αρχικά, έπειτα για τη βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και τέλος για τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος, του  $MgCl_2$ , των dNTPs και του BSA.

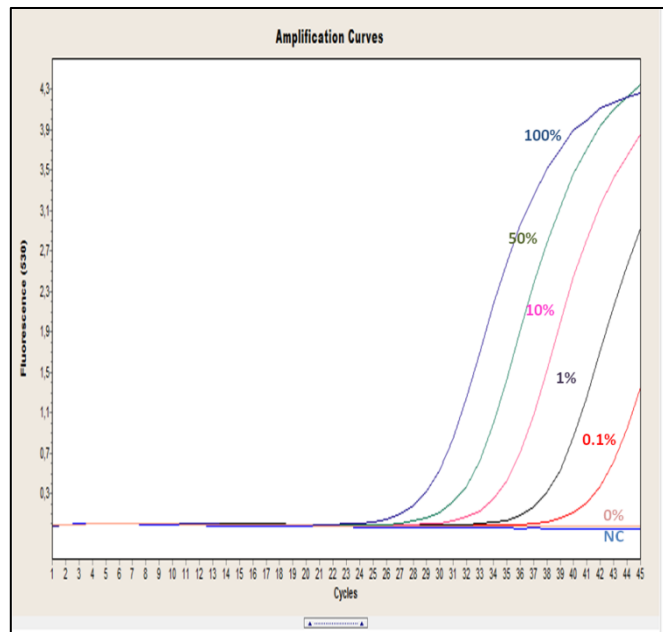
**Αναλυτική ειδικότητα:** Για την αξιολόγηση της αναλυτικής ειδικότητας της μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *ESR1*, πρώτα απ' όλα ελέγχθηκαν in silico οι εκκινητές και στη συνέχεια στην MSP, χρησιμοποιώντας gDNA το οποίο δεν έχει υποστεί τη διαδικασία της χημικής τροποποίησης και SB-treated πλακουντιακό DNA, το οποίο δεν είναι μεθυλιωμένο. Σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του *ESR1*. Καμία ενίσχυση δεν παρατηρήθηκε, επίσης, σε SB-treated DNA από τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SKBR3. Αντιθέτως, ενίσχυση με επακόλουθο σχηματισμό PCR προϊόντος, παρατηρήθηκε στην περίπτωση όπου σαν δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν SB-treated DNA από την κυτταρική σειρά MDA-MB-231 και το 100% μεθυλιωμένο DNA. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία είναι ειδική, αφού είναι ικανή να ανιχνεύει μεθυλίωση του *ESR1* μόνο σε SB-treated μεθυλιωμένες αλληλουχίες (Σχήμα 6.1).



Σχήμα 6.1. Αναλυτική ειδικότητα *ESR1* real-time MSP

**Αναλυτική ευαισθησία:** Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε με χρήση SB-treated συνθετικών προτύπων εις τριπλούν (0% και 100% μεθυλιωμένου DNA), με διαδοχικές αραιώσεις αυτών ώστε να ληφθούν διάφορα ποσοστά μεθυλίωσης (0,1%, 1%, 10% και 50%). Η αναπτυχθείσα μέθοδος για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *ESR1* ανίχνευσε με αξιοπιστία και

ειδικότητα την παρουσία 1 μεθυλιωμένης αλληλουχίας έναντι 99 μη μεθυλιωμένων, ποσοστό ευαισθησίας που ανέρχεται στο 1%, δηλαδή (Σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.2. Αναλυτική ευαισθησία *ESR1* real-time MSP

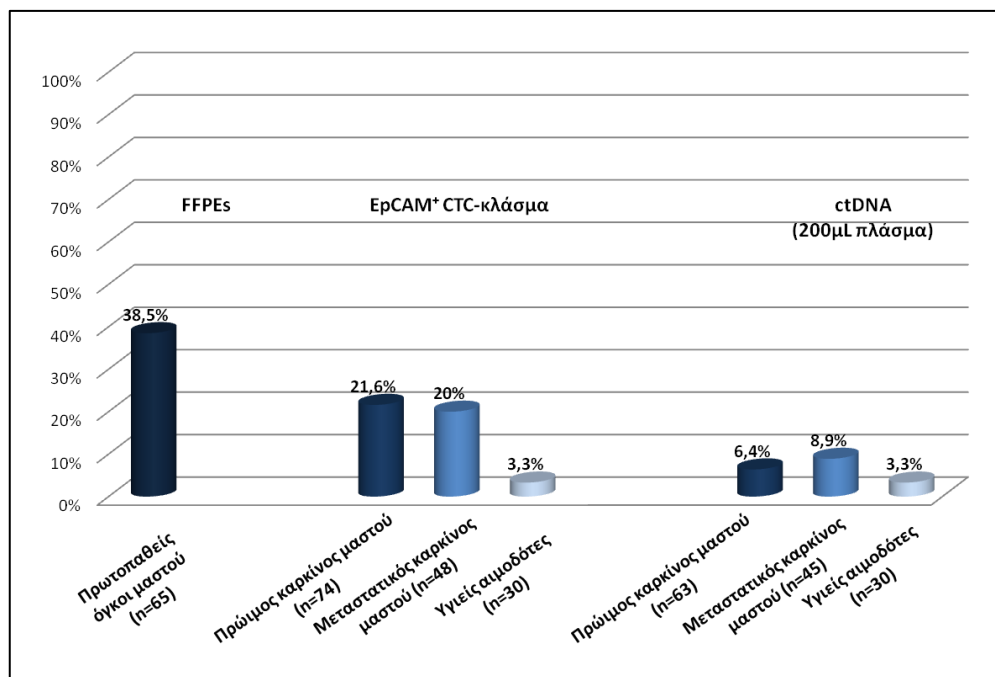
### 6.3.2. Ομάδα ελέγχου: αξιολόγηση της μεθόδου real-time MSP για τη μελέτη μεθυλίωσης του *ESR1* σε πρωτοπαθείς όγκους, EpCAM+ CTC-κλάσματα και ctDNA

**Μεθυλίωση του *ESR1* σε πρωτοπαθείς όγκους (FFPEs):** Η αρχική εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού και πιο συγκεκριμένα σε ιστούς μονιμοποιημένους και εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPEs). Η μεθυλίωση του *ESR1* παρατηρήθηκε σε 25/65(38.5%) δείγματα (Σχήμα 6.3). Το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1*, συσχετίστηκε στη συνέχεια με την έκφραση του ER στον όγκο, όπως αυτή προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν μία αρνητική συσχέτιση μεθυλίωσης του *ESR1* και έκφρασης του ER στον πρωτοπαθή όγκο ( $p < 0,001$ , Fisher's exact test) των 56/65(86%) δειγμάτων (Πίνακας 6.4).

**Μεθυλίωση του *ESR1* σε EpCAM+ CTC-κλάσματα:** Το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* αξιολογήθηκε, στη συνέχεια, σε 122 EpCAM+ CTC-κλάσματα, απομονωμένα από το περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού. Η μεθυλίωση του *ESR1* παρατηρήθηκε σε 26/112 (23,3%) ασθενείς με καρκίνο μαστού. Πιο συγκεκριμένα, το *ESR1* ήταν μεθυλιωμένο σε 16/74

(21,6%) ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, σε 10/48 (20%) ασθενείς με επιβεβαιωμένη μετάσταση και μόνο σε 1/30 (3,3%) υγιείς αιμοδότες (Σχήμα 6.3).

**Μεθυλίωση του *ESR1* σε ctDNA πλάσματος:** Τέλος, εξετάστηκε το προφίλ μεθυλίωσης του DNA για το *ESR1* σε 108 ctDNA δείγματα πλάσματος, (63 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού και 45 ασθενείς με μεταστατική νόσο). Μεθυλίωση του *ESR1* ανιχνεύθηκε σε 8/108 (7,4%) ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα το *ESR1* ήταν μεθυλιωμένο σε 4/63 (6,3%) με πρώιμη νόσο, σε 4/45 (8,9%) ασθενείς με μεταστατική νόσο, ενώ σε μόνο 1/30 (3,3%) υγιείς αιμοδότες (Σχήμα 6.3).



Σχήμα 6.3. Ομάδα ελέγχου: Μεθυλίωση του *ESR1* σε πρωτοπαθείς όγκους, EpCAM<sup>+</sup> CTC-κλάσματα, ctDNA πλάσματος και υγιείς αιμοδότες.

### 6.3.3. Ανεξάρτητη ομάδα: Μεθυλίωση του *ESR1* σε CTCs και ctDNA πλάσματος του ίδιου ασθενούς

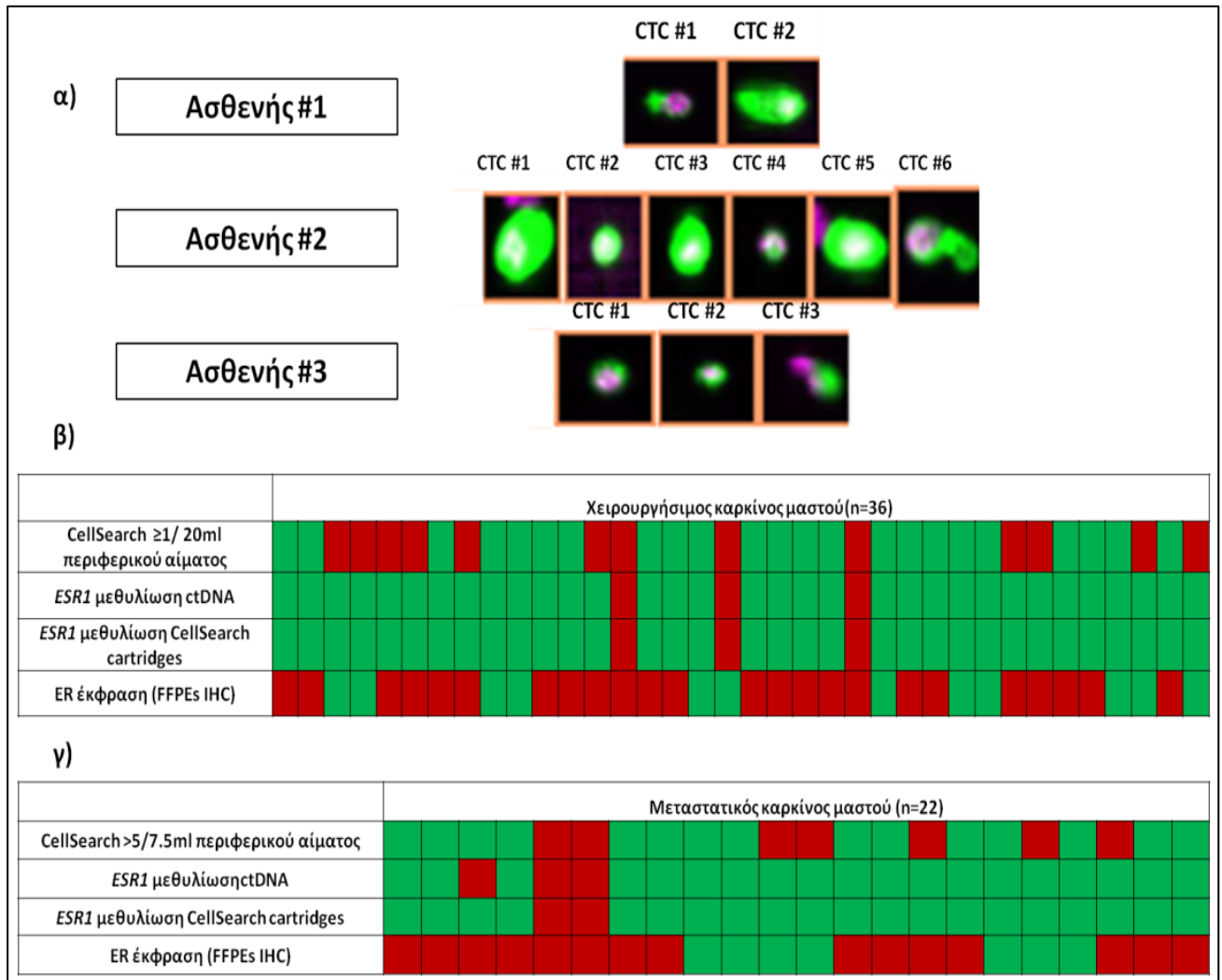
Η ανεξάρτητα ομάδα αποτελούταν από 58 αντιστοιχισμένα δείγματα CTC και ctDNA πλάσματος. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από την ίδια αιμοληψία, απομονώθηκαν την ίδια μέρα και επεξεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο, προς ελαχιστοποίηση των διαφορών που δύνανται να προκύψουν από προαναλυτικές παραμέτρους. Η ανάλυση των CTC για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με χρήση της πλατφόρμας CellSearch<sup>®</sup>. Για το λόγο αυτό, το προφίλ

μεθυλίωσης του *ESR1* αξιολογήθηκε στα παραπάνω 58 SB-treated gDNA δείγματα που απομονώθηκαν από CellSearch<sup>®</sup> cartridges, ανεξαρτήτως αριθμού των καταμετρημένων CTC (Σχήμα 6.4α). Η ανεξάρτητη ομάδα αποτελούταν από: α) 36 δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού για τα οποία πάνω από 1 CTC ανιχνεύθηκε στα 13/36 (36,1%) και β) 22 δείγματα ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση για τα οποία πάνω από 5 CTCs ανιχνεύθηκαν στα 7/22 (31,8%). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μεθυλίωση του *ESR1* ανιχνεύθηκε μόνο στα CTC-θετικά δείγματα και σε κανένα από τα CTC-αρνητικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, το *ESR1* ήταν μεθυλιωμένο σε 3/13 (23,1%) CTC-θετικά δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού (Σχήμα 6.4β) και σε 2/7 (28,6%) CTC-θετικά δείγματα ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση (Σχήμα 6.4γ).

Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* στα αντίστοιχα δείγματα ctDNA που απομονώθηκαν από το πλάσμα του ίδιου ασθενούς και 54 υγιείς αιμοδοτές. Σε αυτή την περίπτωση, μεθυλίωση του *ESR1* παρατηρήθηκε σε 3/36 (8,3%) δειγμάτων από πρώιμο καρκίνο, σε 3/22 (13,6%) δειγμάτων από μεταστατικό καρκίνο και σε 2/54 (3,7%) υγιών αιμοδοτών (Σχήματα 6.4β,γ).

Αναφορικά με τη σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης στα CTCs και στο αντίστοιχο ctDNA από τον ίδιο ασθενή, υπήρχε υψηλή συμφωνία αποτελεσμάτων (Πίνακας 6.4). Για την ακρίβεια, παρατηρήθηκε μία σχεδόν τέλεια συμφωνία στα ευρήματα για 57/58 (98,3%) του συνόλου των ασθενών. Στα θετικά για CTCs δείγματα ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, η συμφωνία της μεθυλίωσης του *ESR1* μεταξύ CTCs και αντίστοιχου ctDNA ήταν για 36/36 (100%) ασθενείς, ενώ για τους μεταστατικούς ασθενείς η συμφωνία ήταν για 21/22 (95,5%) ( $p < 0,001$  και στις δύο περιπτώσεις). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματά μας σχετικά με την πιθανώς κοινή προέλευση ctDNA και CTCs (97).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs και το ctDNA με το προφίλ έκφρασης του ER στους πρωτοπαθείς όγκους των ίδιων ασθενών (Πίνακας 6.4). Η έκφραση του ER στον ιστό συσχετίστηκε αρνητικά με τη μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs για 36/58 (62,1%) των περιπτώσεων, ενώ για το ctDNA υπήρχε αντίθετη συσχέτιση για 35/58 (60,3%) των περιπτώσεων.



Σχήμα 6.4. Ανεξάρτητη ομάδα: α) Ενδεικτικές εικόνες από το CellSearch® για CTCs που καταμετρήθηκαν σε 3 ασθενείς, β) heatmap για τη μεθυλίωση του *ESR1* σε δείγματα CTCs αντιστοιχισμένα με ctDNA και προφίλ έκφρασης του ER σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, γ) heatmap για τη μεθυλίωση του *ESR1* σε δείγματα CTCs αντιστοιχισμένα με ctDNA και προφίλ έκφρασης του ER σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού

**Πίνακας 6.4. Σύγκριση της έκφρασης του ER (IHC) και της μεθυλίωσης του *ESR1* σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού, CTCs, ctDNA και σε αντιστοιχισμένα δείγματα ctDNA-CTCs από ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού**

<b>Ομάδα ελέγχου: Σύγκριση της έκφρασης του ER (IHC) και της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού</b>				
		Μεθυλίωση <i>ESR1</i>		Σύνολο
		Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	
Έκφραση ER (IHC)	ER-	18	2	20
	ER+	7	38	45
Σύνολο		25	40	65
<b>Συμφωνία: 56/65 (86,2%) (p&lt;0.001, Fisher's exact test)</b>				
<b>Ανεξάρτητη ομάδα: Σύγκριση της έκφρασης του ER (IHC) σε πρωτοπαθείς όγκους και της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε CTCs (gDNA απομονωμένο από CellSearch® cartridges)</b>				
		Μεθυλίωση <i>ESR1</i>		Σύνολο
		Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	
Έκφραση ER (IHC)	ER-	1	18	19
	ER+	4	35	39
Σύνολο		5	53	58
<b>Συμφωνία: 36/58 (62,1%) (p=0,498, Fisher's exact test)</b>				
<b>Ανεξάρτητη ομάδα: Σύγκριση της έκφρασης του ER (IHC) σε πρωτοπαθείς όγκους και της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε ctDNA από τον ίδιο ασθενή</b>				
		Μεθυλίωση <i>ESR1</i>		Σύνολο
		Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	
Έκφραση ER (IHC)	ER-	1	18	19
	ER+	5	34	39
Σύνολο		6	52	58
<b>Συμφωνία: 35/58 (60,3%) (p=0,653, Fisher's exact test)</b>				
<b>Ανεξάρτητη ομάδα: Σύγκριση της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε αντιστοιχισμένα δείγματα ctDNA και CTCs από ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού (n=36)</b>				
		Μεθυλίωση <i>ESR1</i> (CTCs)		Σύνολο
		-	+	
Μεθυλίωση <i>ESR1</i> (ctDNA)	-	33	0	33
	+	0	3	3
Σύνολο		33	3	36
<b>Συμφωνία: 36/36 (100%) (p&lt;0,001, <math>\chi^2</math> test)</b>				
<b>Ανεξάρτητη ομάδα: Σύγκριση της μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> σε αντιστοιχισμένα δείγματα ctDNA και CTCs από ασθενείς με επιβεβαιωμένη μετάσταση (n=22)</b>				
		Μεθυλίωση <i>ESR1</i> (CTCs)		Σύνολο
		-	+	
Μεθυλίωση <i>ESR1</i> (ctDNA)	-	19	0	19
	+	1	2	3
Σύνολο		20	2	22
<b>Συμφωνία: 21/22 (95.4%) (p&lt;0,001, <math>\chi^2</math> test)</b>				

#### 6.3.4. Κλινική αξιολόγηση της μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs ασθενών με ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> προχωρημένου σταδίου καρκίνο μαστού, υπό ενδοκρινή θεραπεία

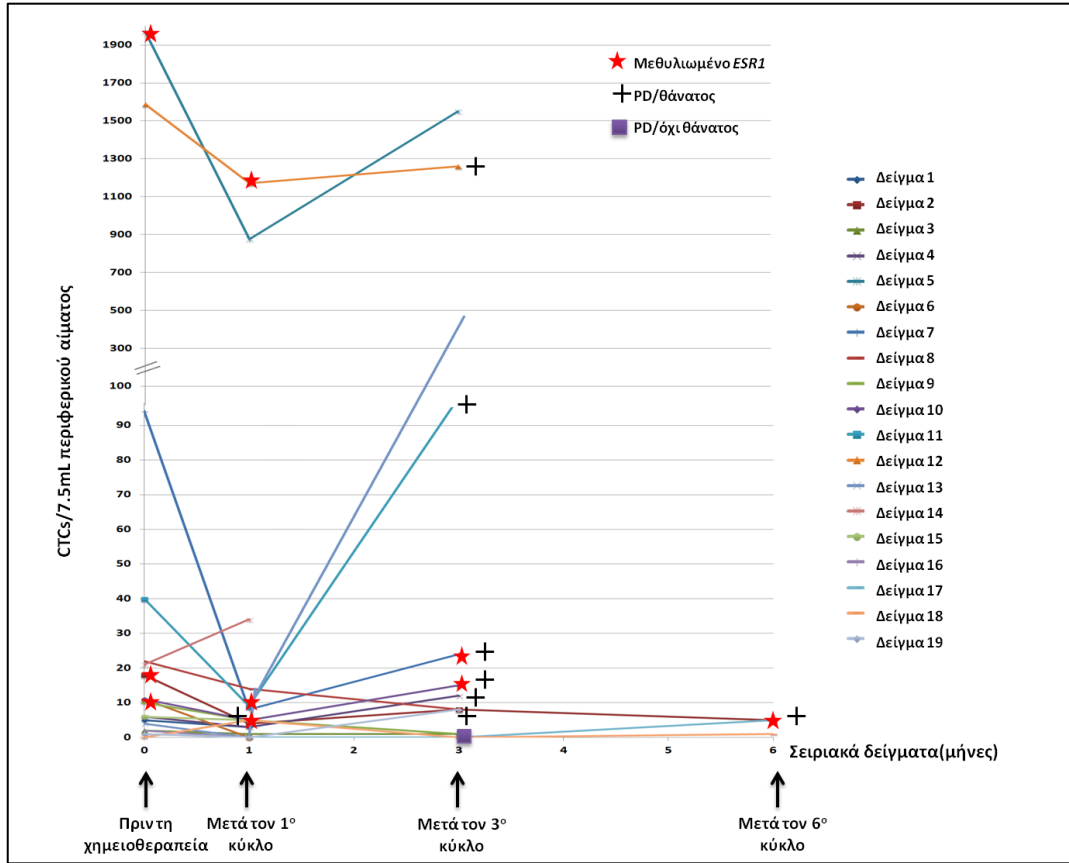
Η κλινική σημασία της μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs, αξιολογήθηκε σε μία ομάδα 19 επιλεγμένων ασθενών με ανιχνεύσιμα CTCs προ έναρξης της θεραπείας, σύμφωνα με την καταμέτρηση από το σύστημα CellSearch<sup>®</sup>, οι οποίοι είχαν λάβει θεραπεία με συνδυασμό everolimus/exemestane. Στα δείγματα αυτά, απομονώθηκε γενωμικό DNA από τα απομονωμένα με το CellSearch<sup>®</sup> CTCs, σε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές και προσδιορίστηκε το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1*. Κατά μέσο όρο, από τον κάθε ασθενή συλλέχθηκαν τουλάχιστον 3 δείγματα. Πάνω από 5CTCs/7.5mL περιφερικού αίματος ανιχνεύθηκαν για τα 36/58 (62,1%) προς ανάλυση δείγματα. Από τα παραπάνω, το *ESR1* βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 10/36 (27,8%) CTC-θετικά δείγματα, ενώ σε όλα τα CTC-αρνητικά δείγματα δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση (Σχήμα 6.5).

