



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υγρή Βιοψία: Ανάπτυξη και κλινική αξιολόγηση νέων μη-επεμβατικών μεθόδων μοριακής διαγνωστικής για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο

ΜΑΡΘΑ ΖΑΒΡΙΔΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Υγρή Βιοψία: Ανάπτυξη και κλινική αξιολόγηση νέων μη-επεμβατικών μεθόδων μοριακής
διαγνωστικής για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο**

ΜΑΡΘΑ ΖΑΒΡΙΔΟΥ

A.M.: 001411

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Δημήτριος Μαυρουδής, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
2. Δημήτριος Μαυρουδής, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
3. Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
4. Χρίστος Παπαδημητρίου, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
5. Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
6. Αμάντα Ψυρρή, Αναπλ. Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
7. Γεωργία Σωτηροπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η «υγρή βιοψία», βασισμένη στην ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs), του εξωκυττάρου καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), των miRNAs και των εξωσωμάτων παρέχει μια μη-επεμβατική παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, σε πραγματικό χρόνο.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αρχικά αξιολογήσαμε την επίδραση των προαναλυτικών συνθηκών για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CTCs. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα εμβολιασμού 100 MCF7 σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος, με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των CTCs με EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό σε διαστήματα 0h, 24h και 48h και ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων *B2M* και *CK-19* στα CTCs με RT-qPCR. Παράλληλα, προτείνουμε μια ολοκληρωμένη διαδικασία ελέγχου ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα υγρής βιοψίας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι αναλύσεις των CTCs σε επίπεδο mRNA επηρεάζονται από τα συντηρητικά ή/και τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος.

Στη συνέχεια, στόχο μας αποτέλεσε η επιλογή του βέλτιστου συστήματος απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs για το μοριακό χαρακτηρισμό τους στον HNSCC. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά άμεση σύγκριση του συστήματος Parsortix, που βασίζεται σε σύστημα μικροροών για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs με βάση το μέγεθός τους, με τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs με βάση το EpCAM από το ίδιο περιφερικό αίμα ασθενών με HNSCC και προχωρήσαμε στη συνέχεια σε μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν σαφώς ότι ο πληθυσμός των CTCs που απομονώθηκε με το σύστημα Parsortix είναι υψηλότερης καθαρότητας σε σχέση με τον πληθυσμό των CTCs που απομονώθηκε με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.

Επιπρόσθετα, αναπτύξαμε μεθοδολογία πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του υποδοχέα των ανδρογόνων (*AR*), *AR-full length (AR-FL)*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και του ολικού *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε κλινικά στα CTCs και στα εξωσώματα που απομονώθηκαν από το πλάσμα ασθενών με μεταστατικό ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στα CTCs όσο και στα εξωσώματα.

Στο τελευταίο μέρος της διατριβής, διερευνήθηκε το μοριακό προφίλ των CTCs και των εξωσωμάτων ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*.

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/>)

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: υγρή βιοψία, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, εξωσώματα, προαναλυτικές παράμετροι, έλεγχος ποιότητας, μοριακός χαρακτηρισμός

ABSTRACT

Liquid biopsy, based on the analysis of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA), circulating miRNAs and exosomes provides a non-invasive, real-time monitoring of tumor evolution and therapeutic efficacy.

In the present PhD thesis, we evaluated the effect of pre-analytical conditions on gene expression analysis in CTCs. For this purpose, we performed spiking experiments of 100 MCF7 cells into different peripheral blood collection tubes. Furthermore, CTCs were isolated using EpCAM-positive immunomagnetic enrichment at 0h, 24h and 48h and gene expression was quantified using RT-qPCR for *CK-19* and *B2M*. At the same time, we performed a systematic quality control for all steps involved in the procedure for gene expression analysis in liquid biopsy. Our results indicate that CTC-analysis at the mRNA level is severely impeded by the preservatives or/and anticoagulants used in most peripheral blood collection tubes.

Furthermore, our next aim was to select the optimal isolation/enrichment system for CTC downstream molecular characterization in HNSCC. For this reason, we directly compared for the first time the performance of Parsortix™ device, a label-independent size-based microfluidic device versus an EpCAM-based CTC enrichment system using identical blood draws from patients with HNSCC, and downstream molecular characterization at the gene expression level. Our data clearly indicate that the CTCs population enriched using the Parsortix™ device is of higher purity than that of CTCs isolated using EpCAM positive immunomagnetic CTC enrichment.

We additionally developed a multiplex RT-qPCR for the simultaneous quantification of *AR-full length (AR-FL)*, splice variants *AR-V7*, *AR-567* and *AR-Total* with hydrolysis probes in Cobas z480 (Roche Diagnostics). The developed assay was applied and clinically validated in CTCs and exosomes of metastatic castration resistant prostate cancer. Our results clearly indicate that the developed assay can be applied both in CTCs and exosomes.

Finally, we evaluated the molecular profile of CTCs and exosomes of patients with metastatic castration resistant prostate cancer. More specifically, we evaluated gene expression profile for *PD-L1*, *CK-19*, splice variants *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* and *AR-total*, and the methylation profile of *GSTP1* and *RASSF1A*.

This PhD thesis was funded by the European Program IMI-CANCER-ID (Contract No. 115749): “Cancer treatment and monitoring through identification of circulating tumour cells and tumour related nucleic acids in blood” (<https://www.cancer-id.eu/>)

KEY WORDS: liquid biopsy, circulating tumor cells (CTCs), exosomes, preanalytical parameters, quality control, molecular characterization

Στην αδερφή μου και
στους γονείς μου,
Στάθη και Κατερίνα

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/ΕΛΙΔΕΚ στα πλαίσια του έργου με Κ.Ε. 15107 και τίτλο “ Υγρή βιοψία ως εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση της κλινικής υποτροπής ασθενών πρώιμου σταδίου με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και για την αξιολόγηση της γενετικής ετερογένειας του όγκου”.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια Ε. Λιανίδου, τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για τη διαρκή υποστήριξη, την άριστη συνεργασία και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα ακόμη να την ευχαριστήσω για την ηθική συμπαράστασή της, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την αδιάκοπη προσπάθειά της για τη γενικότερη επιστημονική μου κατάρτιση. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια και να έρθω σε επαφή με σημαντικούς και καταξιωμένους ερευνητές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Δ. Μαυρουδή και Επίκουρο Καθηγητή Χρ. Κρούπη για τις σημαντικές παρατηρήσεις τους και την άμεση ανταπόκριση σε οτιδήποτε χρειάστηκε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Χρ. Παπαδημητρίου, τον Καθηγητή Ν. Θωμαΐδη, την Αναπλ. Καθηγήτρια Α. Ψυρρή και την Αναπλ. Καθηγήτρια Γ. Σωτηροπούλου για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπλ. Καθηγήτρια Α. Ψυρρή για τα δείγματα ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου από το Π.Γ.Ν. «Αττικόν». Επίσης, ευχαριστώ τον Ογκολόγο κο Ε. Μπουρνάκη για τα δείγματα ασθενών με μεταστατικό ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη από το «Αρεταίειον» πανεπιστημιακό νοσοκομείο. Ακόμη, ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη και την Δρ. Πηνελόπη Σαμαρά, του τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, για τις καλλιέργειες όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω το Διαγνωστικό Κέντρο ΒΙΟΤΥΠΟΣ Α.Ε. και ιδιαιτέρως τα μέλη του τμήματος αιμοληψίας Β. Καπερνάρο, Μ.Ρόντου, Δ. Δελβινιώτη, γιατί ήταν πάντα πρόθυμοι να μας βοηθήσουν με τις αιμοληψίες από υγιείς δότες για την πραγματοποίηση των πειραμάτων εμβολιασμού κυττάρων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Αρετή Στρατή για τη άψογη συνεργασία μας, τη σημαντική βοήθεια και τη στήριξή της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Δρ. Α. Μάρκου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στο ερευνητικό της πρόγραμμα ΕΛΙΔΕΚ για μεταδιδάκτορες, για τη στήριξη και για ενδιαφέρον της. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη Λ. Γιαννοπούλου, Σ.

Μαστοράκη, Κ. Παρίση, την Ε. Τζανίκου και την Α. Ντζιφά για την άψογη συνεργασία μας, την αμέριστη συμπαράσταση και όλες τις όμορφες και δύσκολες στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γείτονές μου, στο εργαστήριο, Κ.Κουκουλάκη, Γ. Κανελλόπουλο και Ε. Χρυσοχού για την ευχάριστη παρέα και γιατί ήταν πάντα πρόθυμοι να συμμετάσχουν στις αιμοληψίες για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να πω το πιο μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στην αδερφή μου για την αγάπη τους, την ψυχολογική στήριξη και την ανοχή τους. Η οικογένειά μου αποτελεί για μένα το πιο ουσιαστικό στήριγμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	25
ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ	25
1.1. Εισαγωγή.....	25
1.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs).....	27
1.3. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA).....	29
1.4. Κυκλοφορούντα miRNAs	30
1.5. EVs και εξωσώματα	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	37
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ/ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ CTCs ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ.....	37
2.1. Εισαγωγή.....	37
2.2. Τεχνικές απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs	37
2.2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού εξαρτώμενα από δείκτες	38
2.2.1.1. Θετική επιλογή.....	39
2.2.1.2. Αρνητική επιλογή.....	45
2.2.2. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει των βιοφυσικών ιδιοτήτων	45
2.2.2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει του μεγέθους ή/και της παραμορφωσιμότητας των κυττάρων	45
2.2.2.2. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας.....	47
2.2.2.3. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με διηλεκτροφόρηση.....	47
2.2.2.4. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με αδρανειακή εστίαση (inertial focusing).....	48
2.2.3. In vivo συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού	49
2.2.4. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με απεικονιστικές μεθόδους	50
2.2.4.1. Μέθοδοι απεικόνισης χωρίς εμπλουτισμό	50
2.3. Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων	54
2.3.1. Υπερφυγοκέντρηση.....	54
2.3.2. Μέθοδοι απομόνωσης βάσει μεγέθους	56
2.3.3. Μέθοδοι απομόνωσης βάσει της ανοσοσυγγένειας	57

2.3.4. Μέθοδοι απομόνωσης με κατακρήμιση	58
2.3.5. Μέθοδοι απομόνωσης με τη χρήση συστημάτων μικροροών.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	61
ΝΕΩΤΕΡΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	61
3.1. Νεώτεροι μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου	61
3.2. Νεώτεροι μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη.....	64
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	73
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
4.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (red cell lysis buffer, RCL)	73
4.1.1. Αρχή μεθόδου.....	73
4.1.2 Αντιδραστήρια/υλικά	74
4.1.3. Πειραματική πορεία	74
4.2. Εμπλουτισμός επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.....	74
4.2.1. Αρχή μεθόδου.....	74
4.2.2 Αντιδραστήρια/υλικά	75
4.2.3. Πειραματική πορεία	75
4.3. Απομόνωση CTCs με το σύστημα Parsortix (ANGLE plc, UK).....	77
4.3.1. Αρχή μεθόδου.....	77
4.3.2. Αντιδραστήρια/υλικά	78
4.3.3. Πειραματική πορεία	79
4.4. Απομόνωση ολικού RNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS.....	79
4.4.1. Αρχή μεθόδου.....	79
4.4.2. Αντιδραστήρια/υλικά	80
4.5. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS	81
4.5.1. Αρχή μεθόδου.....	81
4.5.2. Αντιδραστήρια/υλικά	81
4.5.3. Πειραματική πορεία	82

4.6. Φωτομετρικός προσδιορισμός RNA και DNA	83
4.6.1. Αρχή μεθόδου.....	83
4.6.2. Πειραματική πορεία	84
4.7. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	84
4.7.1. Αρχή μεθόδου.....	84
4.7.2. Αντιδραστήρια/υλικά	84
4.7.3. Πειραματική πορεία	85
4.8. Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα	85
4.9. Απομόνωση εξωσωμάτων από πλάσμα	86
4.9.1. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (QIAGEN [®] , Germany)	86
4.9.1.1. Αρχή μεθόδου.....	86
4.9.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά	86
4.9.1.3. Πειραματική πορεία	87
4.9.2. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου EXO-Prep (HansaBioMed LLC, Estonia).....	88
4.9.2.1. Αντιδραστήρια/υλικά	88
4.9.2.2. Πειραματική πορεία	88
4.9.3. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου plasma/serum Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit (NORGEN BIOTEK.CORP., Canada)	89
4.9.3.1. Αντιδραστήρια/υλικά	89
4.9.3.2. Πειραματική πορεία	89
4.10. Απομόνωση miRNAs από πλάσμα	90
4.10.1. Αρχή μεθόδου.....	90
4.10.2. Αντιδραστήρια/υλικά	91
4.10.3. Πειραματική πορεία	91
4.11. Ποσοτικός Προσδιορισμός miRNAs με RT-qPCR.....	92
4.11.1. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	93
4.11.1.1. Αρχή μεθόδου.....	93
4.11.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά	94
4.11.1.3. Πειραματική πορεία	94
4.11.2 Αντίδραση PCR.....	96

4.11.2.1. Αρχή μεθόδου.....	96
4.11.2.2. Αντιδραστήρια/υλικά	97
4.11.2.3. Πειραματική πορεία	97
4.11.3. Κανονικοποίηση τιμών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs	99
4.12. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο.....	101
4.12.1. Αρχή μεθόδου.....	101
4.12.2. Πειραματική πορεία	102
4.12.3. Οργανολογία	103
4.13. Γενική οργανολογία	104
4.13.1. LightCycler [®] (Roche Diagnostics, Switzerland).....	104
4.13.2. Σύστημα cobas [®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)	105
4.14. Κυτταρικές σειρές	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	107
ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ	
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ	
ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs.....	107
5.1. Μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης στα CTCs ..	107
5.1.1. Εισαγωγή.....	107
5.1.2. Πειραματική πορεία	107
5.1.2.1. Εμβολιασμός δειγμάτων περιφερικού αίματος.....	107
5.1.2.2. Απομόνωση των CTCs με EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό	108
5.1.2.3. Απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR	108
5.1.2.4. Στατιστική ανάλυση	111
5.1.3. Αποτελέσματα.....	111
5.1.3.1. Έλεγχος ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα υγρής βιοψίας ..	111
5.1.3.2. Μελέτη σταθερότητας της έκφρασης του mRNA των CTCs.....	114
5.2. Μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs.....	117
5.2.1. Εισαγωγή.....	117
5.2.2. Πειραματική πορεία	117

5.2.3. Αποτελέσματα μελέτης προαναλυτικών παραμέτρων για την ποσοτικοποίηση των miRNAs.....	119
5.3. Συμπεράσματα-συζήτηση	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	122
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CTCs ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC)	122
6.1. Εισαγωγή.....	122
6.2. Πειραματική πορεία	122
6.2.1. Κλινικά δείγματα.....	123
6.2.2. Απομόνωση των CTCs με το σύστημα Parsortix.....	123
6.2.3. Απομόνωση των CTCs μέσω EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού....	123
6.2.4. Απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR	124
6.2.5. Κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των PD-L1, TWIST και CDH2 στα CTCs	127
6.2.6. Στατιστική επεξεργασία	128
6.3. Αποτελέσματα	128
6.3.1. Σύγκριση μεταξύ του Parsortix και του EpCAM-θετικού CTC εμπλουτισμού σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων.....	128
6.3.2. Πειραματικά αποτελέσματα: εμπλουτισμός με Parsortix	129
6.3.3. Πειραματικά αποτελέσματα: EpCAM-θετικός ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός.....	130
6.4. Συμπεράσματα-συζήτηση	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	135
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΤΕΤΡΑΠΛΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ RT-qPCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ AR-FL, AR-V7, AR-567 ΚΑΙ AR-TOTAL ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ CTCs. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΕΥΝΟΥΧΟΑΝΤΟΧΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (mCRPC)	135
7.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας τετραπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων AR-FL, AR-V7, AR-567 και του AR-total με ανιχνευτές υδρόλυσης.....	135

7.1.1. Εισαγωγή.....	135
7.1.2. In silico μελέτη.....	136
7.1.3. Φασματική διόρθωση.....	137
7.1.4. Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών.....	138
7.1.5. Μελέτη αναλυτικής ειδικότητας.....	139
7.1.6. Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας.....	141
7.1.7. Μελέτη επαναληψιμότητας.....	144
7.1.8. Μελέτη αναπαραγωγιμότητας.....	145
7.2. Εφαρμογή του αναπτυχθέντος πρωτοκόλλου σε CTCs και εξωσώματα ασθενών με ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη.....	145
7.2.1. Πειραματική πορεία.....	145
7.2.2. Αποτελέσματα.....	147
7.3. Συμπεράσματα-συζήτηση.....	150
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	152
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CTCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ mCRPC.....	152
8.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs σε δείγματα ασθενών με mCRPC.....	152
8.1.1. Εισαγωγή.....	152
8.1.2. Πειραματική πορεία.....	152
8.1.2.1. Κλινικά δείγματα.....	153
8.1.2.2. Απομόνωση των CTCs με χρήση EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού.....	153
8.1.2.3. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR.....	153
8.1.2.4. Απομόνωση DNA, χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB- treatment) και real-time MSP.....	154
8.1.3. Αποτελέσματα.....	156
8.1.3.1. Μελέτη γονιδιακής έκφρασης των CTCs ασθενών με mCRPC.....	156
8.1.3.2. Μελέτη μεθυλίωσης των υποκινητών RASSF1A και GSTP1 στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	157
8.1.3.3. Κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων CK-19 και PD-L1 καθώς και της μεθυλίωσης του GSTP1 στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	158
8.2. Μοριακός χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων.....	161

8.2.1. Εισαγωγή.....	161
8.2.2. Πειραματική πορεία	161
8.2.2.1. Κλινικά δείγματα.....	162
8.2.2.2. Απομόνωση πλάσματος	162
8.2.2.3. Απομόνωση εξωσωμάτων	162
8.2.2.4. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR	163
8.2.2.5. Απομόνωση DNA, χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) και real-time MSP.....	164
8.2.3. Αποτελέσματα.....	168
8.2.3.1. Μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε εξωσώματα που απομονώθηκαν από το πλάσμα ασθενών με μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη.....	168
8.2.3.2. Μελέτη μεθυλίωσης των υποκινητών του GSTP1 και του RASSF1A στα εξωσώματα από το πλάσμα ασθενών με μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη	170
8.3. Σύγκριση CTCs και εξωσωμάτων.....	171
8.4. Συμπεράσματα-συζήτηση	174
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	177
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	177
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	183
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	185

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Υγρή Βιοψία	25
Σχήμα 1.2. Τα κύρια στοιχεία της υγρής βιοψίας	36
Σχήμα 2.1. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης CTCs βιοψία (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. And Hoon D.).....	38
Σχήμα 2.2. Επιλεγμένα συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού: i) AdnaTest, ii) MagSweeper, iii) Ephesia-chip, iv) Magnetic Sifter, v) CTC-iChip, vi) Rosette Sep, vii) ISET	44
Σχήμα 2.3. Σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει μεγέθους ScreenCell [®] MB	46
Σχήμα 2.4. Σύστημα απομόνωσης εμπλουτισμού με αδρανειακή εστίαση ClearCell [®] FX.....	49
Σχήμα 2.5. <i>In vivo</i> σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs εξαρτώμενο από δείκτες, CellCollector	49
Σχήμα 2.6. <i>In vivo</i> σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs, διαγνωστική λευκαφαίρεση (DLA).....	50
Σχήμα 2.7. Συστήματα απομόνωσης εξωσωμάτων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό	58
Σχήμα 2.8. Σύστημα απομόνωσης εξωσωμάτων με τη χρήση νανοσωλήνων.....	59
Σχήμα 2.9. Σύστημα απομόνωσης εξωσωμάτων μέσω ακουστικών κυμάτων	60
Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου του ανδρογονικού υποδοχέα AR full length (AR-FL) και των πλέον γνωστών εναλλακτικών του μεταγράφων	68
Σχήμα 4.1. Απομόνωση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια	75
Σχήμα 4.2. Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix	78
Σχήμα 4.3. Πορεία εφαρμογής λογισμικών κατά τη χρήση του συστήματος απομόνωσης Parsortix	79
Σχήμα 4.4. α) Φασματοφωτόμετρο ND-1000, β) Χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA	84

Σχήμα 4.5. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης δύο σταδίων που περιλαμβάνει αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	93
Σχήμα 4.6. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση ειδικού stem-loop εκκινητή	94
Σχήμα 4.7. Σχηματική απεικόνιση RT-qPCR με τη χρήση ανιχνευτή TaqMan. P: DNA πολυμεράση, R: φθορίζουσα χρωστική (FAM)	97
Σχήμα 4.9. Χημική αντίδραση της μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη.....	101
Σχήμα 4.10. Επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο: 1) Το όξινο θειώδες νάτριο μετατρέπει τη μη μεθυλωμένη κυτοσίνη σε ουρακίλη 2) Ενίσχυση με PCR οδηγεί στην αντικατάσταση της ουρακίλης από θυμίνη	102
Σχήμα 4.11. α) Θάλαμος προετοιμασίας αντιδράσεων PCR (PCR hood), β) Θερμικός κυκλοποιητής DNA (Mastercycler [®] pro, Eppendorf)	104
Σχήμα 4.12. Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler [®] 2.0 της Roche και β) της οργανολογίας του	105
Σχήμα 4.13. α) Ο αναλυτής Cobas z480, β) Λογισμικό LightCycler [®] 480	106
Σχήμα 5.1. Διάγραμμα πειραματικής πορείας για τον έλεγχο ποιότητας των αναλύσεων γονιδιακής έκφρασης σε CTCs	112
Σχήμα 5.2. Γραφήματα Levey-Jennings. Έλεγχος ποιότητας της αναλυτικής διαδικασίας σε κάθε βήμα: α) απομόνωση ολικού RNA από τα CTCs, β) σύνθεση cDNA και γ) RT-qPCR.....	113
Σχήμα 5.3. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη σταθερότητας του mRNA των CTCs	114
Σχήμα 5.4. Εκτίμηση της σταθερότητας του mRNA των CTCs στα 7 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα σωληνάρια σε τρία χρονικά διαστήματα (T ₀ , T ₂₄ και T ₄₈). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές Cq: α) <i>B2M</i> και β) <i>CK-19</i>	115
Σχήμα 5.5. Χαρακτηριστικό καταγράφημα RT-qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της <i>CK-19</i> που αντιστοιχούν σε MCF-7 κύτταρα.....	116

Σχήμα 5.6. α) Καμπύλη βαθμονόμησης για την <i>CK-19</i> , τιμές Cq προς log(κυττάρων/μL), οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και β)% Ανάκτηση των κυττάρων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα για κάθε σωληνάριο.....	116
Σχήμα 5.7. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των miRNAs.....	118
Σχήμα 5.8. Εκτίμηση της σταθερότητας των miRNAs στο πλάσμα σε 3 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα σωληνάρια σε τρία χρονικά διαστήματα (T ₀ , T ₂₄ και T ₄₈). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές Cq κανονικοποιημένες με το εξωγενές cel-miR-39: α) για το miR-191 και β) για το miR-21.....	119
Σχήμα 6.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων σε ασθενείς με HNSCC.....	122
Σχήμα 6.2. Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της RT-qPCR για το <i>B2M</i> (γονίδιο αναφοράς) στα δείγματα υγιών αιμοδοτών και HNSCC ασθενών.....	129
Σχήμα 6.3. Αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης του <i>PD-L1</i> στα CTCs ασθενών με HNSCC και υγιών αιμοδοτών που έχουν απομονωθεί με Parsortix και EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.....	131
Σχήμα 6.4. Αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης του <i>TWIST1</i> στα CTCs ασθενών με HNSCC και υγιών αιμοδοτών που έχουν απομονωθεί με Parsortix και EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.....	131
Σχήμα 6.5. Αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης του <i>CDH2</i> στα CTCs ασθενών με HNSCC και υγιών αιμοδοτών που έχουν απομονωθεί με Parsortix και EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.....	132
Σχήμα 6.6. Heatmap για την έκφραση γονιδίων στα CTCs ασθενών με HNSCC.....	132
Σχήμα 7.1. Αλληλεπικάλυψη φασμάτων φθορισμού.....	137
Σχήμα 7.2. Μελέτη ειδικότητας με τη χρήση συνθετικών δειγμάτων ελέγχου για τα γονίδια α) <i>AR-FL</i> , β) <i>AR-V7</i> , γ) <i>AR-567</i> και δ) <i>AR-total</i>	139
Σχήμα 7.3. Μελέτη αναλυτικής ειδικότητας της αναπτυχθείσας πολλαπλής RT-qPCR για τα εναλλακτικά μετάγραφα του <i>AR</i>	140

Σχήμα 7.4. Μελέτη ειδικότητας ως προς την ενίσχυση του gDNA απομονωμένου από υγιή αιμοδότη για τα γονίδια α) <i>AR-FL</i> , β) <i>AR-V7</i> , γ) <i>AR-567</i> και δ) <i>AR-total</i>	140
Σχήμα 7.5. Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας της πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό γονιδίων (<i>AR-FL</i> , <i>AR-V7</i> , <i>AR-567</i> και <i>AR-total</i>) με ανιχνευτές υδρόλυσης.....	141
Σχήμα 7.6. Διαγράμματα βαθμονόμησης της πολλαπλής RT-qPCR από $1,0 \times 10^1$ αντίγραφα έως $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα.....	142
Σχήμα 7.7. Heatmap για την έκφραση γονιδίων στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62).....	147
Σχήμα 7.8. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του <i>AR-FL</i> στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62).....	148
Σχήμα 7.9. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του <i>AR-V7</i> στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62).....	149
Σχήμα 7.10. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του <i>AR-567</i> στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62).....	149
Σχήμα 7.11. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του <i>AR-Total</i> στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62).....	150
Σχήμα 8.1. Διάγραμμα ροής της μελέτης για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs από περιφερικό αίμα ασθενών με mCRPC.....	152
Σχήμα 8.2. Heatmap για την έκφραση γονιδίων στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	156
Σχήμα 8.3. Heatmap για τη μεθυλίωση των γονιδίων <i>GSTP1</i> και <i>RASSF1A</i> στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	157
Σχήμα 8.4. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την έκφραση της <i>CK-19</i> στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	158
Σχήμα 8.5. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την έκφραση του <i>PD-L1</i> στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	159
Σχήμα 8.6. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για τη μεθυλίωση του <i>GSTP1</i> στα CTCs ασθενών με mCRPC.....	159

Σχήμα 8.7. Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας για την απομόνωση και το μοριακό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων.....	161
Σχήμα 8.8. Heatmap για την έκφραση γονιδίων στα εξωσώματα από πλάσμα ασθενών με mCRPC.....	169
Σχήμα 8.9. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την έκφραση του <i>PD-L1</i> στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC.....	169
Σχήμα 8.11. Heatmap για τη γονιδιακή έκφραση και τη μεθυλίωση στα CTCs και στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC.....	172

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Σύγκριση κλασικής με υγρή βιοψία	27
Πίνακας 2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού των CTCs	51
Πίνακας 4.1. Οι κυριότεροι υποπληθυσμοί των κυττάρων του αίματος και ο τυπικός αριθμός τους/mL αίματος	73
Πίνακας 4.2. Συστατικά της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	95
Πίνακας 4.3. Συστατικά της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ώριμων miRNAs.....	98
Πίνακας 4.4. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	99
Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>B2M</i>	109
Πίνακας 5.2. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>B2M</i>	109
Πίνακας 5.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>B2M</i>	110
Πίνακας 5.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υβριδισμού για το γονίδιο <i>CK-19</i>	110
Πίνακας 5.5. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>CK-19</i>	110
Πίνακας 5.6. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>CK-19</i>	111
Πίνακας 6.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>PD-L1</i>	125
Πίνακας 6.2. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>PD-L1</i>	125
Πίνακας 6.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>PD-L1</i>	125
Πίνακας 6.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>EGFR</i>	125
Πίνακας 6.5. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>EGFR</i>	126
Πίνακας 6.6. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>EGFR</i>	126
Πίνακας 6.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>TWIST1</i>	126

Πίνακας 6.8. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>TWIST1</i>	126
Πίνακας 6.9. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>TWIST1</i>	127
Πίνακας 7.1. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τη διόρθωση αλληλεπικάλυψης των φασμάτων των φθορίζουσών χρωστικών.....	138
Πίνακας 7.2. Συστατικά της αντίδρασης πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης για το γονίδιο <i>AR-full length</i> , των εναλλακτικών μεταγράφων του (<i>AR-V7</i> , <i>AR-567</i>) και του <i>AR-total</i>	138
Πίνακας 7.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης για το γονίδιο <i>AR-full length</i> , των εναλλακτικών μεταγράφων του (<i>AR-V7</i> , <i>AR-567</i>) και του <i>AR-total</i>	139
Πίνακας 7.4. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές C _q και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του πλήρους μεταγράφου του <i>AR</i> (<i>AR-full length</i>)	142
Πίνακας 7.5. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές C _q και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του <i>AR-V7</i>	143
Πίνακας 7.6. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές C _q και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του <i>AR-567</i>	143
Πίνακας 7.7. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές C _q και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του <i>AR-total</i>	144
Πίνακας 7.8. Επαναληψιμότητα εντός της ίδιας μέρας (n=3) πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης	144
Πίνακας 7.9. Αναπαραγωγιμότητα της πολλαπλής RT-qPCR σε διάστημα τεσσάρων ημερών (n=4).....	145
Πίνακας 8.1. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα CTCs με την ολική επιβίωση	160
Πίνακας 8.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>ACTB</i>	165

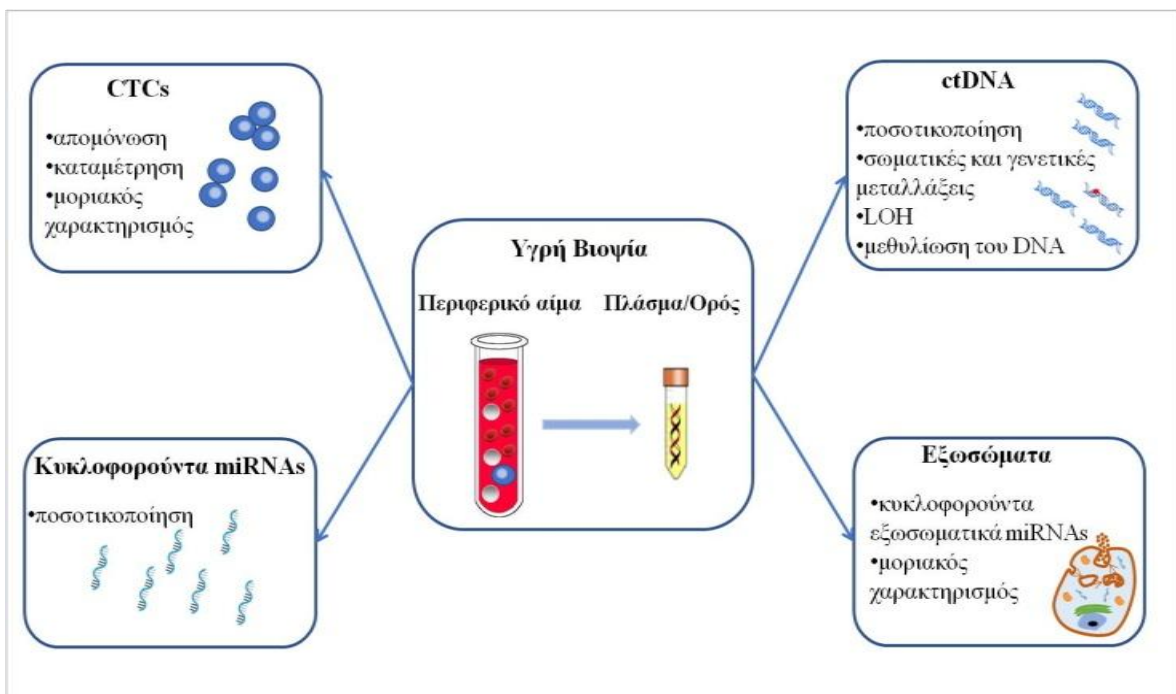
Πίνακας 8.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ACTB</i>	165
Πίνακας 8.3. Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το γονίδιο <i>ACTB</i>	166
Πίνακας 8.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	166
Πίνακας 8.5. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	166
Πίνακας 8.6. Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	166
Πίνακας 8.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο <i>RASSF1A</i>	167
Πίνακας 8.8. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF1A</i>	167
Πίνακας 8.9. Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF1A</i>	167
Πίνακας 8.10. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα εξωσώματα με την ολική επιβίωση ...	171
Πίνακας 8.11. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων <i>PD-L1</i> , <i>AR-FL</i> , <i>AR-V7</i> , <i>AR-567</i> και <i>AR-total</i> σε εξωσώματα και CTCs ασθενών με mCRPC	173
Πίνακας 8.12. Συσχέτιση της μεθυλίωσης των γονιδίων <i>GSTP1</i> και <i>RASSF1A</i> σε εξωσώματα και CTCs ασθενών με mCRPC	173

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

1.1. Εισαγωγή

Ο όρος «υγρή βιοψία» (**liquid biopsy**) αναφέρεται σε δοκιμασίες στο περιφερικό αίμα, που βασίζονται στην απόκτηση μοριακής πληροφορίας για την εξέλιξη του όγκου, έπειτα από ανάλυση του γενετικού υλικού. Κύριες πηγές της υγρής βιοψίας αποτελούν τα **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTCs)**, το **εξωκυττάριο καρκινικό DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)**, τα **κυκλοφορούντα miRNAs (circulating miRNAs)** και τα **εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles, EVs)**, κυριότερη υποκατηγορία των οποίων αποτελούν τα εξωσώματα (**Σχήμα 1.1**) (1). Η υγρή βιοψία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των γενετικών και επιγενετικών μεταβολών κατά την εξέλιξη της νόσου, όπως και την παρακολούθηση των ασθενών, μέσω απλών επαναλαμβανόμενων αιμοληψιών, σε πραγματικό χρόνο (1,2). Οι προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνονται στην ανάπτυξη στοχευμένων μοριακών δοκιμασιών μέσω ανάλυσης του περιφερικού αίματος, με πιθανή χρησιμότητα ως **συνοδές διαγνωστικές εξετάσεις (companion diagnostics, CDx)** για την παρακολούθηση της νόσου ή ακόμη και για την έγκαιρη ανίχνευσή της (3–5).



Σχήμα 1.1. Υγρή Βιοψία (6)

Η σύγχρονη έρευνα στο πεδίο διάγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου στρέφεται πλέον στην ανεύρεση βιοδεικτών στο αίμα και συγκεκριμένα στα CTCs, στο ctDNA και στα κυκλοφορούντα miRNAs (7,8). Εξαιτίας της ετερογένειας του καρκινικού ιστού, η απομόνωση και ανάλυση των CTCs, του ctDNA, των miRNAs και των EVs παρέχει μια ολοκληρωμένη σκιαγράφιση της μοριακής ταυτότητας του όγκου. Τα CTCs ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης και έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν σημαντικό προγνωστικό δείκτη σε σχέση με το ελεύθερο νόσου διάστημα και την ολική επιβίωση, ενώ παράλληλα το ctDNA ανιχνεύεται στο πλάσμα των ασθενών και αντανακλά το καρκινικό φορτίο καθώς παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής του σε ασθενείς με καρκίνο σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (9). Η αναλυτική και κλινική σημασία των δοκιμασιών υγρής βιοψίας έχουν αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις μέχρι τώρα, ενώ η κλινική επικύρωσή τους βρίσκεται σε εξέλιξη μέσω συνεχιζόμενων μελετών σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου. Σε κάποιες περιπτώσεις, ιδιαίτερα στα πλαίσια της μελέτης μηχανισμών αντίστασης σε στοχευμένες θεραπείες, υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι η υγρή βιοψία δρα συμπληρωματικά με την κλασική ανάλυση του πρωτοπαθούς όγκου μέσω ιστοικής βιοψίας, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη λήψη κλινικών αποφάσεων (**Πίνακας 1.1**) (8).

Η υγρή βιοψία αποτελεί ένα σύνολο μη επεμβατικών μεθόδων για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την επιλογή στοχευμένης θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο, ωστόσο η εφαρμογή της στην καθημερινή κλινική πράξη δεν έχει ακόμη καθιερωθεί. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στους εξής παράγοντες: 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 (1). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η βελτίωση και η επικύρωση αναλυτικά ευαίσθητων μεθοδολογιών, αποτελούν απαραίτητα βήματα για την καθιέρωση των αναλύσεων της υγρής βιοψίας στην καθημερινή κλινική πράξη (8).

Πίνακας 1.1. Σύγκριση κλασικής με υγρή βιοψία (8)

Analyte	Solid biopsy		Liquid biopsy			
	Tissue	CTCs	ctDNA	EVs	cfRNA	miRNA
Origin						
Viable cells	Yes	Yes	No	Yes	Unknown	Unknown
Apoptotic cells	Yes	Yes	Yes	Unknown	Unknown	Unknown
Components						
DNA	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
RNA	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Proteins	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Metabolites	Yes	Yes	No	Unknown	No	No
Extractable information						
Mutations	Yes	Yes	Yes	Yes	Possibly	No
Copy number alterations	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Epigenetic alterations	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Fusion genes	Yes	Yes	Yes	Yes	Possibly	No
Splice variants	Yes	Yes	No	Yes	Possibly	No
Information at single-cell level	Yes	Yes	No	No	No	No
Functional assays	Yes	Yes	No	No	No	No
Applications in precision oncology						
Prognostication	Yes	Yes	Yes	Yes	Unknown	Possibly
Identification of predictive marker	Yes	Yes	Yes	Possibly	Unknown	No
Classification of molecular subtypes	Yes	Possibly	Possibly	Unknown	Unknown	No
Tracking of clonal evolution over time	No	Yes	Yes	Unknown	No	No
Early identification of resistance mechanisms	No	Yes	Yes	Possibly	Unknown	No
Monitoring treatment response	No	Possibly	Yes	Possibly	Unknown	Unknown
Early detection of recurrence and MRD	No	Possibly	Yes	Possibly	Possibly	No
Early detection of cancer	No	Unknown	Possibly	Possibly	Unknown	Unknown
FDA-approved assays	Yes ^a	Yes ^b	Yes ^c	No	No	No

1.2. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Από τη στιγμή της δημιουργίας πρωτοπαθούς όγκου έως και την εμφάνιση μακροσκοπικών μεταστάσεων μεσολαβεί μια περίοδος, παρόμοια και το ίδιο σημαντική με την περίοδο της ογκογένεσης, κατά την οποία ορισμένα καρκινικά κύτταρα ενδοαγγειώνονται και εισέρχονται στην κυκλοφορία. Αυτά καλούνται **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTCs)** και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία. Τα CTCs αποπίπτουν ή επιβιώνουν από την αλληλεπίδρασή τους με το ανοσολογικό σύστημα, οπότε μεταπίπτουν σε μια «ληθαργική» κατάσταση, δημιουργούν μικροσκοπικές εστίες από διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα και εν τέλει οδηγούν στην ανάπτυξη δευτεροπαθών εστιών. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το μεταστατικό δυναμικό του φαινοτύπου τους, την έκβαση των

αλληλεπιδράσεών τους με το μικροπεριβάλλον και τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται.

Η πρώτη αναφορά για την παρουσία των CTCs έλαβε χώρα το 1869 από τον Thomas Ashworth (10). Είκοσι χρόνια αργότερα, ο Steve Paget, στο πρώτο τεύχος του Lancet, περιέγραψε την υπόθεση “the seed and soil hypothesis”, σύμφωνα με την οποία «η μετάσταση εξαρτάται από τη διασταυρούμενη δράση μεταξύ των επιλεγμένων καρκινικών κυττάρων (*the seed*) και το ειδικό μικροπεριβάλλον του οργάνου (*the soil*)», μια υπόθεση που επανεξετάστηκε πολλά χρόνια αργότερα από τους Langley και Fidler (11).

Ελάχιστα από τα CTCs δημιουργούν μεταστατικές εστίες καθώς έχει υπολογιστεί ότι περίπου ένα κύτταρο ανά 10.000 είναι ικανό να δημιουργήσει κάποια απομακρυσμένη εστία. Μια αιτία που εξηγεί το πολύ μικρό ποσοστό είναι ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής των CTCs καθώς η πλειοψηφία τους υπόκειται σε απόπτωση ή απομακρύνεται από την κυκλοφορία στους πνεύμονες ή το ήπαρ (2).

Τα CTCs χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ετερογένεια και παρουσιάζουν γονδιακές διαφορές από τα κύτταρα του πρωτοπαθούς (12). Οι διαφορές αυτές μεταβάλλουν τις μοριακές ισορροπίες, που είναι υπεύθυνες για την κυτταρική προσκόλληση, τη μεταναστευτική ικανότητα και την αγγειογένεση, επιτρέποντας τελικά στα CTCs να δημιουργήσουν δευτεροπαθείς όγκους σε απομακρυσμένα όργανα. 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)** (13,14), διαφεύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και μέσω της συστηματικής ή της λεμφικής κυκλοφορίας δημιουργούν απομακρυσμένες εστίες (15). Με την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος, σημαντικός αριθμός CTCs θα αποφύγει την καταστροφή από τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, λόγω της μη αναγνώρισής τους από τα τελευταία, γεγονός που αποδίδεται σε μειωμένη έκφραση από τα CTCs αντιγόνων ιστοσυμβατότητας κλάσης I. Η επιβίωση των CTCs στο συχνά εχθρικό περιβάλλον που αντιμετωπίζουν μέχρι την οργάνωσή τους σε συμπαγείς μεταστατικές εστίες εξασφαλίζεται και από την καταστολή των μηχανισμών της απόπτωσης (16). Οι διαφορετικές αυτές φαινοτυπικές ιδιαιτερότητες βοηθούν τα CTCs να αποσχιστούν από τον πρωτοπαθή όγκο, να διασχίσουν το στρώμα, να επιβιώσουν στην κυκλοφορία όπου εμφανίζονται είτε ως μονήρη κύτταρα, είτε σε συστοιχίες κυττάρων (clusters), γεγονός που ονομάζεται **μικροεμβολισμός του όγκου (circulating tumour microemboli, CTM)** και παρουσιάζει υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό (17) και τελικά να αποικίσουν απομακρυσμένα όργανα. Τα CTM, που αποτελούν

συσσωματώματα CTCs, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μέσω παθητικής διάχυσης από τον πρωτοπαθή όγκο (18).

Η ανάλυση των CTCs είναι ένας πολλά υποσχόμενος νέος διαγνωστικός τομέας για ασθενείς προχωρημένου αλλά και πρώιμου σταδίου. Ωστόσο, η ανάλυση των CTCs παρουσιάζει αρκετές αναλυτικές και τεχνικές προκλήσεις, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι πολύ σπάνια και η ποσότητά τους στο διαθέσιμο δείγμα πολύ περιορισμένη. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα του χαρακτηρισμού των CTCs περιλαμβάνουν μεθόδους που βασίζονται στην **αντίστροφης μεταγραφής ποσοτική PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)**, σε απεικονιστικές προσεγγίσεις και στον τομέα της απομόνωσης σε συσκευές μικροδιήθησης και μικροροών. Εξαιρετικά ευαίσθητες αναλυτικά πλατφόρμες ανίχνευσης των CTCs επιτρέπουν την παρακολούθηση της νόσου και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (19).

Επιπλέον, τα CTCs είναι ένας καλά καθορισμένος στόχος για την κατανόηση της βιολογίας του όγκου και της διασποράς των καρκινικών κυττάρων. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης και την αντοχή στις καθιερωμένες θεραπείες (19), αλλά και για τον καθορισμό νέων θεραπευτικών στόχων, οι οποίοι μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω της αποσαφήνισης της σχέσης των CTCs με τα **καρκινικά βλαστικά κύτταρα (cancer stem cells, CSCs)**. Ωστόσο υπάρχει μια σειρά ερωτημάτων τα οποία πρέπει να διαλευκανθούν και αφορούν στη βιολογία των CTCs και στην επιλογή της βέλτιστης μεθόδου τόσο για την απομόνωση όσο και για το μοριακό χαρακτηρισμό τους.

1.3. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA)

Η πρώτη αναφορά του **εξωκυττάρου DNA (cell-free DNA, cfDNA)** έγινε το 1948 από τους Mandel και Metais, οι οποίοι εντόπισαν εξωκυττάρια νουκλεϊκά οξέα στο ανθρώπινο πλάσμα (20). Το **εξωκυττάριο καρκινικό DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)** αποτελεί ένα πολύ μικρό κλάσμα του cfDNA που προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα. Το ctDNA περιλαμβάνει μικρά θραύσματα που σχετίζονται με τα νουκλεοσώματα (80-200bp), ενώ τα μεγαλύτερα θραύσματα (>10kb) ενσωματώνονται στα **εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles, EVs)**. Το ctDNA μπορεί να προέρχεται από απόπτωση, νέκρωση, λύση των CTCs αλλά και ενεργή έκκριση από τον όγκο (18).

Από την ανάλυση του ctDNA λαμβάνονται τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες. Ποσοτικές πληροφορίες λαμβάνονται από τη μέτρηση του κλάσματος μεταλλαγμένου αλληλόμορφου και αποτελεί αντανάκλαση του φορτίου του όγκου. Βρίσκει εφαρμογή στην

έγκαιρη διάγνωση, ανίχνευση της **ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease, MRD)** στην ανίχνευση μεταστάσεων, καθώς και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία (21).

Ποιοτικές πληροφορίες αντλούνται μέσω της μελέτης των γενετικών αλλαγών, όπως των μεταλλάξεων, των ενισχύσεων, των ελλείψεων και των μετατοπίσεων, αλλά και των επιγενετικών αλλαγών, όπως της μεθυλίωσης (22). Η ανάλυση του ctDNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας, όπως στην περίπτωση των μεταλλάξεων EGFR στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (23). Στην πρώτη εγκεκριμένη από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) δοκιμασία ανίχνευσης των μεταλλάξεων του EGFR (cobas[®] EGFR Mutation Test v2, Roche Diagnostic), η ανάλυση του ctDNA αποτέλεσε την πρώτη συνοδό διαγνωστική εξέταση για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα με Erlotinib (24). Άλλες ποιοτικές πληροφορίες που λαμβάνονται από την ανάλυση του ctDNA είναι το προφίλ της μεθυλίωσης. Η μοναδική έως σήμερα εγκεκριμένη από τον FDA δοκιμασία αποτελεί το EpiProColon[®], για τη μεθυλίωση του γονιδίου *σεπτίνη 9 (SEPT9)* στο ctDNA ασθενών με καρκίνου παχέος εντέρου (25).

1.4. Κυκλοφορούντα miRNAs

Τα miRNAs είναι μικρά, μη κωδικά, μονόκλωνα RNAs που έχουν μέγεθος 17-25 νουκλεοτίδια και συνιστούν μια κατηγορία μορίων-ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης, ρυθμίζοντας αρνητικά τα γονίδια-στόχους τους με τρόπο ο οποίος εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας που φέρουν ως προς το γονίδιο-στόχο (26).

Η βιογένεση των miRNAs είναι μια σύνθετη διαδικασία πολλών σταδίων που περιλαμβάνει διάφορα ένζυμα και κυτταρικά διαμερίσματα. Διακρίνεται σε τρία κύρια στάδια που αφορούν: i) στη μεταγραφή του γονιδίου του miRNA, ii) στην επεξεργασία του πρώιμου μεταγράφου μέχρι τη δημιουργία του ώριμου miRNA και iii) στο σχηματισμό του νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου RISC μέσω του οποίου ασκεί τη δράση του το ώριμο miRNA (26).

Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι εν δυνάμει το 30% των γονιδίων ενός οργανισμού ρυθμίζεται μέσω επίδρασης μορίων miRNAs. Ακόμη κάθε miRNA μπορεί να ρυθμίζει πολλούς στόχους αλλά και διαφορετικοί στόχοι μπορεί να συνδέονται και να ρυθμίζονται από διαφορετικά miRNAs. Γενικά οι στόχοι των miRNAs ποικίλουν, μπορεί να είναι μεταβολικά ένζυμα, σηματοδοτικές πρωτεΐνες ή και μεταγραφικοί παράγοντες. Επομένως, γίνεται φανερό ότι τα miRNAs έχουν τεράστια επίδραση σε διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Τα miRNAs

εμπλέκονται σε μονοπάτια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στην ανάπτυξη του νευρικού και μυϊκού συστήματος, καθώς και στην εμβρυογένεση (27).

Ένα ακόμη σημαντικό μονοπάτι ρύθμισης εμπλέκει τα miRNAs με τις βασικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα miRNAs σχετίζονται τόσο με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων της φυσικής και επίκτητης ανοσίας όσο και με την ενεργοποίηση των μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Επιπλέον, φαίνεται ότι κατέχουν ρόλους-κλειδιά στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και των λιπών, στην ομοιόσταση των υδατανθράκων μέσω της δράσης της ινσουλίνης αλλά και στην ομοιόσταση των λιπών του ήπατος. Η απορρύθμιση της έκφρασής τους συμβάλλει στην ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα ή μεταβολικών διαταραχών (28).

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, παρατηρείται ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης. Η διατήρηση αυτού του προφίλ ή αλλιώς της miRNA-ομοιόστασης κρίνεται ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Πάρα πολλές περιπτώσεις ασθενειών συνοδεύονται από «διαταραγμένο» προφίλ έκφρασης των miRNAs γεγονός που αποκαλύπτει τη σημαντικότητα της λεπτής ρύθμισης που προκαλούν στην πρόγνωση και στη διάγνωση (29).

Η συμμετοχή των miRNAs σε όλες αυτές τις θεμελιώδεις για ένα υγιές κύτταρο βιολογικές λειτουργίες, τα καθιστά τόσο σημαντικά μόρια ώστε διαταραχές στην έκφρασή τους, κατόπιν απώλειας ή ενίσχυσης των γονιδίων τους, να επηρεάζουν την ομοιόσταση του κυττάρου και να οδηγούν σε καρκίνο. Αυτό συμβαίνει διότι τα ίδια τα μόρια αυτά μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια ανάλογα με τους στόχους που έχουν (30).

Η υπερέκφραση ενός miRNA που έχει ογκογονικό ρόλο μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία όγκου. Στην περίπτωση αυτή, αυξημένες ποσότητες ενός miRNA το οποίο παράγεται είτε σε λανθασμένο χρόνο είτε σε ιστό όπου φυσιολογικά δε θα παραγόταν, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου-στόχου και την προαγωγή της καρκινογένεσης με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και μείωση της απόπτωσης (31).

Η έκφραση των miRNAs μπορεί να απορρυθμιστεί μέσω ποικίλων μηχανισμών που περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, επιγενετικές αλλαγές, μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς καθώς και ανωμαλίες στο μηχανισμό βιογένεσης των miRNAs.

Ένας μεγάλος αριθμός miRNAs φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας. Τα miRNAs αυτά ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον της μετάστασης μέσω πολλών και διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της

έκφρασης των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και εκκρινόμενων πρωτεϊνών, καθώς επίσης και άμεση μεταφορά των ώριμων miRNAs μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων (31,32).

Οι παραπάνω διεργασίες υποδεικνύουν ότι τα miRNAs μπορούν να αποτελούν μια ομάδα πολλά υποσχόμενων βιοδεικτών καρκίνου. Η μεγάλη τους συμμετοχή σε ένα σύνολο λειτουργιών του κυττάρου τα καθιστά ικανά ν' αξιοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου, ως προγνωστικοί δείκτες για την πρόγνωση και κλινική έκβαση των ασθενών και τέλος ως πιθανοί δείκτες στην ανταπόκριση της θεραπείας που ακολουθείται.

Τα εξωκυτταρικά miRNAs που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά (πλάσμα, ορός, ούρα, σίελος κ.λ.π.) ονομάζονται κυκλοφορούντα miRNAs. Τα miRNAs αυτά είναι σταθερά και εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης μεταξύ διαφορετικών τύπων βιολογικών υγρών (33). Η αξιοσημείωτη σταθερότητα που εμφανίζουν οδηγεί στην αξιοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs ως νέων, μη επεμβατικών βιοδεικτών (34). Τα κυκλοφορούντα στον ορό miRNAs παραμένουν σταθερά ακόμη και μετά την υποβολή τους σε αντίξοες συνθήκες οι οποίες φυσιολογικά θα οδηγούσαν στην αποικοδόμηση των περισσότερων RNAs (35).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs φαίνεται να είναι σταθερά παρά την αστάθεια που εμφανίζουν τα RNA μόρια εκτός του κυττάρου. Η σταθερότητα αυτή πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο μεταφοράς τους (36). Υπάρχουν δυο τρόποι μεταφοράς, ένας ενδοκυτταριακός και ένας εξωκυτταριακός. Κατά την ενδοκυτταριακή μεταφορά τα miRNAs εσωκλείονται μέσα σε: i) εξωσώματα, ii) μικροσωματίδια ή iii) αποπτωτικά σωμάτια. Εκτός από την ενδοκυτταριακή μεταφορά, τα miRNAs φαίνεται να μεταφέρονται και εξωκυτταριακά σχηματίζοντας πρωτεϊνικά σύμπλοκα (37).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs διαθέτουν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά από αυτά που απαιτούνται να έχει ένα μόριο για να αξιοποιηθεί ως βιοδείκτης. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα εξής: i) σταθερά και ανθεκτικά μόρια και εντοπίζονται σε ποικίλα βιολογικά υγρά (37), ii) η απόκτηση του υλικού πραγματοποιείται με μη επεμβατικές μεθόδους, iii) η έκφραση ορισμένων miRNAs είναι ειδική ως προς τα κύτταρα ή τους ιστούς από τα οποία προέρχονται και η αλλαγή των επιπέδων έκφρασής τους στην κυκλοφορία αντανακλά διάφορες βιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις, iv) τα επίπεδα έκφρασής τους είναι σχετικά απλό να προσδιοριστούν στα βιολογικά υγρά.

1.5. EVs και εξωσώματα

Οι πρώτες αναφορές του όρου EVs πραγματοποιήθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1960, με τους ερευνητές να αναφέρονται στις παρατηρούμενες εξωκυτταρικές δομές ή σε σωματίδια πλούσια σε λιπίδια ως “platelet-dust” or “matrix-vesicles” (38). Μεσολάβησαν περίπου δέκα χρόνια ώσπου οι ερευνητές να αναφέρουν την παρουσία των μικροσωματιδίων και των μικροκυστιδίων που απελευθερώνονται από το κύτταρο (39,40). Ο όρος εξωσώματα προέκυψε το 1981 (41) μαζί με μια βασική κατανόηση σχετικά με τις υποκείμενες οδούς ενδοκυτταρικής βιογένεσης που καταδεικνύουν οι ομάδες των Johnstone και Stahl (42,43). Από τότε παρατηρείται ολοένα και περισσότερο αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα EVs, την κατανόηση τη βιολογίας τους, των λειτουργιών τους και της εφαρμογής τους ως βιοδεικτών.

Τα EVs είναι μεμβρανώδη κυστίδια που απελευθερώνονται από όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων. Έχουν απομονωθεί από όλα σχεδόν τα βιολογικά υγρά όπως το πλάσμα, τα ούρα, η σίελος, το μητρικό γάλα, το σπέρμα και το αμνιακό υγρό. Τα κυστίδια αυτά μπορούν να περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, συγκεκριμένα RNA, miRNAs, long non-coding RNAs (lncRNAs), δίκλωνο DNA, αλλά και μιτοχονδριακό DNA (44). Τα EVs ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος και τον τρόπο βιογένεσής τους σε τρεις υποκατηγοίες: i) μικροκυστίδια, που έχουν διάμετρο 50-1000 nm και σχηματίζονται από εγκολλώσεις τις πλασματικής μεμβράνης, ii) αποπτωτικά σωματίδια, που έχουν διάμετρο 50-5000 nm και προέρχονται από κύτταρα που υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και iii) τα εξωσώματα, που έχουν διάμετρο 30-150 nm και προέρχονται από πρόιμα ενδοσώματα. Αυτά αποθηκεύονται σε πολυκυστιδιακά σωματίδια και απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον κατόπιν σύντηξης των σωματίων αυτών με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, οπότε και απελευθερώνονται τα εξωσώματα (45). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να απελευθερώνουν περισσότερα εξωσώματα από τα υγιή κύτταρα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης ή ως αποτέλεσμα διέγερσης σε απόκριση σε συνθήκες στρες (46,47). Όλα τα εξωσώματα έχουν ορισμένα κοινά λιπίδια και πρωτεΐνες, οι οποίες συντίθενται ανεξαρτήτως του κυτταρικού τύπου προελεύσεως, αλλά και πρωτεΐνες που μπορεί να αντανakλούν την προέλευσή τους καθώς και τη λειτουργία τους. Για παράδειγμα, τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, φέρουν μόρια ιστοσυμβατότητας (48). Στα εξωσώματα έχουν αποδοθεί διάφοροι βιολογικοί ρόλοι, όπως η διακυτταρική επικοινωνία, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, η αντιγονοπαρουσίαση και η μεταφορά RNA και πρωτεϊνών μεταξύ των κυττάρων (49). Τα εξωσώματα μπορούν να επηρεάσουν τα κύτταρα-στόχους μέσω τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών μηχανισμών: i) άμεση επαφή μεταξύ πρωτεϊνών της

μεμβράνης των εξωσωμάτων με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-δέκτη, με επακόλουθη ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, ii) διάσπαση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη των εξωσωμάτων ακολουθούμενη από αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνικών θραυσμάτων και των μεμβρανικών υποδοχέων στο κύτταρο, iii) σύντηξη των εξωσωμάτων με τη μεμβράνη του κυττάρου που οδηγεί στην απελευθέρωση του φορτίου του και iv) η κυτταρική ενσωμάτωση (cellular internalization) ολόκληρου του κυστιδίου με φαγοκυττάρωση (50).

Στον καρκίνο τα εξωσώματα έχουν περιγραφεί σε μεγάλο βαθμό ως υποκινητές της εξέλιξης του όγκου, ωστόσο είναι πιθανό να δρουν και περιοριστικά στην εξέλιξη της νόσου. Τα εξωσώματα μπορούν να αποτελέσουν μια πηγή πληροφόρησης για την ανίχνευση του καρκίνου και την παροχή πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη του όγκου και της μετάστασης. Τα εξωσώματα ανιχνεύονται σε όλα τα βιολογικά υγρά, συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις υγρής βιοψίας ώστε να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία για την ανίχνευση του καρκίνου σε όσο το δυνατόν πιο πρώιμα στάδια, για την πρόγνωση και κλινική έκβαση των ασθενών αλλά και ως δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία. Πολλές μελέτες είτε *in vitro* είτε σε κλινικά δείγματα έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της φύσης των εξωσωμάτων και την πιθανή χρησιμότητά τους στην ανίχνευση και παρακολούθηση του καρκίνου. Τα λιπίδια και οι μεταβολίτες στα καρκινικά εξωσώματα παρέχουν πληροφορίες για την ανίχνευση και τη βιολογία του καρκίνου, ωστόσο καλύτερη γνώση επιτυγχάνεται με την διερεύνηση και τη μελέτη των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων (47).

Μοριακές τροποποιήσεις στα νουκλεϊκά οξέα που εμπεριέχονται στα εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι βιοδείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα miRNAs που εμπεριέχονται στα εξωσώματα μπορούν να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία για την ανίχνευση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του miR-21 βρέθηκε αυξημένο σε εξωσώματα που απομονώθηκαν στον ορό ασθενών με οισοφαγικό πλακώδες καρκίνωμα και σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο της νόσου (51). Σε άλλη μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-141 στον ορό ασθενών με καρκίνο προστάτη διαφοροποιούνταν μεταξύ των ασθενών με μεταστατική νόσο σε σχέση με τους ασθενείς που εμφάνιζαν εντοπισμένη νόσο (52). Αναλύσεις στα miRNAs των εξωσωμάτων που προέρχονται από τα ούρα, οδήγησε στη δημιουργία ενός προφίλ miRNAs που επιτρέπει την ανίχνευση ουροθηλιακού καρκινώματος ουροδόχου κύστης. Τα miRNAs των καρκινικών εξωσωμάτων μπορεί να συμβάλλουν στην ογκογένεση και τα καρκινικά εξωσώματα μπορούν να μεσολαβήσουν σε βιογένεση miRNAs εξωκυτταρική, μια ιδιότητα που δεν σχετίζεται με φυσιολογικά εξωσώματα. Σε σχετικά πρόσφατη δημοσίευση οι Melo et al έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκκρίνουν εξωσώματα μέσα στα οποία φαίνεται να

πραγματοποιείται βιογένεση των miRNAs εκτός των κυττάρων, γεγονός που επίσης δε λαμβάνει χώρα στα εξωσώματα που προέρχονται από φυσιολογικά κύτταρα (53). Τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα και από ορό ασθενών με καρκίνο μαστού περιέχουν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα RISC, Dicer, TRBP και AGO2, το οποίο επεξεργάζεται τα πρώιμα miRNAs και τα μετατρέπει σε ώριμα miRNAs. Τα καρκινικά αυτά εξωσώματα μεταβάλλουν τη μεταγραφή των κυττάρων στόχων με έναν Dicer-εξαρτώμενο τρόπο ώστε να διεγείρουν τα μη καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα να σχηματιστούν όγκοι. Στη μελέτη αυτή, παρουσιάζεται ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα προσδίδουν μια ογκογόνο επίδραση στα γύρω κύτταρα μέσω των εξωσωμάτων (53).

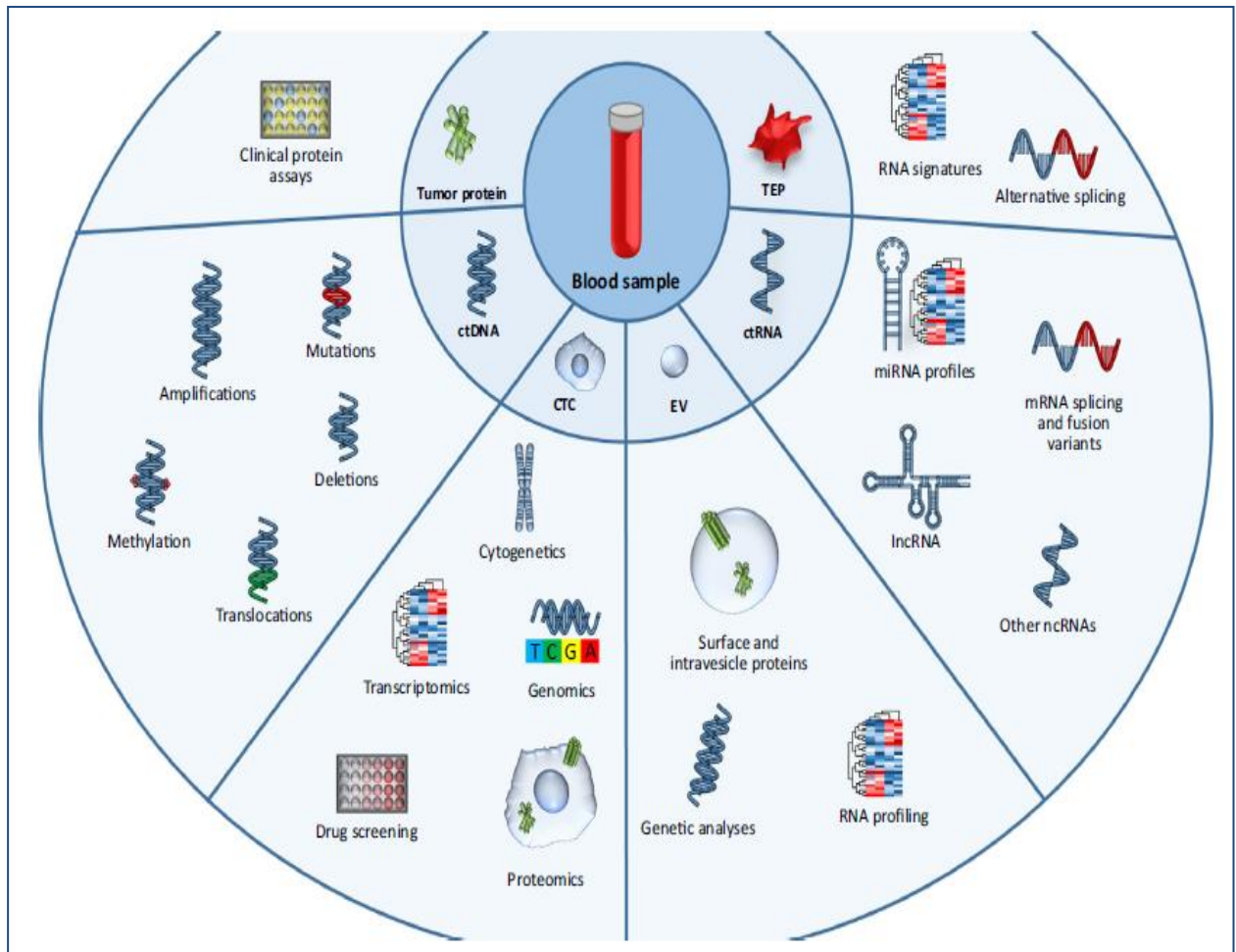
Το DNA που εμπεριέχεται στα εξωσώματα μπορεί επίσης να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (**epidermal growth factor receptor, EGFR**) μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτη για το γλοιοβλάστωμα (54). Επιπλέον, οι οδηγές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος ταυτοποιήθηκαν σε DNA εξωσωμάτων. Τα αποτελέσματα της ομάδας αυτής επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια από μια σειρά μελετών άλλων ερευνητικών ομάδων (55).

Επίσης, οι πρωτεΐνες των εξωσωμάτων αντικατοπτρίζουν την κυτταρική τους προέλευση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση του καρκίνου. Η μεταφορά πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση (oncoproteins), μεταξύ των κυττάρων, από τα εξωσώματα συμβάλει στη διευκόλυνση της ογκογένεσης. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III και IV, ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων MET βρέθηκε αυξημένος στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Οι πρωτεΐνες των εξωσωμάτων φαίνεται να αποτελούν χρήσιμους δείκτες και για την ανίχνευση του καρκίνου παγκρέατος. Οι Costa-Silva et al. ανέφεραν ότι ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων είναι αυξημένος στα κυκλοφορούντα εξωσώματα ασθενών με καρκίνο παγκρέατος σε σχέση με τα εξωσώματα που έχουν απομονωθεί από υγιείς αιμοδοτές. Η πρωτεογλυκάνη 1 (proteoglycan glypican-1, GPC-1) ανιχνεύτηκε επιπλέον, στα εξωσώματα ασθενών με καρκίνο παγκρέατος και μαστού (56). Η επίδραση των εξωσωμάτων στη μεταστατική διαδικασία έχει μελετηθεί ευρέως. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων διαφέρει όταν αυτά προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα σε σχέση με αυτά που προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα. Η ετερογένεια αυτή των εξωσωμάτων μπορεί να επηρεάσει τη μετάσταση ή και την ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία (47).

Η καταλληλότητα της χρήσης των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες στον καρκίνο έγκειται στο γεγονός ότι το μοριακό τους φορτίο θεωρείται το δακτυλικό αποτύπωμα του κυττάρου από το

οποίο έχουν προέλθει (57). Συγκρινόμενα με τα CTCs και το ctDNA, που η εφαρμογή τους στην κλινική διάγνωση παρεμποδίζεται από προκλήσεις στην απομόνωση, την αναλυτική ευαισθησία και τη σταθερότητά τους, τα πιθανά πλεονεκτήματα των εξωσωμάτων θεωρείται από μερικούς ότι είναι πολλά (58). Τα εξωσώματα παράγονται και απελευθερώνονται σε άφθονες ποσότητες και μεγαλύτερες σε σχέση με τα CTCs. Αυτό μένει να αποδειχθεί με μελέτες σύγκρισης που μέχρι τώρα δεν έχουν γίνει.

Όπως το ctDNA και τα CTCs έτσι και τα εξωσώματα μπορούν να αποτελέσουν πηγή ποιοτικών και ποσοτικών πληροφοριών. Οι ποσοτικές πληροφορίες περιλαμβάνουν αριθμούς εξωσωμάτων και ενημερώνουν για την παρουσία κακοήθους νόσου και όγκου. Για παράδειγμα ο αριθμός των εξωσωμάτων είναι αυξημένος στον καρκίνο μαστού και παγκρέατος. Ποιοτικές πληροφορίες μέσω του μοριακού χαρακτηρισμού των εξωσωμάτων είναι εύκολο να αποκτηθούν (18).



Σχήμα 1.2. Τα κύρια στοιχεία της υγρής βιοψίας (18)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ/ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ CTCs ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

2.1. Εισαγωγή

Η απομόνωση των CTCs και των εξωσωμάτων από το περιφερικό αίμα και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης είναι πολύ σημαντικά στις αναλύσεις υγρής βιοψίας (1). Ωστόσο, η ταυτοποίηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs είναι πολύ δύσκολος, καθώς αυτά τα κύτταρα είναι εξαιρετικά σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος για ανάλυση στις περισσότερες περιπτώσεις είναι πολύ περιορισμένη (1,4).

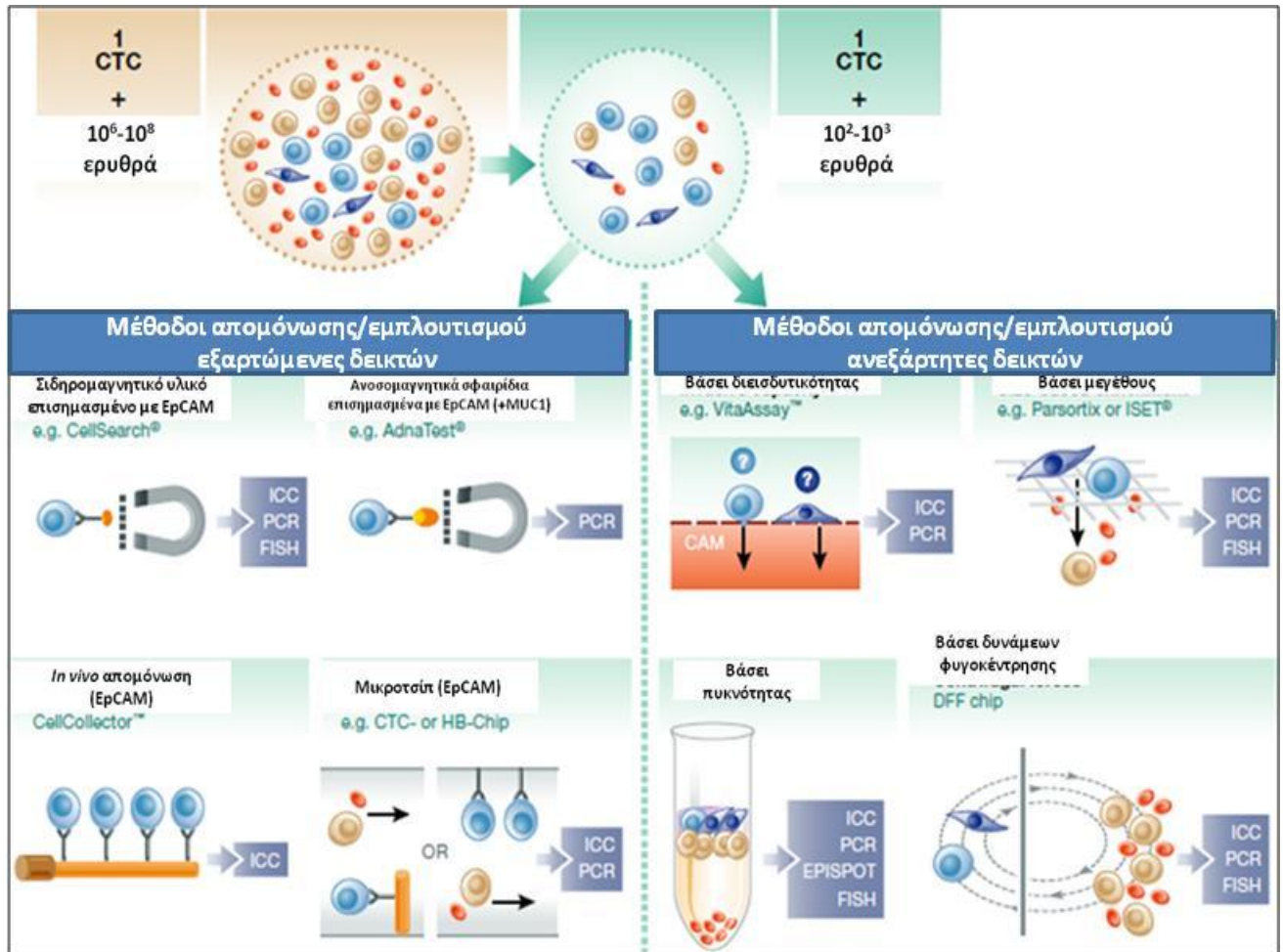
Ο εμπλουτισμός των CTCs είναι απαραίτητος πριν από τον μοριακό τους χαρακτηρισμό τους, κυρίως για τη μείωση της παρουσίας των **μονοπύρηνων λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)**. Ωστόσο, ο πληθυσμός των CTCs είναι εξαιρετικά ετερογενής και παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η ετερογένεια των CTCs και η φαινοτυπική διαφοροποίησή τους περιπλέκουν τον εμπλουτισμό τους και τον επακόλουθο φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό (1,3).

2.2. Τεχνικές απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs

Οι κυριότερες τεχνικές για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs πραγματοποιούν διαχωρισμό που βασίζεται στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην κυτταρική τους επιφάνεια, την πυκνότητα, το μέγεθος και τα ηλεκτρικά φορτία στις κυτταρικές μεμβράνες των CTCs. Μία συνοπτική εικόνα των συστημάτων απομόνωσης CTCs παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.1**. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία συσκευών μικροροών και διήθησης για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των CTCs. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί προηγμένες τεχνολογίες για την *in vivo* απομόνωση των CTCs καθώς και για την απομόνωση καθαρών και βιώσιμων μονήρων CTCs.

Οι μέθοδοι που είναι εμπορικά διαθέσιμες χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, βάσει των διαφορετικών ιδιοτήτων των CTCs που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα αιμοποιητικά κύτταρα: α) τα συστήματα τα οποία εξαρτώνται από την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών στην επιφάνεια των CTCs και βασίζονται σε βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων και β) 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. Η αύξηση της απόδοσης της απομόνωσης επιτυγχάνεται με συνδυασμό των δύο αυτών κατηγοριών (1).



Σχήμα 2.1. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης CTCs βιοψία (προσαρμοσμένο στα ελληνικά με βάση το σχήμα των Lianidou E. And Hoon D.) (1)

2.2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού εξαρτώμενα από δείκτες

Στα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται συγκεκριμένοι βιοδείκτες που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια (π.χ. EpCAM και CD45). Τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την επιλογή συνδέονται είτε στην επιφάνεια της συσκευής είτε σε μαγνητικά σφαιρίδια, επιτρέποντας την απομόνωση των CTCs μέσω μαγνητικού πεδίου (59,60). Διάφορα αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs. Ανάμεσά τους το EpCAM είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, καθώς έχει δειχθεί πολλές φορές η κλινική σημασία των CTCs που έχουν απομονωθεί με αυτό τον τρόπο (1). Παρόλα αυτά στην προσέγγιση αυτή, παρουσιάζεται το μειονέκτημα της απώλειας κυττάρων που υποβάλλονται σε EMT διαδικασία. Για να ξεπεραστεί το παραπάνω πρόβλημα, έχει προταθεί η χρήση κι άλλων

ειδικών δεικτών, όπως οι CEA, EGFR, PSA, HER-2, MUC-1, EphB4, IGF-1R, cadherin-11 και TAG-72 (61,62). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της βιμεντίνης, ειδικό για CTCs που βρίσκονται σε EMT φάση (EMT-CTCs) (63). 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 θετικό αποτέλεσμα της θεραπευτικής αντιμετώπισης (63).

Η αρνητική επιλογή είναι μια διαφορετική προσέγγιση απομόνωσης εντελώς ανεξάρτητη από τον φαινότυπο των CTCs και βασίζεται στην αφαίρεση των μη καρκινικών κυττάρων του περιφερικού αίματος, αρχικά με λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μετέπειτα χρήση ειδικών δεικτών για τα λευκά αιμοσφαίρια όπως το CD45 και το CD61 (64,65).

Μια από τις προκλήσεις των μεθόδων απομόνωσης εξαρτώμενες από δείκτες, αποτελεί η μη ταυτοποίηση ενός καθολικού CTC αντιγόνου-δείκτη εξαιτίας της ετερογένειας των CTCs.

2.2.1.1. Θετική επιλογή

❖ Ανοσοσυγγένεια (immunoaffinity)

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. Παρά τα μειονεκτήματα που αντιμετωπίζουν οι τεχνολογίες απομόνωσης/εμπλουτισμού που βασίζονται σε επιθηλιακούς δείκτες, το σύστημα CellSearch[®] (Menarini Diagnostics, Italy) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση των CTCs καθώς είναι η μόνη μέθοδος που έχει λάβει έγκριση από τον FDA από το 2005, για την πρόγνωση και παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη (66–69). Αυτή η τεχνολογία μπορεί να ανιχνεύσει και να καταμετρήσει CTCs επιθηλιακού χαρακτήρα σε περιφερικό αίμα ανάμεσα σε εκατομμυρία λευκοκύτταρα, και βασίζεται σε ανοσομαγνητικό διαχωρισμό βασισμένο στο EpCAM. Στο CellSearch[®], ένας συνδυασμός ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των CTCs με βάση ειδικούς δείκτες όπως οι **κυτταροκερατίνες (cytokeratins, CK)** 8, 18 και 19, το CD45 και η πυρηνική χρώση 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI). Το σύστημα αυτό βασίζεται σε ένα συνδυασμό θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού των CTC και αυτοματοποιημένης ψηφιακής μικροσκοπίας. Βασικά πλεονεκτήματα του συστήματος αυτού είναι η ευκολία χρήσης και η υψηλή αναπαραγωγιμότητα. Το κύριο πλεονέκτημά του είναι ότι τα περισσότερα από τα στάδια της

ανάλυσης που χρησιμοποιούνται είναι 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, που επιτρέπει την ασφαλή μεταφορά και σταθερότητα του δείγματος. Το σύστημα CellSearch[®] μπορεί να ανιχνεύσει 1 CTC ανά 7,5mL περιφερικού αίματος με υψηλή αναπαραγωγιμότητα. Η αναλυτική ακρίβεια, η γραμμικότητα και η διαγνωστική του ευαισθησία επικυρώθηκαν για πρώτη φορά το 2004 (70). Οι Riethdorf et al διενήργησαν μια μελέτη επικύρωσης μέσω ενός αυστηρού προγράμματος κλινικών δοκιμών (67) και έδειξαν ότι οι μετρήσεις των CTCs παρέμειναν σταθερές για 72h μετά τη συλλογή των δειγμάτων αίματος, ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια ομάδα έδειξε επίσης ότι ο αριθμός των καταμετρούμενων CTCs στα ίδια δείγματα δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των νοσοκομείων, γεγονός που υποδηλώνει την υψηλή αναπαραγωγιμότητα της καταμέτρησης (67).

Ένα άλλο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα για τον εμπλουτισμό των CTCs με θετική επιλογή αποτελεί το AdnaTest (QIAGEN, Hilden, Germany) (**Σχήμα 2.2.i**). Η απομόνωση των CTCs με το σύστημα AdnaTest επιτρέπει τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων μέσω ενός συνδυασμού ειδικών επιθηλιακών αντισωμάτων και αντιγόνων για τον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών και του παχέος εντέρου. Το AdnaTest απομονώνει τα CTCs από 5mL ολικού αίματος, όχι αργότερα από 4h μετά τη λήψη του αίματος σε EDTA σωληνάρια ή μέσα σε 24h με τη χρήση των ειδικών σωληναρίων συλλογής αίματος AdnaCollect. Μετά τη λύση των κυττάρων πραγματοποιείται απομόνωση του mRNA των CTCs με τα AdnaTest Detect και στη συνέχεια ελέγχεται η ποιότητα και η ακεραιότητα του RNA. Η παρουσία των CTCs ανιχνεύεται με πολλαπλή RT-PCR και η ανίχνευση των μεταγράφων γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων. Μια συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση CTCs σε μεταστατικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού με το σύστημα CellSearch[®] και το AdnaTest, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δυο συστήματα παρουσιάζουν παρόμοια ευαισθησία. Από τους 55 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού οι 20/55 ταυτοποιήθηκαν ως θετικοί με το σύστημα CellSearch[®] και με το AdnaTest οι 29/55 (71). Αντίθετα, η μελέτη των Raimondi et al έδειξε ότι σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ταυτοποιήθηκαν CTCs στο 81% των ασθενών έναντι 21% με το σύστημα CellSearch[®] (72).

Μια άλλη τεχνολογία εμπλουτισμού με βάση τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό αποτελεί το MACS (magnetic cell shorter, MACS) (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Το MACS χρησιμοποιεί μαγνητικά σφαιρίδια ή νανοσφαιρίδια διαμέτρου 10-85nm, επισημασμένα με ειδικό αντίσωμα έναντι του EpCAM ή του CD45, τα οποία εκτίθενται στη συνέχεια σε

μαγνητικό πεδίο. Το δείγμα περνάει μέσα από ειδικά διαμορφωμένη στήλη που μπορεί να μαγνητιστεί και να απομαγνητιστεί με την παρουσία ή απουσία μαγνητικού πεδίου αντίστοιχα, επιτρέποντας την απομόνωση και την έκλυση των μαγνητικά επισημασμένων κυττάρων (73,74).

Μια ακόμη τεχνολογία θετικής επιλογής αποτελεί το MagSweeper το οποίο αναπτύχθηκε στο Stanford (Illunina, USA). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί ανοσομαγνητικά σφαιρίδια έναντι δεικτών της επιφάνειας επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία προστίθενται απευθείας σε δείγμα περιφερικού αίματος (**Σχήμα 2.2.ii**). Πραγματοποιείται στη συνέχεια ο εμπλουτισμός των CTCs και η απομάκρυνση των αδέσμευτων κυττάρων με χρήση φυγόκεντρων δυνάμεων (75,76). Το MagSweeper έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του γενετικού προφίλ των CTCs σε πολλές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της πρώτης μελέτης του μεταγραφικού προφίλ μονήρων κυττάρων στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού, με την ανίχνευση *PIK3CA* μεταλλάξεων στα CTCs (77). Επιπλέον έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες αλληλούχισης του mRNA, όπως και whole exome sequencing σε καρκίνο προστάτη παχέος εντέρου (78).

❖ Συστήματα μικροροών σε συνδυασμό με ανοσοδιαχωρισμό

Η πρώτη συσκευή που χρησιμοποίησε τεχνολογία μικροροών για την απομόνωση των CTC περιγράφηκε το 2007 από τους Nagrath et al (79). Το λεγόμενο CTC-Chip ήταν ένας θάλαμος πυριτίου που περιείχε 78.000 μικροπόρους επιστρωμένους με EpCAM αντίσωμα, όπου τα παγιδευμένα στους μικροπόρους CTCs, γίνονταν ορατά με χρώση έναντι της κυτταροκερατίνης ή άλλων ειδικών δεικτών (79).