Η παρουσία μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs, συσχετίστηκε ακολούθως με την ανταπόκριση στην αγωγή everolimus/exemestane. 10/19(52,6%) ασθενείς παρουσίασαν μερική ανταπόκριση (partial response, PR) ή σταθερή κατάσταση νόσου (stable disease, SD) και ταξινομήθηκαν ως ανταποκρινόμενοι στην αγωγή. Αντίθετα, 9/19 (47,4%) των ασθενών εμφάνισαν υποτροπή της νόσου (progressive disease, PD) και ταξινομήθηκαν ως μη ανταποκρινόμενοι στην αγωγή. Εννέα ασθενείς βρέθηκαν θετικοί σε *ESR1* μεθυλίωση στα CTCs, εκ των οποίων δύο (22,2%) παρουσίασαν PR ή SD, ενώ επτά (77,8%) εμφάνισαν PD. Αντιστοίχως, μεταξύ των 10 ασθενών με CTC-αρνητικά για *ESR1* μεθυλίωση, οι 8 (80%) θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, ενώ οι δύο (20%) όχι (Σχήμα 6.6). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* σε CTCs θετικών σε ορμονικούς υποδοχείς ασθενών με προχωρημένο καρκίνο μαστού, σχετίζεται με την ανταπόκριση στην αγωγή με συνδυασμό everolimus/exemestane (p=0,023, Fisher's Exact Test).

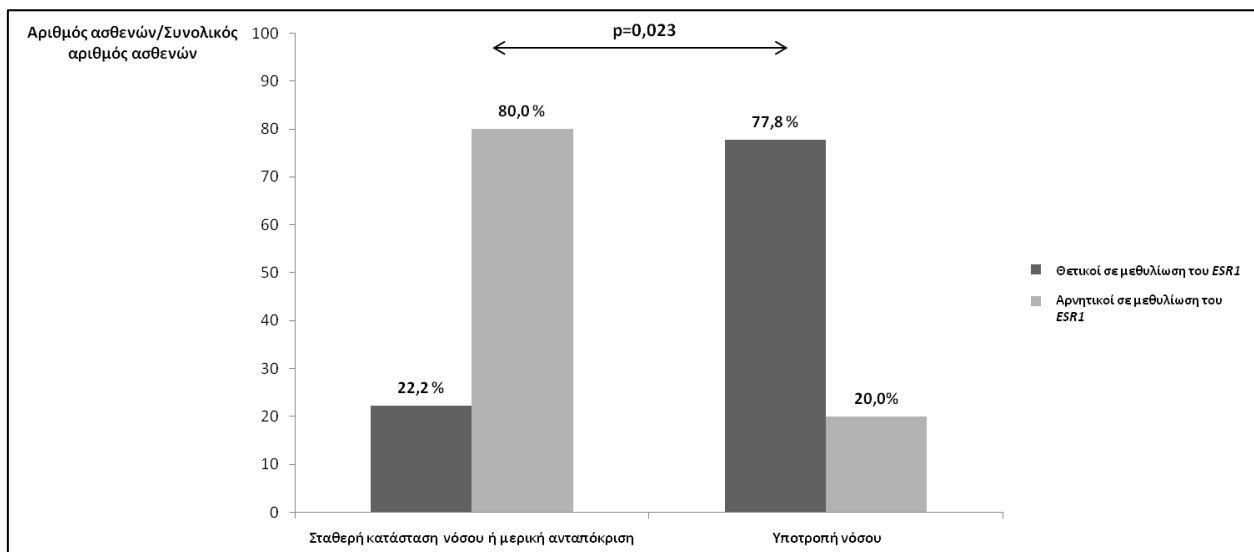
Έπειτα από μία διάμεση παρακολούθηση των ασθενών για 20 μήνες (εύρος 2-55), 14/19 (73,7%) από αυτούς εμφάνισαν πρόοδο της νόσου (PD) και όλοι απεβίωσαν. Ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *ESR1* CTCs, είχαν σημαντικά διαφοροποιημένο (για την ακρίβεια μειωμένο) ελεύθερο υποτροπής διάστημα (PFS) (p= 0,009) (Σχήμα 6.7α) και διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) (p=0.028) (Σχήμα 6.7β) σε σύγκριση με εκείνους για τους οποίους δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs. Η μονοπαραμετρική ανάλυση έδειξε παρόμοια αποτελέσματα,



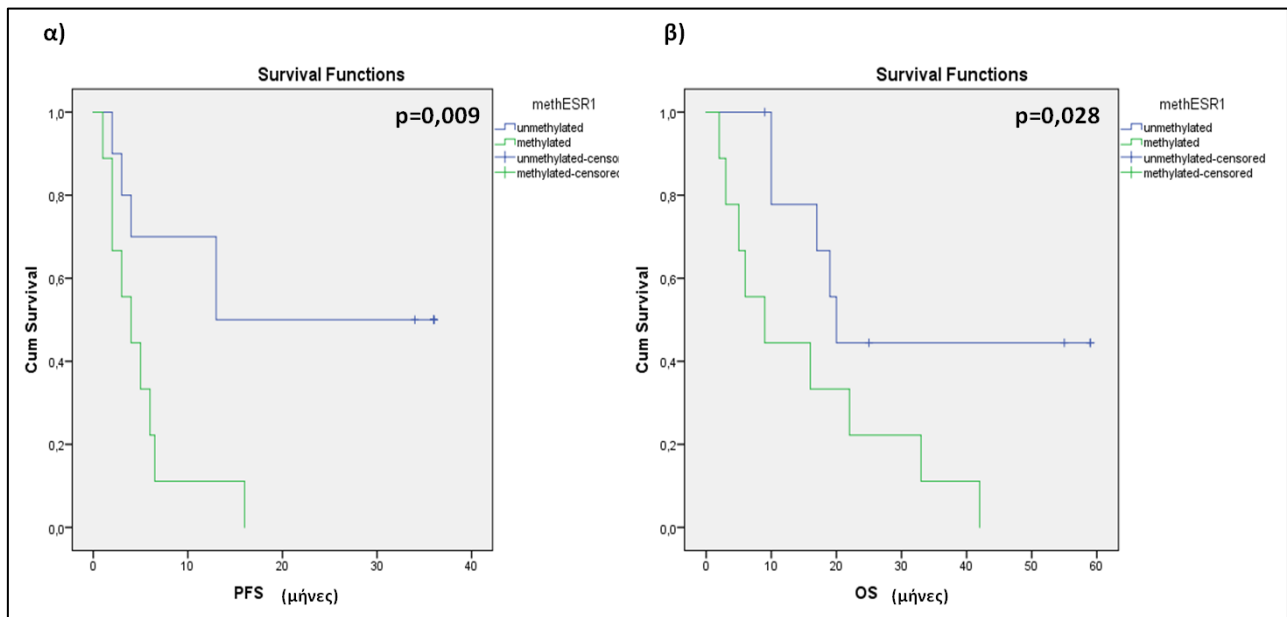
καθώς βρέθηκε υψηλότερος κίνδυνος υποτροπής της νόσου (HR: 4,022, 95%CI: 1,277-12,670, p=0,017) και θνησιμότητας (HR: 3,199, 95%CI: 1,063-9,632, p=0,039) σε ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *ESR1* CTCs, σε σχέση με ασθενείς αρνητικούς σε μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs.



Σχήμα 6.5. Προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* για κάθε ασθενή σε διαδοχικά δείγματα CTC ασθενών με καρκίνο μαστού υπό αγωγή με everolimus/exemestane, σε διαφορετικές στιγμές κατά τη θεραπεία, σε συνάρτηση με τον αριθμό των ανιχνευμένων CTCs.



Σχήμα 6.6. Προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs ασθενών θετικούς σε ορμονικούς υποδοχείς με προχωρημένο καρκίνο μαστού, σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με everolimus/exemestane



Σχήμα 6.7. Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με καρκίνο μαστού υπό αγωγή με ενδοκρινή θεραπεία everolimus/exemestane: α) μεθυλίωση του *ESR1* σε σχέση με το διάστημα υποτροπής της νόσου (PFS), β) μεθυλίωση του *ESR1* σε σχέση με την ολική επιβίωση (OS)

#### 6.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Οι γνώσεις μας γύρω από τη μοριακή εξέλιξη του καρκίνου περιορίζονται από την έλλειψη προσβασιμότητας στον όγκο καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου. Η υγρή βιοψία, η οποία βασίζεται στην ανάλυση των CTCs και του ctDNA πλάσματος, προσφέρει τη δυνατότητα μίας μη-επεμβατικής παρακολούθησης της εξέλιξης του όγκου σε πραγματικό χρόνο (1,5,36,125,253,282). Είναι πιθανό ότι το ctDNA και τα CTCs έχουν συμπληρωματικούς ρόλους ως βιοδείκτες, καρκίνου, αν και οι ξεχωριστές προσεγγίσεις μπορεί να έχουν διακριτά πλεονεκτήματα σε συγκεκριμένα κλινικά πλαίσια (1,282). Μέχρι σήμερα, ωστόσο, υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός μελετών όπου τα CTCs συγκρίνονται άμεσα με το ctDNA, χρησιμοποιώντας για την ανάλυση ίδια δείγματα αίματος και ίδιους βιοδείκτες (97).

Στον πρωτοπαθή όγκο καρκίνου του μαστού, περίπου το 70% των περιπτώσεων είναι ER+, κατάσταση που καθορίζει τους υποψήφιους ασθενείς για ενδοκρινή θεραπεία. Ωστόσο, πολλοί από αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν υποτροπή παρά την χορήγηση επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας, γεγονός που δείχνει ότι οι ER+ όγκοι ίσως έχουν πρωτογενή ή δευτερογενή αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία (268).

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί σχετικά με την κατανόηση της εξέλιξης του όγκου κατά τη διάρκεια θεραπείας με ενδοκρινικούς παράγοντες, έχει αποκαλύψει αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στο προφίλ μεταλλάξεων του πρωτοπαθούς όγκου (268,283). Η αποσιώπηση του *ESR1*, μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του, επηρεάζει με σαφή τρόπο την έκφραση της πρωτεΐνης ER στους ασθενείς με καρκίνο μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η υπερμεθυλίωση του *ESR1* σχετίζεται με ER-αρνητικό προφίλ, γεγονός το οποίο δύναται να εμπλέκεται στην αντίσταση των ασθενών στην ορμονοθεραπεία (270). Οι Ung et al μέσω της ENCODE μελέτης με μεθοδολογία CHIP-seq και DNase I, σε συνδυασμό με χρήση δεδομένων από τη βάση δεδομένων The Cancer Genome Atlas (TCGA), πραγματοποίησαν υπολογιστικές μελέτες και απέδειξαν την πολυπλοκότητα των μηχανισμών επίδρασης της μεθυλίωσης του DNA στη μεταγραφική ρύθμιση του καρκίνου. Μέρος των αποτελεσμάτων τους αποτέλεσε ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ δραστηριότητας της ERα και προτύπων μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο μαστού. Για την ακρίβεια, απέδειξαν ότι το προφίλ μεθυλίωσης των αλληλουχιών DNA στις θέσεις πρόσδεσης της ERα, είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης (284).

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης του *ESR1* σε CTCs και αντίστοιχο ctDNA πλάσματος, ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Εν συνεχεία, αξιολογήσαμε την κλινική χρησιμότητα της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας σε CTCs απομονωμένα από σειριακά δείγματα περιφερικού αίματος, 19 ασθενών με ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> προχωρημένο καρκίνο μαστού, υπό αγωγή με everolimus/exemestane.

Για να επιτευχθούν τα παραπάνω, πρώτα αναπτύξαμε και αξιολογήσαμε αναλυτικά μία υπερευαίσθητη και ειδική μεθοδολογία real-time MSP, για την ανίχνευση μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*. Με εφαρμογή της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας σε πρωτοπαθείς όγκου μαστού, αποδείξαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ER είναι αντίστροφη με την παρουσία μεθυλίωσης στο *ESR1*. Έπειτα, εφαρμόσαμε τη μεθοδολογία σε κλινικά δείγματα ErCAM+ CTC-κλασμάτων ασθενών με καρκίνο μαστού, όπου παρατηρήσαμε ένα ποσοστό μεθυλίωσης του *ESR1* της τάξεως του 20% και σε ctDNA από πλάσμα ασθενών, όπου μεθυλίωση του *ESR1* παρατηρήθηκε σε χαμηλότερο ποσοστό. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη μεθυλίωσης του *ESR1* σε CTCs. Αξιοσημείωτα ήταν τα αποτελέσματά μας για τους ασθενείς με πρώιμη νόσο, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανίχνευσης μεθυλίωσης του *ESR1*. Βεβαίως, αυτό είναι κάτι που δικαιολογείται από αναρίθμητες μελέτες που αποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση αποτελεί πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση και από προηγούμενες δικές μας μελέτες σχετικά με τη μεθυλίωση ογκοκατασταλτικών και κατασταλτικών της μετάστασης γονιδίων στα CTCs ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, όπου επίσης παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα (96–99,285).

Επόμενο βήμα στην εργασία μας, αποτέλεσε η σύγκριση της μεθυλίωσης του *ESR1* στα CTCs και στο ctDNA πλάσματος, απομονωμένα από το περιφερικό αίμα του ίδιου ασθενούς, κατά την ίδια αιμοληψία, την ίδια μέρα και επεξεργασμένα με τον ίδιο τρόπο, προς ελαχιστοποίηση των διαφορών που δύνανται να προκύψουν από προαναλυτικές παραμέτρους. Στην παραπάνω ομάδα δειγμάτων, η μεθυλίωση του *ESR1* στο ctDNA επέδειξε μία στατιστικά σημαντική συμφωνία με τη μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs, υποδεικνύοντας έτσι μία πιθανή σύνδεση μεταξύ CTCs και της προέλευσης του ctDNA.

Σε μία πρόσφατη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε περιορισμένο αριθμό ασθενών, παρατηρήθηκε ετερογένεια στην έκφραση της πρωτεΐνης ER στα CTCs, γεγονός που υποδηλώνει διαφοροποίηση στους μηχανισμούς αντοχής στο fulvestrant όπως η ανεπαρκής δοσολογία, μεταλλάξεις στο *ESR1* ή η απεξάρτηση σηματοδότησης από το ER μονοπάτι (286).

Τα αποτελέσματά μας από τα σειριακά δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> καρκίνο μαστού που λαμβάνουν everolimus/exemestane ως θεραπευτική αγωγή, συνιστούν ότι η μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs συσχετίζεται ισχυρά με έλλειψη ανταπόκρισης στον συγκεκριμένο συνδυασμό και χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, για την καθιέρωση του ως πιθανό βιοδείκτη υγρής βιοψίας για την αποτελεσματικότητα της ενδοκρινικής θεραπείας.

Εν κατακλείδι, αναφέρουμε για πρώτη φορά ότι το *ESR1* αποσιωπείται επιγενετικά στα CTCs, μέσω μεθυλίωσης, κάτι το οποίο αντικατοπτρίζεται στα αντιστοιχισμένα δείγματα CTCs-cfDNA. Δείξαμε, επίσης, ότι η μεθυλίωση του *ESR1* σχετίζεται με μη-έκφραση της πρωτεΐνης ER, όπως αυτή έχει προσδιοριστεί με ανοσοϊστοχημεία στον πρωτοπαθή όγκο. Η παρατήρηση αυτή είναι αρκετά σημαντική, αφού παράλο τον περιορισμένο αριθμό σειριακών δειγμάτων, η μεθυλίωση του *ESR1* στα CTCs παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έλλειψη ανταπόκρισης στη θεραπεία με everolimus/exemestane. Ως εκ τούτου, η μεθυλίωση του *ESR1* στα CTC θα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω σε μελλοντικές μελέτες ως πιθανός βιοδείκτης υγρής βιοψίας για την επιλογή των ασθενών με ευαίσθητο στην ενδοκρινική θεραπεία καρκίνο μαστού (280).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MLL3* ΩΣ ΝΕΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΟ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (NSCLC)

#### 7.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει ως η πρώτη αιτία θνησιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο και για τους άντρες και για τις γυναίκες, παγκοσμίως (197). Ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC), αποτελεί την κύρια υποκατηγορία καρκίνου του πνεύμονα και διαίρειται σε περαιτέρω υπότυπους που περιλαμβάνουν το αδenoκαρκίνωμα (AD), το πλακώδες καρκίνωμα (SCC) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (198). Οι δύο κυρίαρχοι φαινότυποι NSCLC, το αδenoκαρκίνωμα (AD, αντιπροσωπεύοντας το ~50% των περιπτώσεων) και το πλακώδες καρκίνωμα (SCC, ~40% των περιπτώσεων) παρουσιάζουν διακριτά ιστολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, ικανά για να διαχωριστούν από την τρέχουσα παθολογική ταξινόμηση (199).

Παρόλη την πρόοδο αναφορικά με την ανάπτυξη φαρμάκων και θεραπειών για ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC), τα ποσοστά επιβίωσης πενταετίας παραμένουν σε μη δικαιολογημένα χαμηλά ποσοστά της τάξεως του 15%, με πολλούς ασθενείς να εμφανίζουν νόσο προχωρημένου σταδίου και δευτερογενείς όγκους σε απομακρυσμένες περιοχές κατά την αρχική διάγνωση. Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός γενετικών οδηγών μεταλλάξεων και μετατοπίσεων που μπορούν να χρησιμεύσουν ως στοχευμένες θεραπείες για τους ασθενείς με NSCLC. Ανάμεσά τους, οι μεταλλάξεις του *EML4*, του *ALK* γονιδίου σύντηξης, του *EGFR* [σημειακή μετάλλαξη L585R στο εξόνιο 21, απαλοιφές στο εξόνιο 19 και η T790M μετάλλαξη, η οποία υποδηλώνει αντίσταση σε πρώτης και δεύτερης γενιάς αναστολείς τυροσινικών κινασών (TKIs)] καθώς και οι μετατοπίσεις του ROS Πρωτο-Ογκογονιδίου 1 (*ROS1*) (287). Επιπλέον, τεράστιο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δυνατότητες της ανοσοθεραπείας για τη θεραπεία των ασθενών με NSCLC, καθώς για πρώτη φορά, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με προχωρημένο NSCLC έχει επωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από ανοσοθεραπείες και παρουσιάζει παρατεταμένη επιβίωση (288). Έτσι, τα τελευταία χρόνια, οι αναστολείς σημείων ανοσολογικού ελέγχου (immune checkpoint inhibitors) έχουν καταστεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη θεραπεία του NSCLC σε προχωρημένο στάδιο. Οι επί του παρόντος εγκεκριμένες ανοσοθεραπείες στον NSCLC, είναι αναστολείς του PD-1, μέσω του οποίου στοχεύεται ένα ανοσολογικό σημείο ελέγχου που βρίσκεται στα T-κύτταρα (289).

Η υπερμεθυλίωση του DNA σημαντικών για τον καρκίνο γονιδίων, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, έχει ανιχνευθεί σε πληθώρα βιολογικών υγρών, συμπεριλαμβανομένων των βρογχοσκοπικών εκπλυμάτων, πτυέλων και αίματος (πλάσμα και ορός), τα οποία είναι λιγότερο επεμβατικά και ευκολότερα στη λήψη για τον ασθενή, απ' ό,τι η κλασική βιοψία του όγκου (290). Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο του πνεύμονα, προσφέρει τη δυνατότητα ανακάλυψης πιθανών επιγενετικών βιοδεικτών για τη διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενών (291).

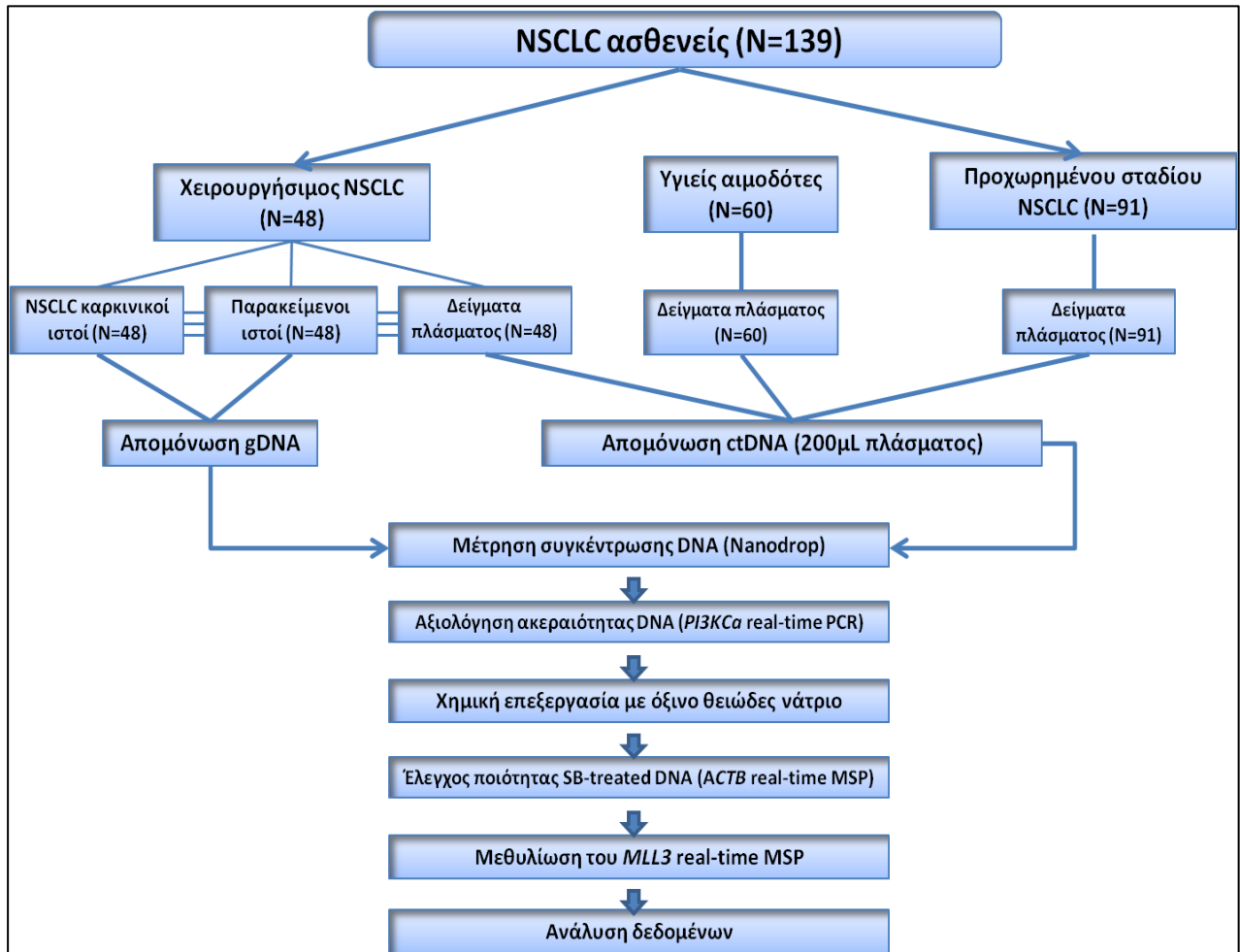
Τα μέλη της οικογένειας N-μεθυλοτρανσφεράσης 2 του καταλοίπου λυσίνης της ιστόνης (histone-lysine N-methyltransferase 2, KMT2), επίσης γνωστά ως πρωτεΐνες μικτής λευχαιμική σειράς (MLL), είναι υπεύθυνα για τη μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4), προωθώντας την προσβασιμότητα του γονιδιώματος σε μεταγραφικούς παράγοντες (292). Η KMT2 οικογένεια είναι υψηλά διατηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στη *Drosophila melanogaster* είναι παρούσες 3 υποομάδες της KMT2: η trithorax (Trx), η σχετιζόμενη με trithorax (Trr) και η Set1. Ο χρωμοσωμικός αναδιπλασιασμός κατά την εξέλιξη των θηλαστικών είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο παράλογων γονιδίων για κάθε υποομάδα της KMT2: τα σχετιζόμενα με την *trx* *KMT2A* και *KMT2B* (επίσης γνωστά ως *Mll2* στα ποντίκια, *MLL4* σε ανθρώπους και *WBP7*), τα σχετιζόμενα με την *ttr* *KMT2C* (επίσης γνωστό ως *MLL3* και *HALR*) και *KMT2D* (γνωστό και ως *Mll4* στα ποντίκια και *MLL2* ή *ALR* σε ανθρώπους) και τα σχετιζόμενα με *Set1* *KMT2F* (γνωστό και ως *SET1A* και *SETD1A*) και *KMT2G* (ή *SET1B-SETD1B*). Το γονίδιο *KMT2E* (αλλιώς *MLL5*) είναι περισσότερο ομόλογο προς την SET3 οικογένεια και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί δεν έχει δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης. Η KMT2 οικογένεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, με τα KMT2 ένζυμα να είναι παρόντα σε πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένων τους υποκινητές γονιδίων και τους ενισχυτές (292). Η *MLL4* (*KMT2D*) και η *MLL3* (*KMT2C*), ως οι κύριες H3K4me1/2 μεθυλοτρανσφεράσες, δρουν και σε επισιγασμένους και σε ενεργούς ενισχυτές (293). Παρόλα αυτά, πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα δύο ένζυμα διευκολύνουν τη σύνθεση του RNA και τη μεταγραφή, προσδεδεμένα σε θέσεις υποκινητών ανεξάρτητα από τη μονο-μεθυλίωση της H3K4 (294). Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα ένζυμα *MLL3/MLL4* είναι βασικά για την ενεργοποίηση των ενισχυτών και την κυτταρο-ειδική γονιδιακή έκφραση κατά την κυτταρική διαφοροποίηση (293,295). Ειδικότερα, τα *MLL3/MLL4* απαιτούνται για την πρόσδεση του CBP/p300 σε ενισχυτές, προς σχηματισμό υπερ-ενισχυτών (super-enhancers, SEs), οι οποίοι επακόλουθα συμμετέχουν στην αδιπογένεση (adipogenesis) (296).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, αρχικά, η ανάπτυξη και αναλυτική επικύρωση μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MLL3* κι έπειτα η αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας του σε NSCLC ιστούς, παρακείμενους μη-καρκινικούς ιστούς και ctDNA πλάσματος από τον ίδιο ασθενή. Η κλινική επικύρωση του ρόλου του ως προγνωστικού βιοδείκτη, πραγματοποιήθηκε σε ανεξάρτητη ομάδα ασθενών NSCLC χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της υγρής βιοψίας, με ανάλυση αποκλειστικά και μόνο δειγμάτων πλάσματος. Συμπερασματικά, αξιολογήσαμε για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης στις CpG νησίδες του υποκινητή του *MLL3* σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

## 7.2. Πειραματική πορεία

Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία έλαβε χώρα σε ξεχωριστούς χώρους, με διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του DNA, η χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και η προετοιμασία των αντιδράσεων real-time MSP πραγματοποιούνται σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar-flow hoods) υπό συνθήκες ελεύθερες DNAσών. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στο NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 4.10. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα αναφορικά με τη σταθερότητα της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και του SB-treated DNA, η απομόνωση ctDNA από δείγματα πλάσματος πραγματοποιήθηκε εντός χρονικού διαστήματος 8 μηνών και τα δείγματα SB-treated DNA αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Με τον τρόπο αυτό, προσπαθήσαμε να διασφαλίσουμε την ακεραιότητα των αποτελεσμάτων μέσω του εκμηδενισμού σφαλμάτων από τις παραπάνω προαναλυτικές παραμέτρους. Σε όλα τα βήματα της πειραματικής πορείας, πραγματοποιήθηκε ο ανάλογος έλεγχος ποιότητας, όπως αυτός περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.3.1 της παρούσας διατριβής. Το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.1.





Σχήμα 7.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *MLL3* σε δείγματα ασθενών με NSCLC.

### 7.2.1. Κλινικά δείγματα

Το υλικό της μελέτης περιελάμβανε δύο διαφορετικές ομάδες κλινικών δειγμάτων:

α) μία ομάδα ασθενών με χειρουργήσιμο NSCLC που αποτελείται από 48 φρέσκους κατεψυγμένους ιστούς, 48 παρακείμενους μη-καρκινικούς ιστούς και 48 αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος του ίδιου ασθενούς (Υπεύθυνη ιατρός: Α. Τσαρουχά). 60 δείγματα πλάσματος από υγιείς αιμοδότες χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ειδικότητας της μεθόδου. Η ομάδα αυτή των ασθενών, διαιρείται σε 37 άντρες και 11 γυναίκες (διάμεσης ηλικίας 61 ετών), διαγνωσμένους με χειρουργήσιμο (σταδίου I-III) μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Πιο συγκεκριμένα, 28 ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με AD, 19 με SCC και 1 με αδιαφοροποίητο NSCLC. Η πλειονότητα ήταν καπνιστές (60,4%) και έπασχαν από ήπια έως μέτρια χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, σύμφωνα με την προεγχειρητική αξιολόγηση. Τη χρονική στιγμή της λήψης των δειγμάτων, όλοι οι ασθενείς

λάμβαναν τυχαιοποιημένες θεραπείες, μετά το χειρουργείο όμως ακολουθήθηκαν τυπικά σχήματα επικουρικής χημειοθεραπείας, όπως ο συνδυασμός gemcitabine με ταξάνες (90%) ή χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα (10%). Τέλος, οι περισσότεροι ασθενείς εμφάνισαν υποτροπή σε στάδιο ΙΙΒ.

β) μία ανεξάρτητη ομάδα που αποτελείται από 91 δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με προχωρημένου σταδίου NSCLC (στάδιο ΙΙΙ-ΙV) (Υπεύθυνος: Καθ. Β. Γεωργούλιας). Σε αυτή την ομάδα, το περιφερικό αίμα συλλέχθηκε κατά της διάγνωση, πριν την έναρξη οποιασδήποτε συστηματικής θεραπείας και ακολούθησε η απομόνωση του πλάσματος και του ctDNA (200μL πλάσματος). Από την παραπάνω ομάδα, οι 57 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν από μη-πλακώδες καρκίνωμα ιστολογικά, οι 32 παρουσίαζαν πλακώδες καρκίνωμα (SCC), ενώ οι 2 διαγνώστηκαν με αδιαφοροποίητο NSCLC.

Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με την Διακήρυξη του Ελσίνκι (1964) και εγκρίθηκε από επιτροπές δεοντολογίας και ηθικής των συμμετεχόντων ιδρυμάτων. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν την υπογεγραμμένη συνειδητή συναίνεσή τους για να λάβουν μέρος στην παρούσα μελέτη.

### **7.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) από καρκινικούς και φυσιολογικούς παρακείμενους φρέσκους ιστούς πνεύμονα**

Τη χρονική στιγμή του χειρουργείου, οι ιστοί που συλλέχθηκαν καταψύχθηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Ο τύπος και το στάδιο του όγκου προσδιορίστηκαν ιστολογικά και τομές ιστών που περιείχαν >80% ποσοστό καρκινικών κυττάρων ήταν εκείνοι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση gDNA και επακόλουθα real-time MSP. Το gDNA από τους καρκινικούς και μη-καρκινικούς παρακείμενους ιστούς πνεύμονα, απομονώθηκε με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές περιγράφονται με λεπτομέρεια στο εδάφιο 4.6.2.

### **7.2.3. Απομόνωση ctDNA από πλάσμα**

Τα δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν αντιπηκτικό EDTA, αναδεύτηκαν ελαφρώς και το πλάσμα απομονώθηκε εντός 2-4h από την συλλογή, με φυγοκέντρηση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την απομόνωση, το πλάσμα φυγοκεντρήθηκε και πάλι στα 2000g για 10min, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε

αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf και ακολούθησε η φύλαξή τους στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Switzerland) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ctDNA από 200 $\mu\text{L}$  πλάσματος, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εδάφιο 4.7.1).

#### 7.2.4. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment)

Πριν προχωρήσουμε στην επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, εξετάστηκε η ακεραιότητα του gDNA για όλα τα δείγματα με εφαρμογή real-time PCR για το εξόνιο 20 του *PIK3CA* (281). Μόνο δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν στο *PIK3CA* προχώρησαν για χημική τροποποίηση, προς μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες και τη διατήρηση των μεθυλιωμένων κυτοσινών ανεπηρέαστες. Η χημική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA) (υποκεφάλαιο 4.11.2) και το SB-treated DNA αποθηκεύτηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$ . Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, συμπεριλάβαμε  $\text{dH}_2\text{O}$  και 100% μεθυλιωμένο DNA ως αρνητικό και θετικό πρότυπο ελέγχου, αντίστοιχα. Η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε με μεθοδολογία real-time MSP για τη  $\beta$ -ακτίνη (*ACTB*) (εδάφιο 5.2.4). Τέλος, το ανθρώπινο πλακουντιακό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control της real-time MSP μετά τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ το 100% μεθυλιωμένο DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA), ως το πλήρως μεθυλιωμένο, θετικό control της μεθοδολογίας.

#### 7.2.5. Real-time MSP

Σχεδιάσαμε *in-silico* εκκινητές του γονιδίου *MLL3* ειδικούς για εφαρμογές MSP στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου με χρήση του λογισμικού Primer Premier 5.00 (Premier Biosoft, USA), αποφεύγοντας τον σχηματισμό σταθερών δομών φουρκέτας, διμερών και ψευδών σημείων εκκίνησης. Για τη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων αλληλίων, και οι δύο εκκινητές περιείχαν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια. Επιπλέον, περιείχαν βάσεις θυμίνης οι οποίες έχουν προέλθει μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες κατά την αντίδραση της χημικής τροποποίησης, ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός χημικά επεξεργασμένου από μη-χημικά επεξεργασμένο DNA. Για να διαπιστωθεί η ειδική ανίχνευση μόνο των μεθυλιωμένων *MLL3* αλληλουχιών, χρησιμοποιήσαμε τρία διαφορετικά δείγματα ελέγχου: gDNA το οποίο δεν έχει υποστεί τη χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, πλακουντιακό SB-treated DNA (0% μεθυλιωμένο) και το Universal Methylated Human DNA

Standard (100% μεθυλιωμένο DNA, ZYMO Research, USA). Οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, USA) και η αλληλουχία τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.1.

**Πίνακας 7.1.** Αλληλουχίες εκκινητών για το γονίδιο *MLL3*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>MLL3</i>	Πρόσθιος	GTCGTCGTTTCGGGTTTGAC	19	58,3	<b>109</b>
	Ανάστροφος	CGACGCGAAAAAACCG	17	58,3	

*MLL3* accession number NC\_000007.14

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο όργανο cobas<sup>®</sup> 4800 (Roche, Germany) σε πλάκα 96 θέσεων (96 well-plate) και σε τελικό όγκο 10μL, με συστατικά που παρατίθενται στον Πίνακα 7.2 και θερμοκρασιακές συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 7.3. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία real-time MSP δεν είναι ποσοτική, επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε cut-off τιμών. Πιο συγκεκριμένα, ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν ανιχνεύεται σήμα ενίσχυσης στη real-time με C<sub>q</sub><41,00, ενώ αρνητικό χαρακτηρίζεται το δείγμα εκείνο που δεν παρουσιάζει ενίσχυση ή καταγράφεται τιμή C<sub>q</sub>>41,00.

**Πίνακας 7.2.** Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *MLL3*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	4,0	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2,0	1x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,8	2mM
dNTPs 10mM	0,2	0,2mM
BSA 10μg/μL	0,3	0,3μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,3	0,3μM
LC-Green 10x	1,0	1x
Taq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	<b>9,0</b>	<b>-</b>
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	<b>10,0</b>	<b>-</b>

**Πίνακας 7.3. Συνθήκες αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *MLL3***

Στάδιο real-time MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	63°C/20 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/20 sec*
	55 °C/10 sec
Ανάλυση καμπυλών τήξης	92 °C/0 sec* (ramp rate: 0,11 °C/sec)
	92 °C/1 min (ramp rate: 4,4 °C/sec)
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

### 7.2.6. Στατιστική ανάλυση

Για να προσδιοριστεί η ύπαρξη ή όχι σημαντικής διαφοράς μεταξύ των αναμενόμενων συχνοτήτων και των παρατηρούμενων συχνοτήτων μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών των δειγμάτων, εφαρμόσαμε τη μη-παραμετρική δοκιμασία  $\chi^2$ . Οι διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ του προφίλ μεθυλίωσης του *MLL3* και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με NSCLC, πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Fisher exact test. Το ελεύθερο εξέλιξης νόσου διάστημα (PFS), το ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) και η ολική επιβίωση υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kaplan Meier και οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του long rank test. Τέλος, εφαρμόστηκε μονοπαραμετρική Cox ανάλυση παλινδρόμησης, για τον προσδιορισμό του κινδύνου εξέλιξης και θανάτου σε θετικούς για μεθυλίωση του *MLL3* ασθενείς. Οι τιμές  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 7.3. Αποτελέσματα

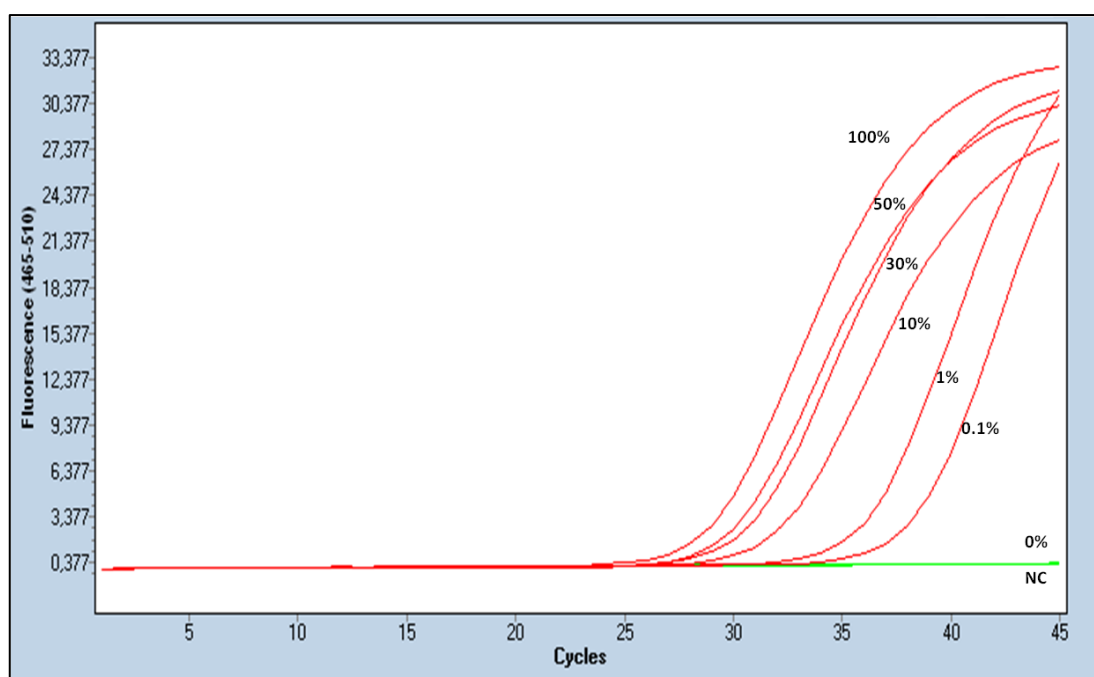
### 7.3.1. Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας για τη μελέτη μεθυλίωσης του *MLL3* με real-time MSP

**Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών:** Οι πειραματικές συνθήκες της real-time MSP βελτιστοποιήθηκαν με λεπτομέρεια αναφορικά με τη θερμοκρασία και το χρόνο υβριδισμού των

εκκινητών, αρχικά, έπειτα για τη βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και τέλος για τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος, του  $MgCl_2$ , των dNTPs και του BSA.

**Αναλυτική ειδικότητα:** Για την αξιολόγηση της αναλυτικής ειδικότητας της μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MLL3*, πρώτα απ' όλα ελέγχθηκαν *in silico* οι εκκινητές και στη συνέχεια στην PCR, χρησιμοποιώντας gDNA το οποίο δεν έχει υποστεί τη διαδικασία της χημικής τροποποίησης και SB-treated πλακουντιακό DNA, το οποίο δεν είναι μεθυλιωμένο. Σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του *MLL3*. Αντιθέτως, ενίσχυση με επακόλουθο σχηματισμό PCR προϊόντος, παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση όπου σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο DNA. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία είναι ειδική, αφού είναι ικανή να ανιχνεύει μεθυλίωση του *MLL3* μόνο σε SB-treated μεθυλιωμένες αλληλουχίες.

**Αναλυτική ευαισθησία:** Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε με χρήση SB-treated συνθετικών προτύπων (0% και 100% μεθυλιωμένου DNA), με διαδοχικές αραιώσεις αυτών ώστε να ληφθούν διάφορα ποσοστά μεθυλίωσης (0,1%, 1%, 10% και 50%). Η αναπτυχθείσα μέθοδος για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *MLL3* μπορούσε με αξιοπιστία και ειδικότητα να ανιχνεύσει την παρουσία 0,1 μεθυλιωμένης αλληλουχίας έναντι 99,9 μη μεθυλιωμένων, ποσοστό ευαισθησίας που ανέρχεται στο 0,1%, δηλαδή (Σχήμα 7.2).



Σχήμα 7.2. Αναλυτική ευαισθησία *MLL3* real-time MSP

### 7.3.2. Αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας της μεθυλίωσης του *MLL3* στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

**Υγιείς αιμοδοτές:** Το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3*, διερευνήθηκε αρχικά στα δείγματα πλάσματος 60 υγιών αιμοδοτών, για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ειδικότητας της μεθόδου. Κανένα από τα παραπάνω δείγματα δεν βρέθηκε θετικό για τη μεθυλίωση του *MLL3* (0/60, 0%), υποδεικνύοντας ότι μπορεί να συνεχισθεί η εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας και η αξιολόγηση του γονιδίου ως βιοδείκτη στα κλινικά δείγματα ασθενών NSCLC.