Η ανάπτυξη του CTC-Chip αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη μιας σειράς νέων τεχνικών μικροροής για τον εμπλουτισμό των CTCs. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί το σύστημα GEDI (geometrically enhanced differential immunocapture, GEDI). Το σύστημα GEDI συνδυάζει το θετικό εμπλουτισμό χρησιμοποιώντας αντισώματα παγιδευμένα σε μικροπόρους, με υδροδυναμική χρωματογραφία, για να περιορίσει τη μη ειδική προσκόλληση λευκοκυττάρων. Η υδροδυναμική χρωματογραφία διαχωρίζει τα κύτταρα με βάση το μέγεθός τους. Στην πρώτη εφαρμογή του συστήματος GEDI χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα έναντι του ειδικού μεμβρανικού προστατικού αντιγόνου (prostate specific membrane antigen, PSMA) για την δέσμευση των CTCs. Στη συνέχεια το GEDI χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση CTCs που ορίζονται ως PSMA⁺/CD45⁻, από ασθενείς με ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη και συγκρίθηκε με το σύστημα CellSearch[®] (80,81).

Ένα άλλο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα μικροροών σε συνδυασμό με ανοσοδιαχωρισμό αποτελεί το OncoCEE (cell enrichment and extraction, CEE) (Biocept, San Diego, USA). Το OncoCEE χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό αντισωμάτων για την προσκόλληση των CTCs που περιλαμβάνει επιθηλιακούς (π.χ. HER2, MUC1, EGFR, TROP2) και μεσεγχυματικούς δείκτες (π.χ. N-καδερίνη) (82). Τα δείγματα που εμπλουτίστηκαν με τη χρήση μείγματος αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του EpCAM, φάνηκε να έχουν καλύτερη δέσμευση των κυττάρων σε σχέση με αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο το EpCAM. Για την περαιτέρω ανίχνευση των CTCs, το OncoCEE χρησιμοποιεί ένα *in situ* πρωτόκολλο χρώσης με φθορισμό των αντισωμάτων που προσδενονται στα CTCs. Σε μια κλινική μελέτη, το OncoCEE ανίχνευσε CK⁺/CD45⁻ CTCs σε 19/36 (53%) δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης υψηλή συμφωνία (79%) στην έκφραση των ER/PR υποδοχέων στα CTCs και στην βιοψία από τον πρωτοπαθή ή μεταστατικό όγκο (83).

Τα ανωτέρω συστήματα, παρόλο που είναι πολλά υποσχόμενα, απαιτούν τη χημική τροποποίηση της επιφάνειάς τους για την παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα, εξαιτίας ενδογενών περιορισμών. Επιπλέον, οι τρέχουσες τεχνικές ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των CTCs εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ανοσοκυτταροχημεία και άλλες τεχνικές που απαιτούν απεικόνιση υψηλής ανάλυσης που είναι δύσκολη με την παρουσία αδιάφανων τριών διαστάσεων συστοιχιών.

Αυτοί οι περιορισμοί οδήγησαν στην ανάπτυξη συστημάτων μικροροών όπως είναι το HB-chip (herringbone, HB) (84), το GEM-chip (geometrically enhanced mixing, GEM) (85) και το GO-chip (graphene oxide, GO) οξειδίου του γραφενίου (86). Αυτές οι συσκευές χρησιμοποιούν επιφάνειες επικαλυμμένες με αντισώματα για την καλύτερη προσκόλληση και δέσμευση των CTCs. Η απλοποιημένη αρχιτεκτονική των συσκευών αυτών είναι καταλληλότερη για μεγάλης κλίμακας παραγωγή και επιτρέπει επίσης την κατασκευή διαφανών συσκευών για την καλύτερη απεικόνιση. Επίσης έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν υψηλές ταχύτητες ροής 1-3mL/h, 3,6 mL/h και 4,8 mL/h για το GO-chip, το GEM-chip και το HB-chip αντίστοιχα. Τόσο το HB-chip όσο και το GEM-chip, βασίζονται στην ανάμιξη κυττάρου-αντισώματος μέσω μικροκαναλιών με τη χρήση διασταυρούμενης ροής. Αντιθέτως, το GO-chip χρησιμοποιεί ένα νανοφύλλο οξειδίου του γραφενίου με EpCAM αντίσωμα προσροφημένο σε επιφάνεια χρυσού με 58.957 μοτίβα σε σχήμα λουλουδιού, προς διευκόλυνση της δέσμευσης των CTCs. Το GO-chip χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την απομόνωση CTCs από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, καρκίνο παγκρέατος και πρώιμο καρκίνο πνεύμονα (87).

Μια τεχνολογία που χρησιμοποιεί μια ανοσομαγνητική προσέγγιση σε μικροκλίμακα για την απομόνωση των CTCs είναι το Ephesia-chip (88). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιεί

μικροσυστοιχίες για να δημιουργήσει μαγνητικές παγίδες που προάγουν την αυτόματη συναρμολότητα λειτουργικών μαγνητικών σφαιριδίων με μια συστοιχία 48.000 στηλών σε ένα κανάλι. Συνδυάζει λοιπόν τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό με τον εμπλουτισμό με μικροστήλες ξεπερνώντας έτσι κάποιους από τους περιορισμούς της απομόνωσης με συστοιχίες μικροστηλών, δίνοντας παράλληλα τη δυνατότητα υψηλής απόδοσης της συσκευής με πάνω από 3mL/h (**Σχήμα 2.2.iii**) (89).

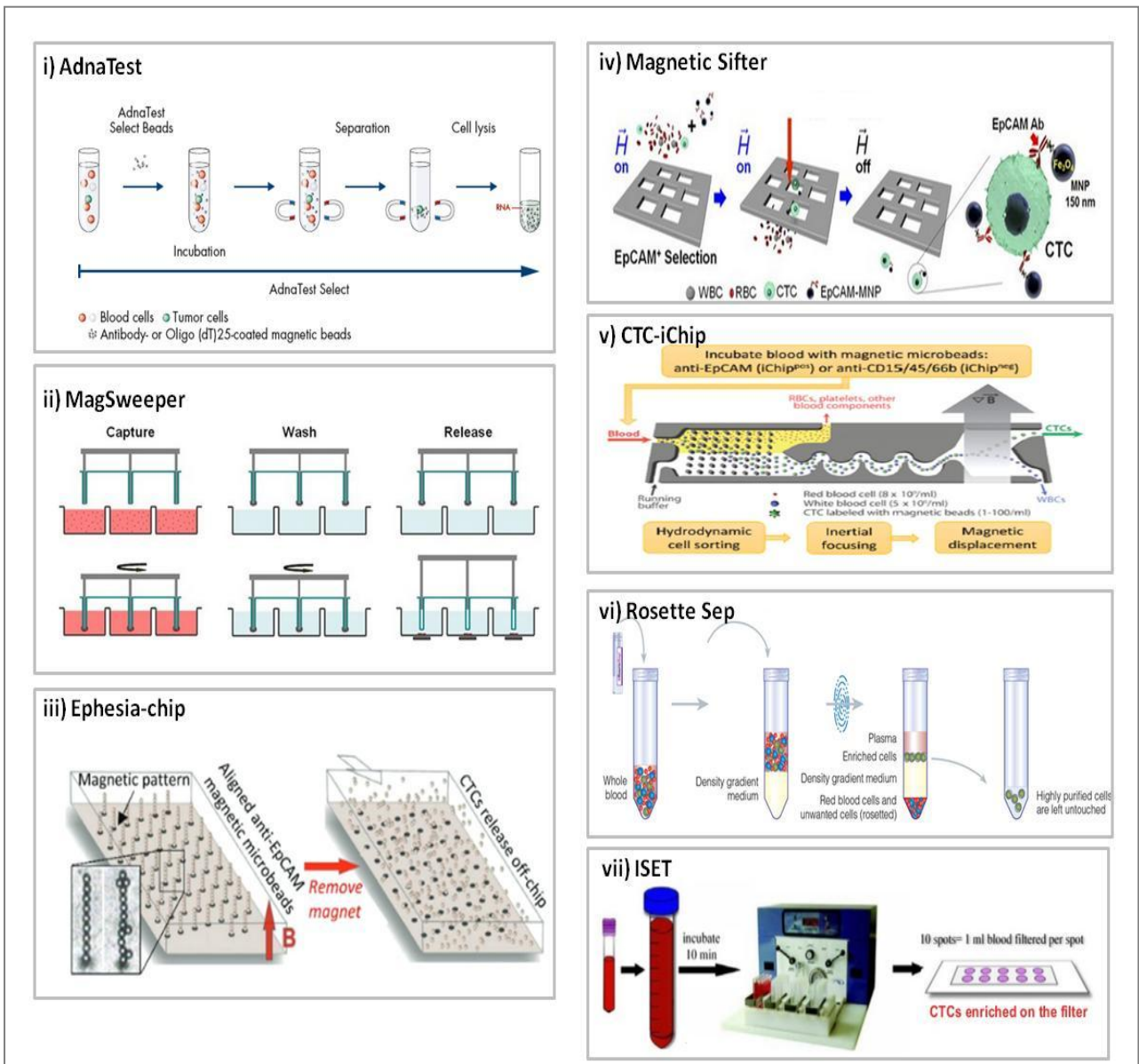
Το Magnetic Sifter είναι ένα άλλο σύστημα μικροροών σε συνδυασμό με ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό (**Σχήμα 2.2.iv**) (90). Σε αντίθεση με τα άλλα συστήματα μικροροών, το Magnetic Sifter χρησιμοποιεί διαμόρφωση κατακόρυφης ροής που «κοσκινίζει» το δείγμα μέσω μιας πυκνής συστοιχίας 3.808 τετραγωνικά μαγνητικών πόρων (40x40μm) τοποθετημένα σε σχήμα κηρήθρας. Αυτή η μοναδική διαμόρφωση επιτρέπει υψηλή απόδοση δέσμησης των CTCs με παροχή 10 mL/h (90).

Δυο εμπορικά διαθέσιμα αυτοματοποιημένα συστήματα που συνδυάζουν το ανοσομαγνητικό διαχωρισμό με τις μικροροές είναι το LiquidBiopsy (Cyvenio Biosystems, USA) (91) και το IsoFlux (Fluxion Biosciences, USA) (92). Το σύστημα LiquidBiopsy χρησιμοποιεί μια ροή πολυστρωματικού περιβλήματος για την μείωση της μη-ειδικής δέσμησης στις μαγνητικές επιφάνειες. Το μονιμοποιημένο δείγμα, επισημασμένο με μαγνητικά νανοσωματίδια που φέρουν συνδυασμό αντισωμάτων, εισέρχεται στη συσκευή μικροροών μέσω ενός κεντρικού καναλιού ανάμεσα σε δυο προσαρμοσμένες ως προς την πυκνότητα, ροές διαλύματος. Καθώς το δείγμα ρέει μέσα από την περιοχή δέσμησης της συσκευής, ένα μεγάλο μαγνητικό πεδίο εκτρέπει τα επισημασμένα κύτταρα από το στρώμα του δείγματος μέσω του ανώτερου στρώματος του διαλύματος και της ανώτερης επιφάνειας όπου και δεσμεύονται. Αυτή η προσέγγιση πολυστρωματικής ροής επιτρέπει την υψηλή απόδοση με ρυθμό ροής 5 mL/h.

Η πλατφόρμα του IsoFlux αποτελείται από τρεις δεξαμενές ρευστών που συνδέονται μεταξύ τους με κανάλια μικροροής. Το δείγμα περνά μέσα από την περιοχή απομόνωσης με συνεχή ροή και με βέλτιστη ταχύτητα ώστε ο χρόνος παραμονής του στην περιοχή να είναι ο ιδανικός. Το πάνω μέρος της περιοχής απομόνωσης αποτελείται από ένα δίσκο πολυμερών χαμηλού βαθμού συγκόλλησης κάτω από ένα μαγνήτη. Το υψηλό μαγνητικό πεδίο προσελκύει καρκινικά κύτταρα με μαγνητικά σφαιρίδια επισημασμένα με αντίσωμα έναντι του EpCAM, ενώ οι βαρυτικές δυνάμεις και η ροή επηρεάζουν τα μη-δεσμευμένα κύτταρα ώστε να συνεχίσουν την κίνησή τους προς τη δεξαμενή αποβλήτων (87).

Το CTC-iChip αποτελεί μια εναλλακτική πλατφόρμα απομόνωσης CTCs από περιφερικό αίμα. Ο τρόπος απομόνωσης CTCs είναι είτε εξαρτώμενος, είτε ανεξάρτητος από δείκτες, επομένως έχει τη δυνατότητα εφαρμογής σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου (93). Το CTC-iChip είναι

ένα σύστημα μικροροής με ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Αρχικά χρησιμοποιούνται συστοιχίες μικροσφαιριδίων για το διαχωρισμό των μονοπύρηνων κυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος (π.χ. ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια), με ταξινόμηση με βάση το υδροδυναμικό τους μέγεθος. Στη συνέχεια, τα μεγαλύτερα κύτταρα που είναι οργανωμένα σε μια γραμμή χρησιμοποιώντας αδρανειακή εστίαση, προετοιμάζονται για το τρίτο βήμα της μαγνητοφόρησης (magnetophoresis). Τα CTCs διαχωρίζονται ανοσομαγνητικά από το υπόβαθρο των κυττάρων χρησιμοποιώντας θετικό ή αρνητικό εμπλουτισμό. Η αδρανειακή εστίαση πριν το μαγνητικό διαχωρισμό διευκολύνει την ακριβή παραμόρφωση είτε των CTCs είτε των λευκοκυττάρων και τα οδηγεί σε ροή συλλογής ή αποβλήτων αντίστοιχα, με ελάχιστη μαγνητική δύναμη. Το CTC-iChip μπορεί να επεξεργαστεί δείγματα με ταχύτητα 8mL/h (Σχήμα 2.2.v).



Σχήμα 2.2. Επιλεγμένα συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού: i) AdnaTest (72), ii) MagSweeper (75,76), iii) Ephesia-chip (88), iv) Magnetic Sifter (90), v) CTC-iChip (93), vi) Rosette Sep (94), vii) ISET (95)

2.2.1.2. Αρνητική επιλογή

Αυτή η προσέγγιση απομόνωσης είναι εντελώς ανεξάρτητη από τον φαινότυπο των CTCs και βασίζεται στην απάλειψη των μη καρκινικών κυττάρων του περιφερικού αίματος, αρχικά με λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μετέπειτα χρήση ειδικών δεικτών για τα λευκά αιμοσφαίρια τους το CD45 ή το CD61 (64,65). 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 ερυθρά κύτταρα αρχικά μεταξύ τους και μετά με τα λευκοκύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, αφαιρείται η πλειοψηφία των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων, εμπλουτίζοντας έτσι το δείγμα περιφερικού αίματος με CTCs, εάν αυτά υπάρχουν. Το σύστημα RosetteSep™ έχει επιδείξει καλύτερα αποτελέσματα, σε σύγκριση με τη μέθοδο φυγοκέντρησης διαβαθμισμένης πυκνότητας (Σχήμα 2.2.vi) (94).

Ορισμένες συσκευές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για το θετικό εμπλουτισμό, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν και ως τεχνολογίες αρνητικού εμπλουτισμού με την εφαρμογή διαφορετικών αντισωμάτων, αφού δεν απαιτούνται άλλες αλλαγές σε αυτές τις συσκευές. Δυο τέτοια συστήματα, που χρησιμοποιούνται τόσο για θετική όσο και για αρνητική επιλογή, είναι το MACS και το CTC-ichip (93,96). Η ευελιξία αυτών των συσκευών τις καθιστά ειδικές στην απομόνωση διαφορετικών υποπληθυσμών των CTCs λαμβάνοντας υπόψη την ετερογένειά τους.

2.2.2. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει των βιοφυσικών ιδιοτήτων

Τα συστήματα αυτά είναι ανεξάρτητα των δεικτών που εκφράζονται στα CTCs και βασίζονται σε φυσικές ιδιότητες των κυττάρων όπως το μέγεθος, η πυκνότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, οι φυγόκεντρες δυνάμεις και η πλαστικότητα τους.

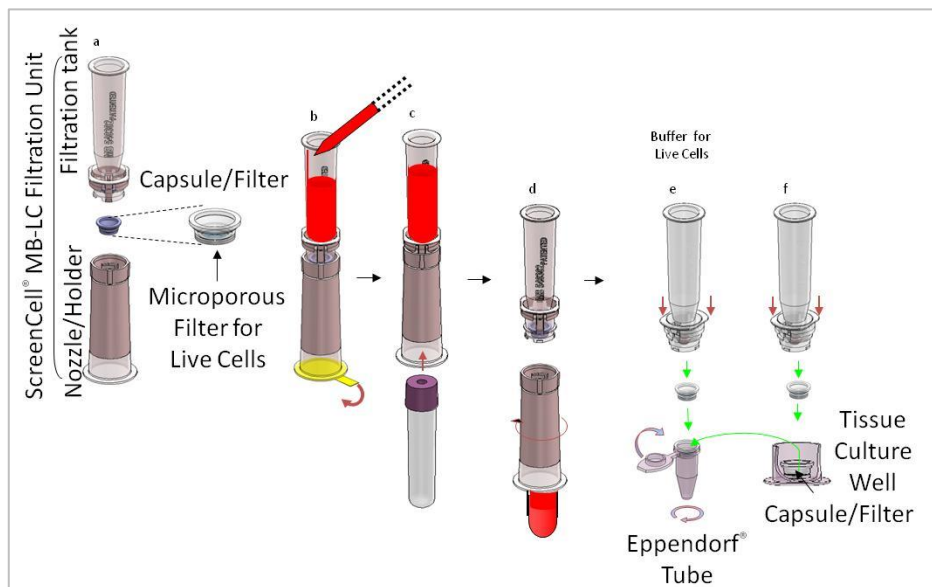
2.2.2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει του μεγέθους ή/και της παραμορφωσιμότητας των κυττάρων

Οι τεχνολογίες απομόνωσης/εμπλουτισμού των CTCs με βάση το μέγεθος λειτουργούν σύμφωνα με την αρχή ότι τα CTCs έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα λευκά αιμοσφαίρια. Οι μέθοδοι μικροεπεξεργασίας οδήγησαν στην ανάπτυξη πιο εξελιγμένων τεχνικών για την παραγωγή μικροφίλτρων διαφόρων ειδών.

Τα συστήματα απομόνωσης με βάση το μέγεθος διαχωρίζουν άμεσα τα CTCs λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους (~6,5-10μm) από τα λευκά αιμοσφαίρια. Η πρώτη συσκευή

φιλτραρίσματος περιγράφηκε από τους Vona et al το 2000 και χρησιμοποιείται έως σήμερα (95). Πρόκειται για το σύστημα ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) (RareCells, France), το οποίο είναι ικανό να ανιχνεύσει ένα κύτταρο σε 1mL αίματος, με απλό και γρήγορο τρόπο (Σχήμα 2.2.vii) (95). Τα απομονωμένα μέσω του ISET CTCs μπορούν να ανακτηθούν από το φίλτρο και να αξιολογηθούν με ανοσοφθορισμό, fluorescent in situ hybridization (FISH) ή μοριακή γενετική ανάλυση (97). Το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση ALK θετικών (98) και ROS θετικών (99) CTCs με επιθηλιακό/μεσεγχυματικό φαινότυπο σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα καθώς επίσης και σε μια σειρά άλλων τύπων καρκίνου.

Ένα άλλο εμπορικά διαθέσιμο φίλτρο είναι το ScreenCell[®] (Screencell SA, France), το οποίο παρέχει τρία φίλτρα: i) ένα για την απομόνωση ζωντανών ή μονιμοποιημένων κυττάρων (ScreenCell[®] Cyto), ii) ένα για την απομόνωση ζωντανών κυττάρων για καλλιέργεια (ScreenCell[®] CC) και iii) ένα για την απομόνωση κυττάρων για μοριακές εφαρμογές (ScreenCell[®] MB) (Σχήμα 2.3)(100–103).



Σχήμα 2.3. Σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού βάσει μεγέθους ScreenCell[®] MB (<http://www.screencell.com>)

Το σύστημα Cellsieve (CREATV microtech, USA), 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 (104).

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 τη μελέτη με μοριακές τεχνικές (105–107). Η τεχνολογία 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 (108). Το βασικό πλεονέκτημα του συστήματος Parsortix™ είναι ότι διαχωρίζει τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος ανεξάρτητα από το αν εκφράζεται το EpCAM στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Σε μια πρόσφατη μελέτη το σύστημα Parsortix™ χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό των CTC που απομονώθηκαν με τη λευκαφαίρεση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού (109).

2.2.2.2. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης 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 πολυμορφοπύρηνια κύτταρα, συγκεντρώνοντάς τα σε ένα μεσοδακτύλιο (110). 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) (111), ενώ έχουν αναπτυχθεί και άλλα μέσα, όπως είναι η χρήση του **διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (red cell lysis buffer, RCL)**. Τα ποσοστά ανάκτησης CTCs, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από πειράματα σε κυτταρικές σειρές, ήταν της τάξεως του 80-90% (112).

Το σύστημα OncoQuick (Greiner BioOne, Germany) συνδυάζει τη φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας με τη διήθηση μέσω ενός πορώδους φράγματος από το οποίο διέρχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και ένα μέρος των λευκών αιμοσφαιρίων (113,114). Το RosetteSep™, που περιγράφηκε παραπάνω, αποτελεί και αυτό ένα σύστημα που χρησιμοποιεί τη διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση σε συνδυασμό όμως με τη χρήση ειδικών δεικτών.

2.2.2.3. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με διηλεκτροφόρηση

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 των κυττάρων. Ανάλογα με τον φαινότυπο και τη μορφολογία τους, τα διαφορετικά κύτταρα έχουν διαφορετικές διηλεκτρικές ιδιότητες κι αυτό αποτελεί τη βασική αρχή για την ηλεκτροκινητική απομόνωση

των CTCs. Τα CTCs διαφέρουν πολύ από τα PBMCs σε σχέση με τη μορφολογία και τις διηλεκτρικές τους ιδιότητες (115).

Το σύστημα DEParrayTM (Menarini Diagnostics, Italy) επιτρέπει την απομόνωση μονήρων και απολύτως καθαρών CTC από προ-εμπλουτισμένα δείγματα αίματος μέσω διηλεκτροφόρησης (116). Η τεχνολογία αυτή είναι εντελώς ανεξάρτητη από την έκφραση αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και αξιολογείται, επί του παρόντος, σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες, προάγοντας έτσι δυνατότητες ανάλυσης μονήρων CTC (117). Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τεχνολογίες, όπως το CellSearch[®] για περαιτέρω μοριακό χαρακτηρισμό των μονήρων CTCs (118,119).

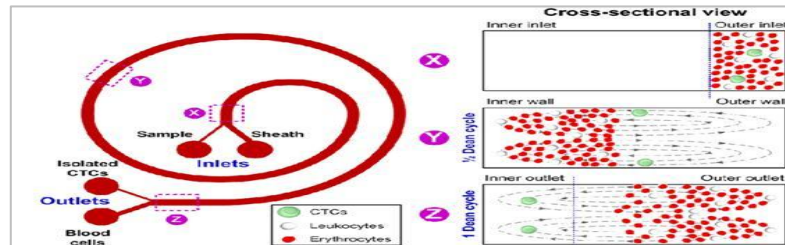
2.2.2.4. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με αδρανειακή εστίαση (inertial focusing)

Η αδρανειακή εστίαση διαχωρίζει τα CTCs από τα άλλα κύτταρα του αίματος βάσει του μεγέθους, μέσω της εφαρμογής αδρανειακών αποτελεσμάτων (inertial effects) σε συσκευές μικροροής χρησιμοποιώντας δυο δυνάμεις: i) μια διατμητική δύναμη ανύψωσης που προκύπτει από τη στρωτή ροή parabolic profile characteristic of laminar flow και κατευθύνει τα κύτταρα προς τα τοιχώματα των καναλιών και ii) μια δύναμη ανύψωσης λόγω της επίδρασης το τοιχώματος των καναλιών η οποία κατευθύνει τα κύτταρα μακριά από τα τοιχώματα. Η μεγέθυνση και η κατεύθυνση αυτών των δυνάμεων διέπονται/εξαρτώνται από τις διαστάσεις των καναλιών, το λόγο των διαστάσεων, το ρυθμό ροής και τη διάμετρο των σωματιδίων (87).

Σε μία άλλη πλατφόρμα εμπλουτισμού, το σύστημα Vortex (Vortex Biosciences, USA), προηγείται η αδρανειακή εστίαση για την τοποθέτηση των κυττάρων κατά μήκος των τοιχωμάτων των καναλιών και ακολουθούν μικροί στρόβιλοι σχεδιασμένοι να παγιδεύουν τα CTCs (120). Το μήκος του καναλιού επιτρέπει στα κύτταρα του αίματος να μεταναστεύουν φυσικά σε θέσεις ισορροπίας κατά μήκος τους. Τα παγιδευμένα CTCs παραμένουν στη συσκευή μέχρι να ξεπλυθούν από αυτή με διάχυση ρυθμιστικού διαλύματος με μειωμένο ρυθμό ροής. Το σύστημα αυτό που διαθέτει οκτώ κανάλια παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης 7,5mL περιφερικού αίματος σε 20min (120).

Η ClearCell[®]FX (Biolidics, Singapore) συνδυάζει την αδρανειακή μετανάστευση των κυττάρων με δευτερεύουσα ροή στα κανάλια με σπειροειδές σχήμα (121,122). Σε αυτά τα κανάλια μια δευτερεύουσα ροή προκύπτει ως συνέπεια της διαφορετικής ταχύτητας μεταξύ του κέντρου και των τοιχωμάτων του καναλιού. Το σπειροειδές κανάλι έχει τραπεζοειδή διατομή που βελτιώνει το διαχωρισμό καθώς τα μεγαλύτερα κύτταρα, στην περίπτωση αυτή τα CTC, τοποθετούνται κατά μήκος του κοντύτερου, εσωτερικού τοιχώματος του καναλιού καθώς τα μικρότερα κύτταρα

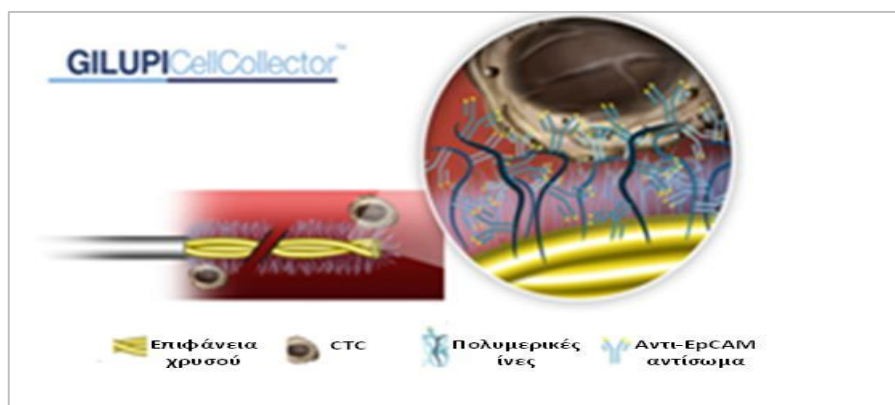
τοποθετούνται κατά μήκος του ψηλότερου, εξωτερικού τοιχώματος. Το σπυροειδές τσιπ διακλαδίζεται στο τέλος του σε εσωτερική και εξωτερική έξοδο συλλογής για τα CTCs και τα λευκά κύτταρα του αίματος. Το σύστημα αυτό παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης 7,5mL αίματος σε 8min και απαιτείται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων πριν τη χρήση του (Σχήμα 2.4) (121,122).



Σχήμα 2.4. Σύστημα απομόνωσης εμπλουτισμού με αδρανειακή εστίαση ClearCell®FX (<https://www.biolidics.com/clear-cell-fx1-system>)

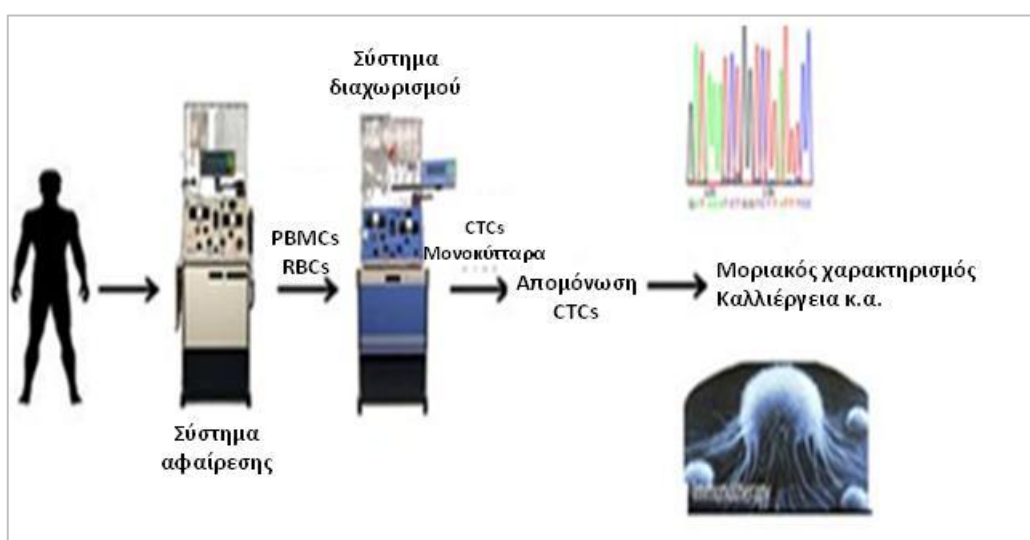
2.2.3. *In vivo* συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού

Ένα *in-vivo* σύστημα απομόνωσης CTC είναι το CellCollector (Gilupi GmbH, Germany). Το CellCollector είναι ένας νανοκαθετήρας (nanowire), που είναι επικαλυμμένος στην μήκος 2cm άκρη του με νανοσφαιρίδια χρυσού, πάνω στα οποία δεσμεύονται ομοιοπολικά χημικά αντισώματα έναντι του EpCAM (Σχήμα 2.5) (123). Το CellCollector τοποθετείται στη φλέβα του ασθενούς και επιτρέπει την *in vivo* σύλληψη των σπάνιων CTCs, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η προσέγγιση αυτή, θεωρείται ότι επιτρέπει την απομόνωση μεγαλύτερου αριθμού CTCs για περαιτέρω προσδιορισμούς σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές, που χρησιμοποιούν αρχικό όγκο περιφερικού αίματος 7-10mL. Επιπλέον, θα μπορούσε ενδεχομένως να αυξήσει τις πιθανότητες απομόνωσης CTCs στα αρχικά στάδια της νόσου, όπου αναμένονται πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο αίμα (124).



Σχήμα 2.5. *In vivo* σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs εξαρτώμενο από δείκτες, CellCollector (1)

Η διαγνωστική λευκαφαίρεση (Diagnostic Leukapheresis, DLA) είναι μια εργαστηριακή διαδικασία στην οποία τα λευκοκύτταρα ή τα βλαστοκύτταρα του περιφερικού αίματος διαχωρίζονται από το αίμα (Σχήμα 2.6). Κατά τη διάρκεια της λευκαφαίρεσης, το αίμα του ασθενούς διέρχεται μέσα από ένα μηχάνημα που αφαιρεί τα λευκοκύτταρα ή τα βλαστοκύτταρα και στη συνέχεια επιστρέφει το αίμα πίσω στον ασθενή. Το προϊόν της λευκαφαίρεσης, μπορεί επίσης να περιέχει CTCs. Οι Fischer et al εξέτασαν τα προϊόντα της DLA 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 (125). Τα συστήματα αυτά αποσκοπούν στο να ξεπεραστούν τα προβλήματα μικρού όγκου δειγμάτων ολικού αίματος, που προκύπτουν κατά τις *ex vivo* τεχνικές απομόνωσης.



Σχήμα 2.6. *In vivo* σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού CTCs, διαγνωστική λευκαφαίρεση (DLA) (126)

2.2.4. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού με απεικονιστικές μεθόδους

Παρά το γεγονός ότι ο εμπλουτισμός μειώνει τον αριθμό των υπο μελέτη κυττάρων, η απεικονιστική προσέγγιση για την μελέτη των κυττάρων αποτελεί μια χρονοβόρα διαδικασία. Για το λόγο αυτό, έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να αναπτύσσεται μια σειρά τεχνολογιών για τη βελτίωση της απεικόνισης μετά τον εμπλουτισμό και ορισμένα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα (π.χ. CellSearch[®], DEPAarray[™], Ariol[®]) έχουν ενσωματώσει επιτυχώς την αυτοματοποιημένη απεικόνιση φθορισμού πολύ υψηλής ανάλυσης στη ροή εργασίας τους.

2.2.4.1. Μέθοδοι απεικόνισης χωρίς εμπλουτισμό

Αρκετές απεικονιστικές πλατφόρμες έχουν αποφύγει το στάδιο του εμπλουτισμού με τη χρήση εξελιγμένων απεικονιστικών τεχνικών. Το σύστημα HD-CTC (Epic Sciences, USA) όχι μόνο

καθιστά δυνατή την καταμέτρηση των CTC μέσω απεικόνισης χωρίς εμπλουτισμό, άλλα παρέχει και τη δυνατότητα αξιολόγησης της έκφρασης πρωτεϊνικών βιοδεικτών με τη χρήση δοκιμασιών ανοσοφθορισμού υψηλής ανάλυσης (127).

Ένα άλλο σύστημα, το CytoTrack™ (CytoTrack ApS, Denmark) σαρώνει τα δείγματα σε υψηλές συχνότητες και καταγράφει τα πιθανά CTCs για επιπλέον ανάλυση και επαλήθευση. Χρησιμοποιεί ειδικό γυάλινο δίσκο, με πολύ μεγαλύτερη επιφάνεια από τις τυπικές μικροσκοπικές κυψέλες, πάνω σε ένα σαρωτή που τον περιστρέφει σε υψηλές ταχύτητες. Ένα σύστημα λέιζερ χρησιμοποιείται για τη σάρωση ολόκληρης της επιφάνειας του δίσκου (128).

Το σύστημα PAFC (photoacoustic flow cytometry, PAFC) αποτελεί μια μοναδική μέθοδο ανεξάρτητη δεικτών, όπου και με τη χρήση λέιζερ ανιχνεύονται τα CTCs σε πραγματικό χρόνο. Τα κύτταρα εντός της κυκλοφορίας του αίματος απορροφούν την ακτινοβολία, η οποία προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας και επακόλουθη δημιουργία ακουστικών κυμάτων που ανιχνεύονται με υπερηχογράφημα κοντά στη φλέβα. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται *in vivo* επιτρέποντας την χρήση μεγάλης ποσότητας αίματος κάτι που δεν καθίσταται δυνατόν *ex vivo* (129).

Πίνακας 2.1. Συστήματα απομόνωσης/εμπλουτισμού των CTCs

Κατηγορία	Τεχνολογία	Κριτήρια Επιλογής	Βασικά χαρακτηριστικά	Αναφορές
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ/ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΕΙΚΤΕΣ				
A. Ανοσοσυγγένεια -Θετική επιλογή				
1.Ανοσοσυγγένεια	CellSearch®	EpCAM	Έγκριση από FDA	(66–69)
	AdnaTest	Συνδυασμός αντισωμάτων	Απομόνωση CTCs, προσδιορισμός βιοδεικτών με RT-qPCR	(72)
	MACS	EpCAM	Θετική/αρνητική επιλογή	(73,74)
	MagSweeper	EpCAM	Υψηλή καθαρότητα, απόδοση 9mL/h	(75–78)
	Dynabeads® Epithelial Enriched	EpCAM	Ανοσομαγνητικά σφαιρίδια για την απομόνωση CTCs	
	CELLlection™ Epithelial Enrich Dynabeads®	EpCAM	Απομόνωση ζωντανών κυττάρων	
2.Συστήματα μικροροών				

i)Μικροστύλων	CTC-chip	EpCAM	Απόδοση 1-2mL/h	(79)
	GEDI	PSMA/HER2, μέγεθος	Ο διαχωρισμός βάσει μεγέθους ελαχιστοποιεί επιμολύνσεις	(80,81)
	OncCEE	Συνδυασμός αντισωμάτων		(82,83)
ii)Τροποποιημένη επιφάνεια	Herringbone Chip	EpCAM	Απόδοση 4,8mL/h	(84)
	GEM	EpCAM	Απόδοση 3,6mL/h	(85)
	GO-chip	EpCAM	επίπεδη γεωμετρία, απόδοση 1-3 mL/h	(86)
iii)Ανοσοσυγγένεια	Ephesia	EpCAM	απόδοση >3 mL/h	(88)
	Magnetic Sifter	EpCAM	διαμόρφωση κατακόρυφης ροής, απόδοση 10 mL/h	(90)
	LiquidBiopsy	Συνδυασμός αντισωμάτων	Αυτοματοποιημένο, συνεχόμενη ροής, απόδοση	(91)
	Isoflux	EpCAM	Αυτοματοποιημένο, συνεχούς ροής	(92)
	CTC-iChip	EpCAM, μέγεθος	Θετική/αρνητική επιλογή 8mL/h	
iv)in-vivo	GILUPI CellCollector	EpCAM	Μεγάλος όγκος περιφερικού αίματος	(123,124)
B. Ανοσοσυγγένεια -Αρνητική επιλογή				
1.Ανοσοσυγγένεια	EasySep™ Human	CD45	Απλό, εύκολο στη χρήση του	(130)
	RosseteSep™	Συνδυασμός αντισωμάτων	Θετική /αρνητική επιλογή	(94)
	QMS Quadrupole magnetic separator	CD45	Συνεχόμενη ροή	(131)
	MACS	EpCAM	Θετική/αρνητική επιλογή	(73,74)
2.Συστήματα μικροροών	CTC-iChip	EpCAM, μέγεθος	Θετική/αρνητική επιλογή 8mL/h	(93)
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ/ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ				
A. Βιοφυσικές ιδιότητες				
1.Φυγοκέντρηση	Ficoll-Paque®	Πυκνότητα	Φθηνή, εύκολη στη χρήση	(132)

διαβαθμισμένης πυκνότητας				
	OncoQuick	Πυκνότητα, μέγεθος		(113,114, 133)
	RosseteSep™	Πυκνότητα, συνδυασμός αντισωμάτων	Θετική /αρνητική επιλογή	(94)
	AccuCyte – CyteSealer™	Πυκνότητα	Εμπλουτισμός των CTC και χρήση CyteFinder και CytePicker	(134)
2.Με βάση το μέγεθος	ISET®	Μέγεθος	Χρήση φίλτρων διαμέτρου πόρων 8μm	(95,97–99)
	ScreenCell®	Μέγεθος	Υδρόφιλες επιφάνειες, συγκρατούν ζωντανά κύτταρα, μέγεθος πόρων 7.5/6.5μm	(100–103)
	CellSieve	Μέγεθος	Μέγεθος πόρων 7μm	(104)
	Flexible Micro Spring Array(FMSA)	Μέγεθος	Απομονώνει ζωντανά κύτταρα	(135)
	FaCTChecker	Μέγεθος		(136)
	Parsortix	Μέγεθος	Μέγεθος 6,5μm και 10μm	(105–109)
	VyCAP	Μέγεθος	Μικροδιήθηση	(137)
	MetaCell	Μέγεθος	Δυνατότητα απομόνωσης κυττάρων για κυτταροκαλλιέργεια	(138)
	Resettable Cell Trap	Μέγεθος		(139)
	Cluster Chip	Μέγεθος		(140)
3.Με αδρανειακή εστίαση	Vortex	Μέγεθος	Απομόνωση με βάση το μέγεθος με τη χρήση δυνάμεων αδράνειας για την κατεύθυνση των κυττάρων μέσα στη ροή	(120)
	ClearCell®FX	Μέγεθος	απόδοση 1-1,5mL/min	(121,122)
4.Με διηλεκτροφόρηση	ApoStream®		Διαχωρισμός των κυττάρων βασισμένος στην «ηλεκτρική υπογραφή» τους με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου	(141)
	DEPArray™		Απομόνωση μονήρων	(116–119)

			κυττάρων	
5.Με ακουστοφόρηση				(115)
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ/ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΜΕ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ				
1.Μέθοδοι απεικόνισης με εμπλουτισμό	MCC Microfluidic Cell Concentrator			(142)
	ImageStream	CK, CD45, DRAAQ5	Συνδυασμός κυτταρομετρίας ροής και μικροσκοπίου φθορισμού	(143)
2.Μέθοδοι απεικόνισης χωρίς εμπλουτισμό	EPIC	CK, CD45, DAPI		(144)
	FASTCell	CK, CD45, DAPI		(145)
	CytoTrack	CK, CD45, DAPI		(128)
3.in-vivo	PAFC Photoacoustic flow cytometry	Φασμα απορρόφησης		(129)

2.3. Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων

2.3.1. Υπερφυγοκέντρωση

Η υπερφυγοκέντρωση είναι μια διαδικασία φυγοκέντρωσης βελτιστοποιημένη ώστε να παράγονται εξαιρετικά υψηλές φυγόκεντρες δυνάμεις μέχρι 120.000g. Υπάρχουν δύο είδη υπερφυγοκέντρωσης, η αναλυτική και η προπαρασκευαστική. Η υπερφυγοκέντρωση αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς (gold standard) για την απομόνωση των εξωσωμάτων και είναι μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους (146). Η προπαρασκευαστική υπερφυγοκέντρωση χωρίζεται σε δυο κατηγορίες, i) την διαφορική και ii) την διαβαθμισμένης πυκνότητας. Η διαφορική υπερφυγοκέντρωση συνήθως αποτελείται από μια σειρά φυγοκεντρήσεων με διαφορετικές φυγόκεντρες δυνάμεις και διάρκειας φυγοκέντρωσης, για την απομόνωση των εξωσωμάτων που βασίζεται στις διαφορές της πυκνότητας και του μεγέθους σε σχέση με τα άλλα συστατικά του δείγματος. Στην υπερφυγοκέντρωση, η φυγόκεντρος δύναμη που χρησιμοποιείται συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 100.000g έως 120.000g. Πριν από την έναρξη της απομόνωσης, πραγματοποιείται ένα στάδιο καθαρισμού στο πλάσμα ή στον ορό για την απομάκρυνση των μεγάλων σωματιδίων από το δείγμα και ακολουθεί εμβολιασμός του δείγματος με αναστολείς πρωτεασών για την πρόληψη της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών των εξωσωμάτων. Μεταξύ των φυγοκεντρήσεων, το υπερκείμενο είτε αναρροφάται, εξαρτόμενο από τη φυγόκεντρο δύναμη, είτε το υπερκείμενο/πελέτα επαναιωρείται/αναδυσάλυεται σε κατάλληλο

μέσο και υποβάλλεται ξανά σε υπερφυγοκέντρωση. Τα εξωσώματα που απομονώνονται επαναιωρούνται/αναδυναμώνονται και φυλάσσονται στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση (147).