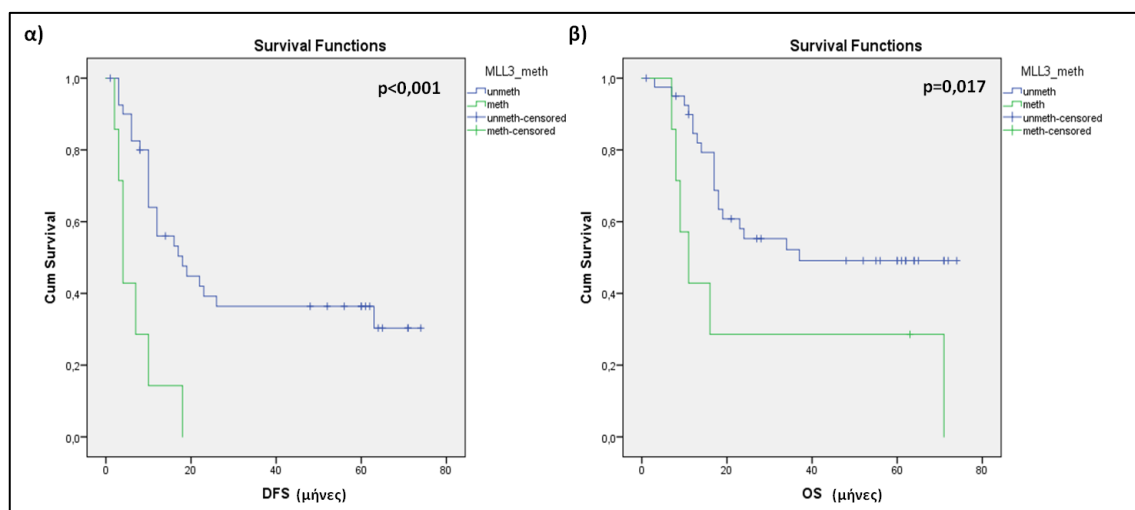
**Ασθενείς με χειρουργήσιμο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα:** Στη συνέχεια αξιολογήσαμε τη μεθυλίωση του υποκινητή του *MLL3* σε 48 δείγματα φρέσκων ιστών και παρακείμενων-μη καρκινικών ιστών από ασθενείς με NSCLC. Το *MLL3* βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 3/48 (6,3%) των δειγμάτων καρκινικών ιστών και σε 3/48 (6,3%), επίσης, των αντίστοιχων παρακείμενων ιστών. Από τα παραπάνω τρία δείγματα που βρέθηκαν θετικά, τα δύο ήταν από τον ίδιο ασθενή, ενώ το τελευταίο ήταν θετικό είτε στον ιστό είτε στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό σε δείγματα διαφορετικών ασθενών. Έπειτα, αξιολογήθηκε το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* σε αντιστοιχισμένα δείγματα ctDNA, απομονωμένα από το πλάσμα των ίδιων ασθενών. Στην περίπτωση αυτή, μεθυλίωση του *MLL3* παρατηρήθηκε σε 7/48 (14,6%) ασθενείς με NSCLC. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα από τα δείγματα που βρέθηκαν μεθυλιωμένα στο ctDNA, δε βρέθηκε μεθυλιωμένο στα αντίστοιχα δείγματα πρωτοπαθούς και παρακείμενο αυτού ιστού (σχήμα 7.3).

	Χειρουργήσιμος NSCLC (n=48)																																															
<i>MLL3</i> μεθυλίωση καρκινικός ιστός	[Heatmap showing methylation status for 48 patients]																																															
<i>MLL3</i> μεθυλίωση παρακείμενος ιστός	[Heatmap showing methylation status for 48 patients]																																															
<i>MLL3</i> μεθυλίωση ctDNA	[Heatmap showing methylation status for 48 patients]																																															
Υποτροπή	[Heatmap showing relapse status for 48 patients]																																															
Θάνατος	[Heatmap showing death status for 48 patients]																																															

Σχήμα 7.3. Heatmap για τη μεθυλίωση του *MLL3* σε δείγματα φρέσκων ιστών, παρακείμενων-μη καρκινικών ιστών και αντίστοιχο πλάσμα ασθενών με χειρουργήσιμο NSCLC.

Κατόπιν διάμεσης παρακολούθησης των ασθενών για 45 μήνες (εύρος 1-73 μήνες), 32/48 (66,7%) παρουσίασαν υποτροπή και 30/48 (62,5%) απεβίωσαν λόγω της νόσου. Το *MLL3* βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 7/32 (21,9%) ασθενείς που υποτροπίασαν και σε 6/30 (20%) ασθενείς που απεβίωσαν. Ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *MLL3* δείγματα ctDNA, είχαν σημαντικά διαφοροποιημένο (για την ακρίβεια μειωμένο) ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) ( $p < 0,001$ , log rank test) (Σχήμα 7.4α) και διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) ( $p = 0,017$ , log rank test) (Σχήμα

7.4β) σε σύγκριση με εκείνους για τους οποίους δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του *MLL3* στο ctDNA. Η μονοπαραμετρική ανάλυση έδειξε παρόμοια αποτελέσματα, καθώς βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος κίνδυνος υποτροπής της νόσου (HR: 0,239, 95%CI: 0,099-0,575,  $p=0,001$ ) και θνησιμότητας (HR: 0,342, 95%CI: 0,135-0,865,  $p=0,023$ ) σε ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *MLL3* δείγματα πλάσματος, σε σχέση με ασθενείς αρνητικούς σε μεθυλίωση του *MLL3* στο ctDNA.

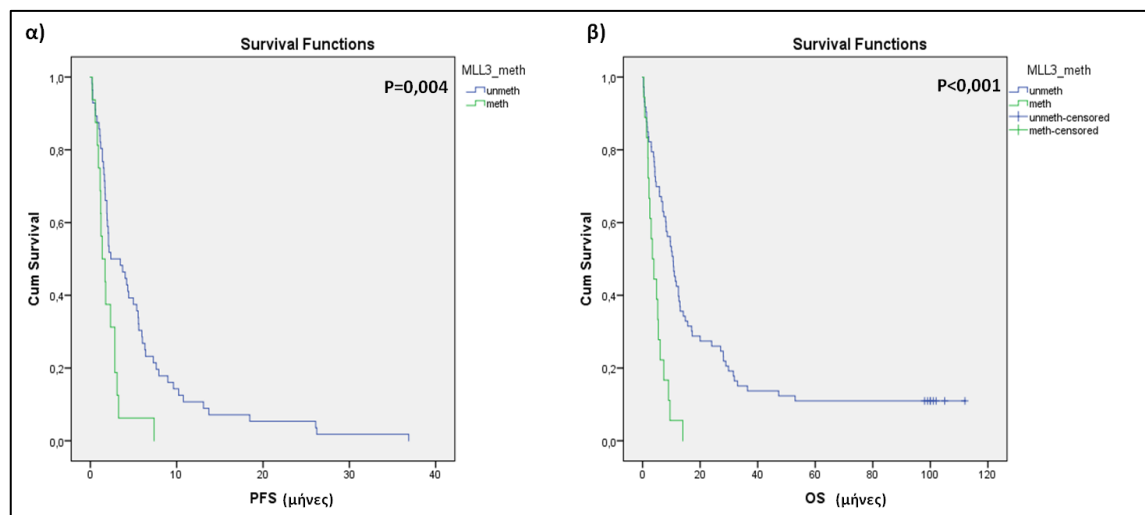


**Σχήμα 7.4. Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με χειρουργήσιμο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (N=48). α) Μεθυλίωση του *MLL3* στο πλάσμα σε συνάρτηση με το DFS, β) Μεθυλίωση του *MLL3* στο πλάσμα σε συνάρτηση με το OS**

**Ασθενείς με προχωρημένου σταδίου μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα:** Η προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του *MLL3* στο ctDNA, επιβεβαιώθηκε ακολούθως σε μία ανεξάρτητη ομάδα 91 ασθενών με προχωρημένου σταδίου NSCLC. Σε αυτή την ομάδα, βρήκαμε ότι ο υποκινητής του *MLL3* ήταν μεθυλιωμένος στο ctDNA 18/91 (19,8%) ασθενών. Η αξιολόγηση του βιοδείκτη ως προγνωστικού δείκτη, πραγματοποιήθηκε έπειτα από μακροπρόθεσμο διάστημα παρακολούθησης των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από διάμεση παρακολούθηση για 52 μήνες (εύρος 1-112 μήνες), 87/91 (95,6%) ασθενείς εμφάνισαν υποτροπή και 83/91 (91,2%) ασθενείς απεβίωσαν λόγω προόδου της νόσου. Μεθυλίωση του *MLL3* ανιχνεύθηκε στο πλάσμα όλων των ασθενών που υποτροπίασαν και απεβίωσαν. Σύμφωνα με τις καμπύλες Kaplan-Meier (Σχήμα 7.5α,β), ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *MLL3* δείγματα ctDNA, είχαν σημαντικά μειωμένο ελεύθερο υποτροπής διάστημα (PFS) ( $p=0,004$ ) (Σχήμα 7.5α) και διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) ( $p<0,001$ ) (Σχήμα 7.5β) σε σύγκριση με εκείνους για τους οποίους δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του *MLL3* στο ctDNA. Η μονοπαραμετρική ανάλυση επέδειξε παρόμοια αποτελέσματα, καθώς βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος κίνδυνος υποτροπής της νόσου (HR: 0,431, 95%CI: 0,239-0,779,  $p=0,005$ ) και



θνησιμότητας (HR: 0,306, 95%CI: 0,173-0,541,  $p < 0,001$ ) σε ασθενείς με θετικά σε μεθυλίωση του *MLL3* δείγματα πλάσματος, σε σχέση με ασθενείς αρνητικούς σε μεθυλίωση του *MLL3* στο ctDNA.



**Σχήμα 7.5.** Καμπύλες Kaplan-Meier για τους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα προχωρημένου σταδίου (N=91). α) Μεθυλίωση του *MLL3* στο πλάσμα σε συνάρτηση με το PFS, β) Μεθυλίωση του *MLL3* στο πλάσμα σε συνάρτηση με το OS

#### 7.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Η ανάλυση ctDNA αποτελεί σε σχέση με την ανάλυση των CTCs, μία πιο γρήγορη και εύκολη διαδικασία, γιατί το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και να αναλυθεί, χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού και απομόνωσης ενός σπάνιου πληθυσμού κυττάρων (297). Η ανάλυση του ctDNA μπορεί να εφαρμοστεί ως στρατηγική υψηλής απόδοσης για την αξιολόγηση των κλινικών δειγμάτων, αλλά περιορίζεται στην ανίχνευση σημειακών DNA μεταλλάξεων, δομικών αναδιατάξεων, αλλαγών του αριθμού αντιγράφων (Copy number variations, CNVs) και αλλαγών στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA. Ήδη έχει επιτευχθεί η ταξινόμηση ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) με στόχο την ανταπόκριση σε στοχευμένες θεραπείες, μέσω παρακολούθησης και ανίχνευσης μεταλλάξεων του EGFR στο ctDNA πλάσματος (298,299), δοκιμασία η οποία έχει πάρει έγκριση από τον FDA. Από την άλλη, η εκτεταμένη χρήση των δεικτών μεθυλίωσης του DNA μέσω προσέγγισης υγρής βιοψίας, στην κλινική πράξη, για την πρόγνωση και διάγνωση των ασθενών με καρκίνο, βρίσκεται σε προπαρασκευαστικό στάδιο (300). Καθώς η μεθυλίωση του DNA θεωρείται συχνά ως ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση, παρέχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο με μη επεμβατικό και οικονομικά αποδοτικό τρόπο. Η πρώτη εξέταση αίματος που

εγκρίθηκε από τον FDA τον Απρίλιο του 2016 και διερευνά τη μεθυλίωση του ctDNA ως μέσο διαλογής και διάγνωσης του καρκίνου του παχέος εντέρου, βασίζεται στη μεθυλίωση του υποκινητή του *SEPT9* στο πλάσμα περιφερικού αίματος των ασθενών με χρήση αντιπηκτικού EDTA (124).

Δεδομένα από exome sequencing ανθρώπινων όγκων, έχουν αποκαλύψει μία αξιοσημείωτη ποικιλία μεταλλάξεων στην *KMT2* οικογένεια, που σχετίζονται με τον καρκίνο. Μέχρι στιγμής, χιλιάδες μεταλλάξεις έχουν προσδιοριστεί στα γονίδια *MLL3* και *MLL4*, καθιστώντας τα ως τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον καρκίνο (301). Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου όπου απαντώνται μεταλλάξεις του *MLL3*, είναι ο καρκίνος του πνεύμονα (302), του παχέος εντέρου (303), του μαστού (303), του ενδομητρίου (304) και της ουροδόχου κύστης (305). Οι παραπάνω τύποι είναι υπεύθυνοι για το 60% των συνολικών μεταλλάξεων του *MLL3* που έχουν προσδιοριστεί. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί και οι απλότυποι του *MLL3* συσχετίζονται, επίσης με τον καρκίνο του λάρυγγα στον Κινέζικο πληθυσμό (306). Αρκετές μελέτες έχουν επιπλέον συστήσει τη χρήση της έκφρασης του *MLL3* ως προγνωστικού βιοδείκτη στον καρκίνο του στομάχου (307), του παγκρέατος (308) και του ER+ καρκίνο μαστού (309). Τέλος, έχει προταθεί ο ρόλος του *MLL3* ως ένα 7q ογκοκατασταλτικό γονίδιο που παρουσιάζει απλο-ανεπάρκεια (haploinsufficiency) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία στα ποντίκια, μέσω βλάβης κατά τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSPC) και σε συνεργασία με άλλες καθιερωμένες βλάβες που λαμβάνουν χώρα κατά την έναρξη της νόσου (310).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη που αξιολογεί το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* σε δείγματα πλάσματος ασθενών με NSCLC. Για να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος, αναπτύξαμε και επικυρώσαμε μία ειδική μεθοδολογία real-time MSP, με ευαισθησία 0,1%. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε 60 δείγματα πλάσματος υγιών αιμοδοτών, για την αξιολόγηση της διαγνωστικής της ειδικότητας κι έπειτα ακολούθησε η εφαρμογή της σε δύο διαφορετικές ομάδες ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματά μας, υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *MLL3* είναι συχνή στο ctDNA και σχετίζεται με το μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα και τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών με χειρουργήσιμο NSCLC. Η επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, προέκυψε από μία ανεξάρτητη ομάδα ασθενών με προχωρημένου σταδίου NSCLC. Και στις δύο ομάδες ασθενών, η παρατηρούμενη συχνότητα μεθυλίωσης του *MLL3* ήταν υψηλή. Η παραπάνω παρατήρηση ίσως να αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της έκφρασης του *MLL3*, ρυθμίζεται επιγενετικά μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Επιπλέον, η μεθυλίωση είναι πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση του NSCLC και παραμένει σε υψηλά επίπεδα στα πιο

προχωρημένα στάδια της νόσου. Τέλος, στους ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, η ανάλυση καμπυλών Kaplan–Meier επέδειξε μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* στο πλάσμα και μειωμένου PFS και OS, γεγονός που επιβεβαιώθηκε παράλληλα από τη μονοπαραμετρική Cox ανάλυση παλινδρόμησης.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά την προγνωστική αξία της ανίχνευσης μεθυλίωσης του *MLL3* στο ctDNA από πλάσμα ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Πιστεύουμε ακράδαντα, ότι η αξιολόγηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* αξίζει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών με απώτερο στόχο την επικύρωσή του ως ένα μη-επεμβατικό, κυκλοφορούν, επιγενετικό βιοδείκτη καρκίνου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC)

#### 8.1. Εισαγωγή

Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) αποτελεί μία ετερογενή ομάδα όγκων που χαρακτηρίζονται από βλάβες στη στοματική κοιλότητα, το λάρυγγα, το φάρυγγα, τους σιελογόνους αδένες και τον θυρεοειδή (311). Το HNSCC είναι ο έκτος επικρατέστερος καρκίνος παγκοσμίως, με περίπου 780.000 νέες διαγνωσμένες περιπτώσεις και 350.000 θανάτους ετησίως (197). Παρά τις προσπάθειες για τον εντοπισμό βιοδεικτών για έγκαιρη ανίχνευση και ανάπτυξη νέων θεραπειών, το συνολικό ποσοστό επιβίωσης και η πρόγνωση της νόσου παραμένουν ανεπαρκείς (312).

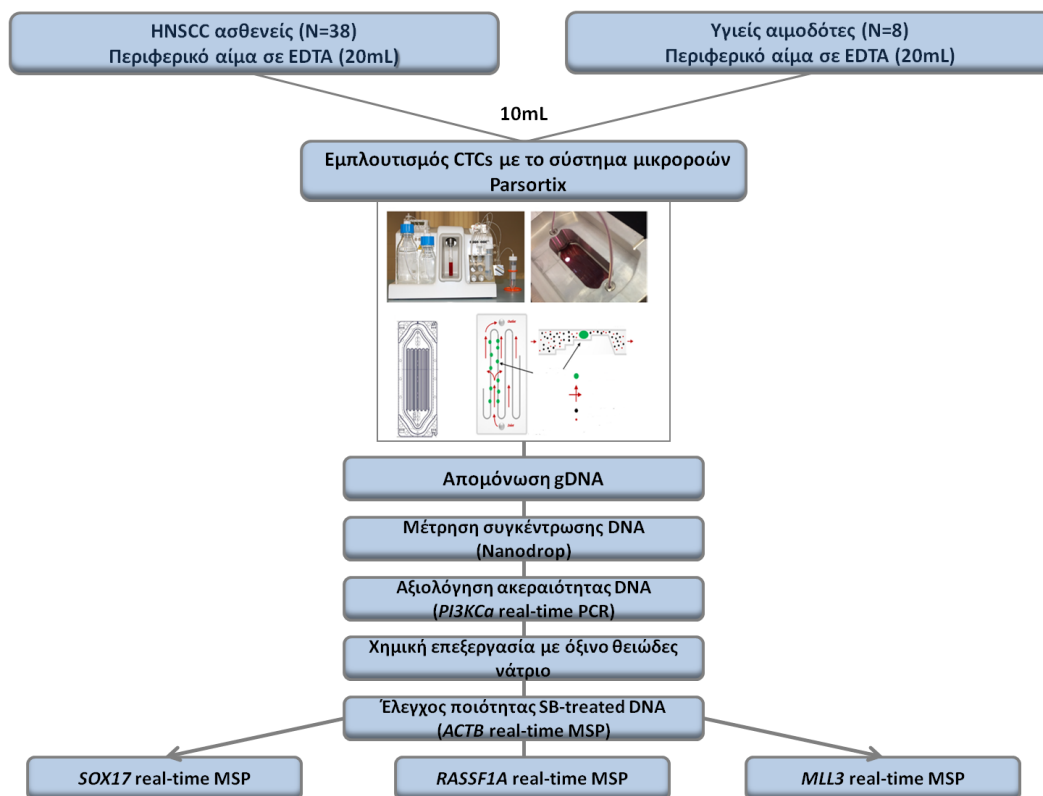
Παρόλο που οι παράγοντες κινδύνου που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του HNSCC έχουν προσδιοριστεί, η τοπική υποτροπή κι η μετάσταση αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την επιτυχία της θεραπείας (313). Η ικανότητα ταυτοποίησης ασθενών υψηλού κινδύνου πριν από την παρουσίαση κλινικά ανιχνεύσιμων μεταστάσεων, αποτελεί πρόκληση για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών για τη βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *SOX17*, *RASSF1A* και *MLL3* σε CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix, σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Το καθένα από τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκε σύμφωνα με τον διαφορετικό ρόλο που επιτελεί στον καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, το *SOX17* εκφράζει έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος δεσμεύεται στο DNA μέσω του τομέα HMG (High Mobility Group). Η πρωτεΐνη *SOX17* εμπλέκεται σε πληθώρα λειτουργιών, εκφράζεται κυρίως κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, μέσω της καταστολής του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, ένα βασικό μονοπάτι πολλαπλασιασμού επιθηλιακών κυττάρων (314,315). Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *SOX17* έχει ήδη μελετηθεί από την ομάδα μας κι έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος του ως προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του μαστού (96,97,99) και για τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (219). Οι πρωτεΐνες RASSF συμβάλλουν στη σταθερότητα των

μικροσωληναρίων και εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στη μετανάστευση των κυττάρων και στην κυτταρική προσκόλληση. Το γονίδιο *RASSF1A* αποτελεί μία από τις οκτώ ισομορφές του *RASSF1* και εμπλέκεται σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των Ras/PI3K/AKT, Ras/RAF/MEK/ERK, Hippo και β-κατενίνης (316). Ο ρόλος του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο έχει κατοχυρωθεί από ποικίλες μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου και η ανίχνευση υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή του σχετίζεται με πιο επιθετικούς φαινότυπους (317). Τέλος, η πρωτεΐνη MLL3 είναι μέλος των πρωτεϊνών μικτής λευχαιμική σειράς (MLL), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4), προωθώντας την προσβασιμότητα του γονιδιώματος σε μεταγραφικούς παράγοντες (292). Επιπλέον, είναι βασική για την ενεργοποίηση των ενισχυτών και την κυτταρο-ειδική γονιδιακή έκφραση κατά την κυτταρική διαφοροποίηση (293,295). Το γονίδιο *MLL3* δεν είναι αρκετά μελετημένο έως σήμερα, παρόλα αυτά έχει προταθεί ο ρόλος του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο που παρουσιάζει απλο-ανεπάρκεια (haploinsufficiency) (310). Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του μελετήθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα διδακτορική διατριβή (Κεφάλαιο 7), σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, όπου τα αποτελέσματα αναφορικά με τη θέσπισή του ως προγνωστικό βιοδείκτη ήταν ενθαρρυντικά και προτείνεται η περαιτέρω αξιολόγησή του και σε άλλους τύπους καρκίνου.

## 8.2. Πειραματική πορεία

Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία έλαβε χώρα σε ξεχωριστούς χώρους, με διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του DNA, η χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και η προετοιμασία των αντιδράσεων real-time MSP πραγματοποιούνται σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar-flow hoods) υπό συνθήκες ελεύθερες DNAσών. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στο NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 4.10. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα αναφορικά με τη σταθερότητα του SB-treated DNA, τα δείγματα SB-treated DNA αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Με τον τρόπο αυτό, προσπαθήσαμε να διασφαλίσουμε την ακεραιότητα των αποτελεσμάτων μέσω του εκμηδενισμού σφαλμάτων από προαναλυτικές παραμέτρους. Σε όλα τα βήματα της πειραματικής πορείας, πραγματοποιήθηκε ο ανάλογος έλεγχος ποιότητας, όπως αυτός περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.3.1 της παρούσας διατριβής. Το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.1.