Μια άλλη μέθοδος υπερφυγοκέντρωσης είναι αυτή της διαβαθμισμένης πυκνότητας. Υπάρχουν δυο τύποι διαβαθμισμένης πυκνότητας υπερφυγοκέντρωσης, i) η ισόπυκνη και ii) η κινούμενης ζώνης. Η διαβαθμισμένης πυκνότητας υπερφυγοκέντρωση εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο για την απομόνωση EVs και κυρίως εξωσωμάτων. Ο διαχωρισμός των εξωσωμάτων επιτυγχάνεται με βάση το μέγεθος, τη μάζα και την πυκνότητά τους με τη χρήση ενός μέσου προκαθορισμένης συγκέντρωσης σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρωσης με σταδιακά μειούμενη πυκνότητα, από κάτω προς τα πάνω. Ένα δείγμα στοιβάζεται σαν μια στενή λωρίδα στην κορυφή του μέσου διαβαθμισμένης πυκνότητας που χρησιμοποιείται και πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρωση. Τα διάφορα συστατικά του δείγματος συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων, κινούνται ως μεμονωμένες ζώνες με διαφορετικό ρυθμό καθίζησης δημιουργώντας διακριτές στιβάδες. Τα εξωσώματα μπορούν να ανακτηθούν εύκολα με απλή συλλογή του κλάσματος (148).

Στην ισόπυκνη διαβαθμισμένης πυκνότητας υπερφυγοκέντρωση, ένα μέσο διαβαθμισμένης πυκνότητας περιλαμβάνει όλο το εύρος πυκνοτήτων των συστατικών ενός δείγματος και τοποθετείται σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης. Ο διαχωρισμός των εξωσωμάτων από τα άλλα διαλυμένα συστατικά γίνεται με διακριτές στιβάδες οι οποίες εξαρτώνται αποκλειστικά από την διαφορά της πυκνοτήτάς τους από εκείνη των άλλων συστατικών, με δεδομένο ότι έχει προηγηθεί επαρκής χρόνος φυγοκέντρωσης. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης τα εξωσώματα καθιζάνουν κατά μήκος του μέσου διαβαθμισμένης πυκνότητας με το οποίο έχουν την ίδια πυκνότητα (ισόπυκνη θέση). Μόλις τα εξωσώματα φτάσουν στην ισόπυκνη θέση τους, η φυγόκεντρος δύναμη τα συγκρατεί σε μια στιβάδα και τα διατηρεί εκεί. Τα εξωσώματα παραλαμβάνονται από τη στιβάδα, ακολουθεί μια σύντομη υπερφυγοκέντρωση για να δώσει καθαρά εξωσώματα και επαναιωρούνται για περαιτέρω ανάλυση.

Στην κινούμενης ζώνης διαβαθμισμένης πυκνότητας υπερφυγοκέντρωση, το δείγμα επιστοιβάζεται στην κορυφή του μέσου διαβαθμισμένης πυκνότητας που έχει χαμηλότερη πυκνότητα από οποιοδήποτε άλλο συστατικό του δείγματος. Σε αντίθεση με την ισόπυκνη υπερφυγοκέντρωση όπου ο διαχωρισμός των εξωσωμάτων εξαρτάται αποκλειστικά από τη διαφορά πυκνότητας από τα άλλα συστατικά, εδώ τα εξωσώματα διαχωρίζονται βάσει μεγέθους και μάζας. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει το διαχωρισμό EVs με παρόμοιες πυκνότητες αλλά διαφορετικά μεγέθη. Επειδή οι πυκνότητες των διαλυμένων συστατικών είναι μεγαλύτερες από αυτή του μέσου διαβαθμισμένης πυκνότητας η κινούμενης ζώνης υπερφυγοκέντρωση είναι δυναμική και όχι στατική. Συνεπώς, όλα τα διαλυμένα συστατικά θα καθιζάνουν με μορφή

πελέτας τον πυθμένα του σωληναρίου φυγοκέντρωσης όταν πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιούνται βελτιστοποιήσεις στο χρόνο φυγοκέντρωσης (148).

2.3.2. Μέθοδοι απομόνωσης βάσει μεγέθους

Μια από τις δημοφιλέστερες μεθόδους απομόνωσης με βάση το μέγεθος είναι η υπερδιήθηση (ultrafiltration). Οι βασικές αρχές της υπερδιήθησης δε διαφέρουν από την απλή διήθηση με μεμβράνη κατά την οποία ο διαχωρισμός των αιωρούμενων σωματιδίων γίνεται ανάλογα με το μέγεθος ή το μοριακό τους βάρος. Έτσι τα εξωσώματα μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους χρησιμοποιώντας κατάλληλα φίλτρα μεμβρανών με καθορισμένο μοριακό βάρος ή όρια αποκλεισμού μεγέθους (149). Επιπλέον, συμπυκνωτές νανομεμβρανών με μικρές περιόδους φυγοκέντρωσης έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση/εμπλουτισμό των εξωσωμάτων από ούρα ασθενών (150).

Το Exomir (Bioo Scientific, USA), είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ για την απομόνωση βάσει μεγέθους των εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά. Το Exomir χρησιμοποιεί μια σύριγγα με μεμβράνες για την ταχεία κλασματοποίηση των εξωσωμάτων και των άλλων EVs. Δυο μεμβράνες είναι τοποθετημένες διαδοχικά έτσι ώστε τα εξωσώματα να δεσμεύονται στην κατώτερη μεμβράνη και τα άλλα EVs να συγκρατούνται στην ανώτερη μεμβράνη. Στη συνέχεια ακολουθεί απομόνωση του RNA από τα εξωσώματα με λύση των εξωσωμάτων πάνω στη μεμβράνη στην οποία έχουν δεσμευτεί.

Μια άλλη διαδικασία που εφαρμόζεται για την απομόνωση των εξωσωμάτων, είναι η διαδοχική διήθηση. Συγκεκριμένα, στη μέθοδο αυτή εφαρμόζονται τρεις διαδοχικές διηθήσεις. Κατά την πρώτη διήθηση χρησιμοποιείται ένα φίλτρο με διάμετρο πόρων 100nm για την απομάκρυνση κυττάρων και των κυτταρικών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια δεύτερη διήθηση εφαπτόμενης ροής, ενώ στο τρίτο στάδιο το δείγμα διηθείται σε ένα φίλτρο με πόρους 100nm. Σε κάθε στάδιο πραγματοποιείται εκπλύση των μεμβρανών και παρακολουθείται η διαμεμβρανική πίεση. Η διαδοχική διήθηση επιτρέπει την απομόνωση των εξωσωμάτων με υψηλή καθαρότητα και διατήρηση των λειτουργικών τους ιδιοτήτων (151,152).

Στη **χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography, SEC)** τα μόρια των συστατικών του μίγματος διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, καθώς με τη βοήθεια της υγρής κινούμενης φάσης διέρχονται μέσω των πόρων της στήλης. Εμπορικά διαθέσιμα κιτ χρησιμοποιούν στήλες αποκλεισμού μεγέθους για την απομόνωση εξωσωμάτων μετά την αφαίρεση με φυγοκέντρωση ή διήθηση των μεγαλύτερων EVs. Μικρά μόρια όπως οι πρωτεΐνες

διατηρούνται στη στατική φάση ενώ τα μεγαλύτερα μόρια, όπως τα εξωσώματα, εκκλύονται ταχύτερα. Τα εξωσώματα μπορούν επομένως να απομονωθούν με συλλογή του εκκλυόμενου κλάσματος σε συγκεκριμένο χρόνο (153).

Μια άλλη τεχνική για την απομόνωση των εξωσωμάτων με βάση το μέγεθος είναι η F4 κλασματοποίηση ροής πεδίου. Καθώς μια παραβολική ροή εκτείνεται κατά μήκος του άξονα ενός ορθογώνιου καναλιού το οποίο φέρει το δείγμα προς το τέλος του καναλιού, μια άλλη διασταυρούμενη ροή στο κανάλι ελέγχει τη διατήρηση του δείγματος. Η διασταυρούμενη ροή διανέμει τα σωματίδια έναντι του τοιχώματος του καναλιού βασισμένη στη διάχυση των συστατικών. Τα μικρότερα σωματίδια διαχέονται περισσότερο από το τοίχωμα με αποτέλεσμα να εκκλύονται γρηγορότερα. Με την F4 έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχείς προσπάθειες απομόνωσης των εξωσωμάτων από καλλιέργειες ανθρώπινων βλαστοκυττάρων (154). Τέλος, μια άλλη τεχνική για την επεξεργασία μεγάλων όγκων δείγματος, αποφεύγοντας την υπερφυγοκέντρωση, αποτελεί η υδροστατικής διήθησης διάλυση (hydrostatic filtration dialysis, HFD) (155).

2.3.3. Μέθοδοι απομόνωσης βάσει της ανοσοσυγγένειας

Η παρουσία πολλών πρωτεϊνών και υποδοχέων στη μεμβράνη των εξωσωμάτων προσφέρει εξαιρετικές δυνατότητες ανάπτυξης τεχνικών υψηλής ειδικότητας για την απομόνωση εξωσωμάτων, βασιζόμενες στην ανοσοσυγγένεια μεταξύ αντιγόνων-αντισωμάτων και ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέα-προσδέτη. Ιδανικά, οι βιοδείκτες των εξωσωμάτων που χρησιμοποιούνται για απομόνωση είναι συνδεδεμένοι στη μεμβράνη, δεν υπάρχουν διαλυτά ομόλογά τους, και εκφράζονται μόνο ή βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στην επιφάνεια των εξωσωμάτων (156).

Τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση συνδέονται είτε στην επιφάνεια μιας συσκευής είτε σε μαγνητικά σφαιρίδια, επιτρέποντας την απομόνωση των εξωσωμάτων μέσω μαγνητικού πεδίου. Διάφορα αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των εξωσωμάτων. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η υψηλή καθαρότητα των εξωσωμάτων, επιτρέποντας έτσι την απομόνωση συγκεκριμένων υποσυνόλων εξωσωμάτων ανάλογα με το δείκτη επιφανείας. Ωστόσο αυτό αποτελεί ταυτόχρονα και μειονέκτημα καθώς μπορεί να μην απομονωθεί μεγάλος αριθμός εξωσωμάτων που δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο δείκτη.

Μια άλλη μέθοδος που βρίσκει εφαρμογή στην απομόνωση εξωσωμάτων είναι η δοκιμασία ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης σε μικροπλακίδια (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (156).

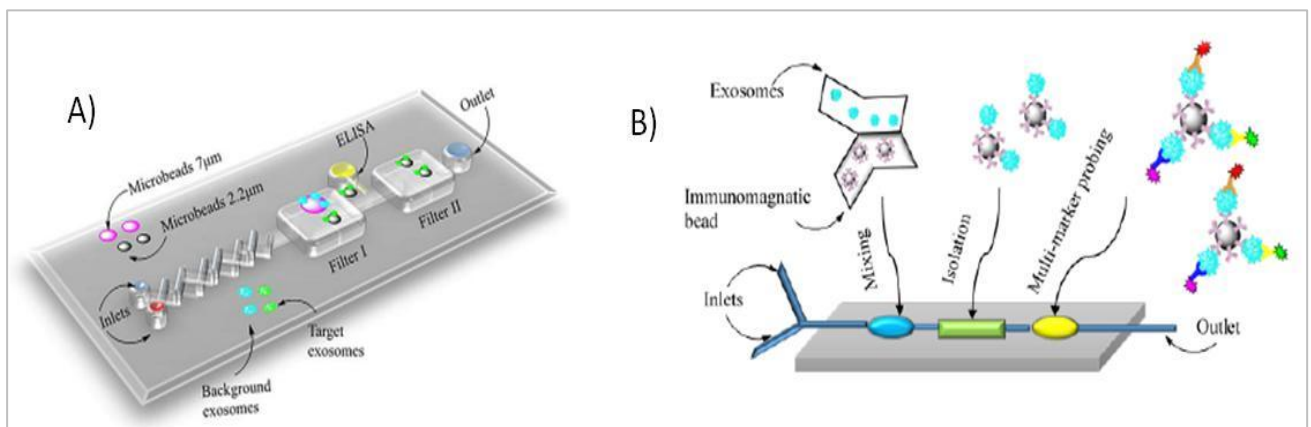
2.3.4. Μέθοδοι απομόνωσης με κατακρήμνιση

Μια άλλη συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομόνωση των εξωσωμάτων είναι η κατακρήμνιση με τη χρήση πολυμερών. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση πολυμερών όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG) για τη μείωση της διαλυτότητας των εξωσωμάτων ώστε να καταβυθιστούν με γρήγορη, χαμηλής ταχύτητας φυγοκέντρηση. Τα δείγματα επωάζονται με ένα διάλυμα κατακρήμνισης που περιέχει PEG. Μετά την επώαση στους 4°C, το ίζημα που περιέχει τα εξωσώματα απομονώνεται είτε με χαμηλής ταχύτητας φυγοκέντρηση είτε με διήθηση (149). Μια σειρά εμπορικά διαθέσιμων κιτ χρησιμοποιούν την αρχή αυτής της μεθόδου για την απομόνωση εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά ασθενών με καρκίνο.

2.3.5. Μέθοδοι απομόνωσης με τη χρήση συστημάτων μικροροών

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια αύξηση στην παραγωγή συστημάτων μικροροής για την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση τόσο των εξωσωμάτων όσο και των υπόλοιπων EVs. Τα συστήματα αυτά συνδυάζουν τις μικροροές τόσο με κλασικές μεθόδους απομόνωσης βάσει μεγέθους, πυκνότητας και ανοσοσυγγένειας όσο και με νέες καινοτόμες μεθοδολογίες όπως είναι οι ακουστικές, οι ηλεκτροφοριστικές και ηλεκτρομαγνητικές μέθοδοι. Με τη χρήση αυτών των μεθοδολογιών αναμένεται μείωση του όγκου του δείγματος για την απομόνωση εξωσωμάτων καθώς επίσης και σημαντικές μειώσεις των αντιδραστηρίων και του χρόνου απομόνωσης (157).

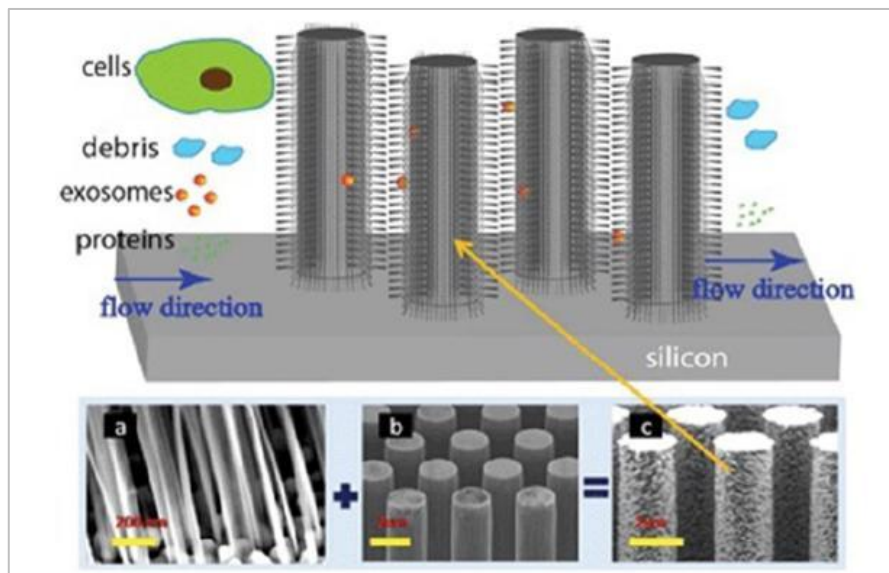
Τα συστήματα μικροροών σε συνδυασμό με ανοσοδιαχωρισμό/ανοσοσυγγένεια για την απομόνωση των εξωσωμάτων μπορούν να χωριστούν σε δυο βασικές κατηγορίες: i) συστήματα με τροποποιημένες εσωτερικές επιφάνειες και ii) συστήματα μικροροών με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (157–159).



Σχήμα 2.7. Συστήματα απομόνωσης εξωσωμάτων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (157)

Μια άλλη κατηγορία συστημάτων αποτελούν τα συστήματα μικροροών με τη χρήση μεμβρανών διήθησης. Οι Davies et al. ανέπτυξαν δυο συστήματα διήθησης μεμβρανών, μέσω πίεσης και μέσω ηλεκτροφόρησης, για την απομόνωση εξωσωμάτων. Και τα δυο συστήματα χρησιμοποιούν μια *in situ* παρασκευασμένη και ρυθμιζόμενη μεμβράνη νανοπόρων η οποία επιτρέπει στα εξωσώματα να περάσουν μέσα από τη μεμβράνη καθώς αφαιρεί τα μεγαλύτερα κύτταρα (160). Οι Cho et al. επίσης χρησιμοποίησαν την ηλεκτροφορητική μετανάστευση των ειδών αλλά σε συνδυασμό με μεμβράνη διάλυσης (μέγεθος πόρων 30nm) (161). Ένα άλλο σύστημα, το Exodisc, είναι βασισμένο στη διήθηση με τη χρήση δύο μεμβρανών (μέγεθος πόρων 20 και 600nm). Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι λόγω του μεγέθους των πόρων τα εξωσώματα συναπομονώνονται με άλλα EVs (162).

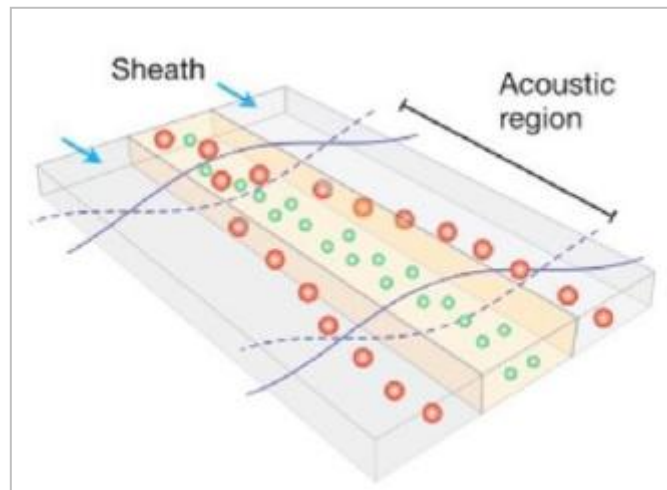
Η παγίδευση εξωσωμάτων σε νανοσωλήνες είναι μέθοδος για την απομόνωση των εξωσωμάτων (163) και η αρχή λειτουργίας της δίνεται στο **Σχήμα 2.8**.



Σχήμα 2.8. Σύστημα απομόνωσης εξωσωμάτων με τη χρήση νανοσωλήνων (163)

Η ακουστική απομόνωση είναι μια άλλη μέθοδος για απομόνωση εξωσωμάτων. Ένα ακουστικό σταθερό πεδίο που δημιουργείται σε ένα ρευστό μέσο παράγει διαφορικές δυνάμεις ακουστικής ακτινοβολίας που δρουν σε σωματίδια βυθισμένα σε ρευστό ανάλογα με τις ιδιότητες των σωματιδίων ως προς το μέγεθος, την πυκνότητα και την συμπίεση (164). Αυτή η αρχή έχει χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση μικροσωματιδίων σε μικροσφαιρίδια κατά την κατεύθυνση ροής σε τριχοειδές. Η μέθοδος της απομόνωσης με τη χρήση ακουστικών κυμάτων προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως οι ανέπαφοι χειρισμοί, γρήγορη ενεργοποίηση ρευστών και απλή κατασκευή. Οι Lee et al. με μετατροπείς ηλεκτροδίων αλληλεπίδρασης (interdigitated transducer electrodes, IDT) παρήγαγαν συμμετρικά στατικά ακουστικά κύματα κάθετα προς την

κατεύθυνση ροής μετακινώντας τα μεγαλύτερα σωματίδια προς τις πλευρικές εξόδους, διευκολύνοντας τη συλλογή των μικρών σωματιδίων στην κεντρική έξοδο (165).



Σχήμα 2.9. Σύστημα απομόνωσης εξωσωμάτων μέσω ακουστικών κυμάτων (165)

Η nano-DLD είναι μια τεχνική διαλογής σωματιδίων συνεχούς ροής που εφαρμόζεται σε συσκευές μικροροής που ενσωματώνουν διαβαθμισμένες συστοιχίες των οποίων η γεωμετρία καθορίζει ένα cutoff διαμέτρου (D_c). Τα σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από το D_c θα είναι μετατοπισμένα πλευρικά, ενώ τα μικρότερα σωματίδια ρέουν ακολουθώντας τη ροή του υγρού και δεν μετατοπίζονται πλευρικά με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η διαλογή τους (166).

Στη μέθοδο ιξωδοελαστικής ροής, ο διαχωρισμός των σωματιδίων καθορίζεται από ελαστικές δυνάμεις ανύψωσης δρώντας σε σωματίδια διαφορετικών μεγεθών σε ένα ιξωδοελαστικό μέσο. Οι Liu et al. σχεδίασαν ένα τσιπ το οποίο περιέχει αραιωμένο διάλυμα poly-(oxyethylene) (PEO) ως ιξωδοελαστικό για την ευθυγράμμιση των EVs κατά μήκος των πλευρικών τοιχωμάτων του καναλιού. Η βελτιστοποιημένη γεωμετρία του καναλιού, η συγκέντρωση του PEO και η ροή ρυθμίζουν τις ελαστικές δυνάμεις ανύψωσης του συστήματος με αποτέλεσμα τη συνεχή μετακίνηση των EVs προς την έξοδο στο κέντρο από όπου και συλλέγονται και τα εξωσώματα (167).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΝΕΩΤΕΡΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

3.1. Νεώτεροι μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

Το **πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)** αποτελεί μία ετερογενή ομάδα όγκων που χαρακτηρίζονται από βλάβες στη στοματική κοιλότητα, το λάρυγγα, το φάρυγγα, τους σιελογόνους αδένες και τον θυρεοειδή (168). Ο HNSCC είναι ο έκτος επικρατέστερος καρκίνος παγκοσμίως, με περίπου 780.000 νέες διαγνωσμένες περιπτώσεις και 350.000 θανάτους ετησίως (169). 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 (170).

Παρόλο που οι παράγοντες κινδύνου που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του HNSCC έχουν προσδιοριστεί, η τοπική υποτροπή και η μετάσταση αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την επιτυχία της θεραπείας (171). 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.

Η ανακάλυψη καθοριστικών μοριακών μονοπατιών που προωθούν την ανάπτυξη και την διατήρηση του όγκου σε συνδυασμό με την ανάπτυξη φαρμάκων, που προκαλούν αναστολή αυτών, έχει βελτιώσει σημαντικά τον περιορισμένο αριθμό επιλογών για τη θεραπεία ασθενών με HNSCC. Ο τομέας της εξατομικευμένης ιατρικής (personalized medicine) χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο, με σκοπό να προσαρμόσει νέα θεραπευτικά σχήματα σε καθορισμένους υπο-πληθυσμούς, και τελικά να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, ελαχιστοποιώντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες (172). Μέχρι σήμερα μόνο το cetuximab που στοχεύει το EGFR, το pembrolizumab και το nivolumab που στοχεύουν το PD-1 έχουν πάρει έγκριση από τον FDA για υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό HNSCC (173).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που εμποδίζουν τους υποδοχείς του ανοσοποιητικού, συνδέονται με τους ίδιους τους υποδοχείς ή τους προσδέτες τους, οι οποίοι εκφράζονται τόσο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Αντισώματα που στοχεύουν στην αναχαίτιση της σύνδεσης του PD-1 με το PD-L1 ή το PD-L2, οδηγούν στην επανενεργοποίηση των T κυττάρων και την επακόλουθη ανοσολογική απάντηση έναντι του όγκου. Ο FDA έχει εγκρίνει μέχρι στιγμής φάρμακα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του CTLA-4, PD-1 και PD-L1 (174). Μετά την επιτυχία της αναχαίτισης του μονοπατιού PD-1/PD-L1, έχει καταστεί πρωταρχικής σημασίας η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός παραγόντων στο

μικροπεριβάλλον του όγκου, οι οποίοι θα μπορούν να προβλέψουν ποιοι ασθενείς θα επωφελούνται από τη συγκεκριμένη θεραπεία. Η έκφραση των επιπέδων των PD-L1 και PD-L2 στον όγκο μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες, ενώ μελέτες υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης τους στην αρχή της anti-PD-1/PD-L1 θεραπείας έχουν ισχυρή συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η έκφραση του PD-L1 βασίζεται στην **ανοσοϊστοχημία (immunohistochemistry, IHC)** πριν την ανοσοθεραπεία και μπορεί να είναι ένας χρήσιμος, αλλά όχι καθοριστικός προβλεπτικός βιοδείκτης της ανταπόκρισης στον αποκλεισμό του μονοπατιού PD-1/ PD-L1, καθώς υπάρχουν μερικοί σημαντικοί παράγοντες, οι οποίοι καθιστούν δύσκολη την εφαρμογή του.

Η κλινική ανάπτυξη των μέχρι τώρα στοχευμένων θεραπειών που έχουν πάρει έγκριση για την εφαρμογή τους σε ασθενείς με HNSCC πραγματοποιήθηκε κατά κύριο λόγο σε μη-επιλεγμένες ομάδες ασθενών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα ποσοστά της ανταπόκρισης στη στοχευμένη θεραπεία να μην ξεπερνούν το 20% (175). Η αποτελεσματικότητα των μοριακών θεραπειών μπορεί να βελτιωθεί με την προεπιλογή ασθενών βάσει ενός κατάλληλου βιοδείκτη σύμφωνα με το γονίδιο στόχο και/ή το σχετικό με το σηματοδοτικό μονοπάτι. Συμπληρωματικές προσεγγίσεις της χρήσης τόσο της κλασικής όσο και της υγρής βιοψίας ως πηγές για το μοριακό προφίλ, μπορούν να αυξήσουν τη θετική και αρνητική προβλεπτική αξία των βιοδεικτών στην εξατομικευμένη θεραπεία (176). Έτσι λοιπόν βιοδείκτες βασισμένοι στα CTCs, θα μπορούσαν να αξιολογηθούν για την βελτιστοποίηση των θεραπευτικών στρατηγικών στον HNSCC (176).

Τα CTCs έχει διαπιστωθεί ότι έχουν προγνωστικό ρόλο στον HNSCC (176,177). Σε μια μελέτη, οι Hristozova et al. έδειξαν σημαντική συσχέτιση της ανίχνευσης των CTCs και της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων, που αντικατοπτρίζει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών από τον πρωτοπαθή όγκο σε περιφερικούς λεμφαδένες ή απομακρυσμένα όργανα (178). Μια μετα-ανάλυση οκτώ μελετών με συνολικά 433 ασθενείς, έδειξε σημαντικά υψηλότερη **πρόοδο νόσου (progression disease, PD)** στην ομάδα CTC θετικών ασθενών συμπεραίνοντας ότι η παρουσία των CTCs οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση συγκρινόμενη με τους ασθενείς που δεν ανιχνεύονται CTCs (179). Σε ασθενείς με χειρουργήσιμο HNSCC όπου δεν ανιχνεύτηκαν CTCs παρατηρήθηκε μεγαλύτερο **ελεύθερο νόσου διάστημα (disease-free survival, DFS)** (180).

Τα CTCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων έναντι των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (immune checkpoints) μέσω υγρής βιοψίας, προσφέροντας σημαντική πρόοδο στην κλινική πράξη. Σε μια πολυκεντρική μελέτη όπου αξιολογήθηκε ο ρόλος των CTCs, παρουσιάστηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πλήρους ή μερικής ανταπόκρισης και της μείωσης του αριθμού των CTCs κατά τη διάρκεια

της θεραπείας ή της απουσίας τους κατά τη διάγνωση (181). Οι Tinhofen et al. συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους ασθενείς που ελάμβαναν είτε επικουρική χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία ή επαγόμενη χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία με cetuximab, τα CTCs ανιχνεύτηκαν στο 29% των ασθενών (182). Ο αριθμός των CTCs αυξήθηκε σημαντικά μετά την ακτινοθεραπεία ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου από την επαγόμενη χημειοθεραπεία. Το EGFR ανιχνεύτηκε στο 100% και η φωσφορυλιωμένη του μορφή (pEGFR) στο 55% των CTC θετικών ασθενών. Η θεραπεία με cetuximab ήταν πιο αποτελεσματική στη μείωση των EGFR θετικών CTCs σε σχέση με τη χημειοθεραπεία, ωστόσο χρειάζεται να πραγματοποιηθούν πιο εκτεταμένες μελέτες (182). Οι Grobe et al. αξιολόγησαν την προγνωστική σημασία των CTCs και των DTCs (μυελός των οστών) σε ασθενείς με κυτταρικό καρκίνωμα του στόματος. Τόσο τα CTCs όσο και τα DTCs φάνηκε να αποτελούν ανεξάρτητους προβλεπτικούς παράγοντες του **διαστήματος επιβίωσης χωρίς την επανεμφάνιση της νόσου (recurrence free survival, RFS)** (183).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων έναντι των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού μέσω υγρής βιοψίας, προσφέροντας σημαντική πρόοδο στην κλινική πράξη. Η ερευνητική μας ομάδα ανέπτυξε μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδο RT-qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs ασθενών με HNSCC (184). Η μέθοδος είναι κατάλληλη για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων έναντι των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού μέσω του περιφερικού αίματος ασθενών με HNSCC και έχει υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με άλλες μεθόδους όπως η ανοσοϊστοχημεία, που χρησιμοποιείται σε ιστούς πρωτοπαθούς όγκου. Η υπερέκφραση του *PD-L1* στα CTCs στο τέλος της θεραπείας, συσχετίζεται με μικρότερο PFS και OS σε τοπικά προχωρημένο HNSCC. Οι Kulasinghe et al. έδειξαν επίσης ότι η έκφραση του *PD-L1* στα CTCs μπορεί να αποτελέσει ένα προβλεπτικό βιοδείκτη (185,186). Στην κλινική μελέτη φάσης Ib KEYNOTE-012 για το pembrolizumab στον HNSCC, η μέση ολική επιβίωση ήταν μεγαλύτερη για τους PD-L1 θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους PD-L1 αρνητικούς (187).

Η ανάλυση του 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 (188,189). Μελέτες έχουν δείξει ότι το ctDNA, που έχει απομονωθεί τόσο από το περιφερικό αίμα όσο και από τη σίελο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στον HNSCC (190,191). Σε μια μελέτη 93 ασθενών με HNSCC, προσδιορίστηκαν σωματικές μεταλλάξεις στο ctDNA (*TP53*, *PIK3CA*, *NOTCH1*, *CDKN2A*, *HRAS*, *NRAS*), ενώ ανιχνεύτηκαν επίσης στελέχη του ιού ανθρώπινων θηλωμάτων

(Human Papilloma Virus, HPV) (*HPV-16,-18*) (192). Μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* ανιχνεύτηκαν και με **droplet digital PCR (ddPCR)** στο ctDNA από το πλάσμα ασθενών με HNSCC (193). Σε HPV θετικούς HNSCC, η υπερέκφραση του γονιδίου *p16INK4a* που οδηγεί σε αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων του *PIK3CA* και απορρύθμιση του *FGFR3*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης, καθώς σχετίζεται με την μετάσταση και την κακή πρόγνωση στον HNSCC (194–196). Για τους HPV αρνητικούς HNSCC δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη μετάλλαξη ή βιοδείκτης (197).

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 (198). Στον HNSCC, το προφίλ μεθυλίωσης του DNA έχει προσδιοριστεί σε ιστό, σάλιο και πλάσμα. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των αλλαγών στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA και της εξέλιξης του HNSCC (199).

3.2. Νεώτεροι μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου και η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο στους άνδρες (169). Παρά την πρόοδο στο screening, τη χειρουργική επέμβαση, τις ορμονοθεραπείες και τη χημειοθεραπεία, κάθε χρόνο ~27.000 άνδρες εξακολουθούν να πεθαίνουν από μεταστατικό καρκίνο προστάτη στις ΗΠΑ (169,200).

Η σύγχρονη έρευνα στο πεδίο διάγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου του προστάτη στρέφεται πλέον στην ανεύρεση βιοδεικτών στο αίμα και συγκεκριμένα στα CTCs, στο ctDNA και στα κυκλοφορούντα miRNAs και στα EVs (8,201). Το **ειδικό προστατικό αντιγόνο (prostate-specific antigen, PSA)** και άλλοι καθιερωμένοι δείκτες δεν είναι από μόνοι τους ιδανικοί (202), εφόσον δεν έχουν την απαιτούμενη διαγνωστική ειδικότητα και προγνωστική αξία, καθώς φέρουν ένα υψηλό ποσοστό ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Κατά συνέπεια, η έλλειψη ειδικών και ευαίσθητων βιολογικών δεικτών για ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη σε αρχικά στάδια, αποτελεί μία πρόκληση για τη διερεύνηση νέων δεικτών, καθώς

και για την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων, για την αναγνώριση και την επικύρωση διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών για τον καρκίνο του προστάτη (201).

Η προγνωστική σημασία των CTCs, αξιολογούμενη με το σύστημα CellSearch[®], έδειξε ότι μεταστατικοί ασθενείς με ≥ 5 CTC/7,5mL περιφερικού αίματος έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με αυτούς που έχουν < 5 CTC/7,5mL. Ο αριθμός των ανιχνεύσιμων CTCs ποικίλει σε ασθενείς με πρώτης γραμμής θεραπεία, με δεύτερης γραμμής ή και με τρίτης γραμμής θεραπεία. Η διαφοροποίηση αυτή δείχνει το μοναδικό χαρακτηριστικό του βιοδείκτη που αποτελεί μέτρο του μεταστατικού δυναμικού (203,204). Κατά κύριο λόγο, τα ποσοστά ανίχνευσης 1 CTC/7,5mL και 5 CTC /7,5mL περιφερικού αίματος ήταν 75% και 25% αντίστοιχα. Καμπύλες επιβίωσης έχουν δείξει ότι η επιβίωση μειώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των CTCs. Η επιβίωση των ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύονται CTCs ποικίλλει, μια ένδειξη ότι η απουσία των CTCs δεν εξασφαλίζει ευνοϊκό αποτέλεσμα (205).

3.2.1. Ανδρογονικός υποδοχέας και τα εναλλακτικά μετάγραφα του ως βιοδείκτες στον καρκίνο προστάτη

Είναι πλέον γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του **ανδρογονικού υποδοχέα (androgen receptor, AR)** παραμένει κυρίαρχο στην ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου στην μεγαλύτερη πλειοψηφία του **μεταστατικού ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη (castration resistant prostate cancer, mCRPC)** ασθενών. Σε ασθενείς με mCRPC παρατηρείται ανεξαρτησία από τα ανδρογόνα και επικρατεί η υπόθεση ότι αυτή η ανεξαρτησία μπορεί να επηρεάζεται εν μέρει από την αυξημένη έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου *AR-V7*. Το *AR-V7* χαρακτηρίζεται από απάλιοψη του **καρβοξυτελικού άκρου του ανδρογονικού υποδοχέα (ligand-binding domain, LBD)** που αποτελεί το τμήμα σύνδεσης με το στεροειδές και κωδικοποιείται από το 3'-άκρο του εξονίου 4 και τα εξόνια 5-8. Η αυξημένη έκφραση του *AR-V7* οδηγεί πιθανά στην πλήρη έκφραση του *AR*. Επίσης καθώς το LBD αποτελεί τη θέση δέσμησης για τα αντιανδρογόνα όπως η ενζαλουταμίδη, το *AR-V7* σχετίζεται με μη ανταπόκριση σε αυτές τις θεραπείες και οδηγεί σε αντοχή στους mCRPC ασθενείς. Τα CTCs, το ctDNA και τα εξωσώματα αποτελούν πηγές του *AR-V7* για την εφαρμογή του ως βιοδείκτη στην υγρή βιοψία (206).

Οι μηχανισμοί ανάπτυξης του mCRPC δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως και είναι πιθανό να είναι πολυπαραγοντικοί. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι παρά τον ευνουχισμό, κάποια καρκινικά κύτταρα που παραμένουν, συνεχίζουν να αναπτύσσονται παρόλο που η τεστοστερόνη είναι σε χαμηλά ή σε μηδενικά επίπεδα. Μεταξύ των μηχανισμών που μπορεί να οδηγήσουν σε ορμονική αντίσταση έχουν ενοχοποιηθεί αλλαγές στη δομή του υποδοχέα και στη λειτουργία

του. Δομικές αλλαγές σχετίζονται με την ενεργοποίηση του AR απουσία τεστοστερόνης και την απώλεια του ελέγχου στην ανάπτυξη. Οι μεταλλάξεις στον AR λαμβάνουν χώρα αργά στο καρκίνο του προστάτη και ο πιο πιθανός μηχανισμός για την ανεξάρτητη των ανδρογόνων ανάπτυξη είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα από ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο δεν περιλαμβάνει την τεστοστερόνη (207). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την σηματοδότηση του AR σε ένα περιβάλλον με μειωμένα επίπεδα ανδρογόνων, όπως: i) μεταλλάξεις του AR που επιτρέπουν την ενεργοποίηση με χαμηλά επίπεδα ανδρογόνων, ii) ενίσχυση και υπερέκφραση του AR ή των εναλλακτικών του μεταγράφων, iii) αυξημένη τοπική ενδοκρινική σύνθεση ανδρογόνων, iv) αλλαγές στους συμπαράγοντες του AR οι οποίοι εμπλέκονται στην ανεξάρτητη ενεργοποίησή του και v) παρεμβολή από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Τα CTCs αντικατοπτρίζουν την κατάσταση της ενίσχυσης του AR στη βιοψία του ιστού. Όπως είναι αναμενόμενο για έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης του AR μέσα στα καρκινικά κύτταρα είναι επίσης σημαντικός. Για παράδειγμα έχει διαπιστωθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον εντοπισμό του AR στον πυρήνα με την αντίσταση στις ταξάνες (208) και σε μια δεύτερη μελέτη με 48 ασθενείς, η έκφραση διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων του AR στα CTCs επέτρεψε την ανίχνευση των CTCs που ήταν αρνητικά στις κυτταροκερατίνες και συνεπώς δεν είχαν ανιχνευτεί με το CellSearch Epithelial Cell Test (209). Για να εξεταστεί αν η θέση του AR είναι προβλεπτικός παράγοντας της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ειδικές κατηγορίες φαρμάκου, απαιτούνται προοπτικές κλινικές μελέτες που σχεδιάστηκαν για το συγκεκριμένο βιοδείκτη (201).

Τα εναλλακτικά μετάγραφα του AR και πιο συγκεκριμένα το *AR-V7*, έχει σχετιστεί με αντίσταση στην ενζαλουταμίδα και στην αμπιρατερόνη (210). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η έκφραση της πρωτεΐνης του *AR-V7* εκφράζεται σπάνια (~1%) σε πρωτοπαθή καρκίνο του προστάτη, αλλά εκφράζεται (~75%) σε mCRPC με μια περαιτέρω στατιστικά σημαντική αύξηση ($p=0.020$) μετά τη θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη ή ενζαλουταμίδα (211). Η σημασία της ανίχνευσης του εναλλακτικού μεταγράφου *AR-V7* στα CTCs σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Antonarakis et al. που έδειξαν ότι οι mCRPC ασθενείς που λάμβαναν ενζαλουταμίδα ή αμπιρατερόνη με *AR-V7* θετικά CTCs, εμφάνιζαν μικρότερη ολική επιβίωση με βάση τα επίπεδα του PSA σε σχέση με τους ασθενείς με *AR-V7* αρνητικά CTCs (212). Οι Antonarakis et al. επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματά τους σε μια μεγαλύτερη ομάδα 202 ασθενών με mCRPC που έλαβαν δευτερογενή/δεύτερης γραμμής ορμονοθεραπεία (ενζαλουταμίδα ή αμπιρατερόνη) (213). Συνολικά αλλά και χωριστά στην ορμονοθεραπεία πρώτης και δεύτερης γραμμής, οι ασθενείς που δεν είχαν CTCs είχαν ευνοϊκότερα αποτελέσματα, ακολουθούμενοι από αυτούς που ήταν CTCs θετικοί και *AR-V7*

αρνητικοί και τη χειρότερη είχαν οι CTCs θετικοί και *AR-V7* αρνητικοί. Πολλές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν αποδείξει την ικανότητα να ανιχνεύουν το *AR-V7* στα CTCs χρησιμοποιώντας μια σειρά από δοκιμασίες (213–216). Το *AR-V7* αποτέλεσε το επίκεντρο των μελετών που οδήγησαν στην πρώτη έγκριση του μοριακού χαρακτηρισμού των CTCs ως προβλεπτικού βιοδείκτη για την καθοδήγηση της επιλογής των ταξάνων έναντι των αναστολέων σηματοδότησης του *AR* σε καρκίνο προστάτη (212,217,218).