Σχήμα 8.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη μεθυλίωσης των γονιδίων *SOX17*, *RASSF1A* και *MLL3* σε δείγματα ασθενών με HNSCC.

### 8.2.1. Κλινικά δείγματα

Αρχικά, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα σε K<sub>2</sub>EDTA σωληνάρια συλλογής των 10mL (BD Vacutainer, Plymouth,UK) από 38ασθενείς με HNSCC από το Π.Γ.Ν. «Αττικών» (Υπεύθυνη: Αναπλ. Καθ. Α. Ψυρρή) και 8 υγιείς αιμοδότες. Η απομόνωση των CTC πραγματοποιήθηκε εντός 3h με το σύστημα μικροροών Parsortix (ANGLE plc,UK), με χρήση 10mL περιφερικού αίματος από τον κάθε ασθενή. Τα πρώτα 5ml του αίματος απορρίφθηκαν για να αποφευχθεί η επιμόλυνση από επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, τα δείγματα αναδεύτηκαν αμέσως μετά τη συλλογή και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

### 8.2.2. Απομόνωση των CTCs με χρήση της τεχνολογίας του συστήματος Parsortix

Ο εμπλουτισμός του ολικού αίματος γίνεται με εφαρμογή λογισμικών, όπως αυτά περιγράφονται από τον κατασκευαστή (υποκεφάλαιο 4.3) και ο διαχωρισμός των CTCs από τους υπόλοιπους κυτταρικούς υποπληθυσμούς λαμβάνει χώρα σε κασέτα, κατόπιν ειδικής διαδρομής από αυτή. Τα κύτταρα καταλήγουν σε τερματικό σημείο διατομής 6,5μm, όπου επιτρέπεται η διέλευση μόνο των CTCs και των PBMCs. Αφού το δείγμα εμπλουτιστεί, πραγματοποιείται εφαρμογή

ανάστροφης ροής (harvest) και τα κύτταρα αραιωμένα με 200μL διαλύματος PBS, συλλέγονται σε σωληνάριο συλλογής τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται λύση των απομονωμένων κυττάρων με προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου Trizol LS και αποθήκευσή τους στους -70°C.

### 8.2.3. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol LS

Ακολούθησε η προσθήκη χλωροφορμίου στα σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf που περιείχαν το 1mL Trizol. Κατόπιν λήψης της υδατικής φάσης (ανώτερη στιβάδα), που περιέχει το ολικό RNA, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση DNA από την οργανική φάση. Η διαδικασία απομόνωσης περιγράφεται με λεπτομέρεια στο υποκεφάλαιο 4.8. Το απομονωμένο gDNA αναδιαλύθηκε σε 30μL NaOH 8mmol/L και αποθηκεύτηκε στους -70°C, μέχρι τη χρήση του.

### 8.2.4. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment)

Πριν προχωρήσουμε στην επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, εξετάστηκε η ακεραιότητα του gDNA για όλα τα δείγματα με εφαρμογή real-time PCR για το εξόνιο 20 του *PIK3CA* (281). Μόνο δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν στο *PIK3CA* προχώρησαν για χημική τροποποίηση, προς μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες και τη διατήρηση των μεθυλιωμένων κυτοσινών ανεπηρέαστες. Η χημική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA) (υποκεφάλαιο 4.11.2) και το SB-treated DNA αποθηκεύτηκε στους -70°C. Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, συμπεριλάβαμε dH<sub>2</sub>O και 100% μεθυλιωμένο DNA ως αρνητικό και θετικό πρότυπο ελέγχου, αντίστοιχα. Η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε με μεθοδολογία real-time MSP για τη *β-ακτίνη* (*ACTB*) (εδάφιο 5.2.4). Τέλος, το ανθρώπινο πλακουντιακό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control της real-time MSP μετά τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ οι κυτταρικές σειρές MCF-7 και SKBR3 ως τα θετικά δείγματα ελέγχου για το *SOX17* και το *RASSF1A*, αντίστοιχα. Το 100% μεθυλιωμένο DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA), χρησιμοποιήθηκε ως το πλήρως μεθυλιωμένο, θετικό control για όλες τις μεθοδολογίες.

### 8.2.5. Real-time MSP

Χρησιμοποιήσαμε προηγούμενα *in-silico* σχεδιασμένους εκκινήτες των γονιδίων *SOX17* (99), *RASSF1A* (252) και *MLL3* (κεφάλαιο 7), ειδικούς για εφαρμογές MSP με χρήση του λογισμικού

Primer Premier 5.00 (Premier Biosoft, USA), αποφεύγοντας τον σχηματισμό σταθερών δομών φουρκέτας, διμερών και ψευδών σημείων εκκίνησης. Για τη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων αλληλίων, και οι δύο εκκινητές περιείχαν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια. Επιπλέον, περιείχαν βάσεις θυμίνης οι οποίες έχουν προέλθει μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες κατά την αντίδραση της χημικής τροποποίησης, ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός χημικά επεξεργασμένου από μη-χημικά επεξεργασμένο DNA. Για να διαπιστωθεί η ειδική ανίχνευση μόνο των μεθυλιωμένων αλληλουχιών, χρησιμοποιήσαμε τρία διαφορετικά δείγματα ελέγχου: gDNA το οποίο δεν έχει υποστεί τη χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, πλακουντιακό SB-treated DNA (0% μεθυλιωμένο) και το Universal Methylated Human DNA Standard (100% μεθυλιωμένο DNA, ZYMO Research, USA). Οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, USA) και οι αλληλουχίες των *SOX17*, *RASSF1A* παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3 (υποκεφάλαιο 4.13), ενώ του *MLL3* στον Πίνακα 7.1 (υποκεφάλαιο 7.2.5).

Η κάθε αντίδραση για τα γονίδια *SOX17* και *RASSF1A* πραγματοποιήθηκε στο όργανο στο όργανο LightCycler 2.0 (Roche, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή και σε τελικό όγκο 10μL, ενώ για το *MLL3* στο cobas<sup>®</sup> 4800 (Roche, Germany) σε πλάκα 96 θέσεων (96 well-plate) και σε τελικό όγκο εξίσου 10μL. Τα συστατικά της αντίδρασης για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του *SOX17* παρατίθενται στον Πίνακα 5.4 του εδαφίου 5.2.4, του *MLL3* στον Πίνακα 7.2 του εδαφίου 7.2.5, ενώ του *RASSF1A* στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8.1). Ακολούθως, οι θερμοκρασιακές συνθήκες της real-time MSP για το *SOX17* δίνονται στον Πίνακα 5.5 του υποκεφαλαίου 5.2.4, του *MLL3* στον Πίνακα 7.3 του εδαφίου 7.2.5 και του *RASSF1A* παρακάτω (Πίνακας 8.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες real-time MSP assay δεν είναι ποσοτικές, επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε κατώφλι (cut-off) τιμών. Πιο συγκεκριμένα, ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν ανιχνεύεται σήμα ενίσχυσης στη real-time PCR με  $Cq < 41,00$ , ενώ αρνητικό χαρακτηρίζεται το δείγμα εκείνο που δεν παρουσιάζει ενίσχυση ή καταγράφεται τιμή  $Cq > 41,00$ .



**Πίνακας 8.1.** Συστατικά της αντίδρασης *real-time* MSP για το γονίδιο *RASSF1A* (252)

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O (nuclease-free)	4,35	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2,0	1x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,8	2mM
dNTPs 10mM	0,2	0,2mM
BSA 10μg/μL	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής 10μM	0,2	0,2μM
Ανάστροφος εκκινητής 10μM	0,2	0,2μM
LC-Green 10x	1,0	1x
Ταq πολυμεράση 5U/μL	0,1	0,05U/μL
<b>Σύνολο</b>	9,0	-
SB-treated DNA	1,0	-
<b>Σύνολο</b>	10,0	-

**Πίνακας 8.2.** Συνθήκες αντίδρασης *real-time* MSP για το γονίδιο *RASSF1A* (252)

Στάδιο <i>real-time</i> MSP	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10 sec
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	65°C/15 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/20 sec*
	55 °C/20 sec
Ανάλυση καμπυλών τήξης	95 °C/0 sec* (ramp rate: 0,2 °C/sec)
	95 °C/1 min
Ψύξη	40°C/30 sec
<b>Αριθμός κύκλων</b>	<b>45</b>

\*Λήψη σήματος φθορισμού

### 8.3. Αποτελέσματα

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη μελέτη μεθυλίωσης των τριών ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε ασθενείς με HNSCC, παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.2.

#### 8.3.1. Μεθυλίωση του υποκινητή του *SOX17* σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου

Για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ειδικότητας της μεθόδου *real-time* MSP για τη μελέτη μεθυλίωσης του *SOX17* σε CTCs απομονωμένα με την πλατφόρμα Parsortix, αρχικά την

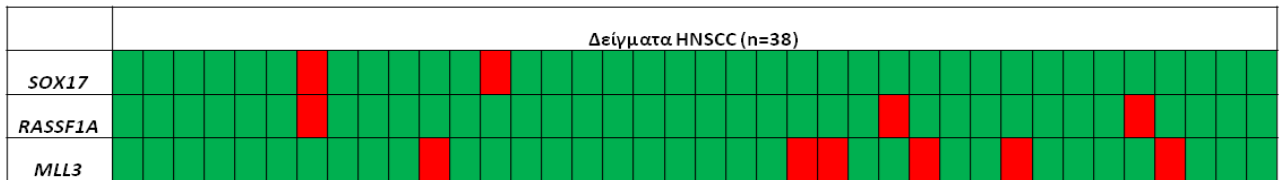
εφαρμόσαμε σε δείγματα 8 φυσιολογικών αιμοδοτών. Το ολικό αίμα από τον κάθε υγιή αιμοδότη είχε υποστεί την ίδια διαδικασία κατεργασίας κι εμπλουτισμού με τα δείγματα των ασθενών και ακολούθησε η απομόνωση gDNA και η χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Κανένα από τα 8 δείγματα του φυσιολογικού πληθυσμού (0/8, 0%) δεν βρέθηκε μεθυλιωμένο για το *SOX17*. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε τη μεθυλίωση του υποκινητή του *SOX17* σε 38 δείγματα CTCs από ασθενείς με HNSCC, όπου το *SOX17* βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 2/38 (5,3%) των δειγμάτων αυτών.

### **8.3.2. Μεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A* σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου**

Αρχικά, εφαρμόσαμε τη μέθοδο real-time MSP για τη μελέτη μεθυλίωσης του *RASSF1A* σε δείγματα 8 φυσιολογικών αιμοδοτών, για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ειδικότητας της μεθοδολογίας. Το ολικό αίμα από τον κάθε υγιή αιμοδότη είχε υποστεί την ίδια διαδικασία κατεργασίας κι εμπλουτισμού με τα δείγματα των ασθενών και ακολούθησε η απομόνωση gDNA και η χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Κανένα από τα 8 δείγματα του φυσιολογικού πληθυσμού (0/8, 0%) δεν βρέθηκε μεθυλιωμένο για το *RASSF1A*. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε τη μεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A* σε 38 δείγματα CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix, από ασθενείς με HNSCC, όπου το γονίδιο βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 3/38 (7,9%) των δειγμάτων αυτών.

### **8.3.3. Μεθυλίωση του υποκινητή του *MLL3* σε CTCs ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου**

Η εφαρμογή της μεθοδολογίας real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης του *MLL3* σε δείγματα SB-treated DNA από 8 υγιείς αιμοδότες, υπέδειξε ότι η μεθοδολογία παρουσιάζει εξίσου υψηλή διαγνωστική ειδικότητα, αφού κανένα από τα 8 δείγματα (0/8, 0%) δεν βρέθηκε μεθυλιωμένο για το *MLL3*. Το ολικό αίμα από τον κάθε υγιή αιμοδότη είχε υποστεί την ίδια διαδικασία κατεργασίας κι εμπλουτισμού μέσω της πλατφόρμας Parsortix, με τα δείγματα των ασθενών και η απομόνωση του gDNA και η χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο έγιναν ακριβώς με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Κατά της εφαρμογή της μεθόδου σε 38 δείγματα CTCs ασθενών με HNSCC, μεθυλίωση του *MLL3* παρατηρήθηκε σε 6/38 (15,8%) των δειγμάτων.



**Σχήμα 8.2. Heatmap για τη μεθυλίωση του SOX17, RASSF1A και MLL3 σε δείγματα CTCs από ασθενείς με HNSCC**

#### 8.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs αποτελεί πηγή βιοδεικτών που μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την εξέλιξη της νόσου και την ανταπόκριση σε θεραπείες (1). Πρόκειται για έναν υψηλά ετερογενή πληθυσμό, επομένως η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης αποτελεί κρίσιμο βήμα στις αναλύσεις υγρής βιοψίας. Τεχνολογίες βασισμένες στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη EpCAM, ενέχουν τον κίνδυνο απώλειας των EpCAM-αρνητικών CTCs. Ωστόσο, σύγχρονα τεχνολογικά επιτεύγματα έχουν διευκολύνει την απομόνωση των CTCs, αφού πλέον υπάρχει πληθώρα μεθόδων που βασίζονται στις διαφορετικές βιολογικές και φυσικές ιδιότητές τους. Το EMT οδηγεί σε μειωμένη ρύθμιση του EpCAM, επομένως ο ανεξάρτητος των EpCAM εμπλουτισμός των CTCs, έχει τη δυνατότητα να απομονώνει κύτταρα που βρίσκονται σε EMT φάση (318).

Το σύστημα Parsortix, χρησιμοποιώντας μία τεχνολογία μικροροών, πραγματοποιεί απομόνωση των CTCs βασισμένο στη μικρότερη τάση τους για παραμόρφωση και συνήθως στο μεγαλύτερο μέγεθός τους από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Οι Obermayer et al. έχουν αναφέρει ότι το σύστημα Parsortix είναι καταλληλότερο για την απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων, διευκολύνοντας έτσι τη μοριακή ανάλυσή τους λόγω υψηλής καθαρότητας των εμπλουτισμένων κυττάρων (319). Τις παραπάνω παρατηρήσεις έρχονται να ενισχύσουν οι Gorges et al, οι οποίοι καθιέρωσαν αξιόπιστες πειραματικές πορείες για μελέτες πολλαπλών δεικτών σε μονήρη CTCs με εφαρμογή qPCR. Όταν οι μεθοδολογίες qPCR συνδυάζοντουσαν με την απομόνωση από το Parsortix, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις που υποδεικνύουν υψηλότερης ποιότητας RNA (77). Επιπλέον, κατά τη σύγκρισή του με άλλη υπάρχουσα μέθοδο απομόνωσης, το Parsortix επέδειξε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης και τη χαμηλότερη επιμόλυνση από λευκά αιμοσφαίρια (320). Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, οι Lampignano et al. αξιολόγησαν την ετερογένεια του προφίλ μεταλλάξεων του *PIK3CA* σε μονήρη CTC, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα απομόνωσης Parsortix και συγκρίνοντας 2 διαφορετικούς υποπληθυσμούς CTC (EpCAM<sup>high</sup> και

ErCAM<sup>low/negative</sup>) από τον ίδιο ασθενή (321). Η ανίχνευση *AR-V7*, *AR-FL*, *PSA* μεταγράφων και *KRAS* μεταλλάξεων στα CTCs, ήταν επίσης εφικτή με τη συσκευή Parsortix (322).

Ο προσδιορισμός των επιγενετικών τροποποιήσεων σε ασθενείς με καρκίνο αποτελεί πρόκληση για την ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό νέων βιοδεικτών. Η μεθυλίωση του DNA, ως η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση, μπορεί να ταυτοποιήσει δείκτες από τα πρώιμα στάδια της νόσου και κατά την εξέλιξή της, ώστε να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς με υψηλότερες πιθανότητες να αναπτύξουν αντίσταση στη θεραπεία ή να εμφανίσουν τοπική και απομακρυσμένη μετάσταση. Ειδικότερα η ανακάλυψη δεικτών μεθυλίωσης με τη προσέγγιση της υγρής βιοψίας, παρέχει τη δυνατότητα να βελτιωθεί μη-επεμβατικά και με μειωμένο κόστος η ακρίβεια της διάγνωσης (170). Για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, το προφίλ μεθυλίωσης του DNA, έχει προσδιοριστεί σε ιστό, σάλιο και πλάσμα ολικού αίματος. Πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης, απέδειξε ότι η ακρίβεια προσδιορισμού βιοδεικτών μεθυλίωσης, διαφέρει από δείγμα σε δείγμα για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, με την ειδικότητα όπως αυτή προσδιορίστηκε από καμπύλες ROC να είναι 85% και την ευαισθησία 46% για τα δείγματα πλάσματος (323). Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η μελέτη μεθυλίωσης του DNA σε CTCs από ασθενείς με HNSCC. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε κατά πόσο είναι δυνατή η ανίχνευση μεθυλίωσης σε CTCs ασθενών HNSCC, απομονωμένα με ανεξάρτητο του ErCAM τρόπο, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Parsortix.

Η επιλογή των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, δεν έγινε τυχαία. Το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης παίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής επιβίωσης και της διαφοροποίησης. Μάλιστα, η σηματοδότηση Wnt/β-κατενίνης καθορίζει την παθοβιολογία των HPV-αρνητικών και HPV-θετικών ασθενών με HNSCC (324). Η πρωτεΐνη SOX17 καταστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης και εμπλέκεται σε πληθώρα λειτουργιών, όπως τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των εμβρυικών βλαστοκυττάρων. Ήδη η ομάδα μας έχει αποδείξει ότι η μεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *SOX17* αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού (96,97,99) και για τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (219). Στην παρούσα μελέτη, μεθυλίωση του *SOX17* παρατηρήθηκε σε 2/38 (5,3%) δειγμάτων CTCs ασθενών με HNSCC.

Το *RASSF1A* είναι από τα πιο συχνά υπερμεθυλωμένα γονίδια στον καρκίνο κι έχει αναφερθεί ο ρόλος του ως προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο των νεφρών (325), το μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (326), στο νευροβλάστωμα (327), στον καρκίνο των ωοθηκών (252) και, τέλος, στον καρκίνο του μαστού (177). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η υπερμεθυλίωση σε CpG

νησίδες του υποκινητή του *RASSF1A* σε κυτταρικές σειρές μαστού (328). Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι το *RASSF1A* ίσως να εμπλέκεται στην ανάπτυξη του HNSCC. Πράγματι, πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A* μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης κατά την εξέλιξη του HNSCC (329). Στην παρούσα μελέτη, 3/38 (7,9%) δείγματα CTCs ασθενών με HNSCC βρέθηκαν μεθυλιωμένα για τον υποκινητή του *RASSF1A*.

Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα ένζυμα *MLL3/MLL4* είναι βασικά για την ενεργοποίηση των ενισχυτών και την κυτταρο-ειδική γονιδιακή έκφραση κατά την κυτταρική διαφοροποίηση (293,295). Η καταστολή της έκφρασης του *MLL3* σε ποντίκια, οδήγησε σε όγκο επιθηλιακής προέλευσης, κάτι που υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (310). Παρόλο που η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου δεν έχει ακόμα μελετηθεί στη βιβλιογραφία, το *MLL3* έχει δείξει να έχει μειωμένη έκφραση σε καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά, σε ασθενείς με καρκίνο του λάρυγγα (330). Επιπλέον, η έκφρασή του σε προχωρημένου σταδίου όγκους ήταν πολύ χαμηλότερη σε σχέση με τα αρχικά στάδια του όγκου, γεγονός που συνιστά την εμπλοκή του στην εξέλιξη της νόσου (330). Μία άλλη μελέτη, υποστηρίζει ότι οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις του *MLL3* μπορεί να λειτουργούν ως προδιαθεσιακός παράγοντας στην ανάπτυξη ρινοφαρυγγικού καρκινώματος, πιθανώς συνεργιστικά με άλλες μεταλλάξεις (331). Τέλος, έχει υπάρξει συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών και απλοτύπων του *MLL3* με την ανάπτυξη καρκίνου του λάρυγγα στον Κινέζικο πληθυσμό. Μάλιστα, για τη δημιουργία των πολυμορφισμών, ενεπλάκησαν ως συνεργιστικοί παράγοντες το κάπνισμα και η λήψη αλκοόλ (306). Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε η αναπτυχθείσα στο Κεφάλαιο 7, επικυρωμένη μέθοδος real-time MSP για τη μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3*. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 38 δείγματα CTCs, ασθενών με HNSCC και το *MLL3* βρέθηκε μεθυλιωμένο για 6/38 (15,8%) από αυτά.

Συμπερασματικά, διερευνήθηκε για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *SOX17*, *RASSF1A* και *MLL3* σε CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix, για ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Καθένα από τα παραπάνω γονίδια βρέθηκε μεθυλιωμένο σε διαφορετικά ποσοστά, επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια των CTCs. Τα αποτελέσματά μας συνιστούν περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω δεικτών, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με γνωστά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ώστε να κατοχυρωθούν ως επιγενετικοί δείκτες υγρής βιοψίας, με στόχο την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ολοκληρώσαμε την ανάπτυξη, επικύρωση και κλινική αξιολόγηση μεθοδολογιών, για την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας ασθενών με καρκίνο. Για να διασφαλισθεί η αξιοπιστία και η ορθότητα των αποτελεσμάτων, πριν την οποιαδήποτε εφαρμογή των μεθοδολογιών σε κλινικά δείγματα, προηγήθηκε μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων αναφορικά με την σταθερότητα των δειγμάτων και την πιστότητα και ακρίβεια της ενίσχυσης του επιγονιδιώματος.

Η υγρή βιοψία, προσφέρει μία χρήσιμη πηγή βιοδεικτών αναφορικά με την πρόγνωση και την ανταπόκριση των ασθενών με καρκίνο στη θεραπεία (125), ενώ πρόσφατα έχει επιδείξει σημαντικά επιτεύγματα και στο πεδίο της διάγνωσης και διαλογής ασθενών (332). Η απομόνωση CTCs από περιφερικό αίμα και ο ακόλουθος μοριακός χαρακτηρισμός τους σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης, αποτελούν σημαντικές αναλύσεις κατά την προσέγγιση της υγρής βιοψίας (1). Η ταυτοποίηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs είναι πολύ δύσκολος, καθώς τα κύτταρα είναι εξαιρετικά σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου προς ανάλυση δείγματος, στις περισσότερες περιπτώσεις είναι πολύ περιορισμένη (125). Επιπρόσθετα, η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του ctDNA χρησιμοποιείται πλέον με επιτυχία για την εκτίμηση της προόδου της νόσου και την αξιολόγηση της πρόγνωσης, διάγνωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία σε πολλούς τύπους καρκίνου (107,108).

Ταυτοποιώντας και παρακολουθώντας όχι μόνο τις γενετικές αλλά και τις επιγενετικές αλλαγές του καρκίνου, οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν για λήψη του πιο αποτελεσματικού θεραπευτικού σχήματος, βάσει διαδικασιών διαλογής με ανάλυση γνωστών βιοδεικτών. Η επιγενετική αποσιώπηση του όγκου και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τη ρύθμιση του μεταστατικού δυναμικού τους (93,96). Επί του παρόντος, η μεθυλίωση του DNA είναι η πιο καλά μελετημένη επιγενετική τροποποίηση στο γονιδίωμα των θηλαστικών και αποτελεί ιδανική πηγή για υποψήφιους βιοδείκτες, λόγω της σταθερότητάς της, της σχεδόν καθολικής παρουσίας της και της ευκολίας στον προσδιορισμό της (170). Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο, προσφέρει τη δυνατότητα ανακάλυψης πιθανών επιγενετικών βιοδεικτών για τη διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενών (333).

Η προτυποποίηση των προαναλυτικών παραμέτρων που εμπλέκονται σε αναλύσεις μεθυλίωσης του DNA είναι πολύ κρίσιμη για να διασφαλισθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, πριν την

οποιαδήποτε κλινική εφαρμογή τους σε αναλύσεις κλινικών δειγμάτων στα πλαίσια της υγρής βιοψίας, όπου το διαθέσιμο υλικό είναι περιορισμένο. **Η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων και αξιολόγησης της σταθερότητας της μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα και της μεθυλίωσης του SB-treated DNA υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.** Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η πληροφορία της μεθυλίωσης δε διατηρείται εφόσον η απομόνωση του ctDNA πραγματοποιηθεί από δείγματα πλάσματος συντηρημένα σε βαθιά κατάψυξη (-70°C) για 8 μήνες. Αντίθετα, το SB-treated DNA μπορεί να διατηρηθεί σε καταψύκτες και των -20°C και των -70°C για ένα έτος, χωρίς κανένα πρόβλημα στην ανάλυση μεθυλίωσης με real-time MSP. Η ενίσχυση του ολικού γονιδιώματος (WGA), μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμη και στην επιγενετική έρευνα ειδικά σε περιπτώσεις υγρής βιοψίας, αφού παρέχει μία μεγαλύτερη ποσότητα DNA για περαιτέρω ανάλυση. Εντούτοις, εάν χρησιμοποιηθούν τα συμβατικά WGA kit για την ενίσχυση του επιγονιδιώματος, η πληροφορία της μεθυλίωσης χάνεται, επομένως ως αρχικός στόχος ενίσχυσης πρέπει να ορίζεται το DNA μετά από επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treated DNA). Μία αναμενόμενη πρόκληση, λοιπόν, αποτελεί η αμερόληπτη και ακριβής ενίσχυση του SB-treated DNA (267). Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι το WGA του SB-treated DNA χρησιμοποιώντας το EpiTect Whole Bisulfite Kit είναι αξιόπιστο, αφού λαμβάνουμε πανομοιότυπα αποτελέσματα πριν και μετά την αντίδραση ενίσχυσης με χρήση και των δύο διαφορετικών kit για χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο. Σε κάθε περίπτωση αναλύσεων μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα υγρής βιοψίας, απαραίτητος είναι ο ποιοτικός έλεγχος σε κάθε βήμα της ανάλυσης.

Στον πρωτοπαθή όγκο καρκίνου του μαστού, περίπου το 70% των περιπτώσεων είναι ERα+, κατάσταση που καθορίζει τους υποψήφιους ασθενείς για ενδοκρινή θεραπεία. Ωστόσο, πολλοί από αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν υποτροπή παρά την χορήγηση επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας, γεγονός που δείχνει ότι οι ER+ όγκοι ίσως έχουν πρωτογενή ή δευτερογενή αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία (268). Η αποσιώπηση του *ESR1*, μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του, επηρεάζει με σαφή τρόπο την έκφραση της πρωτεΐνης ER στους ασθενείς με καρκίνο μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η υπερμεθυλίωση του *ESR1* σχετίζεται με ER-αρνητικό προφίλ, γεγονός το οποίο δύναται να εμπλέκεται στην αντίσταση των ασθενών στην ορμονοθεραπεία (270) **Στην παρούσα διατριβή, πρώτα αναπτύξαμε και αξιολογήσαμε αναλυτικά μία υπερευαίσθητη και ειδική μεθοδολογία real-time MSP, για την ανίχνευση μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*.** Με εφαρμογή της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας σε πρωτοπαθείς όγκου μαστού, αποδείξαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ER είναι αντίστροφη με την παρουσία μεθυλίωσης στο *ESR1*. **Έπειτα, εφαρμόσαμε τη μεθοδολογία σε κλινικά**

**δείγματα ErCAM+ CTC-κλασμάτων ασθενών με καρκίνο μαστού**, όπου παρατηρήσαμε ένα ποσοστό μεθυσίωσης του *ESR1* της τάξεως του 20% και σε ctDNA από πλάσμα ασθενών, όπου μεθυσίωση του *ESR1* παρατηρήθηκε σε χαμηλότερο ποσοστό. **Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη μεθυσίωσης του *ESR1* σε CTCs.** Αξιοσημείωτα ήταν τα αποτελέσματά μας για τους ασθενείς με πρώιμη νόσο, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανίχνευσης μεθυσίωσης του *ESR1*. Βεβαίως, αυτό είναι κάτι που δικαιολογείται από αναρίθμητες μελέτες που αποδεικνύουν ότι η μεθυσίωση αποτελεί πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση και από προηγούμενες δικές μας μελέτες σχετικά με τη μεθυσίωση ογκοκατασταλτικών και κατασταλτικών της μετάστασης γονιδίων στα CTCs ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, όπου επίσης παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα (96–99,285). **Επόμενο βήμα στην εργασία μας, αποτέλεσε η σύγκριση της μεθυσίωσης του *ESR1* στα CTCs και στο ctDNA πλάσματος, απομονωμένα από το περιφερικό αίμα του ίδιου ασθενούς, κατά την ίδια αιμοληψία, την ίδια μέρα και επεξεργασμένα με τον ίδιο τρόπο, προς ελαχιστοποίηση των διαφορών που δύνανται να προκύψουν από προαναλυτικές παραμέτρους.** Στην παραπάνω ομάδα δειγμάτων, η μεθυσίωση του *ESR1* στο ctDNA επέδειξε μία στατιστικά σημαντική συμφωνία με τη μεθυσίωση του *ESR1* στα CTCs, υποδεικνύοντας έτσι μία πιθανή σύνδεση μεταξύ CTCs και της προέλευσης του ctDNA. **Τα αποτελέσματά μας από τα διαδοχικά δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> καρκίνο μαστού που λαμβάνουν everolimus/exemestane ως θεραπευτική αγωγή, συνιστούν ότι η μεθυσίωση του *ESR1* στα CTCs συσχετίζεται ισχυρά με έλλειψη ανταπόκρισης στον συγκεκριμένο συνδυασμό** και χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, για την καθιέρωση του ως πιθανό βιοδείκτη υγρής βιοψίας για την αποτελεσματικότητα της ενδοκρινικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, η μεθυσίωση του *ESR1* στα CTCs θα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω σε μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ως πιθανός βιοδείκτης υγρής βιοψίας για την επιλογή των ασθενών με ευαίσθητο στην ενδοκρινική θεραπεία καρκίνο μαστού (280).

Η ανάλυση ctDNA αποτελεί σε σχέση με την ανάλυση των CTCs, μία πιο γρήγορη και εύκολη διαδικασία, γιατί το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και να αναλυθεί, χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού και απομόνωσης ενός σπάνιου πληθυσμού κυττάρων (297). Ήδη έχει επιτευχθεί η ταξινόμηση ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) με στόχο την ανταπόκριση σε στοχευμένες θεραπείες, μέσω παρακολούθησης και ανίχνευσης μεταλλάξεων του EGFR στο ctDNA πλάσματος (298,299), δοκιμασία η οποία έχει πάρει έγκριση από τον FDA. Αρκετές μελέτες έχουν συστήσει τη χρήση της έκφρασης του *MLL3* ως προγνωστικού βιοδείκτη στον καρκίνο του στομάχου (307), του παγκρέατος (308) και του ER<sup>+</sup> καρκίνο μαστού (309) και ήδη έχει προταθεί ο ρόλος του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. **Στην παρούσα**



διατριβή, αναπτύξαμε και επικυρώσαμε μία ειδική μεθοδολογία real-time MSP για την ανίχνευση μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MLL3*, με ευαισθησία 0,1%. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε 60 δείγματα πλάσματος υγιών αιμοδοτών, για την αξιολόγηση της διαγνωστικής της ειδικότητας κι έπειτα ακολούθησε η εφαρμογή της σε δύο διαφορετικές ομάδες ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματά μας, υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *MLL3* είναι συχνή στο ctDNA και σχετίζεται με το μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα και τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών με χειρουργήσιμο NSCLC. Η επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, προέκυψε από μία ανεξάρτητη ομάδα ασθενών με προχωρημένου σταδίου NSCLC. Και στις δύο ομάδες ασθενών, η παρατηρούμενη συχνότητα μεθυλίωσης του *MLL3* ήταν υψηλή. Η παραπάνω παρατήρηση ίσως να αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της έκφρασης του *MLL3*, ρυθμίζεται επιγενετικά μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Επιπλέον, η μεθυλίωση είναι πρώιμο γεγονός κατά την καρκινογένεση του NSCLC και παραμένει σε υψηλά επίπεδα στα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου. Τέλος, στους ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, η ανάλυση καμπυλών Kaplan–Meier επέδειξε μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* στο πλάσμα και μειωμένου PFS και OS, γεγονός που επιβεβαιώθηκε παράλληλα από τη μονοπαραμετρική Cox ανάλυση παλινδρόμησης. Πιστεύουμε ακράδαντα, ότι η αξιολόγηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του *MLL3* αξίζει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών και σε άλλους τύπους καρκίνου, με απώτερο στόχο την επικύρωσή του ως ένα μη-επεμβατικό, κυκλοφορούν, επιγενετικό βιοδείκτη καρκίνου.

Τα CTCs αποτελούν έναν εξαιρετικά ετερογενή πληθυσμό, επομένως οι τεχνολογίες απομόνωσης βασισμένες στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη EpCAM, ενέχουν τον κίνδυνο απώλειας των EpCAM-αρνητικών CTCs. Το σύστημα Parsortix, χρησιμοποιώντας μία τεχνολογία μικροροών πραγματοποιεί ανεξάρτητο των EpCAM εμπλουτισμό των CTCs κι έτσι έχει τη δυνατότητα να απομονώνει κύτταρα που βρίσκονται σε EMT φάση (318). Για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), το προφίλ μεθυλίωσης του DNA, έχει προσδιοριστεί κυρίως σε ιστό, σάλιο και πλάσμα ολικού αίματος. Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η μελέτη μεθυλίωσης του DNA σε CTCs από ασθενείς με HNSCC. **Στην παρούσα διατριβή, διερευνήθηκε για πρώτη φορά το προφίλ μεθυλίωσης των ογκοκατασταλατικών γονιδίων *SOX17*, *RASSF1A* και *MLL3* σε CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix, για ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου.** Καθένα από τα παραπάνω γονίδια βρέθηκε μεθυλιωμένο σε διαφορετικά ποσοστά, επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια των CTCs. Τα αποτελέσματά μας συνιστούν περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω δεικτών, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με γνωστά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την

ανάλυση μεθυλίωσης σε περισσότερα γονίδια, γεγονότα που θα συνεισέφεραν σημαντικά στην κατοχύρωση νέων επιγενετικών δεικτών υγρής βιοψίας, με στόχο την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενών με HNSCC.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Σύντμηση	Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
<b>5mC</b>	5'-methyl cytosine	5'-μεθυλοκυτοσίνη
<b>ACTB</b>	<i>Actin-beta</i>	<i>Ακτίνη-β</i>
<b>AD</b>	Adenocarcinoma	Αδενοκαρκίνωμα
<b>ALK</b>	Anaplastic Lymphoma Kinase	Κινάση αναπλαστικού λεμφώματος
<b>ARMS-PCR</b>	Amplification Refractory Mutation System-PCR	Ανάλυση μεταλλάξεων με χρήση καμπυλών τήξης-PCR
<b>BAL</b>	Bronchoalveolar Lavage	Βρογχοεκπλύματα
<b>BRMS1</b>	Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1	Γονίδιο κατασταλτικό της μετάστασης του καρκίνου του μαστού
<b>CAMLs</b>	Cancer-Associated Macrophage-Like cells	Μακροφάγα σχετιζόμενα με καρκίνο
<b>CDx</b>	Companion Diagnostics	Συνοδές διαγνωστικές εξετάσεις
<b>CEA</b>	Carcinoembryonic Antigen	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
<b>cfDNA</b>	Cell-free DNA	Εξωκυττάριο DNA
<b>cf-mtDNA</b>	Cell-free mitochondrial DNA	Εξωκυττάριο μιτοχονδριακό DNA
<b>CNVs</b>	Copy Number Variations	Αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων
<b>COBRA</b>	Combined Bisulfite Restriction Analysis	Συνδυασμένη ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα μετά από τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο
<b>CSCs</b>	Cancer Stem Cells	Καρκινικά βλαστοκύτταρα
<b>CTCs</b>	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
<b>ctDNA</b>	Circulating tumor DNA	Εξωκυττάριο καρκινικό DNA
<b>DAPI</b>	4',6 diamidino-2-phenylindole	4'6 -διαμιδινο-2-13 φαινυλινδόλη
<b>DEP</b>	Dielectrophoresis	Διηλεκτροφόρηση
<b>DFS</b>	Disease-Free Survival	Ελεύθερο νόσου διάστημα
<b>DLA</b>	Diagnostic Leukapheresis	Διαγνωστική λευκαφαίρεση
<b>DNMTs</b>	DNA Methyltransferases	DNA μεθυλοτρανσφεράσες
<b>DTCs</b>	Disseminated Tumor Cells	Διασπειρόμενα καρκινικά κύτταρα από τον μυελό των οστών
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition	Επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση
<b>EpcAM</b>	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Επιθηλιακό μόριο κυτταρικής προσκόλλησης
<b>ESR1</b>	Estrogen Receptor 1	Υποδοχέας οιστρογόνων 1
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activating Cell Sorting	Ταξινόμηση κυττάρων με βάση την εκπομπή φθορισμού
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων
<b>FFPE</b>	Formalin-fixed Paraffin-Embedded	Ιστοί μονιμοποιημένοι σε φορμαλδεΰδη και εγκλεισμένοι σε παραφίνη
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ	Φθορίζων in situ υβριδισμός

	Hybridization	
<b>HD-CTC</b>	High-definition Circulating Tumor Cell	Τεχνολογία υψηλής ευκρίνειας για την ανίχνευση CTC
<b>HER-2</b>	Human Epidermal growth factor Receptor 2	Υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
<b>HNSCC</b>	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου
<b>HPV16</b>	Human Papilloma Virus 16	Ιός ανθρώπινων θηλωμάτων 16
<b>ISET</b>	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells	Απομόνωση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων βάσει μεγέθους
<b>LOH</b>	Loss Of Heterozygosity	Απώλεια ετεροζυγωτίας
<b>MBD</b>	Methyl-cytosine Binding Domain	Τομέας πρόσδεσης της μεθυλοκυτοσίνης
<b>MeCP</b>	Methyl CpG binding Protein 2	Πρωτεΐνη πρόσδεσης μεθυλωμένων δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης
<b>miRNAs</b>	Micro-RNAs	Μικρομοριακά RNA
<b>MLL3</b>	Mixed-Lineage Leukemia 3	Γονίδιο μικτής λευχαιμικής σειράς 3
<b>MPS</b>	Massive Parallel Sequencing	Μαζική παράλληλη αλληλούχιση
<b>MRD</b>	Minimal Residual Disease	Ελάχιστη υπολειμματική νόσος
<b>MSI</b>	Microsatellite Instability	Μικροδορυφορική αστάθεια
<b>MSP</b>	Methylation-specific PCR	Ειδική για ανίχνευση μεθύλιωσης PCR
<b>mtDNA</b>	Mitochondrial DNA	Μιτοχονδριακό DNA
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing	Αλληλούχιση επόμενης γενιάς
<b>NSCLC</b>	Non-Small Cell Lung Cancer	Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
<b>OS</b>	Overall Survival	Ολική επιβίωση
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
<b>PBSCs</b>	Peripheral Blood Stem Cells	Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
<b>PFS</b>	Progression-Free Survival	Ελεύθερο υποτροπής διάστημα
<b>PSA</b>	Prostate-specific Antigen	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
<b>RASSF1A</b>	Ras association domain Family member 1A	Γονίδιο της οικογένειας <i>Ras</i>
<b>RBCs</b>	Red Blood Cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια
<b>RT-qPCR</b>	Real-Time quantitative PCR	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου
<b>SAM</b>	S-Adenosyl- Methionine	S-αδενόσυλο-μεθειονίνη
<b>SB</b>	Sodium Bisulfite	Όξινοθειώδες νάτριο
<b>SCC</b>	Small Cell Lung Cancer	Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
<b>SMRT-BS</b>	Single-Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing	Μοριακή αλληλούχιση διθειώδους πραγματικού χρόνου
<b>SOX17</b>	SRY-Box 17	Γονίδιο σχετικό με τον καθορισμό του φύλου
<b>WBCs</b>	White Blood Cells	Λευκά αιμοσφαίρια
<b>WGA</b>	Whole Genome Amplification	Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Lianidou E, Hoon D. Circulating Tumor Cells and circulating Tumor DNA. In: Rifai N, Horvath A-R, Wittwer C, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. Elsevier B.V.; 2017. p. 1111–44.
2. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2016 Mar 10;35(10):1216–24.
3. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146–9.
4. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):793–802.
5. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2015 Jan;7(1):1–11.
6. Lianidou ES, Mavroudis D, Georgoulas V. Clinical challenges in the molecular characterization of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer*. 2013 Jun 25;108(12):2426–32.
7. Lianidou ES, Markou A, Strati A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Dec 13;31(3–4):663–71.
8. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med*. 2017 Feb;95(2):133–42.
9. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan 1;59(1):110–8.
10. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):8–11.
11. Conteduca V, Zamarchi R, Rossi E, Condelli V, Troiani L, Aieta M. Circulating tumor cells: utopia or reality? *Futur Oncol*. 2013 Sep;9(9):1337–52.
12. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol*. 2012 Sep;48(9):775–9.
13. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May 1;8(5):329–40.
14. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*. 2018 Apr 18;556(7702):463–8.
15. Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jun 1;6(6):339–51.
16. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3404–12.
17. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2003 Jun;14(6):849–55.
18. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, 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. *Int J Cancer*. 2006 Oct 1;119(7):1654–9.
19. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, 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. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3756–62.
  20. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781–91.
  21. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2009 Aug;35(5):463–74.
  22. Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prové A, et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Jan 19;102(2):276–84.
  23. Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, Parisi C, Lianidou ES. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013 Mar 7;15(2):R20.
  24. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*. 2012 Jul 2;10(1):138.
  25. Duffy MJ, Sturgeon CM, Sölétormos G, Barak V, Molina R, Hayes DF, et al. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clin Chem*. 2015 Jun 1;61(6):809–20.
  26. Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Cancer. Circulating tumor cells. *Science*. 2013 Sep 13;341(6151):1186–8.
  27. Tibbe AGJ, Miller MC, Terstappen LWMM. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A*. 2007 Mar;71(3):154–62.
  28. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. Chin W-C, editor. *PLoS One*. 2012 May 7;7(5):e33788.
  29. Beije N, Jager A, Sleijfer S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev*. 2015 Feb;41(2):144–50.
  30. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):920–8.
  31. Miller MC, Doyle G V, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
  32. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897–904.
  33. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Jan 7;101(1):61–6.
  34. Coumans FA, Ligthart ST, Terstappen LW. Interpretation of changes in circulating tumor cell counts. *Transl Oncol*. 2012 Dec;5(6):486–91.
  35. Ligthart ST, Coumans FAW, Bidard F-C, Simkens LHJ, Punt CJA, de Groot MR, et al. Circulating Tumor

- Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. Katoh M, editor. PLoS One. 2013 Jun 27;8(6):e67148.
36. Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014 Jun 19;51(3):160–71.
  37. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2015 Jan 1;7(1):1–11.
  38. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2014 May 15;106(5).
  39. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014 Apr;15(4):406–14.
  40. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2012 Jul;13(7):688–95.
  41. Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008 Aug 7;10(4):R69.
  42. Pamme N. On-chip bioanalysis with magnetic particles. *Curr Opin Chem Biol*. 2012 Aug;16(3–4):436–43.
  43. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec 1;13(4):1033–67.
  44. Satelli A, Brownlee Z, Mitra A, Meng QH, Li S. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem*. 2015 Jan 1;61(1):259–66.
  45. Talasz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG, Roh K-H, Yu W, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):3970–5.
  46. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittel A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*. 2011 May 19;9(1):70.
  47. Zborowski M, Chalmers JJ. Rare cell separation and analysis by magnetic sorting. *Anal Chem*. 2011 Nov 1;83(21):8050–6.
  48. Naume B, Borgen E, Tøssvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy*. 2004 Jun;6(3):244–52.
  49. Lang JE, Scott JH, Wolf DM, Novak P, Punj V, Magbanua MJM, et al. Expression profiling of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jan 29;149(1):121–31.
  50. Lu Y, Liang H, Yu T, Xie J, Chen S, Dong H, et al. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry. *Cancer*. 2015 Sep 1;121(17):3036–45.
  51. Neves RPL, Raba K, Schmidt O, Honisch E, Meier-Stiegen F, Behrens B, et al. Genomic high-resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem*. 2014 Oct 1;60(10):1290–7.
  52. Lalmahomed ZS, Kraan J, Gratama JW, Mostert B, Sleijfer S, Verhoef C. Circulating tumor cells and sample size: the more, the better. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 10;28(17):e288–9; author reply e290.

53. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 Nov;68(1):25–30.
54. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry.* 2002 Dec 1;49(4):150–8.
55. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):57–63.
56. Vona G, Bérout C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, et al. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):51–8.
57. Faugeroux V, Pailler E, Auger N, Taylor M, Farace F. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2014 Nov 5;4:281.
58. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 Jul;26(7):1408–15.
59. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 2011 Feb;31(2):427–41.
60. Freidin MB, Tay A, Freydina D V, Chudasama D, Nicholson AG, Rice A, et al. An assessment of diagnostic performance of a filter-based antibody-independent peripheral blood circulating tumour cell capture paired with cytomorphic criteria for the diagnosis of cancer. *Lung Cancer.* 2014 Aug;85(2):182–5.
61. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 4;111(9):3514–9.
62. Pratt ED, Huang C, Hawkins BG, Gleghorn JP, Kirby BJ. Rare Cell Capture in Microfluidic Devices. *Chem Eng Sci.* 2011 Apr 1;66(7):1508–22.
63. Peeters DJE, De Laere B, Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Rothé F, Ignatiadis M, et al. Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer.* 2013 Apr 2;108(6):1358–67.
64. Abonnenc M, Manaresi N, Borgatti M, Medoro G, Fabbri E, Romani A, et al. Programmable interactions of functionalized single bioparticles in a dielectrophoresis-based microarray chip. *Anal Chem.* 2013 Sep 3;85(17):8219–24.
65. Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, De Luca F, Turner N, Malorni L, et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* 2015 Apr;9(4):749–57.
66. Fernandez S V, Bingham C, Fittipaldi P, Austin L, Palazzo J, Palmer G, et al. TP53 mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2014 Oct 9;16(5):445.
67. Sun Y, Haglund TA, Rogers AJ, Ghanim AF, Sethu P. Review: Microfluidics technologies for blood-based cancer liquid biopsies. *Anal Chim Acta.* 2018 Jul 5;1012:10–29.



68. Bhagat AAS, Bow H, Hou HW, Tan SJ, Han J, Lim CT. Microfluidics for cell separation. *Med Biol Eng Comput.* 2010 Oct 23;48(10):999–1014.
69. Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1235–9.
70. Stott SL, Hsu C-H, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18392–7.
71. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med.* 2013 Apr 3;5(179):179ra47.
72. Murlidhar V, Zeinali M, Grabauskiene S, Ghannad-Rezaie M, Wicha MS, Simeone DM, et al. A radial flow microfluidic device for ultra-high-throughput affinity-based isolation of circulating tumor cells. *Small.* 2014 Dec 10;10(23):4895–904.
73. Kim TH, Yoon HJ, Stella P, Nagrath S. Cascaded spiral microfluidic device for deterministic and high purity continuous separation of circulating tumor cells. *Biomicrofluidics.* 2014 Nov;8(6):64117.
74. Yoon HJ, Kim TH, Zhang Z, Azizi E, Pham TM, Paoletti C, et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nat Nanotechnol.* 2013 Oct 29;8(10):735–41.
75. Khoo BL, Warkiani ME, Tan DS-W, Bhagat AAS, Irwin D, Lau DP, et al. Clinical validation of an ultra high-throughput spiral microfluidics for the detection and enrichment of viable circulating tumor cells. Wanjin H, editor. *PLoS One.* 2014 Jul 7;9(7):e99409.
76. Galletti G, Sung MS, Vahdat LT, Shah MA, Santana SM, Altavilla G, et al. Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device. *Lab Chip.* 2014;14(1):147–56.
77. Gorges TM, Kuske A, Röck K, Mauermann O, Müller V, Peine S, et al. Accession of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells. *Clin Chem.* 2016 Nov;62(11):1504–15.
78. Chudziak J, Burt DJ, Mohan S, Rothwell DG, Mesquita B, Antonello J, et al. Clinical evaluation of a novel microfluidic device for epitope-independent enrichment of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Analyst.* 2016;141(2):669–78.
79. Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsvangwa K, Berney D, et al. Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. *PLoS One.* 2015;10(9).
80. Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M, Quidde J, Stein A, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J cancer.* 2016 Jun 15;138(12):2894–904.
81. Sollier E, Go DE, Che J, Gossett DR, O’Byrne S, Weaver WM, et al. Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab Chip.* 2014;14(1):63–77.
82. Che J, Yu V, Garon EB, Goldman JW, Di Carlo D. Biophysical isolation and identification of circulating tumor cells. *Lab Chip.* 2017;17(8):1452–61.
83. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8;110(41):16580–5.
84. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, et al. A novel method for

- the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012 Oct 16;41(4):1241–50.
85. Balic M, Rapp N, Stanzer S, Lin H, Strutz J, Szkandera J, et al. Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2011 Jan;19(1):33–40.
86. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1208–15.
87. Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgen MS, Malchiodi M, Baehring F, et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol*. 2012 Feb 1;9(1):16003.
88. Bethel K, Luttgen MS, Damani S, Kolatkar A, Lamy R, Sabouri-Ghomi M, et al. Fluid phase biopsy for detection and characterization of circulating endothelial cells in myocardial infarction. *Phys Biol*. 2014 Feb 9;11(1):16002.
89. Alix-Panabières C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:69–76.
90. Soler A, Cayrefourcq L, Mazel M, Alix-Panabières C. EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2017. p. 263–76.
91. Lianidou ES, Markou A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep 1;57(9):1242–55.
92. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Sep 1;8(9):a019505.
93. Pixberg C, Schulz W, Stoecklein N, Neves R. Characterization of DNA Methylation in Circulating Tumor Cells. *Genes (Basel)*. 2015 Oct 21;6(4):1053–75.
94. Easwaran H, Tsai H-C, Baylin SB. Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance. *Mol Cell*. 2014 Jun 5;54(5):716–27.
95. Toh TB, Lim JJ, Chow EK-H. Epigenetics in cancer stem cells. *Mol Cancer*. 2017 Dec 1;16(1):29.
96. Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, et al. DNA Methylation of Tumor Suppressor and Metastasis Suppressor Genes in Circulating Tumor Cells. *Clin Chem*. 2011 Aug 1;57(8):1169–77.
97. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan 1;59(1):270–9.
98. Chimonidou M, Kallergi G, Georgoulas V, Welch DR, Lianidou ES. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in primary breast tumors and corresponding circulating tumor cells. *Mol Cancer Res*. 2013 Oct;11(10):1248–57.
99. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Kouneli S, Georgoulas V, Lianidou E. Direct comparison study of DNA methylation markers in EpCAM-positive circulating tumour cells, corresponding circulating tumour DNA, and paired primary tumours in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 22;8(42):72054–68.
100. Parisi C, Mastoraki S, Markou A, Strati A, Chimonidou M, Georgoulas V, et al. Development and validation of a multiplex methylation specific PCR-coupled liquid bead array for liquid biopsy analysis. *Clin Chim Acta*. 2016 Oct 1;461:156–64.

101. Pixberg CF, Raba K, Müller F, Behrens B, Honisch E, Niederacher D, et al. Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells. *Oncogene*. 2017 Jun 9;36(23):3223–31.
102. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. Vol. 142, C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil. 1948. p. 241–3.
103. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24-224ra24.
104. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6;8(346):346ra92.
105. Ulz P, Heitzer E, Geigl JB, Speicher MR. Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA. *Int J Cancer*. 2017 Sep 1;141(5):887–96.
106. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018 Jan 1;16:190–5.
107. Marzese DM, Hirose H, Hoon DSB. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Nov 9;13(8):827–44.
108. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem*. 2015 Jan 1;61(1):112–23.
109. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem*. 2003 May;49(5):719–26.
110. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016 Sep;35(3):347–76.
111. Perakis S, Auer M, Belic J, Heitzer E. Advances in Circulating Tumor DNA Analysis. In: *Advances in clinical chemistry*. 2017. p. 73–153.
112. Gorgannezhad L, Umer M, Islam MN, Nguyen N-T, Shiddiky MJA. Circulating tumor DNA and liquid biopsy: opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies. *Lab Chip*. 2018;18(8):1174–96.
113. Ulz P, Thallinger GG, Auer M, Graf R, Kashofer K, Jahn SW, et al. Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA. *Nat Genet*. 2016 Oct 29;48(10):1273–8.
114. Webb S. The cancer bloodhounds. *Nat Biotechnol*. 2016 Nov 1;34(11):1090–4.
115. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Mar;13(3):239–46.
116. Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014 Oct;15(11):1236–44.
117. Morgensztern D, Politi K, Herbst RS. *EGFR* Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2015 May 1;1(2):146.
118. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):958–67.

119. Karachaliou N, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann Transl Med.* 2015 Mar;3(3):36.
120. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013 Apr 7;497(7447):108–12.
121. Li W, Li Q, Kang S, Same M, Zhou Y, Sun C, et al. CancerDetector: ultrasensitive and non-invasive cancer detection at the resolution of individual reads using cell-free DNA methylation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jun 12;
122. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):903–10.
123. Cree IA, Uttley L, Buckley Woods H, Kikuchi H, Reiman A, Harnan S, et al. The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: a systematic mapping review. *BMC Cancer.* 2017 Dec 23;17(1):697.
124. Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics.* 2010 Aug;2(4):575–85.
125. Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016 May 1;6(5):479–91.
126. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1148–59.
127. Qiu J. Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):143–5.
128. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:3–25.
129. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011 Sep 23;11(10):726–34.
130. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2017 Oct 16;19(2):81–92.
131. Tajima S, Suetake I, Takeshita K, Nakagawa A, Kimura H. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. In: *Advances in experimental medicine and biology.* 2016. p. 63–86.
132. Chédin F. The DNMT3 Family of Mammalian De Novo DNA Methyltransferases. In: *Progress in molecular biology and translational science.* 2011. p. 255–85.
133. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013 Mar 12;14(3):204–20.
134. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics.* 2015 Apr;7(2):247–65.
135. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2014 Dec;1839(12):1362–72.
136. Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet.* 2016 Oct 1;17(10):630–41.
137. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. In: *Advances in genetics.* 2010. p. 27–56.
138. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983 Jan 6;301(5895):89–92.
139. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* 2016 Jun 15;76(12):3446–50.
140. Tubio JMC, Li Y, Ju YS, Martincorena I, Cooke SL, Tojo M, et al. Extensive transduction of nonrepetitive

- DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science* (80- ). 2014 Aug 1;345(6196):1251343–1251343.
141. Zhou S, Treloar AE, Lupien M. Emergence of the Noncoding Cancer Genome: A Target of Genetic and Epigenetic Alterations. *Cancer Discov.* 2016 Nov 1;6(11):1215–29.
  142. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):597–610.
  143. Pfeifer G. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 12;19(4):1166.
  144. Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.* 2017 Jun 28;396:130–7.
  145. Zhang C, Deng Z, Pan X, Uehara T, Suzuki M, Xie M. Effects of Methylation Status of CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck Cancer Cells. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141245.
  146. Miousse IR, Koturbash I. The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–8.
  147. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1(2):157–62.
  148. Di Ruscio A, Welner RS, Tenen DG, Amabile G. The second hit of DNA methylation. *Mol Cell Oncol.* 2016 May;3(3):e1093690.
  149. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 2007 Oct;115(10):1039–59.
  150. Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res.* 2000 Jun 1;60(11):2764–9.
  151. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.* 2011 Mar 1;17(3):330–9.
  152. SILVA TD, VIDIGAL VM, FELIPE AV, DE LIMA JM, NETO RA, SAAD SS, et al. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2013 Dec 1;6(6):1687–92.
  153. Simó-Riudalbas L, Esteller M. Cancer genomics identifies disrupted epigenetic genes. *Hum Genet.* 2014 Jun 9;133(6):713–25.
  154. Xia J, Han L, Zhao Z. Investigating the relationship of DNA methylation with mutation rate and allele frequency in the human genome. *BMC Genomics.* 2012;13 Suppl 8:S7.
  155. Feinberg AP. The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2018 Apr 5;378(14):1323–34.
  156. Marzese DM, Hoon DS. Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015 May 4;15(5):647–64.
  157. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015. p. 249–64.
  158. Roessler J, Lehmann U. Quantitative DNA Methylation Analysis by Pyrosequencing®. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015. p. 175–88.
  159. Kristensen LS, Johansen JV, Grønbaek K. Allele-Specific DNA Methylation Detection by Pyrosequencing®. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015. p. 271–89.
  160. England R, Pettersson M. Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nat Methods.* 2005 Oct;2(10).
  161. Goedecke S, Mühlisch J, Hempel G, Frühwald MC, Wunsch B. Quantitative analysis of DNA methylation in the promoter region of the methylguanine-O<sup>6</sup>-DNA-methyltransferase gene by COBRA and subsequent

- native capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2015 Dec;36(23):2939–50.
162. Varinli H, Statham A, Clark S, Molloy P, Ross J. COBRA-Seq: Sensitive and Quantitative Methylome Profiling. *Genes (Basel)*. 2015 Oct 23;6(4):1140–63.
  163. Yang Y, Scott SA. DNA Methylation Profiling Using Long-Read Single Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS). In: *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017. p. 125–34.
  164. Yang Y, Sebra R, Pullman BS, Qiao W, Peter I, Desnick RJ, et al. Quantitative and multiplexed DNA methylation analysis using long-read single-molecule real-time bisulfite sequencing (SMRT-BS). *BMC Genomics*. 2015 Dec 6;16(1):350.
  165. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods*. 2010 Jun 9;7(6):461–5.
  166. Morris TJ, Beck S. Analysis pipelines and packages for Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k) data. *Methods*. 2015 Jan 15;72:3–8.
  167. Wang T, Guan W, Lin J, Boutaoui N, Canino G, Luo J, et al. A systematic study of normalization methods for Infinium 450K methylation data using whole-genome bisulfite sequencing data. *Epigenetics*. 2015 Jul 3;10(7):662–9.
  168. Chen Y, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. 2013 Feb 27;8(2):203–9.
  169. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015 Jun;4(3):256–69.
  170. Balgkouranidou I, Liloglou T, Lianidou ES. Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomark Med*. 2013 Feb 6;7(1):49–58.
  171. Thomas M, Marcato P. Epigenetic Modifications as Biomarkers of Tumor Development, Therapy Response, and Recurrence across the Cancer Care Continuum. *Cancers (Basel)*. 2018 Apr 1;10(4):101.
  172. Koch A, Joosten SC, Feng Z, de Ruijter TC, Draht MX, Melotte V, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Apr 17;
  173. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):7–30.
  174. Khakpour G, Pooladi A, Izadi P, Noruzinia M, Tavakkoly Bazzaz J. DNA methylation as a promising landscape: A simple blood test for breast cancer prediction. *Tumor Biol*. 2015 Jul 16;36(7):4905–12.
  175. Kioulafa M, Balkouranidou I, Sotiropoulou G, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Methylation of cystatin M promoter is associated with unfavorable prognosis in operable breast cancer. *Int J Cancer*. 2009 Dec 15;125(12):2887–92.
  176. Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol*. 2009 Jun 1;20(6):1020–5.
  177. Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer. *Clin Biochem*. 2009 Jul;42(10–11):970–5.
  178. Hagrass HA, Pasha HF, Ali AM. Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) promoter methylation status in tumor and serum DNA in Egyptian breast cancer patients. *Gene*. 2014 Nov 15;552(1):81–6.
  179. Liu L, Sun L, Li C, Li X, Zhang Y, Yu Y, et al. Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancer patients. Liu F, Lee D-H, Lagoa R, Kumar S, editors. *Biomed Mater Eng*. 2015 Aug 17;26(s1):S2217–22.

180. Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, Miyake T, Iwamoto T, Kim SJ, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARβ2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb 19;132(1):165–73.
181. Shan M, Yin H, Li J, Li X, Wang D, Su Y, et al. Detection of aberrant methylation of a six-gene panel in serum DNA for diagnosis of breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):18485–94.
182. GUERRERO-PRESTON R, HADAR T, OSTROW KL, SOUDRY E, ECHENIQUE M, ILI-GANGAS C, et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep.* 2014 Aug 1;32(2):505–12.
183. Xu Y, Diao L, Chen Y, Liu Y, Wang C, Ouyang T, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2013 Jun;24(6):1498–505.
184. Lu L, Zhu G, Zhang C, Deng Q, Katsaros D, Mayne ST, et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Dec 3;136(3):875–83.
185. van Hoesel AQ, van de Velde CJH, Kuppen PJK, Putter H, de Kruijf EM, van Nes JGH, et al. Primary tumor classification according to methylation pattern is prognostic in patients with early stage ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb 11;131(3):859–69.
186. Lo Nigro C, Monteverde M, Lee S, Lattanzio L, Vivenza D, Comino A, et al. NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker. *Br J Cancer.* 2012 Jun;107(1):75–83.
187. Sheng X, Guo Y, Lu Y. Prognostic role of methylated GSTP1, p16, ESR1 and PITX2 in patients with breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2017 Jul;96(28):e7476.
188. Li S, Li R, Chen Y, Xiong L, Wang H, Rong L, et al. Aberrant PTPRO methylation in tumor tissues as a potential biomarker that predicts clinical outcomes in breast cancer patients. *BMC Genet.* 2014 Jun 11;15(1):67.
189. Jiang Y, Cui L, Chen W, Shen S, Ding L. The Prognostic Role of RASSF1A Promoter Methylation in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Published Data. Toland AE, editor. *PLoS One.* 2012 May 17;7(5):e36780.
190. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer.* 2017 Apr 1;75:284–98.
191. Thomas ML, Marcato P. Epigenetic Modifications as Biomarkers of Tumor Development, Therapy Response, and Recurrence across the Cancer Care Continuum. *Cancers (Basel).* 2018 Apr 1;10(4).
192. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. DNA methylation of circulating DNA: a marker for monitoring efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Tumor Biol.* 2012 Dec 29;33(6):1837–43.
193. Foedermayr M, Sebesta M, Rudas M, Berghoff AS, Promberger R, Preusser M, et al. BRCA-1 methylation and TP53 mutation in triple-negative breast cancer patients without pathological complete response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Apr 14;73(4):771–8.
194. Brianese RC, Nakamura KD de M, Almeida FG dos SR, Ramalho RF, Barros BD de F, Ferreira EN e, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Feb 7;167(3):803–14.
195. Klajic J, Busato F, Edvardsen H, Touleimat N, Fleischer T, Bukholm I, et al. DNA Methylation Status of

- Key Cell-Cycle Regulators Such as CDKNA2/p16 and CCNA1 Correlates with Treatment Response to Doxorubicin and 5-Fluorouracil in Locally Advanced Breast Tumors. *Clin Cancer Res.* 2014 Dec 15;20(24):6357–66.
196. Avraham A, Uhlmann R, Shperber A, Birnbaum M, Sandbank J, Sella A, et al. Serum DNA methylation for monitoring response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2012 Oct 1;131(7):E1166–72.
  197. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan 1;68(1):7–30.
  198. Hou S, Zhou S, Qin Z, Yang L, Han X, Yao S, et al. Evidence, Mechanism, and Clinical Relevance of the Transdifferentiation from Lung Adenocarcinoma to Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol.* 2017 May 1;187(5):954–62.
  199. Chen F, Zhang Y, Parra E, Rodriguez J, Behrens C, Akbani R, et al. Multiplatform-based molecular subtypes of non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2017;36(10):1384–93.
  200. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. *Transl Res.* 2015 Jan;165(1):74–90.
  201. Mastoraki S, Lianidou E. DNA and Histone Methylation in Lung Cancer. In: Kaneda A, Tsukada Y, editors. *DNA and Histone Methylation as Cancer Targets.* Humana Press, Cham; 2017. p. 403–36.
  202. Lissa D, Robles AI. Methylation analyses in liquid biopsy. *Transl lung cancer Res.* 2016 Oct;5(5):492–504.
  203. Diaz-Lagares A, Mendez-Gonzalez J, Hervas D, Saigi M, Pajares MJ, Garcia D, et al. A Novel Epigenetic Signature for Early Diagnosis in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Jul 1;22(13):3361–71.
  204. Dietrich D, Kneip C, Raji O, Liloglou T, Seegebarth A, Schlegel T, et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int J Oncol.* 2011 Nov 16;40(3):825–32.
  205. Lee SM, Park JY, Kim DS. Methylation of TMEFF2 gene in tissue and serum DNA from patients with non-small cell lung cancer. *Mol Cells.* 2012 Aug 18;34(2):171–6.
  206. Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdyntseva N V, Skvortsova TE, Dobrodeev AY, Zav'yalov AA, et al. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2013 Sep;81(3):397–403.
  207. Powrózek T, Krawczyk P, Kucharczyk T, Milanowski J. Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Med Oncol.* 2014 Apr 16;31(4):917.
  208. Pu W, Geng X, Chen S, Tan L, Tan Y, Wang A, et al. Aberrant methylation of CDH13 can be a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma. *J Cancer.* 2016;7(15):2280–9.
  209. Han Y, Shi K, Zhou S-J, Yu D-P, Liu Z-D. The clinicopathological significance of hMLH1 hypermethylation in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and literature review. *Onco Targets Ther.* 2016 Aug;9:5081–90.
  210. Konecny M, Markus J, Waczulikova I, Dolesova L, Kozlova R, Repiska V, et al. The value of SHOX2 methylation test in peripheral blood samples used for the differential diagnosis of lung cancer and other lung disorders. *Neoplasma.* 2016 Jan 16;63(2):246–53.
  211. Powrózek T, Krawczyk P, Nicos M, Kuźnar-Kamińska B, Batura-Gabryel H, Milanowski J. Methylation of the DCLK1 promoter region in circulating free DNA and its prognostic value in lung cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2016 Apr 27;18(4):398–404.
  212. Qin H, Zhu J, Zeng Y, Du W, Shen D, Lei Z, et al. Aberrant promoter methylation of *hOGG1* may be associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *Oncotarget.*