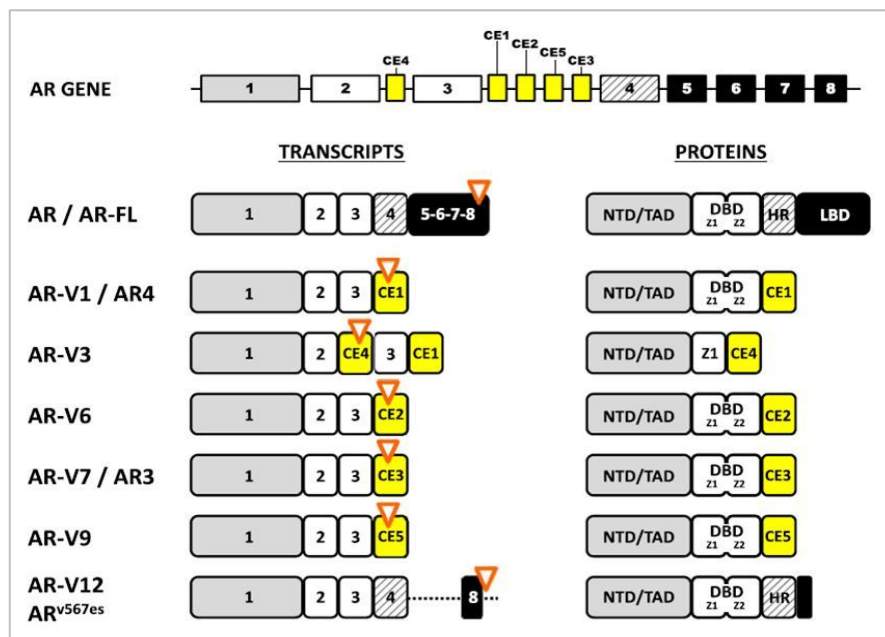
Οι δυο πιο αποδεκτές δοκιμασίες είναι i) αυτή που βασίζεται στον προσδιορισμό του mRNA χρησιμοποιώντας το AdnaTest Prostate Cancer Select and Detect kit (QIAGEN, Hilden, Germany) με επιπλέον εκκινητές για το *AR-V7* και *AR-FL* (212,213) και ii) η Epic Sciences που βασίζεται στον προσδιορισμό πρωτεϊνών *AR-V7* (219). Το AdnaTest Prostate Cancer Select and Detect kit χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες των Antonarakis et al (212).

Η πλατφόρμα Epic Sciences με την οποία γίνεται χρώση των κυττάρων και στη συνέχεια αυτόματη σάρωση με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, αναγνωρίζει τα CTCs και διαχωρίζει τα CTCs ως επιθηλιακά ($CK^+/CD45^-$) και σε μη επιθηλιακά ($CK^-/CD45^-$). Η πρώτη μελέτη περιλάμβανε 161 ασθενείς με mCRPC, με PD, που έπρεπε να αλλάξουν θεραπεία και να λάβουν είτε ορμονοθεραπεία νέας γενιάς (ενζαλουταμίδη ή οξική αμπιρατερόνη) είτε ταξάνες (218). Σε μία άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε κλινική επικύρωση του *AR-V7* ως βιοδείκτη (219). Τα αποτελέσματα έδειξαν χειρότερη έκβαση για τους ασθενείς με *AR-V7* θετικά CTC σε σχέση με τα *AR-V7* αρνητικά CTC που έλαβαν ορμονοθεραπεία νέας γενιάς καθώς και καλύτερη επιβίωση για εκείνους που έλαβαν θεραπεία με ταξάνες (219). Μια μεταγενέστερη ανάλυση έδειξε ότι η προβλεπτική σημασία εξαρτάται από τον εντοπισμό της πρωτεΐνης, καθώς η σχετιζόμενη με τη θεραπεία αλληλεπίδραση έδειξε ένα όφελος επιβίωσης για τους *AR-V7* θετικούς ασθενείς που τους χορηγήθηκε ταξάνη, που όμως δεν ήταν πλέον εμφανές όταν η θετικότητα άλλαξε από τα πυρηνικά εντοπισμένα *AR-V7*, σε μόνο πυρηνικά ή κυττροπλασματικά εντοπισμένα *AR-V7*. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μια ανεξάρτητη ομάδα ασθενών (219).

Η ανίχνευση του *AR-V7* mRNA και η πρωτεΐνη *AR-V7* στα CTCs έχει συσχετιστεί με αντίσταση στη θεραπεία με ενζαλουταμίδη και αμπιρατερόνη, έτσι τα *AR-V7* θετικά CTCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες στο αίμα για την πρόβλεψη ή την ανάπτυξη αντοχής σε θεραπείες που στοχεύουν το ανδρογονικό μονοπάτι. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η κατάσταση του *AR-V7* μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της χορήγησης αντιανδρογόνου (220–222) και επίσης ότι η κατάσταση του *AR-V7* στα CTCs του ίδιου ασθενούς μπορεί να διαφέρει λόγω ετερογένειας που μπορεί να συμβάλλει στην αντοχή στην θεραπεία (105).

Η πρώτη προοπτική μελέτη για την επικύρωση του *AR-V7* ως προβλεπτικό βιοδείκτη ονομάζεται PROPHECY. Η πολυκεντρική αυτή μελέτη για την ανίχνευση του *AR-V7* στα CTCs ασθενών με mCRPC περιλαμβάνει ασθενείς υψηλού κινδύνου που δεν είχαν λάβει χημειοθεραπεία (223)

Παρόλο που το *AR-V7* παραμένει το πλέον μελετημένο εναλλακτικό μετάγραφο του AR σε σχέση με την αντίσταση στην αμπιρατερόνη και την ενζαλουταμίδη, άλλα εναλλακτικά μετάγραφα (Σχήμα 3.1) έχουν ανιχνευτεί στα CTCs ασθενών με mCRPC και μπορούν να συμβάλλουν στα αποτελέσματα της ενδοκρινικής θεραπείας. Επιπλέον και άλλα μονοπάτια αντιανδρογονικής θεραπείας που δείχνουν ότι η κατάσταση του *AR-V7* μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει την αντίσταση που παρατηρείται κλινικά (201).



Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου του ανδρογονικού υποδοχέα AR full length (AR-FL) και των πλέον γνωστών εναλλακτικών του μεταγράφων (224)

3.2.2. Άλλοι μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη

Το χμιαρικό γονίδιο (gene fusion) *TMPRSS2-ERG* καθιστά δυνατή την από το AR οδηγούμενη έκφραση του ογκογονιδίου *ERG*, το οποίο είναι μια ειδική γενετική μεταβολή για τον καρκίνο προστάτη. Η προγνωστική αξία του *TMPRSS2-ERG* στα CTCs έχει διερευνηθεί σε αρκετές μελέτες ασθενών με mCRPC. Σε μια μελέτη με 41 ασθενείς που έλαβαν αμπιρατερόνη μετά από χημειοθεραπεία, το *TMPRSS2-ERG* ανιχνεύτηκε σε 15/41 ασθενείς (225). Σε αντίθεση με την καταμέτρηση των CTCs, το *TMPRSS2-ERG* δεν προέβλεψε κλινική έκβαση ή απόκριση στο PSA στους ασθενείς που λάμβαναν αμπιρατερόνη (225). Σε μια άλλη μελέτη οι Attard et al. αναφέρουν μια συσχέτιση μεταξύ των αναδιατάξεων του *ERG* και της απόκρισης στο PSA σε

ασθενείς που είχαν λάβει αμπιρατερόνη χωρίς να έχουν λάβει άλλη θεραπεία, σε ιστούς και σε CTCs (226). Επιπλέον, η μελέτη COU-AA-302 για την αμπιρατερόνη πριν από χημειοθεραπεία έδειξε ότι ασθενείς με *TMPRSS2-ERG* με αυξημένο αριθμό αντιγράφων χιμαιρικών αλληλουχιών είχαν μεγαλύτερο κλινικό όφελος από την θεραπεία με αμπιρατερόνη (227). Σε ασθενείς που έλαβαν δοσιταξέλη, η παρουσία *TMPRSS2-ERG* σε περιφερικό αίμα συσχετίστηκε με χειρότερη έκβαση σε σχέση με το PSA και PSA-PFS (228). Επόμενες μελέτες μένει να αποδείξουν ποια είναι η καταλληλότερη μεθοδολογία για τη μελέτη χιμαιρικών γονιδίων και αν είναι δυνατόν αυτά να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία ασθενών με mCRPC.

Μια άλλη μελέτη με 62 ασθενείς με mCRPC που τους χορηγήθηκε ενζαλουταμίδη ή αμπιρατερόνη έδειξε ότι η πολλαπλή ενίσχυση του AR στο ctDNA συχετίζεται με χαμηλότερες τιμές PSA κατά τη θεραπεία με ενζαλουταμίδη ή αμπιρατερόνη (229). Σε μια άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση 217 δειγμάτων από 80 ασθενείς με mCRPC που λάμβαναν αμπιρατερόνη, όπου δε βρέθηκε διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων του AR κατά τη διάρκεια της θεραπείας μέχρι την εξέλιξη/πρόοδο της νόσου. Προσδιορίστηκαν όμως συγκεκριμένες μεταλλάξεις που σχετίζονται με μειωμένη απόκριση στο PSA και μικρότερο PFS και OS (230). Μελέτη του γενωμικού προφίλ πραγματοποιήθηκε στο ctDNA ασθενών με mCRPC που έπαιρναν ενζαλουταμίδη (231). Ταυτοποιήθηκαν γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται τόσο με πρωτογενή αντίσταση όσο και με επίκτητη αντίσταση (231).

Οι ανωμαλίες στην επιδιόρθωση του DNA είναι αρκετά συχνές και συμβαίνουν στο 20% των mCRPC ασθενών. Οι τρέχουσες μελέτες επιλέγουν ασθενείς με γενετικές ή σωματικές μεταλλάξεις για θεραπεία με παράγοντες που στοχεύουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και ειδικότερα σε PARP αναστολείς. (232).

Η κλινική σημασία της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* και η επίδρασή της στην πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη έχει αξιολογηθεί (233–235). Σε μια μελέτη, 209 ασθενείς από δυο ανεξάρτητες ομάδες με πρωτοπαθή καρκίνο προστάτη μετά από ολική προστατεκτομή, έδειξε μια συσχέτιση μεταξύ υψηλής έκφρασης του PD-L1 και σημαντικά μικρότερη βιοχημικής επανεμφάνισης ελεύθερη επιβίωση και στις δυο ομάδες. Η υψηλή έκφραση του *PD-L1* στον ιστό συσχετίστηκε επίσης με μεγαλύτερο Gleason score και υψηλότερη έκφραση του AR (236). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ένα μηχανισμό διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση που ευθύνεται για την μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής σε ασθενείς με υψηλή έκφραση *PD-L1* (237).

Οι PD1/PD-L1 αναστολείς μπορούν να εγκριθούν για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνο προστάτη και κυρίως εκείνων που έχουν germline και/ή σωματικές μεταλλάξεις ομόλογου ανασυνδυασμού (π.χ. BRCA2, ATM, CDK12). Αναμένεται να υπάρξουν ισχυρότερα

δεδομένα και για τη χρήση PD1/PD-L1 αναστολέων σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη που εμφανίζουν ανεπάρκεια επιδιόρθωσης mismatch (men with mismatch repair deficient) (237). Αυτές οι μοριακές υποκατηγορίες αναμένεται να εμφανίζουν υψηλή έκφραση του PD-L1 και υψηλό mutational burden, παράγοντες που έχει αποδειχτεί ότι αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας σε άλλους τύπους καρκίνου.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη και η κλινική αξιολόγηση νέων μη-επεμβατικών μεθόδων μοριακής διαγνωστικής για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου και καρκίνο προστάτη.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής αξιολογήσαμε την επίδραση των προαναλυτικών συνθηκών για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CTCs και στα miRNAs. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα εμβολιασμού καρκινικών κυττάρων σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος, με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των CTCs με EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό σε διαστήματα 0h, 24h και 48h, απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων *B2M* και *CK-19* στα CTCs με RT-qPCR. Παράλληλα, προτείνουμε μια ολοκληρωμένη διαδικασία ελέγχου ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα υγρής βιοψίας

Το δεύτερο μέρος της διατριβής αποτέλεσε η επιλογή του βέλτιστου συστήματος απομόνωσης/εμπλουτισμού για το μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs στον HNSCC. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά άμεση σύγκριση του συστήματος Parsortix, που βασίζεται σε σύστημα μικροροών για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs με βάση το μέγεθός τους, με τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs με βάση το EpCAM, με περιφερικό αίμα ασθενών με HNSCC που απομονώθηκε παράλληλα και προχωρήσαμε στη συνέχεια σε μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής αναπτύξαμε μεθοδολογία πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-full length (AR-FL)*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε κλινικά στα CTCs και στα εξωσώματα ασθενών με μεταστατικό ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη.

Στο τελευταίο μέρος της διατριβής, διερευνήθηκε το μοριακό προφίλ των CTCs και των εξωσωμάτων ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (red cell lysis buffer, RCL)

4.1.1. Αρχή μεθόδου

Για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα κατά τη διαδικασία της αιμοληψίας, απορρίπτονται τα πρώτα 5mL περιφερικού αίματος. Στη συνέχεια το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάρια συλλογής αίματος, τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Στο περιφερικό αίμα προστίθεται το διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ακολουθεί φυγοκέντρηση με αποτέλεσμα την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Στον **Πίνακα 4.1** παρουσιάζονται οι κυριότεροι υποπληθυσμοί των κυττάρων του αίματος και ο τυπικός αριθμός τους ανά mL αίματος. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, ο αριθμός των CTCs είναι εξαιρετικά μικρός (μόλις 1-100 κύτταρα/mL), γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευσή τους.

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

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

4.1.2 Αντιδραστήρια/υλικά

- K₂EDTA σωληνάρια συλλογής αίματος (BD Vacutainer, UK)
- RCL (NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM, EDTA 0,1mM , pH=7,4)

4.1.3. Πειραματική πορεία

Αρχικά συλλέγονται 20mL περιφερικού αίματος σε K₂EDTA σωληνάρια συλλογής αίματος , μεταφέρονται σε πλαστικό σωληνάριο φυγοκέντρου (Falcon) των 50mL και φυγοκεντρώνται 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 και αποθηκεύεται στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Μετά τη μεταφορά του πλάσματος, προστίθεται διάλυμα RCL(1X) μέχρι τα 45mL, επώαση για 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρωση στα 530g για 20min. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου, προσθήκη 30mL RCL(1X), επώαση για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρωση στα 530g για 10min. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου. Προστίθενται 10mL RCL(1X) και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων. Προς τούτο, λαμβάνονται 10μL από το κυτταρικό εναιώρημα και τοποθετούνται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL όπου προστίθενται και 90μL από τη χρωστική trypan blue. Ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, φυγοκέντρωση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, από όπου το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως για ανοσομαγνητικό προσδιορισμό.

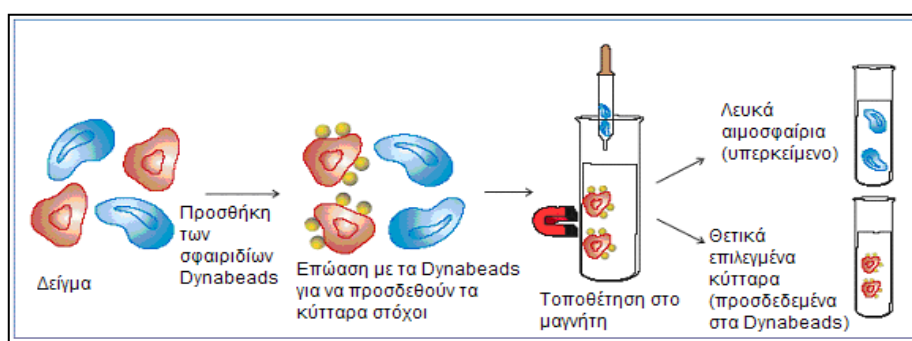
4.2. Εμπλουτισμός επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων από περιφερικό αίμα με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων

4.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκαν τα παραμαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (**Σχήμα 4.1**). Τα CTCs μπορούν να απομονωθούν απευθείας από ολικό αίμα ή από το κλάσμα των PBMC, τα οποία έχουν απομονωθεί μετά τη λύση των ερυθρών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια μιας μικρής περιόδου επώασης, τα επιθηλιακά κύτταρα προσδέονται στα παραμαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads και ακολούθως τα προσδεδεμένα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν και να εκπλυθούν χρησιμοποιώντας έναν

μαγνήτη, ενώ τα μη προσδεδεμένα στα σφαιρίδια κύτταρα απομακρύνονται με εκπλύσεις. Τα εμπλουτισμένα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για απομόνωση γενωμικού DNA, ολικού RNA και ακολούθως ενίσχυση με PCR.

Τα σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich είναι ομοιόμορφα, παραμαγνητικά σφαιρίδια από πολυστυρένιο (4.5μm 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 4.1. Απομόνωση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια

4.2.2 Αντιδραστήρια/υλικά

- Σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) σε μορφή εναιωρήματος με συγκέντρωση 4×10^8 σφαιρίδια/mL PBS (pH 7,4) το οποίο περιέχει επίσης 0,1% BSA, και 0,02% νατραζίδιο (NaN_3) ως συντηρητικό
- Διάλυμα έκπλυσης (PBS , το οποίο περιέχει επίσης 0,1% w/v BSA, και 2mM EDTA)
- 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 τη χρήση διαλύματος λύσης των ερυθρών κυττάρων, 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 σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

Προετοιμασία των σφαιριδίων Dynabeads Epithelial Enrich: Για κάθε 1,00mL κυτταρικού εναιωρήματος χρησιμοποιούνται 25,0μL (1×10^7 σφαιρίδια) από το εναιώρημα των σφαιριδίων. Μεταφέρονται τα σφαιρίδια που απαιτούνται για όλα τα δείγματα σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,5mL και εκπλένονται δύο 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 πέντε.
- 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°C προς μελλοντική απομόνωση του RNA και DNA (υποκεφάλαιο 4.4 και 4.5).

Για το PBMC κλάσμα: Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 500g, απόχυση του ελαιώματος και αναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας σε 1mL διαλύματος TRIzol-LS.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στα ακόλουθα:

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

4.3. Απομόνωση CTCs με το σύστημα Parsortix (ANGLE plc, UK)

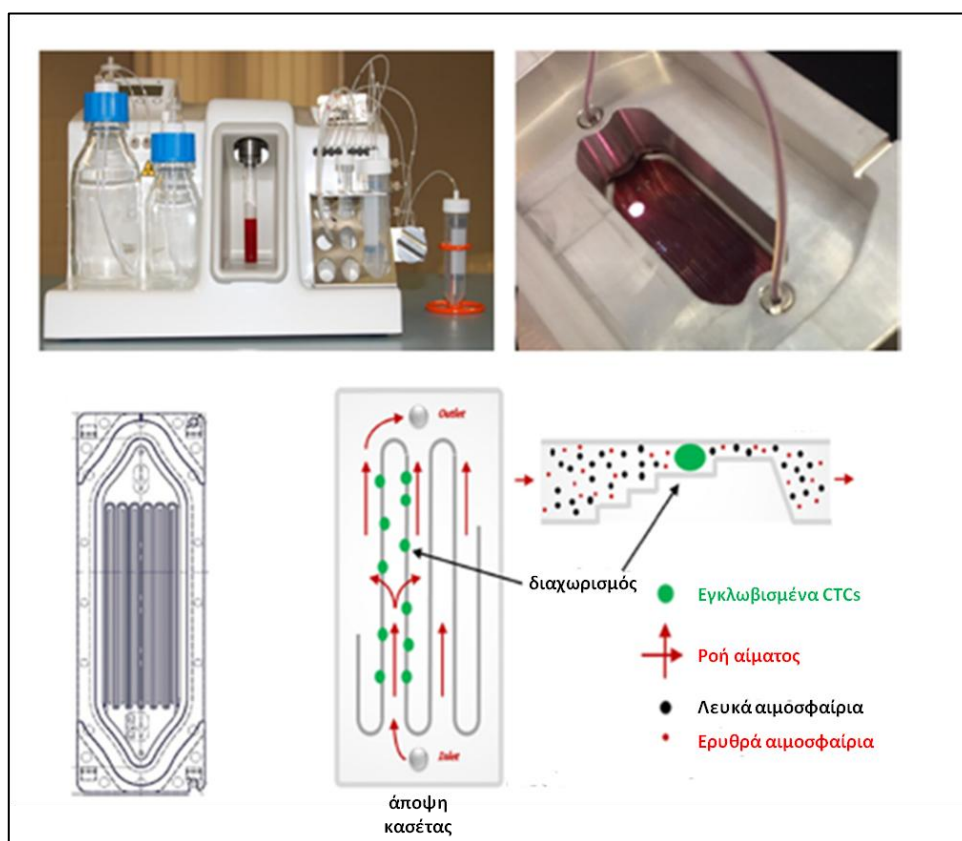
4.3.1. Αρχή μεθόδου

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 περαιτέρω μελέτη τους με μοριακές τεχνικές (106,107,238). 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, αφετέρου διότι η αυτοματοποιημένη του μορφή μειώνει σημαντικά τα προαναλυτικά σφάλματα. Το βασικό πλεονέκτημα του συστήματος Parsortix είναι το ότι διαχωρίζει τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, ανεξάρτητα από την έκφραση ή μη, της πρωτεΐνης EpCAM στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων.

Η EMT κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο 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 διαδικασία οδηγεί στη μείωση της έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών, όπως της EpCAM,

και στην αύξηση της έκφρασης των μεσεγγυματικών δεικτών. Όμως, αυτός ο περιορισμός μπορεί να εξαλειφθεί με την απομόνωση των CTCs με μεθοδολογίες που βασίζονται στις φυσικές ιδιότητες των κυττάρων, όπως είναι η πυκνότητα και το μέγεθός τους (239).

Το σύστημα Parsortix βασίζεται στην απομόνωση των CTCs βάσει του μεγέθους τους. Η κασέτα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση έχει μία δομή διαχωρισμού που περιλαμβάνει πολλαπλά κανάλια μέσω των οποίων τα κύτταρα ωθούνται να διέλθουν και να οδηγηθούν σε μία τερματική διχάλα διαμέτρου 6,5 μ m. Τα περισσότερα κύτταρα του περιφερικού αίματος, λόγω μικρού μεγέθους, διέρχονται από αυτή την τερματική διχάλα, όμως τα κύτταρα των οποίων το μέγεθος και η ακαμψία είναι απαγορευτική για τη διάμετρο των 6,5 μ m, συκρατούνται στην κασέτα. Η βασική αρχή απομόνωσης των CTCs με το σύστημα Parsortix δίνεται στο **Σχήμα 4.2**.



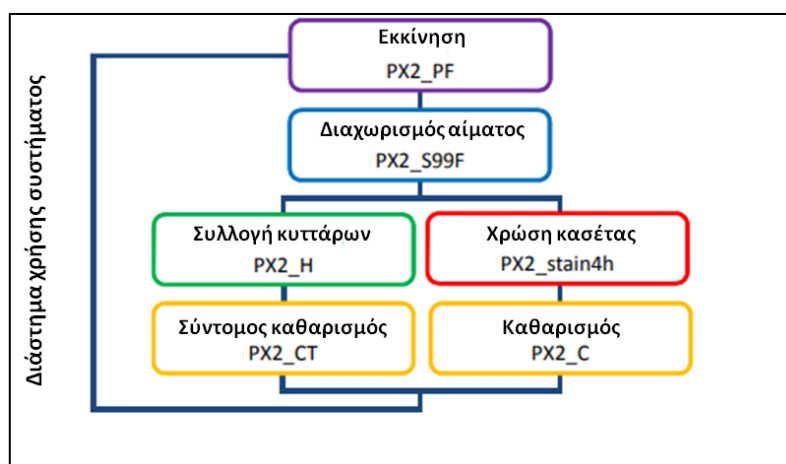
Σχήμα 4.2. Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix (<http://www.angleplc.com>)

4.3.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Διάλυμα έκπλυσης (PBS)
- Διάλυμα NaClO (10%)
- Διάλυμα έκπλυσης Decon Decomatic (10%)
- Απόλυτη αιθανόλη (100% v/v)
- Κασέτα διαχωρισμού

4.3.3. Πειραματική πορεία

Ο εμπλουτισμός των δειγμάτων περιφερικού αίματος σε CTCs πραγματοποιήθηκε μέσα στο σύστημα Parsortix, με χρήση λογισμικού που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Πραγματοποιείται η διέλευση 10mL περιφερικού 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 RNA και DNA. Η σχηματική πειραματική πορεία που περιλαμβάνει τα λογισμικά της πλατφόρμας Parsortix, παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.3.



Σχήμα 4.3. Πορεία εφαρμογής λογισμικών κατά τη χρήση του συστήματος απομόνωσης Parsortix

4.4. Απομόνωση ολικού RNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS

4.4.1. Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS (Invitrogen, USA). Η λύση των κυττάρων βασίζεται στην παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA. Επιπλέον, η ισοθειοκυανική γουανιδίνη είναι ισχυρός αναστολέας των ριβονουκλεασών (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 που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη παρουσία μίας οργανικής φάσης από φαινόλη / χλωροφόρμιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι περισσότερες πρωτεΐνες καθώς και μικρά τμήματα DNA (50b – 10Kb) βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα τμήματα DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση.

4.4.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Αντιδραστήριο TRIzol-LS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Χλωροφόρμιο (Sigma, Germany)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Sigma, Germany)
- 75% v/v αιθανόλη, Cat.No.16368 (Merk,Germany)
- RNA Storage solution (κιτρικό νάτριο, pH 6,4) (ThermoFisher Scientific, USA)

4.4.3. Πειραματική πορεία

Μετά τον διαχωρισμό των CTCs από το κλάσμα PBMC, σε κάθε ένα κλάσμα πραγματοποιείται η απομόνωση του ολικού RNA.

- 1) Συγκεκριμένα, προστίθεται από 1mL TRIzol-LS στα κλάσματα των CTCs και PBMCs, αντίστοιχα. Έπειτα το ομογενοποιημένο δείγμα επωάζεται για 5min στους 15-30°C, ώστε να επιτραπεί η πλήρης αποδέσμευση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.
- 2) Στη συνέχεια, προστίθεται 1/5 (v/v) χλωροφόρμιο (200μL ανά 1mL TRIzol-LS), το μείγμα αναδεύεται έντονα με το χέρι για 15s και επωάζεται για 2-3min στους 15-30°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στα 12.000g για 15min στους 4°C. Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: στην κάτω οργανική φάση (κόκκινη), στην ενδιάμεση φάση και στην επάνω, άχρωμη και διαυγή υδατική φάση, όπου βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Ο όγκος της υδατικής φάσης αποτελεί περίπου το 60% του όγκου του αντιδραστηρίου TRIzol-LS που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ομογενοποίηση.
- 3) Η υδατική φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf, προστίθενται 500μL ισοπροπανόλης (για κάθε 1mL TRIzol-LS) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά. Σε αυτό το στάδιο το διάλυμα μπορεί να παραμείνει στους -20 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.

- 4) Ακολουθεί επώαση για 10min στους 15-30°C και φυγοκέντρωση στα 12.000g για 30min στους 4°C.
- 5) Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και παραμένει το ίζημα που αποτελεί το ολικό RNA.
- 6) Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1mL 75 % αιθανόλη (σε H₂O) (για κάθε 1mL TRIzol-LS), ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρωσή του στα 12000g για 10min στους 4°C. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται εις διπλούν.
- 7) Αφού αποχυθεί το υπερκείμενο υγρό πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 30s, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα ίχνη της αιθανόλης.
- 8) Τέλος, αφήνεται το ίζημα να στεγνώσει τελείως από την αιθανόλη (είτε εκτιθέμενο στο αέρα, είτε σε κενό αέρα για 5-10min) και επαναδιαλύεται σε 11μL RNA Storage Buffer solution (απαλλαγμένο από RNάσες) για το κλάσμα των CTCs και σε 20μL RNA Storage Buffer solution για το κλάσμα των PBMCs. Από το τελικό υδατικό διάλυμα χρησιμοποιείται 1μL για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA, ενώ το υπόλοιπο διάλυμα φυλάσσεται στους -70 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

4.5. Απομόνωση DNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS

4.5.1. Αρχή μεθόδου

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά τμήματα DNA (50b-10Kb) βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα τμήματα 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 και SKBR3.

4.5.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Αντιδραστήριο TRIzol-LS (ThermoFisher Scientific, USA)
- Απόλυτη αιθανόλη (100% v/v)
- 75% v/v αιθανόλη, Cat.No.16368 (Merk,Germany)
- 0,1M κιτρικό νάτριο σε 10% v/v αιθανόλη
- 8mM NaOH

4.5.3. Πειραματική πορεία

Ακολουθεί η αναλυτική πειραματική πορεία της απομόνωσης DNA από TRIzol-LS:

➤ Καταβύθιση DNA

1. Αφαίρεση του υδατικού διαλύματος που περιέχει το RNA (αποθήκευση στους -70°C και περαιτέρω αξιοποίηση για μελέτες RNA).
2. Προσθήκη 300 μL 100 % v/v αιθανόλης για 1mL TRIzol-LS. Ήπια ανάδευση.
3. Επώαση στους 15-30 $^{\circ}\text{C}$ για 2-3 min.
4. Φυγοκέντρηση για 5min στα 2.000g στους 4 $^{\circ}\text{C}$.

➤ Έκπλυση DNA

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

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

➤ Διαλυτοποίηση DNA

13. Απομάκρυνση της αιθανόλης έκπλυσης. Τοποθέτηση του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε θερμαινόμενη πλάκα στους 56 $^{\circ}\text{C}$, μέχρι να εξατμισθεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης.
14. Ανασύσταση του ιζήματος σε 30 μL NaOH 8mM.
15. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 10min στους 4 $^{\circ}\text{C}$.
16. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το DNA σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5ml και αποθήκευση στους -70°C .

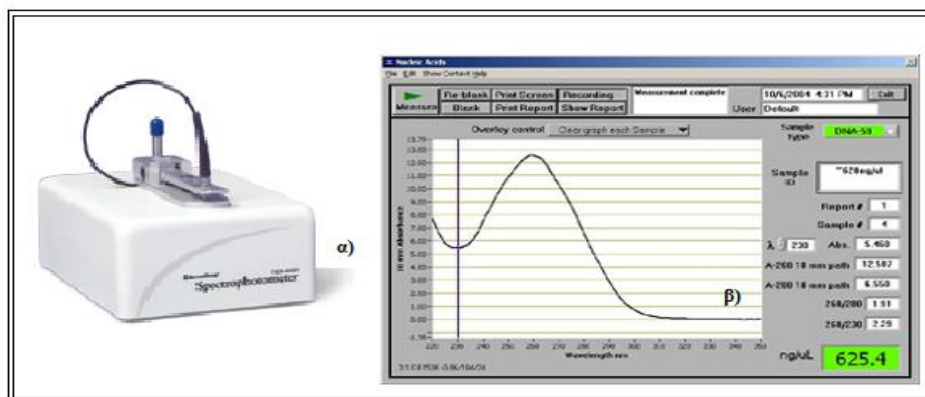
4.6. Φωτομετρικός προσδιορισμός RNA και DNA

4.6.1. Αρχή μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA και του DNA πραγματοποιήθηκε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Το Nanodrop-100 Spectrophotometer ή ND-1000 είναι ένα ειδικό για μέτρηση RNA/DNA φασματοφωτόμετρο (220-275nm), που απαιτεί 1μL δείγματος μέτρηση υψηλής ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας. 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 από ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης του δείγματος. 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 ~ 2.0 είναι αποδεκτή για το RNA. Εάν η αναλογία είναι μικρότερη σε κάθε περίπτωση, αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280nm. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA φαίνεται στο **Σχήμα 4.4**.

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 (DNA) σε ένα μόνο δείγμα.
3. Έχει την δυνατότητα μέτρησης υψηλών τιμών απορρόφησης με αξιοπιστία.
4. Διαθέτει ευρύ φάσμα μέτρησης απορρόφησης (200-750nm).
5. Η ταχύτητα μέτρησης διαρκεί μόλις 10s.
6. Δεν χρησιμοποιούνται κυψελίδες και τριχοειδή σωληνάκια.
7. Επανακτάται το δείγμα.
8. Έχει μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να εγκατασταθεί σε οποιοδήποτε πάγκο εργασίας.



Σχήμα 4.4. α) Φασματοφωτόμετρο ND-1000, β) Χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA

4.6.2. 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 μέτρηση της απορρόφησης και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA ή DNA στο δείγμα..
- Στη συνέχεια καθαρίζεται η θέση και εισάγεται το επόμενο δείγμα
- Το μηχάνημα αυτόματα ανιχνεύει την συγκέντρωση του RNA ή DNA στο δείγμα.

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

4.7. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

4.7.1. Αρχή μεθόδου

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). Το κιτ αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση cDNA μέχρι 2 µg ολικού RNA σε κάθε 20 µL αντίδρασης.

4.7.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- 2X RT Buffer Mix, 500µL
- 20X Enzyme Mix, 50µL
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 0,5mL

4.7.3. Πειραματική πορεία

Για τη σύνθεση του cDNA, η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής διεξάγεται σε τελικό όγκο 20μL. Κάθε αντίδραση αποτελείται από 10μL μείγματος 2X RT Buffer, 1μL 20X Enzyme και 9μL RNA το οποίο προέρχεται από το κλάσμα των CTCs δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο ή υγιών αιμοδοτών.

Σε κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου το οποίο περιέχει ddH₂O αντί του δείγματος, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται κατά την ποσοτική PCR δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της σύνθεσης cDNA από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου (RNA από κυτταρική σειρά MCF-7) ώστε να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έχει πραγματοποιηθεί, αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή.

Παρακάτω δίνονται οι θερμοκρασιακές συνθήκες και οι χρόνοι διεξαγωγής της αντίδρασης :

i) 60min→37°C

ii) 5min→95°C

iii) ∞ →4°C

4.8. Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα

Τα δείγματα ολικού αίματος συλλέγονται σε σωληνάρια συλλογής αίματος K₂EDTA (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 αποθηκεύονται στους -70°C μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν.

4.9. Απομόνωση εξωσωμάτων από πλάσμα

4.9.1. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (QIAGEN[®], Germany)

4.9.1.1. Αρχή μεθόδου

Το exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (QIAGEN[®], Germany) βασίζεται στην απομόνωση των εξωσωμάτων με την σύνδεσή τους στη μεμβράνη της στήλης. Τα εξωσώματα συνδέονται στη μεμβράνη της στήλης ανεξάρτητα από το μέγεθός τους και την κυτταρική τους προέλευση. Η απομόνωση του ολικού RNA των εξωσωμάτων από τις στήλες exoEasy Maxi Spin πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Qiazol[®] (QIAGEN[®], Germany). Η λύση των εξωσωμάτων βασίζεται στην παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA. Επιπλέον, η ισοθειοκυανική γουανιδίνη είναι ισχυρός αναστολέας των ριβονουκλεασών (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 που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη παρουσία μίας οργανικής φάσης από φαινόλη/χλωροφόρμιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά τμήματα DNA βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα τμήματα DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση.

Η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάριο και προστίθεται αιθανόλη ώστε να επιτευχθούν κατάλληλες συνθήκες πρόσδεσης όλων των μορίων RNA. Το δείγμα στη συνέχεια περνά από τη στήλη RNeasy[®] MinElute[®] Spin Column όπου το RNA δεσμεύεται στη μεμβράνη. Η φαινόλη και άλλες ουσίες που επιμολύνουν και παρεμποδίζουν την απομόνωση του RNA απομακρύνονται με διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης. Το καθαρό RNA εκλύεται με H₂O ελεύθερο RNAσών.

4.9.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- 50 exoEasy Maxi Spin Columns (σε σωληνάρια συλλογής των 50mL)
- 50 σωληνάρια συλλογής Falcon των 50mL
- Buffer XBP
- Buffer XWP

- 50 RNeasy[®] MinElute[®] Spin Columns (σε σωληνάρια συλλογής των 2mL)
- 50 σωληνάρια συλλογής (1,5mL)
- 50 σωληνάρια συλλογής (2mL)
- Qiazol[®] Lysis Reagent, 50mL
- Buffer RWT, (απαιτείται προσθήκη 30mL αιθανόλης (96-100%))
- Buffer RPE, (απαιτείται προσθήκη 44mL αιθανόλης (96-100%))
- RNase-Free water, 10mL
- Χλωροφόρμιο

4.9.1.3. Πειραματική πορεία

- 1) Φυγοκέντρηση πλάσματος στα 16.000g για 10min.
- 2) Σε 2mL πλάσματος προσθέτουμε 2mL XBP. Ανάμιξη με ανάδευση 5 φορές.
- 3) Προσθήκη του πλάσματος/XBP στην στήλη (exoEasy Maxi Spin Column) και φυγοκέντρηση στα 500g για 1min. Απόχυση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο Falcon.
- 4) Προσθήκη 10mL XWP στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 3.850g για 5min. Απόρριψη του διηθήματος με το Falcon.
- 5) Μεταφέρουμε τη στήλη σε ένα νέο Falcon των 50mL.
- 6) Προσθήκη 700μL αντιδραστηρίου λύσης Qiazol[®] στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 3.850g για 5min.
- 7) Συλλογή του διηθήματος και μεταφορά σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής των 2mL.
- 8) Ισχυρή ανάδευση σε vortex και επώαση για 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15-25°C).
- 9) Προσθήκη 90μL CHCl₃ και έντονη ανάδευση για 15s. Επώαση για 2-3min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 10) Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15min, στους 4°C. ΠΡΟΣΟΧΗ: Μετά από αυτή τη φυγοκέντρηση αυξάνουμε τη θερμοκρασία της φυγοκέντρου στους 15-25°C.
- 11) Μεταφορά της υδατικής φάσης σε ένα νέο σωληνάριο. Προσθήκη δύο φορές την ποσότητα της υδατικής φάσης απόλυτη αιθανόλη (~450μL υδατικής φάσης άρα 900μL αιθανόλη).
- 12) Μεταφορά 700μL δείγματος στη στήλη (RNeasy[®] MinElute[®] Spin Column), φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30s. Απόρριψη του διηθήματος.
- 13) Επανάληψη του βήματος 12 για την υπόλοιπη ποσότητα δείγματος. Απόρριψη του διηθήματος.
- 14) Προθήκη στη στήλη 700μL buffer RWT και φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30s. Απόρριψη του διηθήματος.
- 15) Προσθήκη στη στήλη 500μL buffer RPE και φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30s.

- 16) Προσθήκη στη στήλη 500μL buffer RPE και φυγοκέντρηση στα 10.000g για 2min.
- 17) Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση στα 14.000g για 5min.
- 18) Τέλος, μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής, προσθήκη 14μL RNase-Free water στο κέντρο της στήλης. Επώαση για 1min και φυγοκέντρηση στα 14.000g για 1min.

4.9.2. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου EXO-Prep (HansaBioMed LLC, Estonia)

4.9.2.1. Αντιδραστήρια/υλικά

- EXO-Prep, 5mL
- Σωληνάκια Falcon 15mL
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf 2mL

4.9.2.2. Πειραματική πορεία

➤ Προετοιμασία πλάσματος

- 1) Φυγοκέντρηση στα 300g για 10min.
- 2) Φυγοκέντρηση στα 1.200g για 20min
- 3) Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30min

➤ Απομόνωση εξωσωμάτων

- 1) Προσθήκη διαλύματος EXO-Prep στο δείγμα σε αναλογία $\frac{1}{4}$ (για παράδειγμα, σε 100μL πλάσμα προστίθενται 25μL EXO-Prep)
- 2) Ανάδευση με πιπέτα και αναποδογύρισμα του σωληναρίου
- 3) Επώαση στον πάγο για 1h
- 4) Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 20min στους 4°C
- 5) Απόρριψη υπερκείμενου
- 6) Φυγοκέντρηση στα 1.500g για 20min στους 4°C και απόρριψη υπερκείμενου
- 7) Ανασύσταση της πελέτας που περιέχει τα εξωσώματα με 21μL PBS

➤ Απομόνωση RNA από τα εξωσώματα

Η διαδικασία της απομόνωσης του RNA των εξωσωμάτων γίνεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS όπως περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.4.

4.9.3. Απομόνωση των εξωσωμάτων από πλάσμα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου plasma/serum Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit (NORGEN BIOTEK.CORP., Canada)

4.9.3.1. Αντιδραστήρια/υλικά

- Slurry E, 14,5mL
- Διάλυμα ExoC, 8mL
- Διάλυμα ExoR, 12mL
- Διάλυμα λύσης A, 20mL
- Διάλυμα πρόσθετης λύσης B, 2mL
- Διάλυμα έκπλυσης A, 18mL
- Διάλυμα έκλουσης A, 6mL
- Στήλες (mini Filter Spin Column)
- Στήλες (mini Spin Column)
- Σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf

4.9.3.2. Πειραματική πορεία

➤ Προετοιμασία πλάσματος

- 1) Αφήνεται να ξεπαγώσει το πλάσμα, που έχει αποθηκευθεί στους -80°C
- 2) Φυγοκέντρηση στα 400g για 2min
- 3) Μετά τη φυγοκέντρηση, τοποθετείται το υπερκείμενο πλάσμα σε ένα καθαρό σωληνάριο

➤ Απομόνωση εξωσωμάτων

- 1) Σε 1mL πλάσμα προστίθενται 15mL H_2O ελεύθερο από RNases και ακολουθεί προσθήκη 300μL διαλύματος ExoC.
- 2) Προσθήκη 400μL Slurry E. Ανάδευση με vortex για 10s και αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5min.
- 3) Ανάδευση με vortex για 10s. Φυγοκέντρηση στα 2000g. Απόρριψη του υπερκείμενου.
- 4) Προσθήκη 400μL διαλύματος ExoR στην πελέτα ,ανάδευση με vortex για 10s και επώαση για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 5) Ανάδευση με vortex για 10s και φυγοκέντρηση στα 500g για 2min.

- 6) Μεταφορά του υπερκείμενου στη στήλη (mini Filter Spin Column) που είναι τοποθετημένη σε ένα σωληνάριο έκλουσης και φυγοκέντρωση στα 6000g για 2min.
- 7) Συλλογή του διηθήματος στο σωληνάριο έκλουσης, στο οποίο περιέχονται τα εξωσώματα.

➤ Απομόνωση RNA από τα εξωσώματα

- 1) Προσθήκη 600μL διάλυμα λύσης A και 75μL διάλυμα πρόσθετης λύσης στα 400μL διαλύματος ExoR που περιέχει τα εξωσώματα στο σωληνάριο έκλουσης.
- 2) Ανάδευση με vortex για 10s και επώαση για 15min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 3) Προσθήκη 1mL αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση με vortex για 10s.
- 4) Μεταφορά 750μL του μείγματος στου βήματος 3 σε μια στήλη (mini Spin Column).
- 5) Επανάληψη του βήματος 4 άλλες δυο φορές ώστε να περάσει όλη η ποσότητα από τη στήλη (mini Spin Column).
- 6) Προσθήκη 600μL διαλύματος έκπλυσης A στη στήλη και φυγοκέντρωση στα 3.000g για 30s . Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο.
- 7) Επανάληψη του βήματος 6.
- 8) Φυγοκέντρωση της άδειας στήλης στα 13.000g για 1min. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής.
- 9) Μεταφορά της στήλης σε ένα καθαρό σωληνάριο έκλουσης. Προσθήκη 50μL διαλύματος έκλουσης A στη στήλη και φυγοκέντρωση στα 400g για 1min ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση στα 5.800g για 2min.
- 10) Για καλύτερη ανάκτηση, μεταφορά του διαλύματος έκλουσης ξανά στη στήλη και επώαση για 2min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Φυγοκέντρωση στα 400g για 1min ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση στα 5.800g για 2min.
- 11) Το RNA των εξωσωμάτων μπορεί τώρα να φυλαχθεί στους -80°C.

4.10. Απομόνωση miRNAs από πλάσμα

4.10.1. Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση των κυκλοφορούντων miRNAs από το πλάσμα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικός διαθέσιμου κιτ αντιδραστηρίων miRNeasy serum/plasma advanced kit (QIAGEN[®], Germany). Το miRNeasy serum/plasma advanced kit απομονώνει τα miRNAs από το πλάσμα συνδυάζοντας τη λύση παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα που βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA,

με τη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης με ακινητοποιημένη μεμβράνη πυριτίου για τον καθαρισμό και την ανάκτηση του ολικού RNA (συμπεριλαμβάνονται τα miRNAs).

4.10.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- Στήλες RNeasy[®]UCP[®] Spin Columns
- Σωληνάρια συλλογής των 1,5 mL
- Σωληνάρια συλλογής των 2 mL
- Διάλυμα RPL, 20 mL
- Διάλυμα RPP, 8mL
- Διάλυμα RWT, 15mL (απαιτείται προσθήκη 30mL αιθανόλης (96-100%))
- Διάλυμα RPE, 11mL (απαιτείται προσθήκη 44mL αιθανόλης (96-100%))
- H₂O ελεύθερο RNAσών
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 80%

4.10.3. Πειραματική πορεία

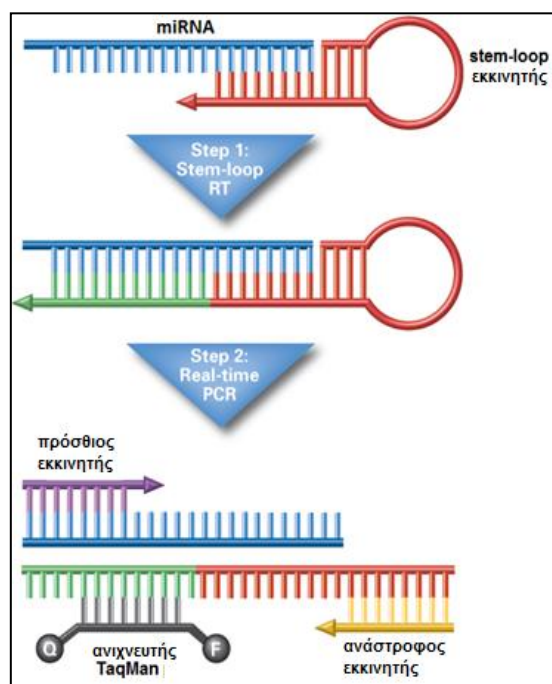
Η διαδικασία απομόνωσης των κυκλοφορούντων miRNAs από το πλάσμα διεξάγεται ως ακολούθως:

- 1) Μεταφορά 200μL πλάσματος σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL.
- 2) Σε 200μL πλάσματος προστίθενται 60μL διαλύματος RPL στο οποίο έχουν προηγουμένως προστεθεί 25 fmol εξωγενούς miRNA από το σκουλήκι *Caenorhabditis elegans* (*cel-miR-39*) (miScript miRNA mimic (Qiagen Inc., Valencia, CA)) το οποίο θα αξιοποιηθεί για τον έλεγχο της απόδοσης της διαδικασίας απομόνωσης των miRNAs από το δείγμα αλλά και των σταδίων που ακολουθούν μέχρι το τελικό στάδιο ποσοτικοποίησης των miRNAs (240).
- 3) Ανάδευση σε vortex και επώαση για 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 4) Προσθήκη 20μL διαλύματος RPP, έντονη ανάδευση σε vortex για 30s και επώαση για 3min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 5) Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 3min σε θερμοκρασία δωματίου για να καταβυθιστεί το ίζημα, έτσι ώστε το υπερκείμενο να είναι καθαρό και διαυγές.

- 6) Μεταφορά του υπερκείμενου (~230μL) σε ένα νέο σωληνάριο και προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης. Καλή ανάδευση με vortex.
- 7) Μεταφορά του δείγματος σε μια στήλη RNeasy[®]UCP[®] Spin Column, φυγοκέντρηση σε $\geq 8.000g$ για 15s. Απόρριψη του διηθήματος.
- 8) Προσθήκη 700μL διαλύματος RWT στην στήλη RNeasy[®]UCP[®] Spin Column, φυγοκέντρηση σε $\geq 8.000g$ για 15s. Απόρριψη του διηθήματος.
- 9) Προσθήκη 500μL αιθανόλης 80% στη στήλη RNeasy[®]UCP[®] Spin Column, φυγοκέντρηση σε $\geq 8.000g$ για 2min. Απόρριψη του διηθήματος.
- 10) Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- 11) Τοποθέτηση της στήλης σε ένα καινούργιο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση στα 14.000g με ανοιχτό το καπάκι της στήλης ώστε να στεγνώσει.
- 12) Τοποθέτηση της στήλης RNeasy[®]UCP[®] Spin Column σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 20μL H₂O ελεύθερο RNAσών, επώαση για 1min και φυγοκέντρηση στα 14.000g για 1min, συλλογή του διηθήματος και φύλαξη στους -80°C.

4.11. Ποσοτικός Προσδιορισμός miRNAs με RT-qPCR

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των miRNAs πραγματοποιήθηκε με μια αντίδραση δύο βημάτων αποτελούμενη από μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής η οποία ακολουθείται από ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει προταθεί από τους Chen et al (241). Στο **Σχήμα 4.5** φαίνονται σχηματικά τα δύο στάδια της διαδικασίας που εξασφαλίζουν γρήγορο, ευαίσθητο, ειδικό και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs, ενώ η αρχική ποσότητα ολικού RNA που απαιτείται είναι μόλις 25pg για τα περισσότερα miRNAs.



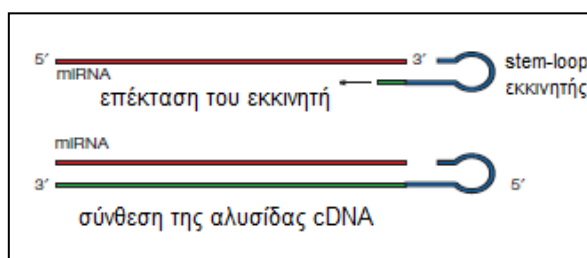
Σχήμα 4.5. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης δύο σταδίων που περιλαμβάνει αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

4.11.1. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

4.11.1.1. Αρχή μεθόδου

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) διεξήχθη με τη χρήση των αντιδραστηρίων TaqMan miRNA reverse transcription kit και TaqMan miRNA assays (Applied Biosystems, Life Sciences, Foster City, CA). Τα αντιδραστήρια αυτά εξασφαλίζουν την ενίσχυση των ώριμων miRNAs-στόχων με υψηλή ειδικότητα, αφού μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους miRNAs που διαφέρουν σε μία μόνο νουκλεοτιδική βάση, αλλά και μεγάλη απόδοση αντίδρασης.

Κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, ένας ειδικός για το ώριμο miRNA-στόχο εκκινητής με τη μορφή φουρκέτας υβριδοποιείται στο μόριο miRNA και επεκτείνεται με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η δομή φουρκέτας του εκκινητή ενισχύει τη θερμική σταθερότητα του ετεροδιμερούς RNA-DNA προσδίδοντας μεγάλη απόδοση στην αντίδραση σύνθεσης του cDNA ενώ παράλληλα εξασφαλίζει και υψηλή ειδικότητα προϊόντος (Σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση ειδικού stem-loop εκκινητή

4.11.1.2. Αντιδραστήρια/υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής (10X)
- Αντίστροφη μεταγραφάση Multiscribe (50U/μL)
- Αναστολέας RNασών (20U/μL)
- dNTPs (100mmol/L)
- Nuclease-free H₂O
- TaqMan miRNA RT-ειδικός εκκινητής

4.11.1.3. Πειραματική πορεία

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής διεξάγεται σε τελικό όγκο 10μL. Κάθε αντίδραση αποτελείται από 3μL δείγματος ολικού RNA και 7μL μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Στον **Πίνακα 4.2** παρατίθενται τα συστατικά του μείγματος των αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση.

Όλα τα υλικά που περιλαμβάνονται στο μείγμα αντιδραστηρίων διατίθενται με το TaqMan miRNA reverse transcription kit, ενώ ο ειδικός ανάστροφος εκκινητής διατίθεται με το TaqMan miRNA assays kit.

Πίνακας 4.2. Συστατικά της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Αντιδραστήρια Master Mix	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (10X)	1μL	1X
Αντίστροφη μεταγραφάση Multiscribe (50 U/μL)	1μL	5U/μL
Αναστολέας RNAσών (20 U/μL)	0,13μL	0,26U/μL
dNTPs (100 mmol/L)	0,20μL	2mM
Nucleases-free H ₂ O	0,67μL	-
TaqMan miRNA RT-ειδικός εκκινητής (περιλαμβάνεται στο TaqMan miRNA assays kit)	4μL	0,4X

Ακολουθούν οι θερμοκρασιακές συνθήκες και οι χρόνοι διεξαγωγής της αντίδρασης:

- i) 30 min → 16°C
- ii) 30 min → 42°C
- iii) 5 min → 85°C
- iv) ∞ → 4°C

Σε κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνεται ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου το οποίο περιέχει ddH₂O αντί του δείγματος, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται κατά την ποσοτική PCR δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της σύνθεσης cDNA από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου το οποίο περιέχει δείγμα στο οποίο περιλαμβάνεται το miRNA-στόχος σε γνωστή ποσότητα ώστε να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή.

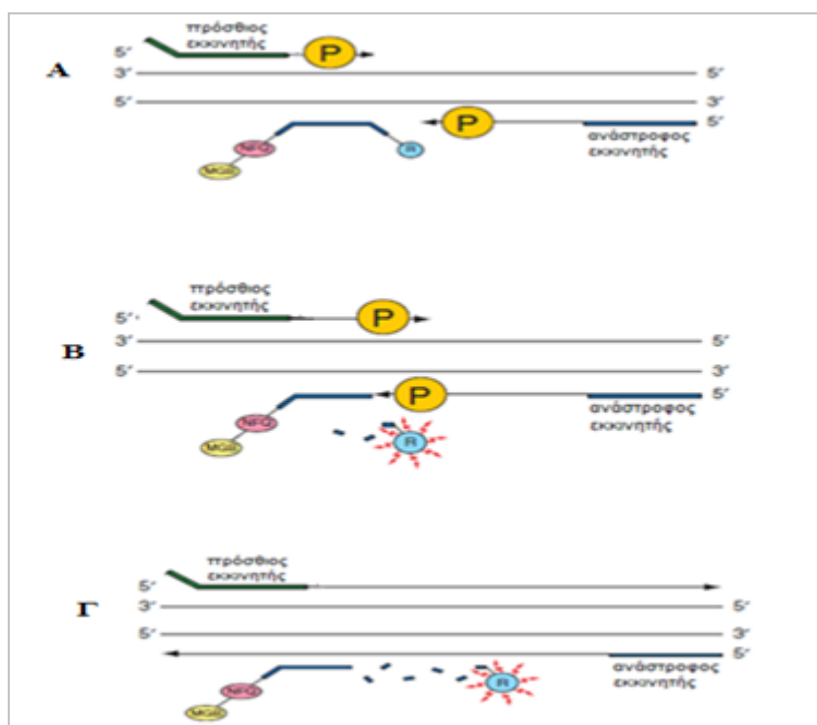
4.11.2 Αντίδραση PCR

4.11.2.1. Αρχή μεθόδου

Ένας πρόσθιος εκκινητής ειδικός για το miRNA-στόχο με επέκταση στο 5' άκρο του εξασφαλίζει αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού του εκκινητή με το στόχο, ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ειδικότητα προϊόντος. Κατά τη διάρκεια της PCR, ο ανιχνευτής TaqMan υβριδοποιείται ειδικά σε συμπληρωματική αλληλουχία που βρίσκεται σε περιοχή μεταξύ του πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή (**Σχήμα 4.7A**). Ο ανιχνευτής TaqMan έχει στο 5' άκρο του συνδεδεμένο το μόριο της φθορίζουσας χρωστικής, η οποία είναι η φλουορεσκεΐνη με μέγιστο απορρόφησης στα 495nm, ενώ στο 3' άκρο του είναι συνδεδεμένο το μόριο του αποσβέστη (non fluorescent quencher, NFQ). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος τύπος ανιχνευτή TaqMan διαθέτει στο 3' άκρο του κι ένα μόριο σύνδεσης στη μικρή αύλακα του σχηματιζόμενου διμερούς (minor groove binder, MGB) αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη θερμοκρασία υβριδισμού του ανιχνευτή με το στόχο, χωρίς να αυξάνεται το μήκος του, εξασφαλίζοντας ακόμη μεγαλύτερη ειδικότητα πρόσδεσης.

Όταν ο ανιχνευτής είναι ακέραιος, η απόσταση του φθορισμογόνου μορίου του από τον αποσβέστη δεν επιτρέπει την εκπομπή φθορισμού (λόγω απόσβεσης) με βάση το φαινόμενο FRET (fluorescence resonance energy transfer). Η DNA πολυμεράση, με τη δράση 5'-3' εξωνουκλεάσης που διαθέτει, κόβει μόνο τα μόρια ανιχνευτή που υβριδοποιούνται με το DNA-στόχο (**Σχήμα 4.7B**). Η αποκοπή αυτή απομακρύνει το φθορισμογόνο μόριο του ανιχνευτή από τον αποσβέστη οδηγώντας στην παραγωγή φθορισμού από τη χρωστική. Η εκπομπή φθορισμού επιτυγχάνεται μόνο όταν η αλληλουχία του στόχου είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία του ανιχνευτή και ενισχύεται κατά την αντίδραση PCR. Έτσι, αποφεύγεται η εκπομπή σήματος από τη μη ειδική ενίσχυση προϊόντων κατά την διεξαγωγή της αντίδρασης. Ο πολυμερισμός της αλυσίδας συνεχίζεται, αλλά καθώς το 3' άκρο του ανιχνευτή είναι μπλοκαρισμένο, δεν εμφανίζεται ενίσχυση του μορίου του ανιχνευτή κατά την αντίδραση PCR (**Σχήμα 4.7Γ**).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μL μέσα σε ειδικά γυάλινα τριχοειδή (capillaries). Κάθε αντίδραση αποτελείται από 2μL cDNA και 8μL μείγματος αντιδραστηρίων (master mix). Στους **Πίνακες 4.3** και **4.4** παρατίθενται τα συστατικά του μείγματος των αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση καθώς και οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης PCR.



Σχήμα 4.7. Σχηματική απεικόνιση RT-qPCR με τη χρήση ανιχνευτή TaqMan. P: DNA πολυμεράση, R: φοθορίζουσα χρωστική (FAM)

4.11.2.2. Αντιδραστήρια/υλικά

- 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Sciences, Foster City, CA)
- Mix εκκινητών και ανιχνευτή (20X) (περιλαμβάνεται στο TaqMan miRNA assays kit)
- Nucleases-free H₂O

4.11.2.3. Πειραματική πορεία

Τα συστατικά της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου δίνονται παρακάτω στον Πίνακα 4.3.

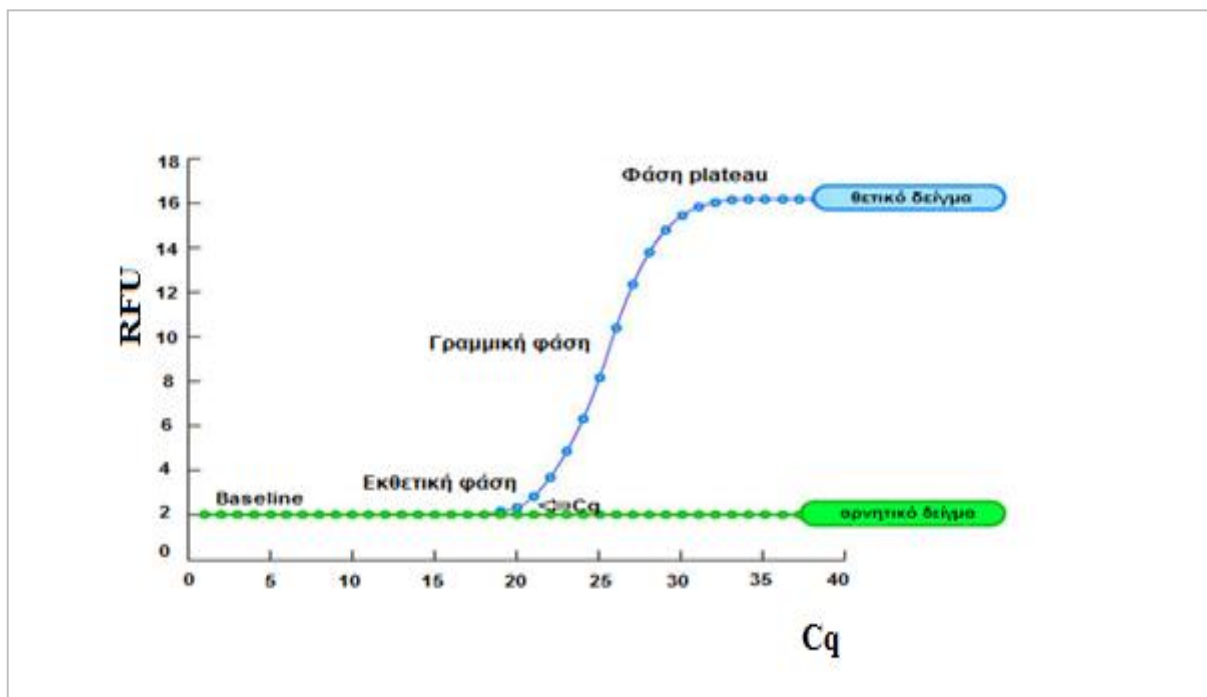
Πίνακας 4.3. Συστατικά της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ώριμων miRNAs

Συστατικά Master Mix	Όγκος αντίδρασης	Τελική Συγκέντρωση
2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Sciences, Foster City, CA)	5μL	1X
Mix εκκινητών και ανιχνευτή (20X) (περιλαμβάνεται στο TaqMan miRNA assays kit)	1μL	0,5X
Nucleases-free H ₂ O	2μL	-

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει:

- Αρχική θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (95°C) για την ενεργοποίηση της AmpliTaq Gold[®] DNA πολυμεράσης (hot start πολυμεράση) που περιλαμβάνεται στο Universal PCR Master Mix.
- Ακολουθούν 45 κύκλοι αντίδρασης καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει θέρμανση στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA και στη συνέχεια στους 60°C για την υβριδοποίηση των εκκινητών στο εκμαγείο και την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας από την DNA πολυμεράση.
- Τέλος, η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 4°C, ώστε να σταματήσει η αντίδραση και να διατηρηθούν τα δείγματα.

Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται κατά την ποσοτική PCR δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή.



Σχήμα 4.8. Επεξεργασία δεδομένων φθορισμού μιας αντίδρασης ποσοτικής PCR. Διακρίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενός θετικού κι ενός αρνητικού δείγματος. Η τιμή Cq υποδεικνύεται με το βέλος. RFU: Relative Fluorescence Units.

Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.4. Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Χρόνος	Θερμοκρασία	Αριθμός κύκλων
10min	95°C	1
15s	95°C	45
1min	60°C	
30s	40°C	1

4.11.3. Κανονικοποίηση τιμών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs

Για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης των miRNAs με τη μέθοδο που αναλύθηκε παραπάνω είναι απολύτως απαραίτητη η κανονικοποίηση των αρχικών τιμών Cq που ελήφθησαν μετά το τέλος της αντίδρασης PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών βασίστηκε στο συνδυασμό της χρήσης δυο miRNAs αναφοράς, ενός εξωγενούς και ενός ενδογενούς (240). Ως εξωγενές miRNA επιλέχθηκε και προστέθηκε σε γνωστή

συγκέντρωση στα δείγματα ένα συνθετικό miRNA που προέρχεται από το σκουλήκι *Caenorhabditis elegans*, το *cel-miR-39*, και το οποίο δεν εμφανίζει ομολογία με τις αλληλουχίες των ανθρώπινων miRNAs ώστε να αποφευχθεί η οποιαδήποτε πιθανότητα υβριδισμού με τους ανιχνευτές των miRNAs-στόχων στα δείγματα. Η χρήση του εξωγενούς miRNA επιτρέπει τον έλεγχο της απόδοσης της διαδικασίας απομόνωσης των miRNAs μεταξύ των δειγμάτων αλλά και τον έλεγχο της απόδοσης των υπολοίπων σταδίων μέχρι την ποσοτικοποίηση των miRNAs καθώς είναι γνωστή η ποσότητα των αντιγράφων που έχουν προστεθεί στα δείγματα και η τιμή Cq (cycle of quantification) στην οποία αναμένεται αυτή η ποσότητα να δίνει σήμα στην RT-PCR. Οποιοσδήποτε αποκλίσεις από την αναμενόμενη τιμή Cq συνυπολογίζονται ώστε να εξαλειφθούν τα αναλυτικά σφάλματα που μπορεί να αλλοιώσουν την πραγματική τιμή της διαφοροποίησης της έκφρασης των miRNAs στα δείγματα.

Η αλληλουχία του εξωγενούς miRNA-προτύπου είναι 5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3' (Qiagen Inc., Valencia, CA). Η προσθήκη του εξωγενούς προτύπου πραγματοποιήθηκε σε ίση και γνωστή ποσότητα σε όλα τα δείγματα ώστε να είναι δεδομένος ο αριθμός των αντιγράφων που προστέθηκαν αρχικώς στα δείγματα με σκοπό αυτός να συγκριθεί με τον αριθμό αντιγράφων που ανακτώνται μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης. Ο λόγος των δυο αυτών τιμών θα κάνει γνωστή την απόδοση της διαδικασίας της απομόνωσης των miRNAs από τα δείγματα, ώστε αυτή η αναλυτική παράμετρος να συνυπολογισθεί κατά την ποσοτικοποίηση των miRNAs στα δείγματα μετά την ολοκλήρωση των πρωτοκόλλων ποσοτικοποίησης.

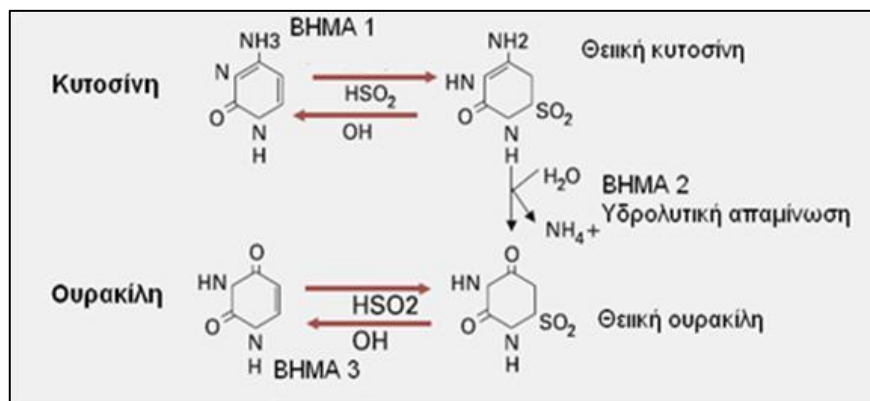
Ο υπολογισμός της κανονικοποιημένης τιμής Cq του δείγματος για κάθε miRNA βασίζεται στο γινόμενο: Κανονικοποιημένο Cq = Cq_{miRNA} × Παράγοντας Κανονικοποίησης, όπου Παράγοντας Κανονικοποίησης = $\frac{\text{Αναμενόμενο Cq cel-miR-39}}{\text{Λαμβανόμενο Cq cel-miR-39}}$

Για την εφαρμογή της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (242) χρησιμοποιούνται οι κανονικοποιημένες τιμές Cq τόσο για το miRNA στόχο όσο και το miRNA αναφοράς. Το miRNA αναφοράς είναι ένα ενδογενές miRNA σταθερής έκφρασης σε όλα τα δείγματα, η χρήση του οποίου εξασφαλίζει τον έλεγχο της ποιότητας των δειγμάτων. Για τα δείγματα πλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενές miRNA αναφοράς το miR-191. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την σταθερή έκφραση του miRNA σε κάθε τύπο δείγματος και σε κάθε τύπο καρκίνου, με βάση την αλγοριθμική ανάλυση του λογισμικού NormFinder (<http://moma.dk/normfinder-software>).

4.12. Χημική τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

4.12.1. Αρχή μεθόδου

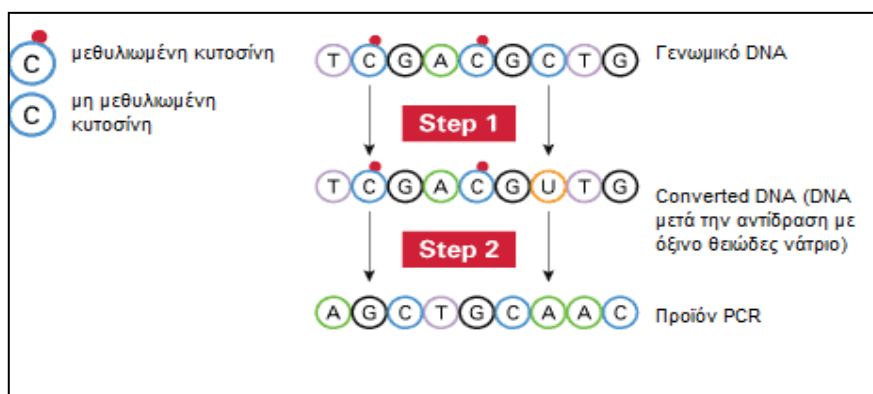
Κατά την επεξεργασία του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο, οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες (C) μετατρέπονται σε ουρακίλες (U), ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες (Σχήμα 4.9). Με βάση την αρχή αυτή προκύπτει ότι μετά την χημική μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο το DNA παύει να 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 ώστε να ενισχύει 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 με το EZ DNA Methylation Gold Kit (ZYMO Research, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του

πρωτοκόλλου 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 (H₂O), το οποίο έπειτα χρησιμοποιείται ως αρνητικό δείγμα ελέγχου στην αντίδραση της PCR.



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

4.12.2. 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 σωληνάρια (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 H₂O 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 έκλυσης στη μικροστήλη και την τοποθετούμε σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5mL
- Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 30sec, ώστε να συλλεγεί το DNA
- Ακολουθεί αποθήκευση του δείγματος στους -70°C για μετέπειτα χρήση

4.12.3. Οργανολογία

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

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιείται θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler[®] pro, Eppendorf, Germany) (**Σχήμα 4.11.β**).



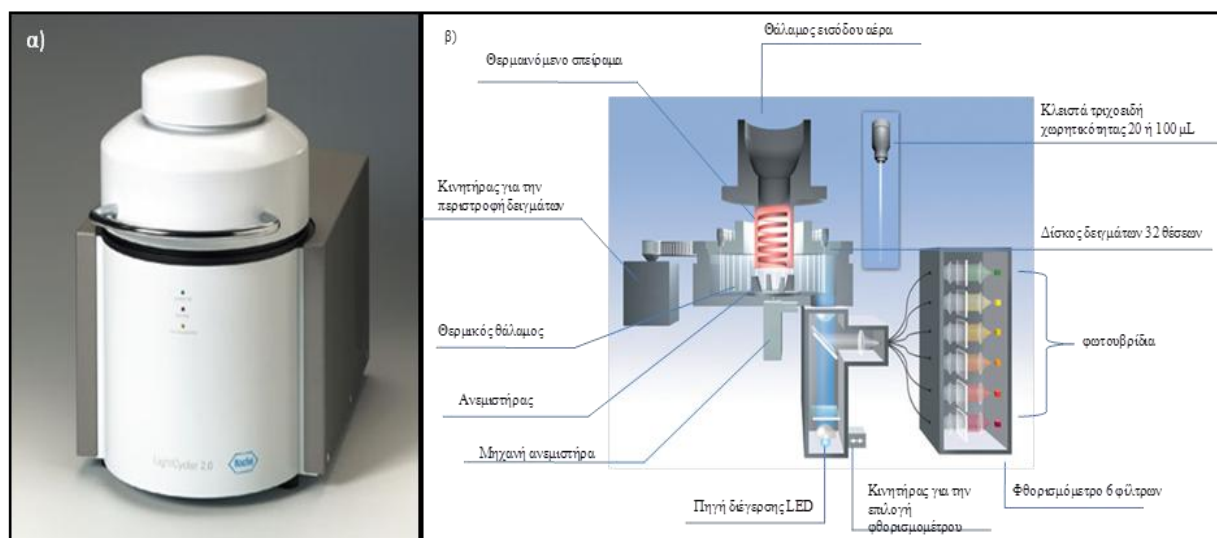
Σχήμα 4.11. α) Θάλαμος προετοιμασίας αντιδράσεων PCR (PCR hood), β) Θερμικός κυκλοποιητής DNA (Mastercycler® pro, Eppendorf)

4.13. Γενική οργανολογία

4.13.1. LightCycler® (Roche Diagnostics, Switzerland)

Στο όργανο LightCycler® η αντίδραση PCR πραγματοποιείται μέσα σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο, ενώ η θέρμανση και η ψύξη γίνεται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα.

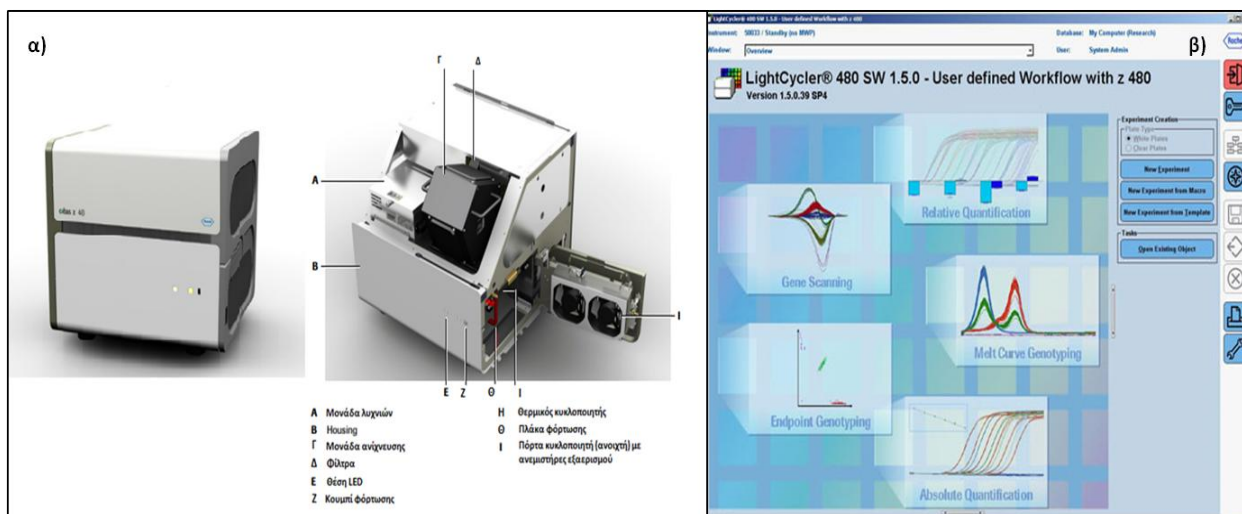
Το LightCycler 2.0 (Σχήμα 4.12) διακρίνεται από το LightCycler 1.5 ως προς τη δυνατότητα ανίχνευσης του εκπεμπόμενου φθορισμού σε έξι διαφορετικά μήκη κύματος. Συγκεκριμένα το φθορισμόμετρο αποτελείται από δύο μονάδες. Η μονάδα διέγερσης διαθέτει μια μπλε δίοδο LED, με μέγιστη εκπομπή στα 470nm που λειτουργεί 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, 705nm. Ένας δεύτερος μη σφαιρικός φακός μεταφέρει το σήμα από κάθε ανιχνευτή σε ένα φωτουβρίδιο για τη τελική αποτίμηση. Τα σήματα των φωτουβριδίων στέλνονται στο όργανο του LightCycler 2.0 μέσω μιας τμηματικής αλληλεπίδρασης.



Σχήμα 4.12. Σχηματική παράσταση α) του οργάνου LightCycler[®] 2.0 της Roche και β) της οργανολογίας του

4.13.2. 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 4.13). Το οπτικό σύστημα που διαθέτει, περιλαμβάνει μία μπλε δίοδο LED με φάσμα εκπομπής από 390-710nm και 5 φίλτρα εκπομπής (440, 465, 498, 533, 618nm), τα οποία σε συνδυασμό με τα έξι 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 4.13. α) Ο αναλυτής Cobas z480, β) Λογισμικό LightCycler® 480

4.14. Κυτταρικές σειρές

Οι καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών MCF-7 και SKBR3 πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, του τμήματος Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Υπεύθυνη: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ο. Τσιτσιλώνη).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs

5.1. Μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης στα CTCs

5.1.1. Εισαγωγή

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έγινε μελέτη σταθερότητας της έκφρασης του mRNA των CTCs σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα εμβολιασμού καρκινικών κυττάρων (spiking) σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος, με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων. Η σύγκριση έγινε ανάμεσα στα K₂EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, UK) σωληνάρια και σε έξι διαφορετικά σωληνάρια που περιέχουν ειδικά συντηρητικά. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 100 κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 10mL περιφερικού αίματος από υγιείς αιμοδότες και στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των CTCs με EpCAM⁺ ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό σε διαστήματα 0h, 24h και 48h. Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με TRIzol-LS και ακολούθησε η σύνθεση του cDNA. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων *B2M* και *CK-19* στα CTCs με ήδη αναπτυχθείσες RT-qPCR μεθοδολογίες.

5.1.2. Πειραματική πορεία

5.1.2.1. Εμβολιασμός δειγμάτων περιφερικού αίματος

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από υγιείς δότες σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος των 10mL με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων. Τα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος ήταν τα εξής: 1) K₂EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, UK), 2) cell-free RNA (cfRNA) BCT (Streck Inc., Omaha, NE, USA), 3) cell-free DNA (cfDNA) BCT (Streck Inc., Omaha, NE, USA), 4) BD/ACD-A σε συνδυασμό με Adnatubes (Adnagen, Qiagen), 5) Cellsave (Menarini Silicon Biosystems), 6) Transfix (Cytomark), 7) BD/ACD-A με προσθήκη τιροφιμπάνης (Sigma-Aldrich). Για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από επιθηλιακά κύτταρα κατά τη διαδικασία της

αιμοληψίας, τα πρώτα 5mL απορρίπτονται. Σε κάθε σωληνάριο, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 100 κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 10mL περιφερικού αίματος από υγιείς αιμοδότες και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωσή τους σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα: α) 0 (T_0), β) 24 (T_{24}) και γ) 48 (T_{48}) ώρες.

5.1.2.2. Απομόνωση των CTCs με EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό

10mL περιφερικού αίματος μεταφέρονται σε Falcon των 50mL και γίνεται προσθήκη RCL(1X) μέχρι τα 45mL του Falcon. Ακολουθεί επώαση για 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, φυγοκέντρηση (530g, 20min, θερμοκρασία περιβάλλοντος), απόχυση του υπερκειμένου και στη συνέχεια προσθήκη 30mL RCL(1X). Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρηση (530g, 10min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου και προσθήκη 10mL RCL(1X). Λαμβάνονται 10μL από το εναίωρημα και τοποθετούνται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL όπου προστίθενται και 90μL από τη χρωστική trypan blue. Μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως για ανοσομαγνητικό προσδιορισμό με τη χρήση σφαιριδίων (υποκεφάλαιο 4.2.3). Τέλος, πραγματοποιείται λύση των απομονωμένων κυττάρων με προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου TRIzol-LS.

5.1.2.3. Απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS (ThermoFisher, USA). Ακολούθησε η προσθήκη χλωροφορμίου στα σωληνάκια συλλογής τύπου Eppendorf που περιείχαν το 1mL TRIzol-LS. Μετά τη λήψη της υδατικής φάσης (ανώτερη στιβάδα), που περιέχει το ολικό RNA, ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στο υποκεφάλαιο 4.4. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του High capacity RNA to cDNA kit (υποκεφάλαιο 4.7). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε στο όργανο ND-1000 Spectrophotometer.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εφαρμόσαμε τις ήδη σχεδιασμένες, επικυρωμένες, ειδικές και εξαιρετικά ευαίσθητες RT-qPCR μεθοδολογίες για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *B2M* και *CK-19* (243,244). Σε όλες τις περιπτώσεις η ποιότητα των δειγμάτων

ελέγχθηκε με την RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler 2.0 (*IVD*, Roche Diagnostics), με συνθήκες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL cDNA σε 9μL μείγματος αντίδρασης. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε cDNA από κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών υδρόλυσης για τα γονίδια *B2M* και την *CK-19* δίνονται στους Πίνακες 5.1 και 5.4, καθώς και οι συνθήκες αντίδρασης για τα δύο γονίδια παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.2, 5.3, 5.5, 5.6.

Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *B2M*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>B2M</i>	Πρόσθιος εκκινητής	GCCTGCCGTGTGAACCATGT	63,7	99
	Ανάστροφος εκκινητής	AAATGCGGCATCTTCAAACCTC	63,2	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	6FAM-CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC -BBQ	73,4	

Πίνακας 5.2. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *B2M*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	4,92	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	1	0,5x
MgCl ₂ (25mM)	1,20	3mM
dNTPs (10mM)	0,15	150μM
BSA (10μg/μL)	0,30	0,3μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,25	0,25μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,25	0,25μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης (3μM)	0,83	0,25μM
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 5.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *B2M*

Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	58°C	20s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s	✓	
Ψύξη	40°C	30s		

Πίνακας 5.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υβριδισμού για το γονίδιο *CK-19*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>CK-19</i>	Πρόσθιος εκκινητής	CGGGACAAGATTCTTGGT	52,4	142
	Ανάστροφος εκκινητής	CGTTGATGTCGGCCTCCA	60,4	
	Ανιχνευτής υβριδισμού -FL	5'-TGTCTGCAGATCGACAACGCC-FL	71	
	Ανιχνευτής υβριδισμού-LC	LC640-CTGGCTGCAGATGACTCCGAACC-PH	69	

Πίνακας 5.5. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *CK-19*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	3,75	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,40	0,40μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,40	0,40μM
Ανιχνευτής υβριδισμού-FL (3μM)	0,50	0,15μM
Ανιχνευτής υβριδισμού-LC (3μM)	0,50	0,15μM
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 5.6. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *CK-19*

Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	55°C	20s	✓	
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s		
Ψύξη	40°C	30s		

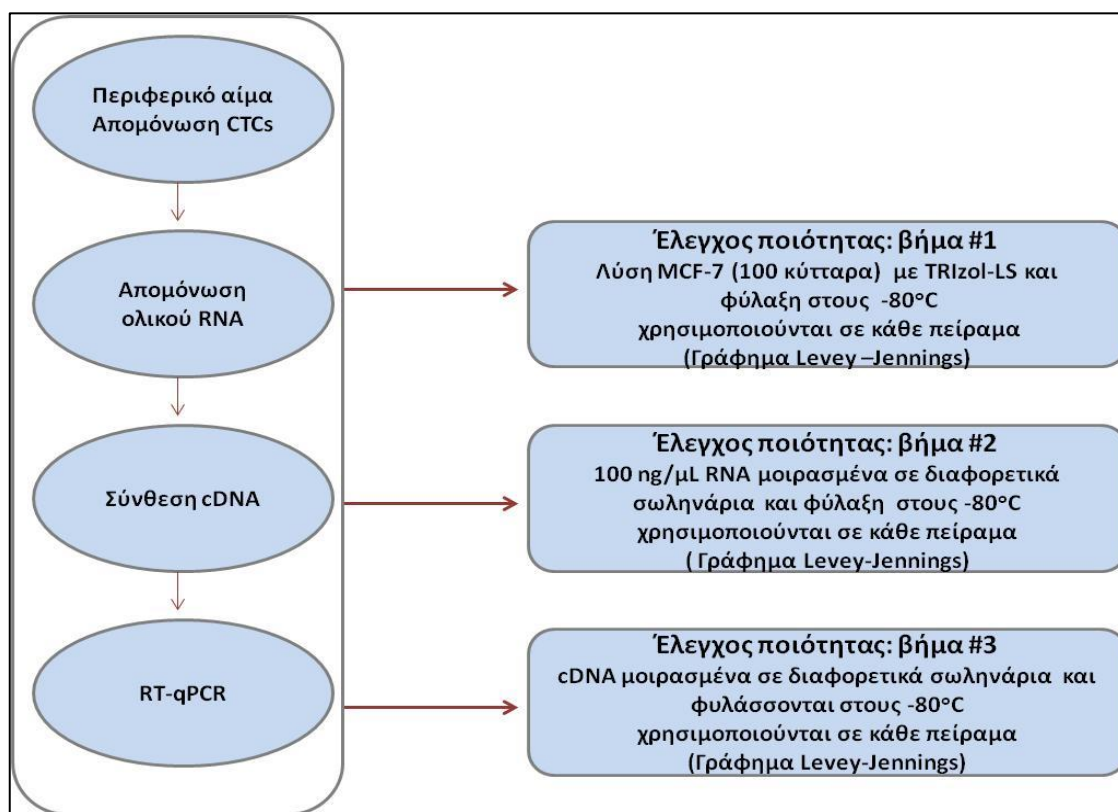
5.1.2.4. Στατιστική ανάλυση

Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα 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).