- 2017 Jan 31;8(5):8330–41.
213. Zhang C, Yu W, Wang L, Zhao M, Guo Q, Lv S, et al. DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer Diagnosis. *J Cancer*. 2017;8(17):3585–91.
  214. Balgkouranidou I, Chimonidou M, Milaki G, Tsarouxa EG, Kakolyris S, Welch DR, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2014 Apr 15;110(8):2054–62.
  215. Zhang X, Yang X, Wang J, Liang T, Gu Y, Yang D. Down-regulation of PAX6 by promoter methylation is associated with poor prognosis in non small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11452–7.
  216. Liu W, Han F, Jiang X, Chen H, Zhao H, Liu Y, et al. TMEM196 acts as a novel functional tumour suppressor inactivated by DNA methylation and is a potential prognostic biomarker in lung cancer. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):21225–39.
  217. Yan W, Xu N, Han X, Zhou X-M, He B. The clinicopathological significance of FHIT hypermethylation in non-small cell lung cancer, a meta-analysis and literature review. *Sci Rep*. 2016 Jan 22;6(1):19303.
  218. Villalba M, Diaz-Lagares A, Redrado M, de Aberasturi AL, Segura V, Bodegas ME, et al. Epigenetic alterations leading to TMRSS4 promoter hypomethylation and protein overexpression predict poor prognosis in squamous lung cancer patients. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):22752–69.
  219. Balgkouranidou I, Chimonidou M, Milaki G, Tsaroucha E, Kakolyris S, Georgoulas V, et al. SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Aug 1;54(8):1385–93.
  220. Schlenzog M, Magnus L, Heide T, Eschenbruch J, Steib F, Tator M, et al. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Epigenetics*. 2018 Mar 4;13(3):214–27.
  221. Wang H, Zhang B, Chen D, Xia W, Zhang J, Wang F, et al. Real-time monitoring efficiency and toxicity of chemotherapy in patients with advanced lung cancer. *Clin Epigenetics*. 2015 Dec 5;7(1):119.
  222. Schmidt B, Beyer J, Dietrich D, Bork I, Liebenberg V, Fleischhacker M. Quantification of cell-free mSHOX2 Plasma DNA for therapy monitoring in advanced stage non-small cell (NSCLC) and small-cell lung cancer (SCLC) patients. Chellappan SP, editor. *PLoS One*. 2015 Feb 12;10(2):e0118195.
  223. Hiddinga BI, Pauwels P, Janssens A, van Meerbeeck JP. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): A drugable target in lung cancer? *Lung Cancer*. 2017 May;107:91–9.
  224. Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 12;18(7):1506.
  225. Demokan S, Chuang A, Suoğlu Y, Uluşan M, Yalınz Z, Califano JA, et al. Promoter methylation and loss of *p16<sup>INK4a</sup>* gene expression in head and neck cancer. *Head Neck*. 2012 Oct;34(10):1470–5.
  226. Pierini S, Jordanov SH, Mitkova A V., Chalakov IJ, Melnicharov MB, Kunev K V., et al. Promoter hypermethylation of *CDKN2A*, *MGMT*, *MLH1*, and *DAPK* genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck*. 2014 Aug;36(8):1103–8.
  227. Shi H, Chen X, Lu C, Gu C, Jiang H, Meng R, et al. Association between P16INK4a Promoter Methylation and HNSCC: A Meta-Analysis of 21 Published Studies. Ramqvist T, editor. *PLoS One*. 2015 Apr 2;10(4):e0122302.
  228. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol*. 2012 Nov;8(11):1407–25.
  229. Worsham MJ, Stephen JK, Chen KM, Havard S, Shah V, Gardner G, et al. Delineating an epigenetic

- continuum in head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2014 Jan 28;342(2):178–84.
230. Mascolo M, Siano M, Iardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Feb 21;13(2):2331–53.
231. Langevin SM, Butler RA, Eliot M, Pawlita M, Maccani JZJ, McClean MD, et al. Novel DNA methylation targets in oral rinse samples predict survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2014 Nov;50(11):1072–80.
232. Zhang Z, Sun D, Hutajulu SH, Nawaz I, Nguyen Van D, Huang G, et al. Development of a Non-Invasive Method, Multiplex Methylation Specific PCR (MMSP), for Early Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. Busson P, editor. *PLoS One.* 2012 Nov 5;7(11):e45908.
233. Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, et al. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse. *Cancer.* 2012 Sep 1;118(17):4298–308.
234. Ovchinnikov DA, Cooper MA, Pandit P, Coman WB, Cooper-White JJ, Keith P, et al. Tumor-suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Transl Oncol.* 2012 Oct;5(5):321–6.
235. Schussel J, Zhou XC, Zhang Z, Pattani K, Bermudez F, Jean-Charles G, et al. EDNRB and DCC Salivary Rinse Hypermethylation Has a Similar Performance as Expert Clinical Examination in Discrimination of Oral Cancer/Dysplasia versus Benign Lesions. *Clin Cancer Res.* 2013 Jun 15;19(12):3268–75.
236. You Y, Yang W, Wang Z, Zhu H, Li H, Lin C, et al. *P. Cell Oncol.* 2013 Jul 6;36(4):323–31.
237. Rettori MM, de Carvalho AC, Longo ALB, de Oliveira CZ, Kowalski LP, Carvalho AL, et al. TIMP3 and CCNA1 hypermethylation in HNSCC is associated with an increased incidence of second primary tumors. *J Transl Med.* 2013 Dec 20;11:316.
238. Tian F, Yip SP, Kwong DLW, Lin Z, Yang Z, Wu VWC. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum as potential biomarker for the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol.* 2013 Oct;37(5):708–13.
239. Bhatia V, Goel MM, Makker A, Tewari S, Yadu A, Shilpi P, et al. Promoter Region Hypermethylation and mRNA Expression of *MGMT* and *p16* Genes in Tissue and Blood Samples of Human Premalignant Oral Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–10.
240. Kis A, Tatár TZ, Gáll T, Boda R, Tar I, Major T, et al. Frequency of Genetic and Epigenetic Alterations of p14ARF and p16INK4A in Head and Neck Cancer in a Hungarian Population. *Pathol Oncol Res.* 2014 Oct 9;20(4):923–9.
241. Arantes LMRB, de Carvalho AC, Melendez ME, Centrone CC, Góis-Filho JF, Toporcov TN, et al. Validation of methylation markers for diagnosis of oral cavity cancer. *Eur J Cancer.* 2015 Mar;51(5):632–41.
242. Nawaz I, Moumad K, Martorelli D, Ennaji MM, Zhou X, Zhang Z, et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma in Morocco (North Africa) using a multiplex methylation-specific PCR biomarker assay. *Clin Epigenetics.* 2015 Dec 22;7(1):89.
243. Ferlazzo N, Currò M, Zinellu A, Caccamo D, Isola G, Ventura V, et al. Influence of MTHFR Genetic Background on p16 and MGMT Methylation in Oral Squamous Cell Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 29;18(4):724.
244. Dong Y, Wang J, Dong F, Wang X, Zhang Y. The correlations between alteration of p16 gene and clinicopathological factors and prognosis in squamous cell carcinomas of the buccal mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2012 Jul;41(6):463–9.

245. Lin H-Y, Huang T-T, Lee M-S, Hung S-K, Lin R-I, Tseng C-E, et al. Unexpected close surgical margin in resected buccal cancer: Very close margin and DAPK promoter hypermethylation predict poor clinical outcomes. *Oral Oncol.* 2013 Apr;49(4):336–44.
246. Yang C-M, Wang T-H, Chen H-C, Li S-C, Lee M-C, Liou H-H, et al. Aberrant DNA hypermethylation-silenced SOX21-AS1 gene expression and its clinical importance in oral cancer. *Clin Epigenetics.* 2016 Dec 26;8(1):129.
247. Ribeiro IP, Caramelo F, Marques F, Domingues A, Mesquita M, Barroso L, et al. WT1, MSH6, GATA5 and PAX5 as epigenetic oral squamous cell carcinoma biomarkers - a short report. *Cell Oncol.* 2016 Dec 4;39(6):573–82.
248. Shen Z, Cao B, Lin L, Zhou C, Ye D, Qiu S, et al. The Clinical Signification of Claudin-11 Promoter Hypermethylation for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit.* 2017 Jul 26;23:3635–40.
249. Shen Z, Zhou C, Li J, Ye D, Deng H, Cao B, et al. *SHISA3* Promoter Methylation Is a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–8.
250. Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009 Dec 9;11(6):213.
251. Lasken RS. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method: Figure 1. *Biochem Soc Trans.* 2009 Apr 1;37(2):450–3.
252. Giannopoulou L, Chebouti I, Pavlakis K, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. RASSF1A promoter methylation in high-grade serous ovarian cancer: A direct comparison study in primary tumors, adjacent morphologically tumor cell-free tissues and paired circulating tumor DNA. *Oncotarget.* 2017 Mar 28;8(13):21429–43.
253. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016 Mar;10(3):464–74.
254. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013 Sep 23;424:222–30.
255. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2016 Dec;49(18):1354–60.
256. van Dessel LF, Beije N, Helmijr JCA, Vitale SR, Kraan J, Look MP, et al. Application of circulating tumor DNA in prospective clinical oncology trials - standardization of preanalytical conditions. *Mol Oncol.* 2017 Mar;11(3):295–304.
257. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, et al. The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res.* 2017 May 15;23(10):2471–7.
258. Mauger F, Dulary C, Daviaud C, Deleuze J-F, Tost J. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Sep 28;407(22):6873–8.
259. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Oct 24;406(26):6499–512.
260. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *J Mol Diagnostics.* 2017 Jan;19(1):162–8.
261. Pallisgaard N, Spindler K-LG, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Controls to validate plasma samples for cell free DNA quantification. *Clin Chim Acta.* 2015 Jun 15;446:141–6.

262. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. Zuo Z, editor. PLoS One. 2014 Apr 3;9(4):e93933.
263. Worm Ørntoft M-B, Jensen SØ, Hansen TB, Bramsen JB, Andersen CL. Comparative analysis of 12 different kits for bisulfite conversion of circulating cell-free DNA. Epigenetics. 2017 Aug 3;12(8):626–36.
264. Izzi B, Binder AM, Michels KB. Pyrosequencing Evaluation of Widely Available Bisulfite Conversion Methods: Considerations for Application. Med epigenetics. 2014 Jan 1;2(1):28–36.
265. Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, Betsou F, Lescuyer P. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. Biopreserv Biobank. 2016 Feb;14(1):29–38.
266. Schröder C, Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. Dante R, editor. PLoS One. 2018 Feb 7;13(2):e0192414.
267. Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. Clin Epigenetics. 2012 Nov 22;4(1):22.
268. Jankowitz RC, Oesterreich S, Lee A V, Davidson NE. New Strategies in Metastatic Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: Searching for Biomarkers to Tailor Endocrine and Other Targeted Therapies. Clin Cancer Res. 2017 Mar 1;23(5):1126–31.
269. Stone A, Zotenko E, Locke WJ, Korbie D, Millar EKA, Pidsley R, et al. DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. Nat Commun. 2015 Jul 14;6(1):7758.
270. Tsuboi K, Nagatomo T, Gohno T, Higuchi T, Sasaki S, Fujiki N, et al. Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlates with hormone therapy resistance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2017 Jul;171:209–17.
271. Marzese DM, Scolyer RA, Roqué M, Vargas-Roig LM, Huynh JL, Wilmott JS, et al. DNA methylation and gene deletion analysis of brain metastases in melanoma patients identifies mutually exclusive molecular alterations. Neuro Oncol. 2014 Nov 1;16(11):1499–509.
272. Sahnane N, Magnoli F, Bernasconi B, Tibiletti MG, Romualdi C, Pedroni M, et al. Aberrant DNA methylation profiles of inherited and sporadic colorectal cancer. Clin Epigenetics. 2015 Dec 21;7(1):131.
273. Dai B, Geng L, Yu Y, Sui C, Xie F, Shen W, et al. Methylation patterns of estrogen receptor  $\alpha$  promoter correlate with estrogen receptor  $\alpha$  expression and clinicopathological factors in hepatocellular carcinoma. Exp Biol Med (Maywood). 2014 Jul 17;239(7):883–90.
274. Kuo L-T, Lu H-Y, Lee C-C, Tsai J-C, Lai H-S, Tseng H-M, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in oligodendroglial tumors. Cancer Med. 2016 Aug;5(8):1830–9.
275. Magnani G, Furlan D, Sahnane N, Reggiani Bonetti L, Domati F, Pedroni M. Molecular Features and Methylation Status in Early Onset ( $\leq 40$  Years) Colorectal Cancer: A Population Based, Case-Control Study. Gastroenterol Res Pract. 2015;2015:132190.
276. Dou C-Y, Fan Y-C, Cao C-J, Yang Y, Wang K. Sera DNA Methylation of CDH1, DNMT3b and ESR1 Promoters as Biomarker for the Early Diagnosis of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. Dig Dis Sci. 2016 Apr 10;61(4):1130–8.
277. Kirn V, Shi R, Heublein S, Knabl J, Guenther-Biller M, Andergassen U, et al. Estrogen receptor promoter methylation predicts survival in low-grade ovarian carcinoma patients. J Cancer Res Clin Oncol. 2014 Oct 8;140(10):1681–7.
278. Sood S, Patel FD, Ghosh S, Arora A, Dhaliwal LK, Srinivasan R. Epigenetic Alteration by DNA Methylation of ESR1, MYOD1 and hTERT Gene Promoters is Useful for Prediction of Response in Patients

- of Locally Advanced Invasive Cervical Carcinoma Treated by Chemoradiation. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2015 Dec;27(12):720–7.
279. Martínez-Galán J, Torres-Torres B, Núñez MI, López-Peñalver J, Del Moral R, Ruiz De Almodóvar JM, et al. ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2014 Feb 4;14(1):59.
280. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, Voutsina A, et al. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res*. 2018 Mar 15;24(6):1500–10.
281. Vorkas PA, Poumpouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V, Lianidou ES. PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn*. 2010 Sep;12(5):697–704.
282. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr 24;17(4):223–38.
283. Selli C, Dixon JM, Sims AH. Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers. *Breast Cancer Res*. 2016 Dec 1;18(1):118.
284. Ung M, Ma X, Johnson KC, Christensen BC, Cheng C. Effect of estrogen receptor  $\alpha$  binding on functional DNA methylation in breast cancer. *Epigenetics*. 2014 Apr 17;9(4):523–32.
285. Chimonidou M, Tzitzira A, Strati A, Sotiropoulou G, Sfikas C, Malamos N, et al. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin Biochem*. 2013 Feb;46(3):235–40.
286. Paoletti C, Larios JM, Muñoz MC, Aung K, Cannell EM, Darga EP, et al. Heterogeneous estrogen receptor expression in circulating tumor cells suggests diverse mechanisms of fulvestrant resistance. *Mol Oncol*. 2016 Aug;10(7):1078–85.
287. Mamdani H, Ahmed S, Armstrong S, Mok T, Jalal SI. Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment. *Transl Lung Cancer Res*. 2017 Dec;6(6):648–60.
288. Heigener D, Reck M. Exploring the potential of immuno-oncology-based treatment for patients with non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015 Jan 2;15(1):69–83.
289. Chae YK, Arya A, Iams W, Cruz MR, Chandra S, Choi J, et al. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer*. 2018 Dec 16;6(1):39.
290. Ansari J, Shackelford RE, El-Osta H. Translational lung cancer research. Vol. 5, *Translational Lung Cancer Research*. AME Publishing Company; 2016. 155-171 p.
291. Arai E, Yotani T, Kanai Y. DNA and Histone Methylation in Liver Cancer. In Humana Press, Cham; 2017. p. 437–60.
292. Rao RC, Dou Y. Hijacked in cancer: The KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):334–46.
293. Lee J-E, Wang C, Xu S, Cho Y-W, Wang L, Feng X, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *Elife*. 2013 Dec 24;2.
294. Dorighi KM, Swigut T, Henriques T, Bhanu N V., Scruggs BS, Nady N, et al. Mll3 and Mll4 Facilitate Enhancer RNA Synthesis and Transcription from Promoters Independently of H3K4 Monomethylation. *Mol Cell*. 2017 May 18;66(4):568–576.e4.
295. Wang C, Lee J-E, Lai B, Macfarlan TS, Xu S, Zhuang L, et al. Enhancer priming by H3K4 methyltransferase MLL4 controls cell fate transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct

- 18;113(42):11871–6.
296. Lai B, Lee J-E, Jang Y, Wang L, Peng W, Ge K. MLL3/MLL4 are required for CBP/p300 binding on enhancers and super-enhancer formation in brown adipogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jun 20;45(11):6388–403.
297. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell.* 2017 Feb 13;31(2):172–9.
298. Sequist L V, Rolfe L, Allen AR. Rociletinib in *EGFR* -Mutated Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Aug 6;373(6):578–9.
299. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, et al. Detection and Dynamic Changes of *EGFR* Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 15;21(14):3196–203.
300. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun 1;3(6):415–28.
301. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013 Oct 17;502(7471):333–9.
302. Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012 Oct 2;44(10):1104–10.
303. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science (80- ).* 2006 Oct 13;314(5797):268–74.
304. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, Sougnez C, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013 May 1;497(7447):67–73.
305. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet.* 2011 Aug 7;43(9):875–8.
306. Chen D, Gong L, Jiang Q, Wang X, Zhang B. Interaction between *MLL3* genetic polymorphisms, smoking, and alcohol drinking in laryngeal cancer: a case-control study. *Cancer Med.* 2016 Mar;5(3):527–33.
307. Li B, Liu HY, Guo SH, Sun P, Gong FM, Jia BQ. Association of *MLL3* expression with prognosis in gastric cancer. *Genet Mol Res.* 2014 Sep 12;13(3):7513–8.
308. Dawkins JBN, Wang J, Maniati E, Heward JA, Koniali L, Kocher HM, et al. Reduced Expression of Histone Methyltransferases *KMT2C* and *KMT2D* Correlates with Improved Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2016 Aug 15;76(16):4861–71.
309. Sato K, Akimoto K. Expression Levels of *KMT2C* and *SLC20A1* Identified by Information-theoretical Analysis Are Powerful Prognostic Biomarkers in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2017 Jun;17(3):e135–42.
310. Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Zhao Z, et al. *MLL3* Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell.* 2014 May 12;25(5):652–65.
311. Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008 May 17;371(9625):1695–709.
312. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009 Apr;45(4–5):324–34.
313. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018 Mar 2;18(5):269–82.

314. Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*. 2007 Aug;236(8):2356–66.
315. Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(12):2195–214.
316. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. *FEBS Lett*. 2014 Aug 19;588(16):2671–84.
317. Grawenda AM, O’Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br J Cancer*. 2015 Jul 28;113(3):372–81.
318. Gabriel MT, Calleja LR, Chalopin A, Ory B, Heymann D. Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clin Chem*. 2016 Apr 1;62(4):571–81.
319. Obermayr E, Maritschnegg E, Agreiter C, Pecha N, Speiser P, Helmy-Bader S, et al. Efficient leukocyte depletion by a novel microfluidic platform enables the molecular detection and characterization of circulating tumor cells. *Oncotarget*. 2018 Jan 2;9(1):812–23.
320. Maertens Y, Humberg V, Erlmeier F, Steffens S, Steinestel J, Bögemann M, et al. Comparison of isolation platforms for detection of circulating renal cell carcinoma cells. *Oncotarget*. 2017 Oct;8(50):87710–7.
321. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAMhigh and EpCAMlow/negative CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug;18(9):1885.
322. El-Heliebi A, Hille C, Laxman N, Svedlund J, Haudum C, Ercan E, et al. In Situ Detection and Quantification of AR-V7, AR-FL, PSA, and KRAS Point Mutations in Circulating Tumor Cells. *Clin Chem*. 2018 Mar;64(3):536–46.
323. Ji X, Guan C, Jiang X, Li H. Diagnostic accuracy of DNA methylation for head and neck cancer varies by sample type and number of markers tested. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):80019–32.
324. Alamoud KA, Kukuruzinska MA. Emerging Insights into Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Head and Neck Cancer. *J Dent Res*. 2018 Jun 17;97(6):665–73.
325. Kawai Y, Sakano S, Suehiro Y, Okada T, Korenaga Y, Hara T, et al. Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2010 Aug 1;21(8):1612–7.
326. Wang J, Wang B, Chen X, Bi J. The prognostic value of RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2011 Mar;32(3):411–6.
327. Misawa A, Tanaka S, Yagy S, Tsuchiya K, Iehara T, Sugimoto T, et al. RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker. *Br J Cancer*. 2009 Jan 22;100(2):399–404.
328. Maruya S, Issa J-PJ, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 1;10(11):3825–30.
329. Meng R-W, Li Y-C, Chen X, Huang Y-X, Shi H, Du D-D, et al. Aberrant Methylation of RASSF1A Closely Associated with HNSCC, a Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2016 Feb 9;6(1):20756.
330. FIGUEIREDO DLA, RABELLO DDA, ZANETTE DL, SAGGIORO FP, MAMEDE RCM, ZAGO MA, et al. Assessment of MLL methyltransferase gene expression in larynx carcinoma. *Oncol Rep*. 2015 Apr;33(4):2017–22.
331. Sasaki MM, Skol AD, Bao R, Rhodes L V., Chambers R, Vokes EE, et al. Integrated Genomic Analysis

- Suggests MLL3 Is a Novel Candidate Susceptibility Gene for Familial Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Aug 1;24(8):1222–8.
332. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018 Feb;359(6378):926–30.
333. Lianidou ES. Gene expression profiling and DNA methylation analyses of CTCs. *Mol Oncol.* 2016 Mar;10(3):431–42.