5.1.3. Αποτελέσματα

5.1.3.1. Έλεγχος ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα υγρής βιοψίας

Σε κάθε βήμα της αναλυτικής πορείας συμπεριλάβαμε κατάλληλα θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα και η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Τα θετικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν και για την παρακολούθηση της διακύμανσης της ανάλυσης με την πάροδο του χρόνου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες MIQE (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) (245). Σε κάθε πείραμα απομόνωσης του ολικού RNA, το θετικό δείγμα ελέγχου ήταν 100 κύτταρα MCF-7 στα οποία είχε προηγηθεί λύση τους με TRIzol-LS και αποθήκευση στους -80°C. Για τη σύνθεση του cDNA, θετικό δείγμα ελέγχου ήταν το RNA (100ng/μL) από κύτταρα MCF-7. Για την RT-qPCR, ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε cDNA από κύτταρα MCF-7. Για κάθε ένα από τα παραπάνω βήματα σχεδιάστηκαν γραφήματα Levey-Jennings για όλα τα θετικά δείγματα ελέγχου σύμφωνα με τη χρήση τους ως δείγματα ελέγχου στα εκάστοτε εξεταζόμενα γονίδια *B₂M* και *CK-19*. Το διάγραμμα της πειραματικής πορείας για τον έλεγχο ποιότητας των αναλύσεων παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5.1**.



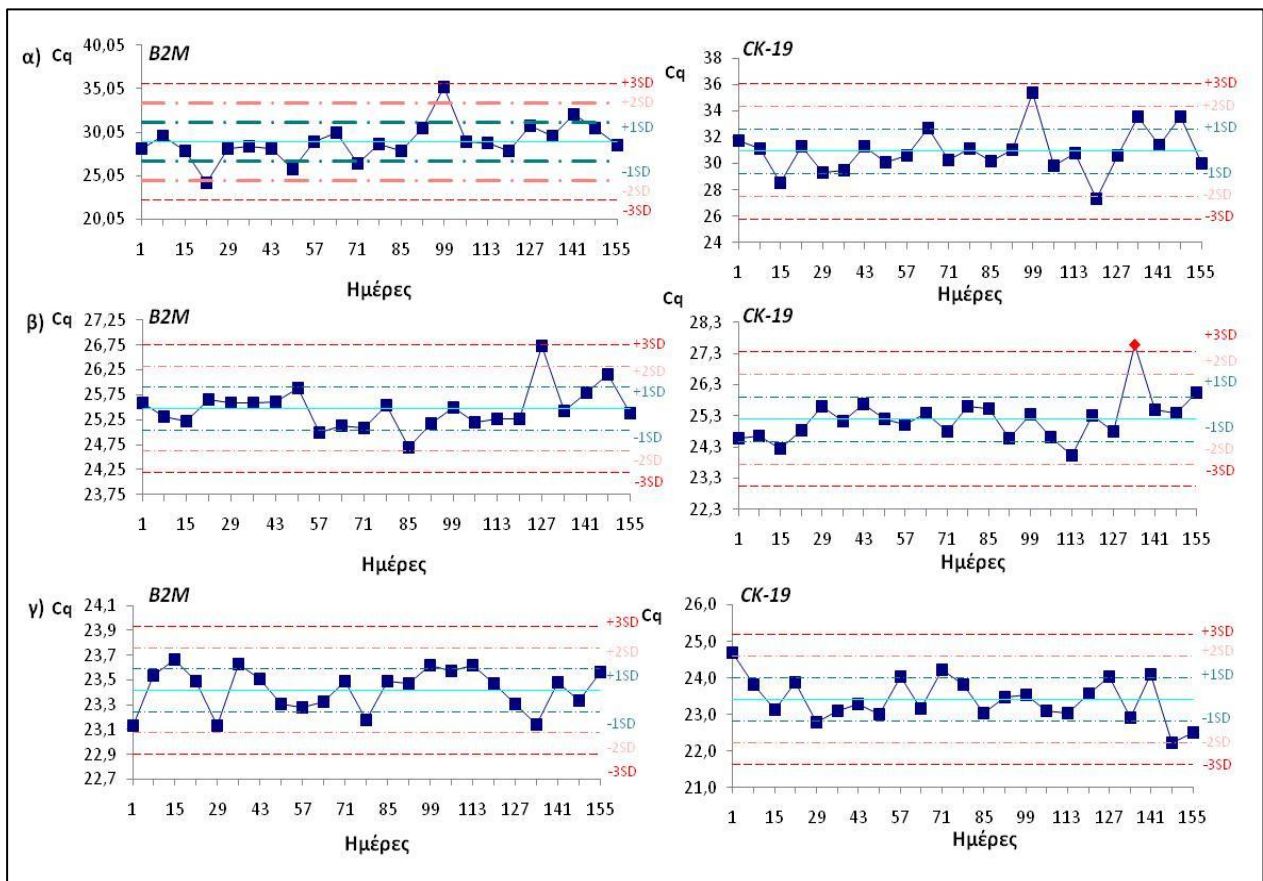
Σχήμα 5.1. Διάγραμμα πειραματικής πορείας για τον έλεγχο ποιότητας των αναλύσεων γονιδιακής έκφρασης σε CTCs

Έλεγχος ποιότητας της απομόνωσης του ολικού RNA: Για την αξιολόγηση της ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας της όλης διαδικασίας στον χρόνο, σε κάθε πείραμα απομόνωσης ολικού RNA, χρησιμοποιήθηκε ένα θετικό δείγμα ελέγχου και κατασκευάστηκαν γραφήματα Levey-Jennings. Για το σκοπό αυτό, 100 κύτταρα της καρκινικής σειράς MCF-7 μοιράστηκαν σε 23 διαφορετικά σωληνάρια τύπου Eppendorf και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε λύση τους με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS και αποθήκευση στους -80°C . Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2α**, σύμφωνα με τα γραφήματα Levey-Jennings που προέρχονται από τις 23 διαφορετικές διαδικασίες απομόνωσης ολικού RNA, που πραγματοποιήθηκαν σε διάρκεια πέντε μηνών, δεν παραβιάζεται κανένα από τα κριτήρια ποιότητας.

Έλεγχος ποιότητας της σύνθεσης του cDNA: Σε κάθε πείραμα σύνθεσης του cDNA συμπεριλήφθη ένα θετικό δείγμα ελέγχου. Για το σκοπό αυτό, $100\text{ng}/\mu\text{L}$ μοιράστηκαν σε 23 διαφορετικά σωληνάρια τύπου Eppendorf και αποθηκεύθηκαν στους -80°C . Δημιουργήθηκαν γραφήματα Levey-Jennings που περιλαμβάνουν τα θετικά δείγματα ελέγχου για καθένα από τα εξεταζόμενα γονίδια, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2β**. Για το γονίδιο αναφοράς *B2M*, 19/23 (82,6%) των συνολικών τιμών από τις μετρήσεις βρίσκεται στο $\pm 1\text{SD}$ από τη μέση τιμή, ενώ 3/23 τιμές των μετρήσεων βρίσκονται στο $\pm 2\text{SD}$ και 1/23 βρίσκεται στο $\pm 3\text{SD}$. Για τα θετικά δείγματα ελέγχου κατά τη σύνθεση του cDNA, για το γονίδιο *CK-19*, 19/23 (82,6%) των

συνολικών τιμών από τις μετρήσεις βρίσκεται στο $\pm 1SD$ από τη μέση τιμή, ενώ 3/23 τιμές των μετρήσεων βρίσκονται στο $\pm 2SD$. Σε μια περίπτωση (ημέρα 134), η τιμή C_q της μέτρησης υπερβαίνει τα όρια ελέγχου, υποδεικνύοντας ένα τυχαίο σφάλμα. Έτσι, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ αυτής της τιμής και των άλλων αποτελεσμάτων των αναλύσεων της ίδιας μέρα καθώς και των προηγούμενων, και εφόσον οι τιμές C_q του θετικού δείγματος ελέγχου ήταν μέσα στο $\pm 2SD$, το τελικό αποτέλεσμα έγινε δεκτό.

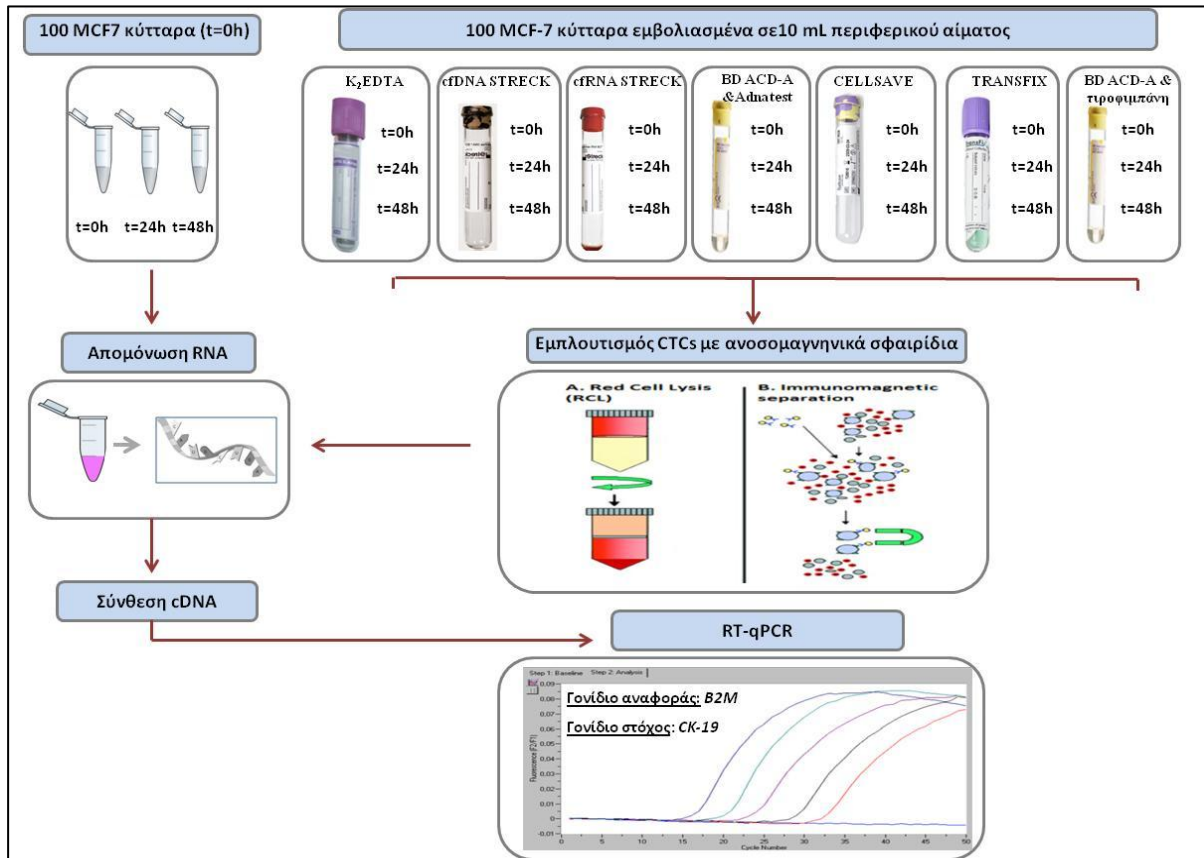
Έλεγχος ποιότητας της RT-qPCR: Για την αξιολόγηση της ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας της RT-qPCR σε κάθε πείραμα, χρησιμοποιήθηκε ένα θετικό δείγμα ελέγχου και κατασκευάστηκαν γραφήματα Levey-Jennings με σκοπό την καθιέρωση μιας διαδικασίας ποιοτικού ελέγχου για κάθε αναλυτικό πείραμα. Για το σκοπό αυτό, cDNA από κύτταρα MCF-7 μοιράστηκαν σε 23 διαφορετικά σωληνάρια τύπου Eppendorf και αποθηκεύθηκαν στους $-80^\circ C$. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2γ**, σύμφωνα με τα γραφήματα Levey-Jennings και για τα δυο εξεταζόμενα γονίδια (*B2M* και *CK-19*) δεν παραβιάζεται κανένα από τα κριτήρια ποιότητας.



Σχήμα 5.2. Γραφήματα Levey-Jennings. Έλεγχος ποιότητας της αναλυτικής διαδικασίας σε κάθε βήμα: α) απομόνωση ολικού RNA από τα CTCs, β) σύνθεση cDNA και γ) RT-qPCR (246)

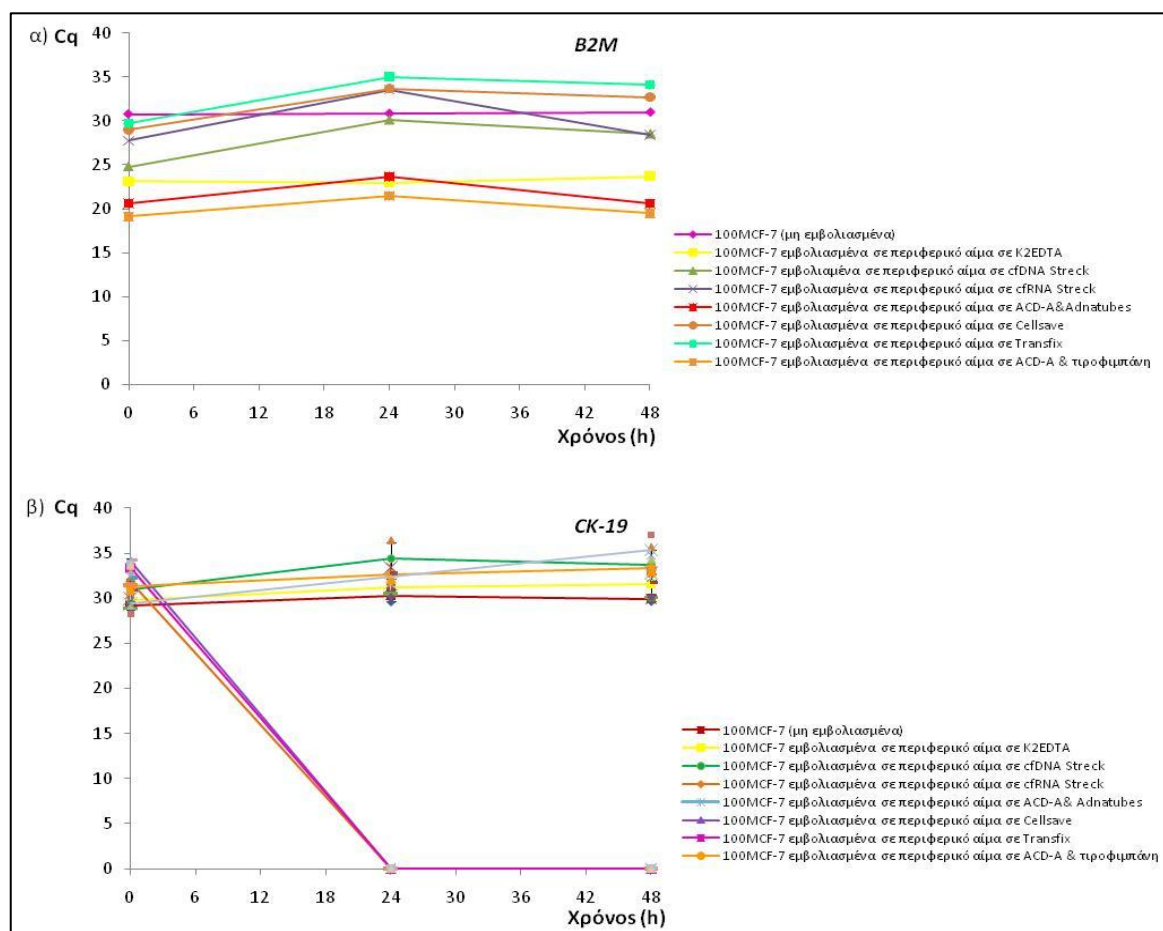
5.1.3.2. Μελέτη σταθερότητας της έκφρασης του mRNA των CTCs

Έγιναν πειράματα εμβολιασμού καρκινικών κυττάρων (spiking) σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος, με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων, με σκοπό τη μελέτη σταθερότητας της έκφρασης του mRNA των CTCs σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (Σχήμα 5.3).



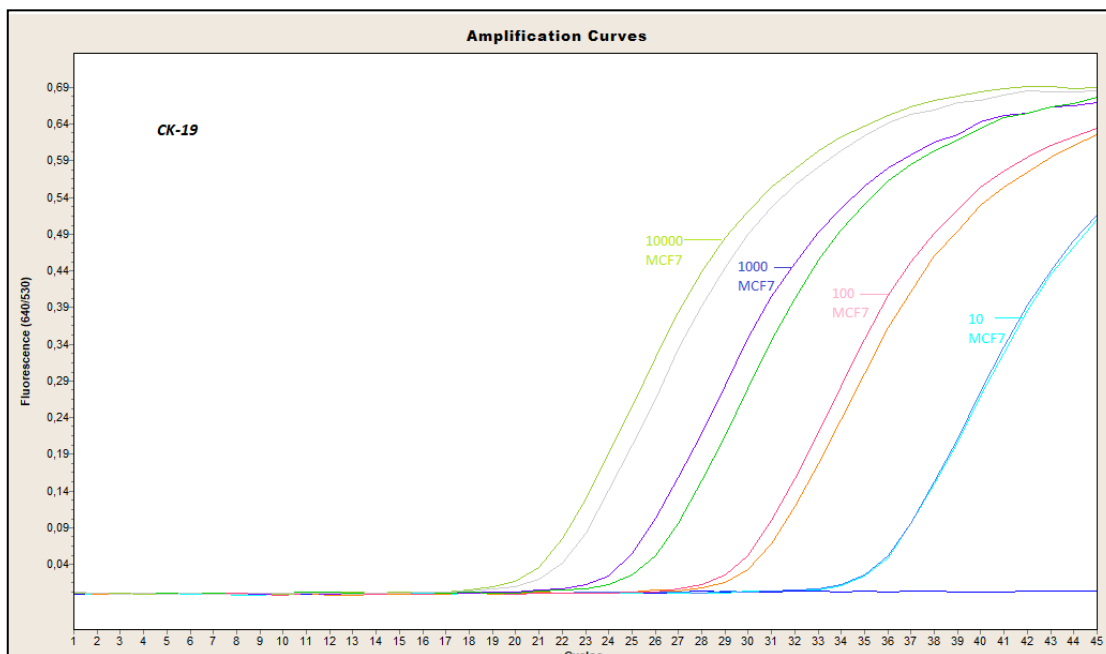
Σχήμα 5.3. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη σταθερότητας του mRNA των CTCs (246)

Όταν το περιφερικό αίμα των υγιών αιμοδοτών, εμβολιασμένο με 100 κύτταρα MCF-7, αποθηκεύτηκε σε K₂EDTA σωληνάρια, η έκφραση του γονιδίου *CK-19* ανιχνεύτηκε σε όλα τα χρονικά διαστήματα (T₀, T₂₄ και T₄₈). Σε σωληνάρια cfDNA-Streck και σε ACD-A με προσθήκη τιροφιμπάνης, παρατηρήθηκε έκφραση σε T₀, T₂₄ και T₄₈ αλλά με χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων. Στα σωληνάρια cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *CK-19* μόνο σε χρόνο T₀, υποδεικνύοντας την αρνητική επίδραση των αντιπηκτικών ή/και των συντηρητικών που περιέχονται σε αυτά. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* είναι χαμηλότερη στα cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix συγκρινόμενη με τα K₂EDTA. Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η έκφραση του mRNA των CTCs επηρεάζεται σημαντικά από τα αντιπηκτικά ή/και τα συντηρητικά που περιέχονται στα συγκεκριμένα σωληνάρια (Σχήμα 5.4).

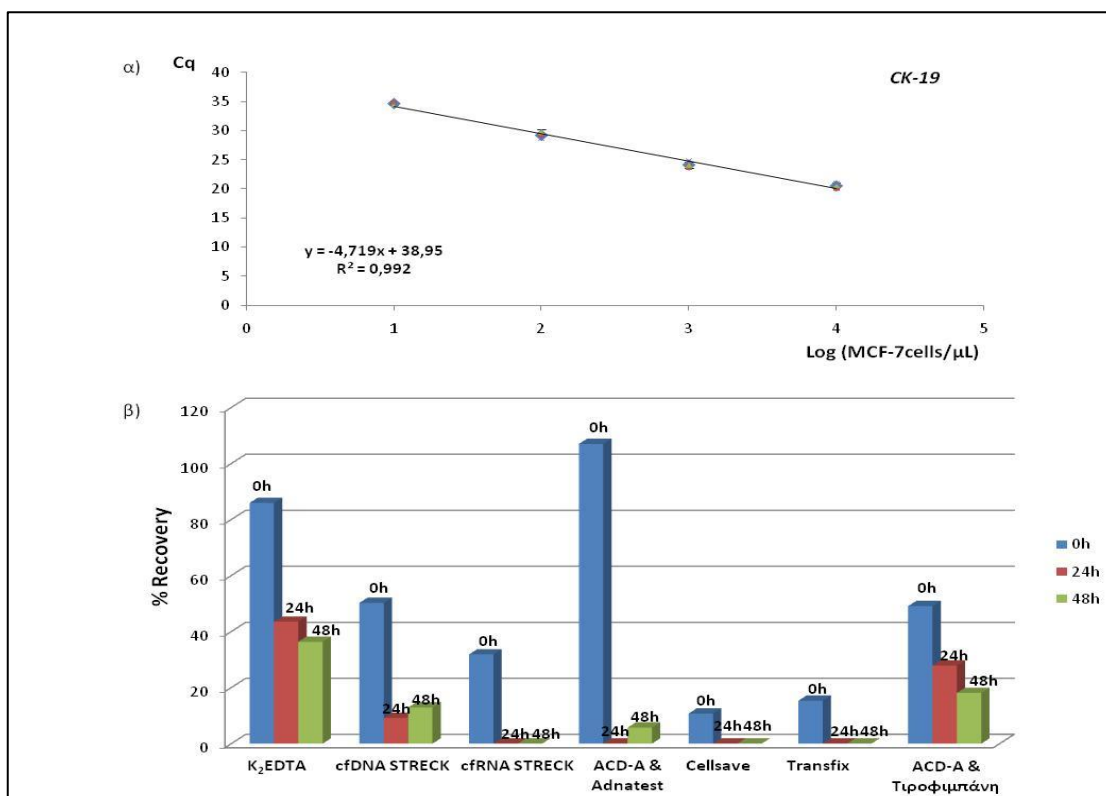


Σχήμα 5.4. Εκτίμηση της σταθερότητας του mRNA των CTCs στα 7 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα σωληνάρια σε τρία χρονικά διαστήματα (T_0 , T_{24} και T_{48}). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές Cq: α) *B2M* και β) *CK-19* (246)

Τα ποσοστά ανάκτησης σε όλα τα χρονικά διαστήματα υπολογίστηκαν συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με αυτά που προέκυψαν από MCF-7 κύτταρα τα οποία δεν εμβολιάστηκαν σε περιφερικό αίμα αλλά απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε λύση 10, 100, 1.000 και 10.000 κυττάρων MCF-7 με TRIzol-LS σε χρόνο T_0 και ακολούθησε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR (Σχήμα 5.5). Τα πρωτόκολλα περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4. Η καμπύλη βαθμονόμησης των αντιγράφων του γονιδίου *CK-19* που αντιστοιχεί στα 10, 100, 1.000 και 10.000 MCF-7 κύτταρα απεικονίζεται στο Σχήμα 5.6α. Η μέση ανάκτηση σε χρόνο T_0 ήταν 86% στα K_2EDTA , 50% στα cfDNA-Streck, 32% στα cfRNA-Streck, 107% στα ACD-A/Adnatubes, 11% στα Cellsave, 15% στα Transfix και 49% στα ACD-A/τιροφιμπάνη (Σχήμα 5.6β). Η μέση ανάκτηση σε χρόνο T_{24} ήταν 44% στα K_2EDTA , 9% στα cfDNA-Streck και 28% στα ACD-A/τιροφιμπάνη. Τέλος, η μέση ανάκτηση σε χρόνο T_{48} ήταν 36% στα K_2EDTA , 6% στα ACD-A/Adnatubes και 18% στα ACD-A/τιροφιμπάνη.



Σχήμα 5.5. Χαρακτηριστικό καταγράφημα RT-qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της CK-19 που αντιστοιχούν σε MCF-7 κύτταρα



Σχήμα 5.6. α) Καμπύλη βαθμονόμησης για την CK-19, τιμές Cq προς log(κυττάρων/μL), οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και β) % Ανάκτηση των κυττάρων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα για κάθε σωληνάριο (77)

5.2. Μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs

5.2.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σταθερότητα των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα που έχει απομονωθεί από περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών σε διαφορετικά σωληνάρια συλλογής του περιφερικού αίματος και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους απομόνωσης (T_0 , T_{24} και T_{48}). Η αξιολόγηση της επίδρασης των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών των σωληναρίων συλλογής του περιφερικού αίματος στηρίχθηκε στον συνδυασμό των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων δυο ενδογενών miRNAs, του miR-21 και του miR-191, καθώς και του εξωγενούς προτύπου cel-miR-39 που προστέθηκε στα δείγματα.

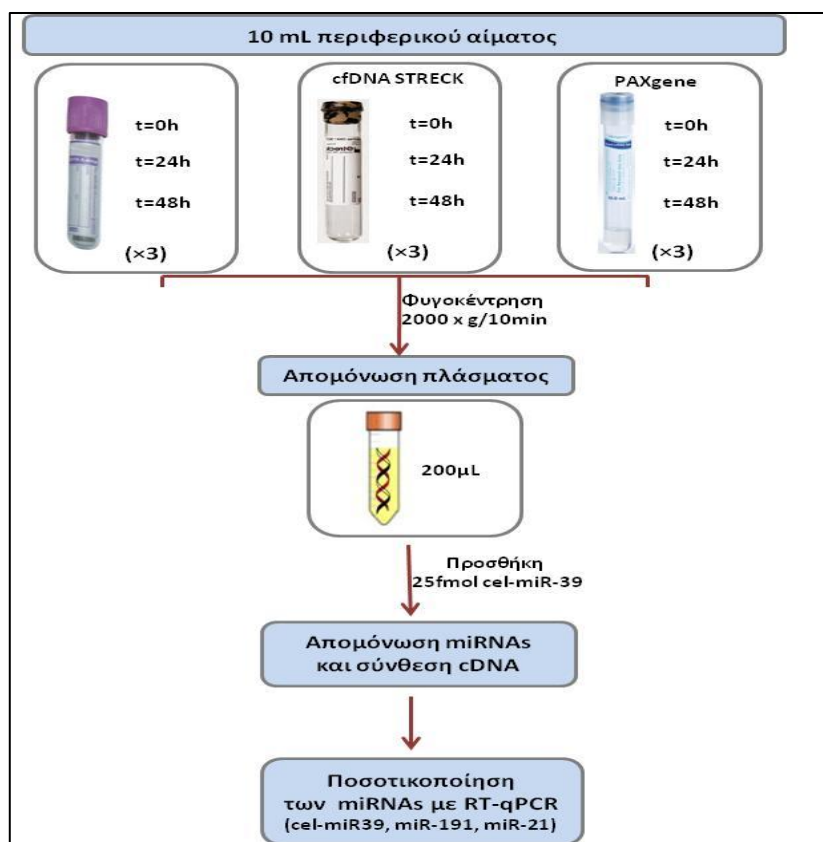
Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Το εξωγενές πρότυπο προστέθηκε στα δείγματα μετά την απόψυξή τους κατά τις διαφορετικές χρονικές στιγμές διεξαγωγής του πειράματος, με σκοπό να εκτιμηθεί εάν οι παρατηρούμενες αποκλίσεις στην ανάκτηση των ενδογενών miRNAs οφείλονται σε σφάλματα κατά τη διαδικασία απομόνωσης των miRNAs από τα δείγματα.

5.2.2. Πειραματική πορεία

Περιφερικό αίμα υγιών δοτών συλλέχθηκε σε σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος των 10mL με διαφορετική σύσταση αντιπηκτικού και συντηρητικών των κυττάρων. Τα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος ήταν τα εξής: 1) K_2EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, UK), 2) Paxgene (Qiagen, Germany), 3) cell-free DNA (cfDNA) BCT (Streck Inc., Omaha, NE, USA). Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του πλάσματος σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα: α) 0 (T_0), β) 24 (T_{24}) και γ) 48 (T_{48}) ώρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας.

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολούθησε απομόνωση του πλάσματος από το περιφερικό αίμα με φυγοκέντρηση στα 2000g για 10min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το διακριτό διαχωρισμό πλάσματος-ερυθρών αιμοσφαιρίων, το πλάσμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2mL. Ακολούθησε η απομόνωση από 200μL πλάσματος των miRNAs με το miRNeasy serum/plasma advanced kit (QIAGEN[®], Germany), η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (υποκεφάλαιο 4.10). Πριν την απομόνωση των miRNAs πραγματοποιήθηκε προσθήκη 25 fmol εξωγενούς miRNA από το

σκουλήκι *Caenorhabditis elegans* (*cel-miR-39*) στο πλάσμα. Το στάδιο αυτό χρειάζεται για τον έλεγχο της απόδοσης της διαδικασίας απομόνωσης των miRNAs από το δείγμα αλλά και των σταδίων που ακολουθούν μέχρι την τελική ποσοτικοποίηση των miRNAs (Σχήμα 5.7).



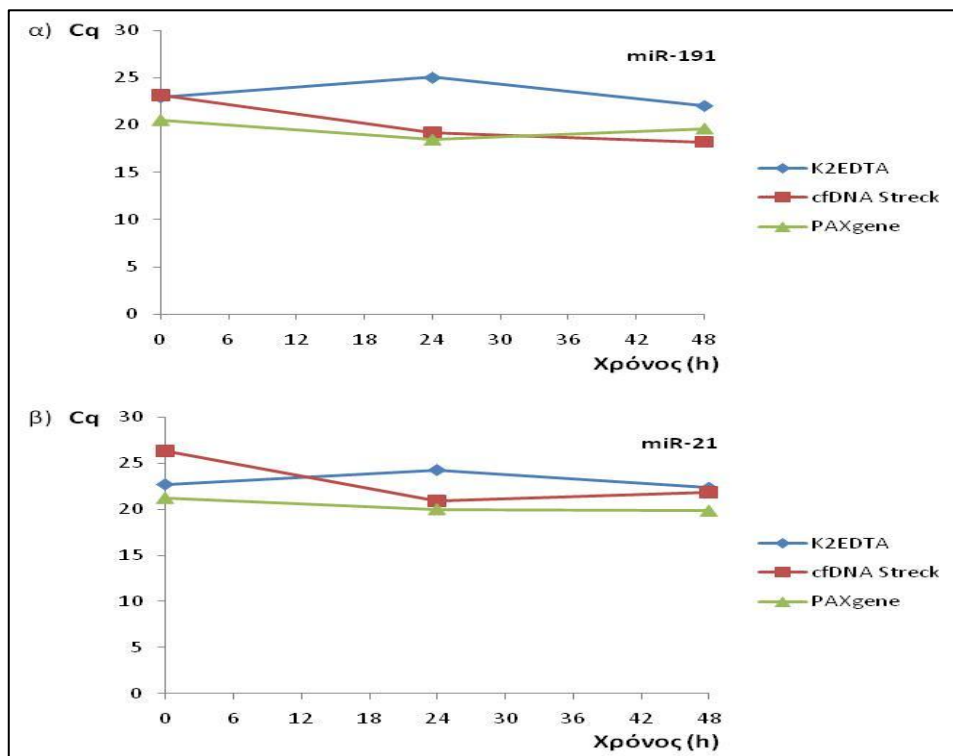
Σχήμα 5.7. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των miRNAs

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των miRNAs πραγματοποιήθηκε με μια αντίδραση δύο βημάτων αποτελούμενη από μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής η οποία ακολουθείται από ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.11.1. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA διεξήχθη με τη χρήση των αντιδραστηρίων TaqMan miRNA reverse transcription kit και TaqMan miRNA assays. Τα αντιδραστήρια αυτά εξασφαλίζουν την ενίσχυση των ώριμων miRNAs-στόχων με υψηλή ειδικότητα, αφού μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους miRNAs που διαφέρουν σε μία μόνο νουκλεοτιδική βάση, αλλά και μεγάλη απόδοση αντίδρασης.

Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας ποσοτικού προσδιορισμού των miRNAs περιλαμβάνει την ποσοτική RT-qPCR με τη χρήση ανιχνευτή TaqMan. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται κατά την ποσοτική PCR δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς και ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή.

5.2.3. Αποτελέσματα μελέτης προαναλυτικών παραμέτρων για την ποσοτικοποίηση των miRNAs

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης, απομονώθηκαν κυκλοφορούντα miRNAs από δείγματα πλάσματος υγιών αιμοδοτών με τη χρήση του miRNeasy serum/plasma advanced kit. Η αξιολόγηση της επίδρασης των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών των σωληναρίων συλλογής του περιφερικού αίματος στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των ενδογενών miR-191 και miR-21 (Σχήμα 5.8) και των επιπέδων του εξωγενούς προτύπου cel-miR-39 που προστέθηκε σε όλα τα δείγματα πριν την απομόνωση.



Σχήμα 5.8. Εκτίμηση της σταθερότητας των miRNAs στο πλάσμα σε 3 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα σωληνάρια σε τρία χρονικά διαστήματα (T_0 , T_{24} και T_{48}). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές Cq κανονικοποιημένες με το εξωγενές cel-miR-39: α) για το miR-191 και β) για το miR-21

5.3. Συμπεράσματα-συζήτηση

Οι προαναλυτικοί παράγοντες, αν δεν λαμβάνονται υπόψη και δεν ελέγχονται επαρκώς, μπορούν να έχουν σοβαρή επίδραση τόσο στην ποιότητα του δείγματος όσο και στην ποιότητα της μοριακής ανάλυσης. Με το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα μοριακά και συνοδά διαγνωστικά τεστ, η ανάπτυξη και η εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων ελέγχου ποιότητας σε όλα τα στάδια της διαδικασίας είναι κρίσιμη για την επιτυχή εφαρμογή τους (247). Η ανάπτυξη

μοριακών αναλύσεων στο περιφερικό αίμα με σκοπό την πρόγνωση και διάγνωση του καρκίνου έχει δημιουργήσει μια ανάγκη για χρήση αντιπηκτικών και συντηρητικών με σκοπό τη διατήρηση των κυττάρων του αίματος για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (248). Τα αντιπηκτικά και τα συντηρητικά προστίθενται συνήθως στα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος είτε για να διατηρήσουν το αίμα στην υγρή κατάσταση για αιματολογικά τεστ, ή για την απομόνωση κατάλληλου πλάσματος για αναλύσεις κλινικής χημείας (249).

Η κλινική χρησιμότητα των δοκιμασιών υγρής βιοψίας μπορεί να αξιολογηθεί μόνο όταν βασίζεται σε προτυποποιημένες και αυστηρά ελεγχόμενες διαδικασίες, καθώς η έλλειψη προτυποποιημένης διαδικασίας αναλύσεων παρεμποδίζει σοβαρά την εφαρμογή των διαγνωστικών εξετάσεων, που βασίζονται σε CTC και ctDNA (250). Για παράδειγμα, η μοριακή ανάλυση των CTCs περιορίζεται λόγω του ότι απαιτείται άμεση επεξεργασία του περιφερικού αίματος (μέσα σε 4h) από τη λήψη του (251,252). Για να ελαχιστοποιηθούν τα προαναλυτικά σφάλματα λόγω της σταθερότητας των CTCs στο περιφερικό αίμα κατά τη μεταφορά τους, έχει κατασκευαστεί μια πληθώρα εμπορικά διαθέσιμων σωληναρίων συλλογής περιφερικού αίματος με τη χρήση συγκεκριμένων συντηρητικών ή αντιπηκτικών που έχουν ως στόχο να παρατείνουν το χρόνο μεταξύ της λήψης του αίματος και της απομόνωσης των CTCs. Μια κατηγορία εμπορικά διαθέσιμων σωληναρίων συλλογής περιφερικού αίματος, τα cfDNA-Streck σταθεροποιούν τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος αποτρέποντας την απελευθέρωση DNA των κυττάρων στο πλάσμα (253–255). Ωστόσο, τα περισσότερα σωληνάρια έχουν κατασκευαστεί για αναλύσεις CTCs σε επίπεδο πρωτεϊνών βασισμένες σε απεικονιστικές τεχνικές και δεν έχει αξιολογηθεί η δυνατότητα χρήση τους σε αναλύσεις CTCs σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε πρώτα την επίδραση των προαναλυτικών συνθηκών για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CTCs. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι αναλύσεις των CTCs σε επίπεδο mRNA επηρεάζονται από τα συντηρητικά ή/και τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος. Όταν το περιφερικό αίμα των υγιών αιμοδοτών, εμβολιασμένο με 100 κύτταρα MCF-7, αποθηκεύτηκε σε K₂EDTA σωληνάρια, ανιχνεύτηκε η έκφραση του γονιδίου *CK-19* σε όλα τα χρονικά διαστήματα (T₀, T₂₄ και T₄₈). Τα αποτελέσματά μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Lu et al. για τον ποσοτικό προσδιορισμό του *AR-V7* στα CTCs με ddPCR (256).

Οι Rodriguez-Lee et al. έδειξαν ότι η υψηλής απόδοσης ανάλυση μονήρων κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά τόσο από το είδος των σωληναρίων όσο και από το χρόνο μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Ειδικότερα, έδειξαν ότι τα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος cfDNA-Streck που προχώρησαν σε ανάλυση εντός 24h από τη λήψη του αίματος,

παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ανίχνευσης σπάνιων κυττάρων του όγκου και μπορούν με ασφάλεια να χρησιμοποιηθούν για τέτοιου είδους αναλύσεις (257). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι σε σωληνάρια cfDNA-Streck και σε ACD-A με προσθήκη τροφοιμπάνης, παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *CK-19* σε T_0 , T_{24} και T_{48} αλλά με χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων σε σύγκριση μ' αυτά των K_2EDTA . Οι διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματά μας και στα αποτελέσματα άλλων μελετών οφείλονται πιθανότατα στις διαφορετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των CTCs (257,258).

Στα σωληνάρια cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *CK-19* μόνο σε χρόνο T_0 , δείχνοντας την αρνητική επίδραση των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών που περιέχονται σ' αυτά στον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA στα CTCs. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* είναι χαμηλότερη στα cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix συγκρινόμενη με τα K_2EDTA . Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA των CTCs επηρεάζεται σημαντικά από τα αντιπηκτικά ή τα συντηρητικά που περιέχονται στα συγκεκριμένα σωληνάρια. Η βέλτιστη επιλογή σωληναρίων συλλογής περιφερικού αίματος για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CTCs είναι τα K_2EDTA .

Σε δεύτερη φάση, αξιολογήσαμε την επίδραση προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σταθερότητα των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα που έχει απομονωθεί από περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών σε διαφορετικά σωληνάρια συλλογής του περιφερικού αίματος (K_2EDTA , cfDNA, Paxgene) και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους απομόνωσης (T_0 , T_{24} και T_{48}). Η αξιολόγηση της επίδρασης των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών των σωληναρίων συλλογής του περιφερικού αίματος στηρίχθηκε στον συνδυασμό των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων δυο ενδογενών miRNAs, του miR-21 και του miR-191 καθώς και του εξωγενούς προτύπου cel-miR-39 που προστέθηκε στα δείγματα.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός των miRNAs δεν επηρεάζεται σημαντικά από τα αντιπηκτικά ή/και τα συντηρητικά των σωληναρίων συλλογής καθώς ανιχνεύονται τα miR-21, miR-191 και cel-miR-39 σε T_0 , T_{24} και T_{48} . Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται στην ποσοτικοποίηση τόσο του εξωγενούς cel-miR-39 όσο και των ενδογενών miR-21 και miR-191 καθώς οι τιμές Cq δεν μεταβάλλονται σημαντικά στα K_2EDTA , cfDNA και Paxgene. Ωστόσο στα K_2EDTA έχουμε καλύτερη ανάκτηση του εξωγενούς cel-miR-39 σε σχέση με την ανάκτησή του στα cfDNA και Paxgene σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

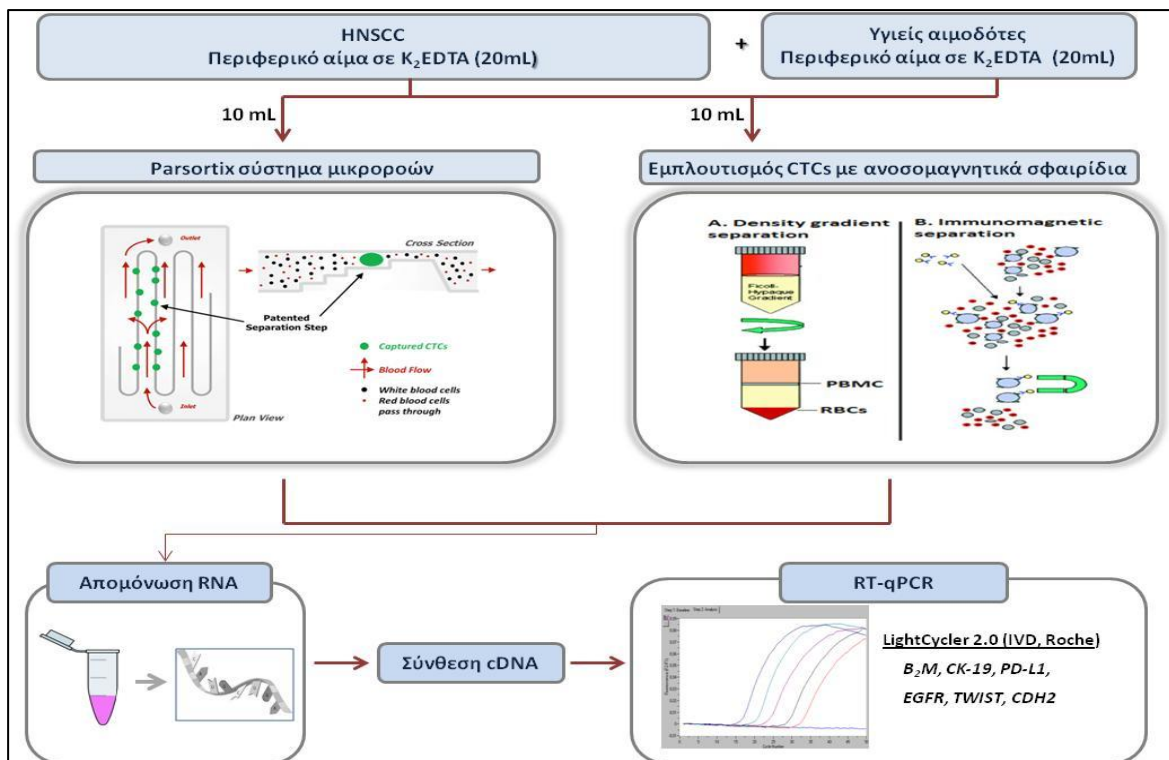
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CTCs ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC)

6.1. Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν α) αρχικά η επιλογή του βέλτιστου συστήματος απομόνωσης/εμπλουτισμού για το μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs και β) ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης στον HNSCC. Για αυτό το λόγο, συγκρίναμε άμεσα την πλατφόρμα απομόνωσης Parsortix, που βασίζεται σε σύστημα μικροροών για την απομόνωση/εμπλουτισμό των CTCs με βάση το μέγεθός τους, με τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs με βάση το EpCAM από το ίδιο περιφερικό αίμα ασθενών με HNSCC.

6.2. Πειραματική πορεία

Σε όλα τα βήματα της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε ο ανάλογος έλεγχος ποιότητας, όπως αυτός περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.1.3.1 της παρούσας διατριβής. Το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.1**.



Σχήμα 6.1. Διάγραμμα ροής για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων σε ασθενείς με HNSCC

6.2.1. Κλινικά δείγματα

Αρχικά, συλλέχθηκε ταυτόχρονα περιφερικό αίμα σε δύο K₂EDTA σωληνάρια συλλογής των 10mL (BD Vacutainer, Plymouth,UK) από 50 ασθενείς με HNSCC από το Π.Γ.Ν. «Αττικόν» (Υπεύθυνη: Αναπλ. Καθ. Α. Ψυρρή) και 18 υγιείς αιμοδότες. Η απομόνωση των CTC πραγματοποιήθηκε εντός 3h μετά τη συλλογή του δείγματος. Τα πρώτα 5ml του αίματος απορρίφθηκαν για να αποφευχθεί η επιμόλυνση από επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος. Τα δείγματα αναδεύτηκαν ήπια αμέσως μετά τη συλλογή και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

6.2.2.Απομόνωση των CTCs με το σύστημα Parsortix

Ο εμπλουτισμός του ολικού αίματος (10mL) σε CTCs γίνεται με εφαρμογή πρωτοκόλλων, όπως αυτά περιγράφονται από τον κατασκευαστή (υποκεφάλαιο 4.3) και ο διαχωρισμός των CTCs από τους υπόλοιπους κυτταρικούς υποπληθυσμούς λαμβάνει χώρα σε κασέτα. Τα κύτταρα καταλήγουν σε τερματική διχάλα διατομής 6,5μm, όπου επιτρέπεται η διέλευση μόνο των CTCs. 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 αποθήκευση στους -70°C.

6.2.3.Απομόνωση των CTCs μέσω EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού

Δέκα mL (10mL) περιφερικού αίματος μεταφέρονται σε Falcon των 50mL και γίνεται προσθήκη 35mL RCL(1X). Επώαση για 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρηση (530g, 20min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου και στη συνέχεια προσθήκη 30mL RCL(1X). Επώαση για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρηση (530g, 10min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου και προσθήκη 10mL RCL(1X). Λαμβάνονται 10μL από το εναίωρημα και τοποθετούνται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL όπου προστίθενται και 90μL από τη χρωστική trypan blue. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως για ανοσομαγνητικό προσδιορισμό με τη χρήση σφαιριδίων (υποκεφάλαιο 4.2.3). Τέλος,

πραγματοποιείται λύση των απομονωμένων κυττάρων με προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου TRIzol-LS και αποθήκευση στους -70°C .

6.2.4. Απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS (υποκεφάλαιο 4.4). Ακολούθησε η προσθήκη χλωροφορμίου στα σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf που περιείχαν το 1mL TRIzol-LS. Μετά τη λήψη της υδατικής φάσης (ανώτερη στιβάδα), που περιέχει το ολικό RNA, ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης RNA όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στο υποκεφάλαιο 4.4. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση του High capacity RNA to cDNA kit (υποκεφάλαιο 4.7). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εφαρμόσαμε τις προηγούμενα σχεδιασμένες, επικυρωμένες, ειδικές και εξαιρετικά ευαίσθητες RT-qPCR μεθοδολογίες για τα γονίδια *PD-L1* (184), *CK-19* (243,244), *EGFR*, *CDH2* (123), *TWIST1* και *B2M* (χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς). Σε όλες τις περιπτώσεις η ποιότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με την RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler 2.0 (IVD, Roche Diagnostics), με συνθήκες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL cDNA σε 9μL μείγματος αντίδρασης. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε cDNA από MCF-7 κύτταρα (246). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών για τα γονίδια *B2M*, *CK-19* δίνονται στο κεφάλαιο 5. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών για τα *PD-L1*, *EGFR* και *TWIST1* δίνονται στους Πίνακες 6.1, 6.4, 6.8, καθώς και οι συνθήκες αντίδρασης για τα τρία γονίδια παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.3, 6.7, 6.9.

Πίνακας 6.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *PD-L1*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>PD-L1</i>	Πρόσθιος εκκινητής	5'-GCTGAATTGGTCATCCCAGAA-3'	59,8	163
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-TTTCACATCCATCATCTCCCTT-3'	60,2	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	6FAM-ACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAG-BBQ	69,8	

Πίνακας 6.2. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *PD-L1*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	2,67	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	3	1,5x
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,60	0,6μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης (3μM)	0,83	0,25μM
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 6.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *PD-L1*

Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	58°C	20s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s	✓	
Ψύξη	40°C	30s		

Πίνακας 6.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *EGFR*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>EGFR</i>	Πρόσθιος εκκινητής	5' – ACAGCTATGAGATGGAGGAAGAC -3'	57,1	88
	Ανάστροφος εκκινητής	5'- CCAATACCTATTCCGTTACACACT-3'	57,6	
	Ανιχνευτής υβριδισμού-FL	5'-GCGGCAAGGCCCTTCGCA-FL	69,6	
	Ανιχνευτής υβριδισμού-LC	5'-LC705-TTCTTACACTTGGCGACGCCGTC-PH	68,3	

Πίνακας 6.5. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *EGFR*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	4,95	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	1	0,5x
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανιχνευτής υβριδισμού-FL (3μM)	0,50	0,15μM
Ανιχνευτής υβριδισμού-LC (3μM)	0,50	0,15μM
Τaq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 6.6. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *EGFR*

Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	55°C	20s	✓	
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s		
Ψύξη	40°C	30s		

Πίνακας 6.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *TWIST1*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>TWIST1</i>	Πρόσθιος εκκινητής	5'- GGCCGGAGACCTAGATGT -3'	59,8	163
	Ανάστροφος εκκινητής	5'- CACGCCCTGTTTCTTTGAAT -3'	60,2	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	6FAM-TGGACAGTCTAGAGACTCTGGAGCTGG-BBQ	69,8	

Πίνακας 6.8. Συστατικά της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *TWIST1*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	3,55	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,50	0,50μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,50	0,50μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης (3μM)	1	0,30μM
Τaq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 6.9. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *TWIST1*

Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	63°C	20s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s	✓	
Ψύξη	40°C	30s		

6.2.5. Κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* στα CTCs

Η κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* στα CTCs πραγματοποιείται σύμφωνα με την έκφραση του *B2M*, ως γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen) (242).

Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* εκτιμάται ως μια σχετική αναλογία προς την έκφραση του *B2M* τόσο στο κλάσμα CTCs των ασθενών, όσο και στο αντίστοιχο κλάσμα CTCs της ομάδας των υγιών αιμοδοτών, που χρησιμοποιήθηκε ως βαθμονομητής. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$, αξιολογήθηκε η υπερ-έκφραση των γονιδίων *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* στο κλάσμα CTCs των δειγμάτων.

Στα CTCs, ένα δείγμα χαρακτηρίστηκε θετικό στην υπερέκφραση των γονιδίων *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* με βάση την αλλαγή της έκφρασής τους σε σχέση με την ομάδα των 18 υγιών αιμοδοτών που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Η τιμή cut-off (μέση τιμή $\pm 2SD$), υπολογίστηκε σύμφωνα με την έκφραση των γονιδίων *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* στο κλάσμα CTCs του υγιούς πληθυσμού, που αναλύθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως τα δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών. Πιο αναλυτικά, για αυτά τα 18 δείγματα ελέγχου, μετρήθηκε η διαφορά της τιμής του C_q ($\Delta C_{q\text{control}}$) για τα *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* από την αντίστοιχη τιμή C_q για το *B2M* (για παράδειγμα, $C_{qPD-L1} - C_{qB2M}$) και υπολογίστηκε η μέση τιμή τους. Ακολούθησε υπολογισμός του $\Delta\Delta C_q$ (ΔC_q -μέση τιμή) για κάθε δείγμα ελέγχου και στη συνέχεια υπολογίστηκε το $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Η μέση τιμή των 18 τιμών $2^{-\Delta\Delta C_q}$ των υγιών αιμοδοτών $\pm 2SD$ αποτελεί το cut-off για την υπερέκφραση των γονιδίων *PD-L1*, *TWIST* και *CDH2* στα CTCs των ασθενών με HNSCC.

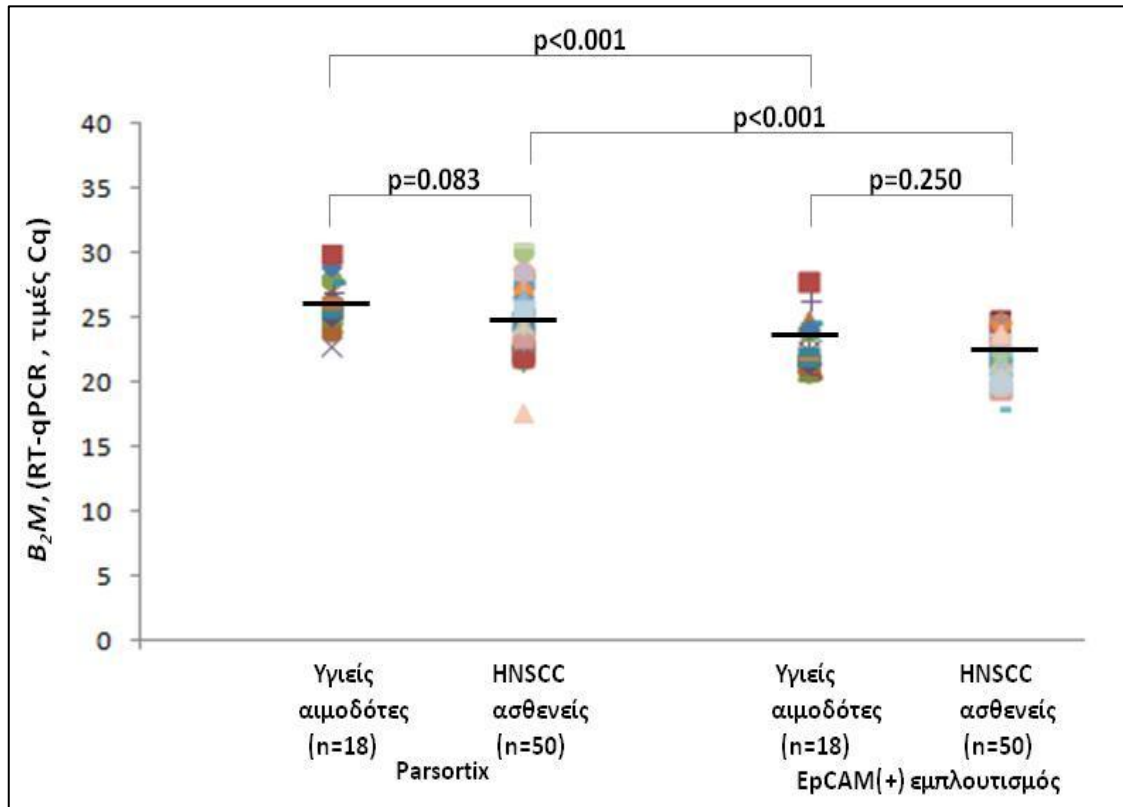
6.2.6. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL). Τα δεδομένα της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων αναλύθηκαν με την εφαρμογή του μη παραμετρικού Mann–Whitney U τεστ. Οι τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

6.3. Αποτελέσματα

6.3.1. Σύγκριση μεταξύ του Parsortix και του EpCAM-θετικού CTC εμπλουτισμού σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων

Αρχικά αξιολογήσαμε με ποσοτικό τρόπο τις δυο διαφορετικές μεθόδους εμπλουτισμού, που διεξήχθησαν παράλληλα, με αναλύσεις έκφρασης των CTC χρησιμοποιώντας ακριβώς την ίδια πορεία για την απομόνωση του RNA και τις μεθοδολογίες RT-qPCR. Τα αποτελέσματά αυτά δείχνουν μια σαφώς σημαντική διαφορά των επιπέδων έκφρασης του *B2M* μεταξύ του εμπλουτισμού που πραγματοποιείται με το Parsortix έναντι του EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2**, οι τιμές C_q για το *B2M* είναι σημαντικά χαμηλότερες στα CTC που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό σε σχέση με τα CTC που απομονώθηκαν με Parsortix, υποδεικνύοντας έναν μεγαλύτερο αριθμό μεταγράφων του *B2M*, που σίγουρα οφείλεται στον μεγαλύτερο αριθμό των PBMCs που συναπομονώνονται με τα CTCs. Η έκφραση του γονιδίου *B2M* δεν διαφέρει μεταξύ των ασθενών με HNSCC και των υγιών αιμοδοτών σε κάθε σύστημα εμπλουτισμού όπως είναι αναμενόμενο, καθώς το γονίδιο αυτό εκφράζεται τόσο στα CTCs όσο και στα PBMCs (**Σχήμα 6.2**)



Σχήμα 6.2. Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της RT-qPCR για το *B2M* (γονίδιο αναφοράς) στα δείγματα υγιών αιμοδοτών και HNSCC ασθενών

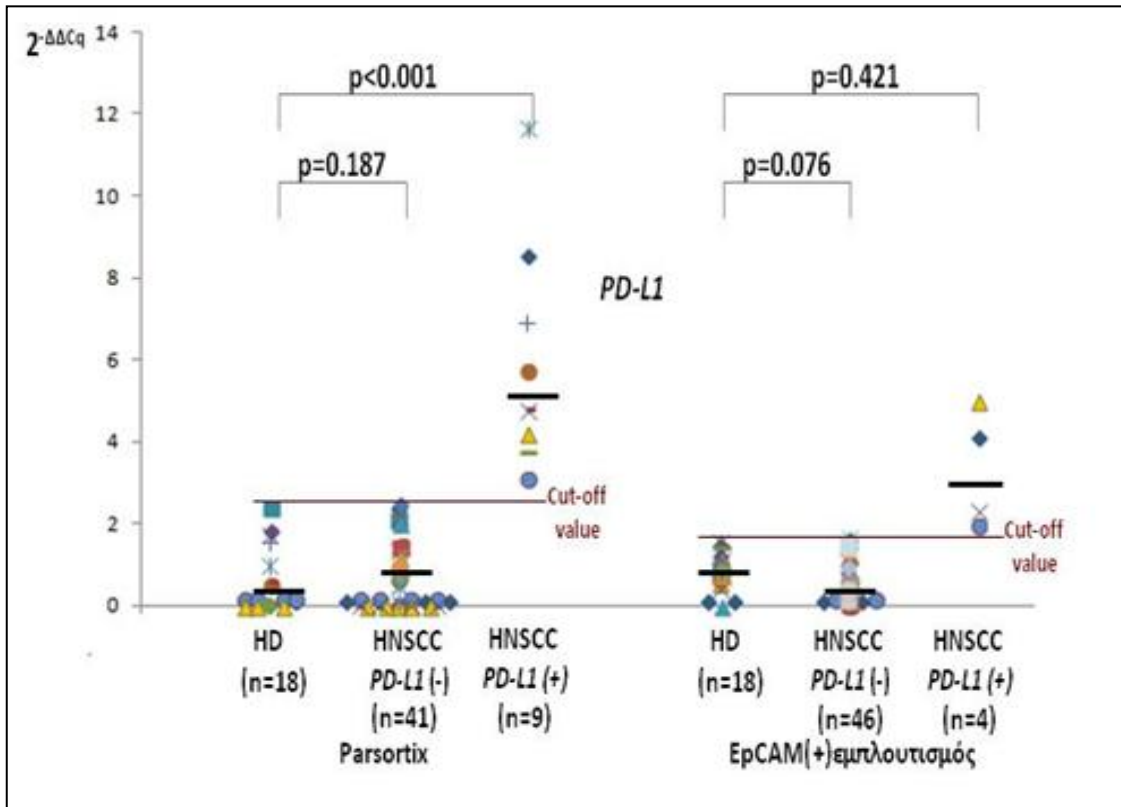
6.3.2. Πειραματικά αποτελέσματα: εμπλουτισμός με Parsortix

Το περιφερικό 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 ολικού RNA, η σύνθεση του cDNA και οι αναλύσεις με RT-qPCR έγιναν ακριβώς με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Όλα τα δείγματα που απομονώθηκαν με το Parsortix ήταν εξαιρετικής ποιότητας όπως αυτό πιστοποιήθηκε από τις τιμές του γονιδίου αναφοράς *B2M*. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του *PD-L1* πραγματοποιείται σύμφωνα με την έκφραση του *B2M*, χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Σχήμα 6.3). Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *PD-L1* στο Parsortix ήταν 0,48 (εύρος: 0-2,39) στους υγιείς, 0,71 (εύρος: 0-2,48) στους *PD-L1* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 5,94 (εύρος: 3,07-11,63) στους *PD-L1* θετικούς HNSCC ασθενείς. Οι τιμές ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) για τα *TWIST1* και *CDH2* δίνονται στα Σχήματα 6.4 και 6.5 αντίστοιχα. Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *TWIST1* στο Parsortix ήταν 0,75 (εύρος: 0-5,35) στους υγιείς, 0,10 (εύρος: 0-2,04) στους *TWIST1* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 227,19 (εύρος: 18,90-982,29) στους *TWIST1* θετικούς HNSCC ασθενείς. Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *CDH2* στο Parsortix ήταν 0,45 (εύρος: 0-1,95) στους υγιείς, 0,13 (εύρος: 0-1,35) στους *CDH2* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 22,6 (εύρος: 4,08-58,49) στους

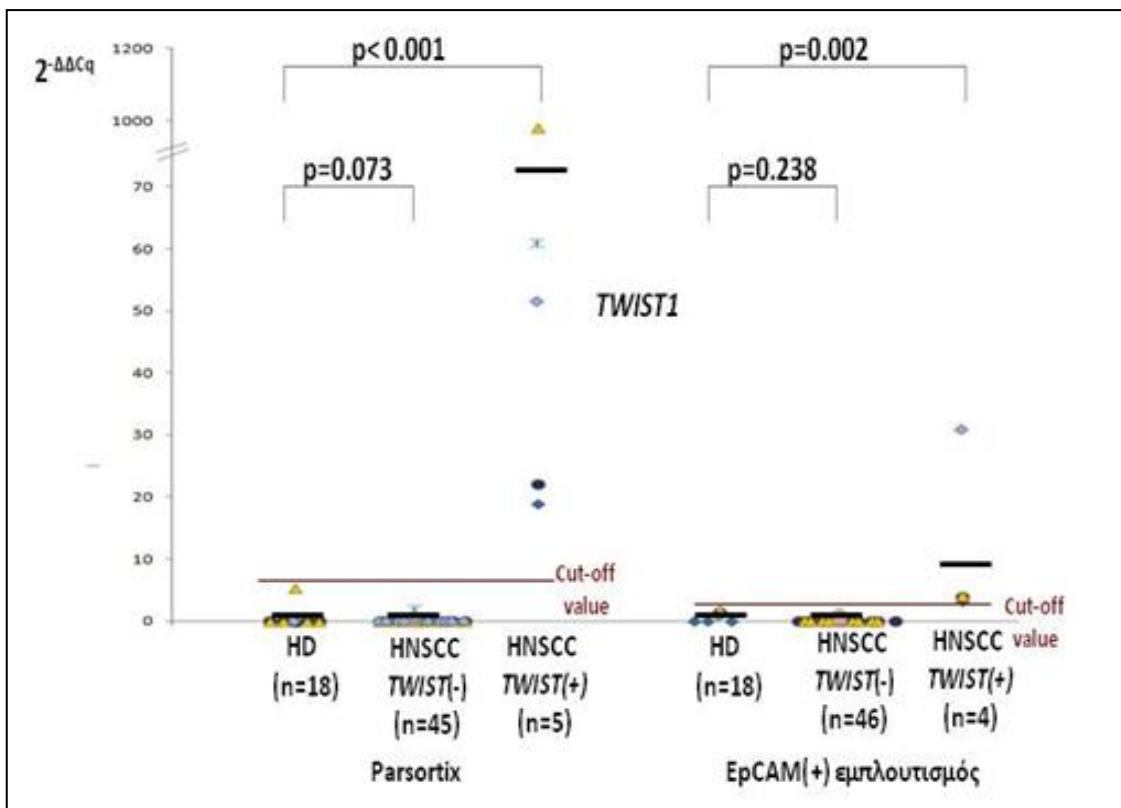
CDH2 θετικούς HNSCC ασθενείς. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης όλων των εξεταζόμενων γονιδίων παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.6** (Heatmap). Όπως βλέπουμε και στο **Σχήμα 6.6**, το *PD-L1* υπερεκφράζεται σε 9/50 (18,0%) περιπτώσεις και η *CK-19* σε 11/50 (22,0%). Σε 4/11 (36,4%) των *CK-19* θετικών δειγμάτων το *PD-L1* ήταν επίσης υπερεκφρασμένο. Η έκφραση του *EGFR* δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις περιπτώσεις 0/50 (0,0%). Όσον αφορά στους EMT δείκτες, το *TWIST1* υπερεκφράστηκε σε 5/50 (10,0%) περιπτώσεις και η *CDH2* σε 3/50 (6,0%). Κανένα από τα 18 δείγματα των υγιών αιμοδοτών δεν βρέθηκε θετικό στην έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων.

6.3.3. Πειραματικά αποτελέσματα: EpCAM-θετικός ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός

Όλα τα δείγματα που απομονώθηκαν με τον EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ήταν εξαιρετικής ποιότητας όπως αυτό πιστοποιήθηκε από τις τιμές του *B2M*. Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *PD-L1* στον EpCAM-θετικό εμπλουτισμό ήταν 0,84 (εύρος: 0-1,54) στους υγιείς, 0,55 (εύρος: 0-1,66) στους *PD-L1* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 3,24 (εύρος: 1,72-4,99) στους *PD-L1* θετικούς HNSCC ασθενείς. Οι τιμές ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) για το *TWIST1* δίνονται στο **Σχήμα 6.4**. Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *TWIST1* στον EpCAM-θετικό εμπλουτισμό ήταν 0,92 (εύρος: 0-3,16) στους υγιείς, 0,10 (εύρος: 0-1,48) στους *TWIST1* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 10,63 (εύρος: 3,2-31,12) στους *TWIST1* θετικούς HNSCC ασθενείς. Οι τιμές ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) για το *CDH2* δίνονται στο **Σχήμα 6.5**. Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) του *CDH2* στον EpCAM-θετικό εμπλουτισμό ήταν 0,28 (εύρος: 0-1,42) στους υγιείς, 0,07 (εύρος: 0-1,41) στους *CDH2* αρνητικούς HNSCC ασθενείς και 2,29 (εύρος: 2,25-2,33) στους *CDH2* θετικούς HNSCC ασθενείς. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης όλων των εξεταζόμενων γονιδίων παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.6** (Heatmap). Η έκφραση των *CK-19* και *EGFR* δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις περιπτώσεις 0/50 (0,0%). Το *PD-L1* υπερεκφράζεται σε 4/50 (8,0%) δείγματα, το *TWIST1* ήταν υπερεκφρασμένο σε 4/50 (8,0%) και το γονίδιο *CDH2* σε 2/50 (8,0%).



Σχήμα 6.3. Αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης του *PD-L1* στα CTCs ασθενών με HNSCC και υγιών αιμοδοτών που έχουν απομονωθεί με Parsortix και ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό



Σχήμα 6.4. Αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης του *TWIST1* στα CTCs ασθενών με HNSCC και υγιών αιμοδοτών που έχουν απομονωθεί με Parsortix και ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό

Στους ασθενείς με HNSCC, *CK-19* θετικά δείγματα στα CTCs ανιχνεύθηκαν μόνο στα CTC που απομονώθηκαν με το Parsortix και όχι σε αυτά που απομονώθηκαν με ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό (**Σχήμα 6.6**). Υπερέκφραση του *PD-L1* ανιχνεύτηκε σε 9/50 (18,0%) των δειγμάτων που απομονώθηκαν με Parsortix και μόνο 4/50 (8,0%) σε δείγματα που απομονώθηκαν με ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τρία από τα τέσσερα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στην υπερέκφραση του *PD-L1* μετά τον ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ήταν επίσης θετικά και με την απομόνωση με το Parsortix. Η έκφραση του *EGFR* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα εξεταζόμενο δείγμα χρησιμοποιώντας και τις δυο μεθοδολογίες. Τέλος, δεν υπήρξε καμία απολύτως συσχέτιση των *TWIST1* και *CDH2* ανάμεσα στο Parsortix και στον ErCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.

6.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Τα CTCs αποτελούν έναν ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό, επομένως η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσής τους αποτελεί κρίσιμο βήμα στις αναλύσεις υγρής βιοψίας. Τεχνολογίες βασισμένες στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη ErCAM, ενέχουν τον κίνδυνο απώλειας των ErCAM-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 (259). Η EMT οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του ErCAM (13), επομένως ο ανεξάρτητος των ErCAM εμπλουτισμός των CTCs έχει τη δυνατότητα να απομονώνει κύτταρα που βρίσκονται σε EMT φάση (260,261). Το σύστημα Parsortix, χρησιμοποιώντας μία τεχνολογία μικροροών, πραγματοποιεί απομόνωση των CTCs βάσει της μικρότερης τάσης τους για παραμόρφωση και στο συνηθέστερα μεγαλύτερο μέγεθός τους συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος.

Προκειμένου να αξιολογηθεί το καταλληλότερο σύστημα απομόνωσης/εμπλουτισμού για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs στον HNSCC, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά άμεση σύγκριση του συστήματος Parsortix με τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs με βάση το ErCAM, από το ίδιο περιφερικό αίμα ασθενών με HNSCC. Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε επίπεδο έκφρασης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν σαφώς ότι ο πληθυσμός των CTCs που απομονώθηκε με το σύστημα Parsortix είναι υψηλότερης καθαρότητας σε σχέση με τον πληθυσμό των CTCs που απομονώθηκε με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.

Τα επίπεδα έκφρασης του *B2M* δείχνουν χαμηλότερη επιμόλυνση των CTCs που απομονώθηκαν με Parsortix σε σχέση με τα CTC που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν την μελέτη τόσο των Obermayer et al. όπου αναφέρεται ότι το σύστημα Parsortix είναι καταλληλότερο για την απομάκρυνση των λευκών

αιμοσφαιρίων, διευκολύνοντας έτσι τη μοριακή ανάλυσή τους λόγω υψηλής καθαρότητας των εμπλουτισμένων κυττάρων (262), όσο και με τα αποτελέσματα των Maertens et al. όπου κατά τη σύγκρισή του με άλλη υπάρχουσα μέθοδο απομόνωσης, το Parsortix επέδειξε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης και τη χαμηλότερη επιμόλυνση από λευκά αιμοσφαίρια (263).

Ένα υψηλότερο ποσοστό *PD-L1* και *CK-19* θετικών δειγμάτων βρέθηκε στα CTC που απομονώθηκαν με Parsortix σε σχέση με τα CTC που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τρία από τα τέσσερα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στην υπερέκφραση του *PD-L1* μετά τον EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ήταν επίσης θετικά και με την απομόνωση με το Parsortix. Η έκφραση του *EGFR* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα εξεταζόμενο δείγμα χρησιμοποιώντας και τις δυο μεθοδολογίες. Δεν υπήρξε καμία απολύτως συσχέτιση των EMT βιοδεικτών (*TWIST1* και *CDH2*) ανάμεσα στο Parsortix και στον EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ξεχωριστοί (διακριτοί) πληθυσμοί CTC απομονώνονται με την εφαρμογή αυτών των δυο διαφορετικών μεθόδων εμπλουτισμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να εξηγηθούν με βάση την ετερογένεια των CTCs.

Οι ανωτέρω παρατηρήσεις ενισχύονται από τους Gorges et al., που καθιέρωσαν αξιόπιστες πειραματικές πορείες για μελέτες πολλαπλών δεικτών σε μονήρη CTCs με εφαρμογή RT-qPCR. Όταν οι μεθοδολογίες RT-qPCR συνδυάζονταν με την απομόνωση από το Parsortix, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις που υποδεικνύουν υψηλότερης ποιότητας RNA (105). Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, οι Lampignano et al. αξιολόγησαν την ετερογένεια του προφίλ μεταλλάξεων του γονιδίου *PIK3CA* σε μονήρη CTC, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα απομόνωσης Parsortix και συγκρίνοντας δύο διαφορετικούς υποπληθυσμούς CTC (EpCAM^{high} και EpCAM^{low/negative}) από τον ίδιο ασθενή (264). Οι El-Heliebi et al. έδειξαν ότι η ανίχνευση των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-V7*, *AR-FL*, του γονιδίου *PSA*, καθώς και μεταλλάξεων του *KRAS* στα CTCs, ήταν επίσης εφικτή με τη συσκευή Parsortix (214).

Πολλές τεχνολογίες μικροροών παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την απομόνωση των CTCs (265), ωστόσο παραμένει το ερώτημα ως προς την ανωτερότητα αυτών των μεθόδων σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται στην ανοσοσυγγένεια, ειδικά για τον εντοπισμό διαφορετικών CTC πληθυσμών (266–268). Συμπερασματικά λοιπόν, ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs σε επίπεδο έκφρασης, από CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix παρέχει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό για ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Η κλινική σημασία της ανίχνευσης των CTCs χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση συνιστά περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση σε μια ομάδα ασθενών επιλεγμένη με σαφώς καθορισμένα κριτήρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΤΕΤΡΑΠΛΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ RT-qPCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* ΚΑΙ *AR-TOTAL* ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΣΤΑ CTCs. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΕΥΝΟΥΧΟΑΝΤΟΧΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (mCRPC)

7.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας τετραπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης

7.1.1. Εισαγωγή

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες δυνατότητες που προσφέρει η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο είναι η ικανότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού πολλαπλών στόχων στην ίδια αντίδραση PCR (multiplex RT-qPCR). Ιδανικά μία multiplex RT-qPCR θα πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύει, να διαφοροποιεί, και να εξασφαλίζει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα για πολλούς διαφορετικούς στόχους, χωρίς η παρουσία του ενός στόχου να επηρεάζει τον προσδιορισμό κάποιου άλλου (διασταυρούμενη αντίδραση), χωρίς να χάνεται η ευαισθησία. Είναι γεγονός ότι λόγω του περιορισμένου αριθμού των φθοριζόντων ιχνηθετών και της σημαντικής αλληλεπικάλυψης των φασμάτων εκπομπής, η ποσοτικοποίηση πολλαπλών προϊόντων αντίδρασης είναι δύσκολη και συχνά μη εφικτή για περισσότερους από δύο στόχους (269).

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-full length* (*AR-FL*), των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Η επιλογή του γονιδίου *AR* και των συγκεκριμένων εναλλακτικών του μεταγράφων, δεν έγινε τυχαία. Όπως είναι γνωστό, η ελλειμματική καρβοξυ-τελική περιοχή του *AR*, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά *AR* μετάγραφα με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες (270,271). Το εναλλακτικό μετάγραφο *AR-V7* κωδικοποιείται από το μάτισμα των εξωνίων του *AR* 1/2/3/CE3 (272), ενώ το μετάγραφο *AR-567* δημιουργείται από το μάτισμα των εξωνίων 1/2/3/4/8 (273). Τα μετάγραφα του *AR* ενεργοποιούν τη γονιδιακή έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο χωρίς να χρειάζεται η παρουσία του *AR-FL*, ενώ η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του *AR-FL* καταστέλλει τα μετάγραφα του *AR* και ενεργοποιεί ρυθμίσεις έκφρασης που σχετίζονται με τη

σύνθεση μακρομορίων, το μεταβολισμό και τη διαφοροποίηση (274). Σε μία από τις πρώτες μελέτες έκφρασης των μεταγράφων του *AR*, ανιχνεύτηκε mRNA των *AR-567* και/ή *AR-V7* σε μια ομάδα ασθενών με mCRPC με οστικές μεταστάσεις, ενώ η έκφραση συσχετίστηκε με υψηλή πυρηνική ανοσοχρώση του *AR*, μη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και μικρή επιβίωση (275). Επιπλέον, σε ανθρώπινες προστατικές καρκινικές σειρές έχει βρεθεί ότι το μετάγραφο *AR-567* αυξάνει την έκφραση του *AR-FL* και επάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα του *AR*. Όταν ανθρώπινα προστατικά καρκινικά κύτταρα μεταφέρθηκαν με το μετάγραφο *AR-567* σε xenografts, δημιουργήθηκαν ευνουχο-άντοχοι όγκοι, κάτι που υποδεικνύει ότι τα ενεργά μετάγραφα του *AR* μπορούν να συνεισφέρουν στο σχηματισμό ευνουχο-άντοχου καρκίνου του προστάτη (276). Ο διμερισμός των *AR* μεταγράφων είναι ένας πιθανός μηχανισμός για την επαγωγή της ευνουχο-άντοχης κατάστασης (277).

Σκοπός του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας στα CTCs και στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC.

7.1.2. *In silico* μελέτη

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 και των ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, USA). Για την ανάπτυξη της τετραπλής RT-qPCR είναι πολύ σημαντικό να γίνει προσεκτικός *in silico* σχεδιασμός των εκκινητών και των ανιχνευτών ώστε κάθε γονίδιο να μπορεί να ενισχύεται εκλεκτικά παρουσία των άλλων. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν συνοψίζονται παρακάτω:

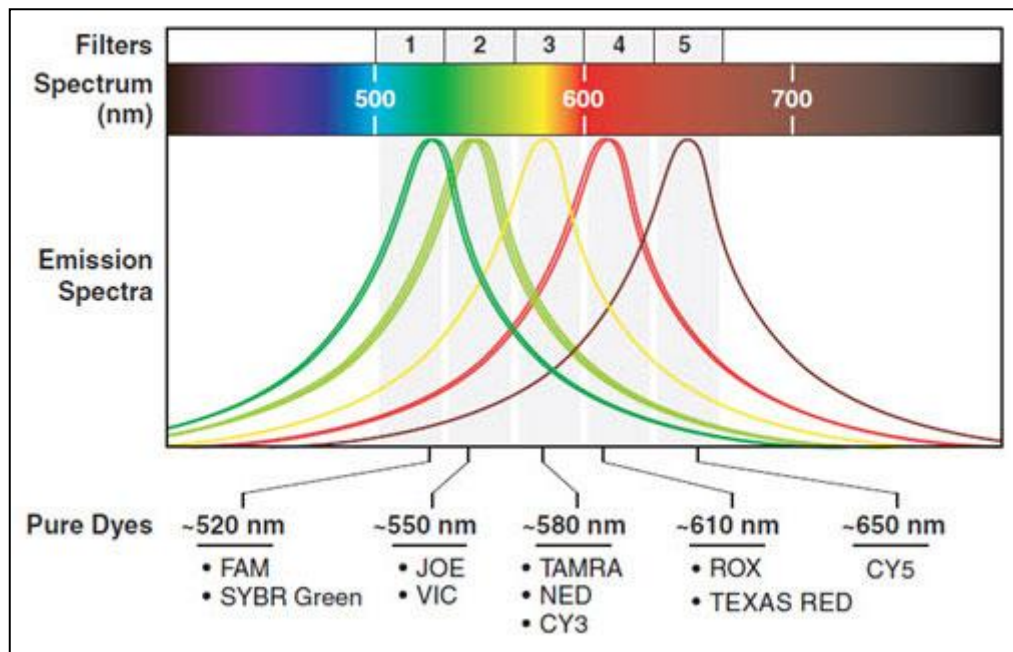
- Αρχικά, βρέθηκε η αλληλουχία των γονιδίων, μέσω της Genecards, και εφαρμόστηκε το πρόγραμμα BLAST για την εύρεση αλληλουχιών που είναι μοναδικές για κάθε γονίδιο.
- Στη συνέχεια, για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν *in silico* οι εκκινητές αλλά και το ζεύγος ανιχνευτών υδρόλυσης μέσω του προγράμματος Primer Premier 5.0. Όλοι οι εκκινητές και οι ανιχνευτές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε γονίδιο να υβριδοποιούνται σε όρια εξωνίου-ιντρονίου (junction). Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η μη ενίσχυση προϊόντων που προκύπτουν από γενωμικό DNA, το οποίο μπορεί να συνυπάρχει στο δείγμα ολικού RNA. Επίσης, πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι αλληλουχίες των εκκινητών δεν είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο, έτσι ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινητών.

- Μετά τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινήτων και των ζευγών ανιχνευτών ελέγχθηκε αν οι εκκινήτες και οι ανιχνευτές του ενός γονιδίου, μπορούν να υβριδοποιηθούν μη ειδικά στην επιθυμητή περιοχή των υπόλοιπων γονιδίων.

Οι εκκινήτες και οι ανιχνευτές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, USA). Οι ανιχνευτές υδρόλυσης φέρουν φθορίζουσες χρωστικές στο 5' άκρο και αποσβέστες στο 3'.

7.1.3. Φασματική διόρθωση

Σε μία πολυχρωματική αντίδραση τα εκπεμπόμενα φάσματα φθορισμού αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα στο ίδιο μήκος κύματος να συλλέγεται σήμα φθορισμού και από μια άλλη χρωστική η οποία εκπέμπει και σε αυτό το μήκος κύματος, αλλά μετράται σε κάποιο άλλο μήκος κύματος. Αυτή η διάχυση του εκπεμπόμενου σήματος του φθορισμού οδηγεί σε κίνδυνο λήψης μη ειδικών πληροφοριακών δεδομένων (Σχήμα 7.1.).



Σχήμα 7.1. Αλληλεπικάλυψη φασμάτων φθορισμού (<https://lifescience.roche.com>)

Για να διορθωθεί συνεπώς η διάχυση σήματος του εκπεμπόμενου φθορισμού, εφαρμόζεται η διόρθωση της αλληλεπικάλυψης των φασμάτων κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος ή κατά την ανάλυση των δεδομένων. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονται μόνο ειδικά σήματα για κάθε μήκος κύματος. Η διόρθωση της αλληλοεπικάλυψης φασμάτων των φθορίζουσών χρωστικών, πρέπει να πραγματοποιείται πάντοτε στο όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την πολυχρωματική αντίδραση. Στη παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία του οργάνου Cobas z480 (Roche Diagnostics).

Πιο συγκεκριμένα, προετοιμάζονται 5 σετ μικροφρεατίων (strips) που περιέχουν το μείγμα της αντίδρασης. Στο πρώτο στη σειρά, που αποτελεί το «τυφλό», προστίθεται μόνο H₂O. Στα άλλα τέσσερα προστίθενται χωριστά οι τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές (FAM, HEX, TEX615, CY5) που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Τα strips τοποθετούνται στο όργανο Cobas z480 σύμφωνα με τον αύξοντα αριθμό του καναλιού. Σύμφωνα με τις οδηγίες η τελική συγκέντρωση της φλουορεσκεΐνης (FAM) πρέπει να είναι 0,5μM, ενώ για τις υπόλοιπες χρωστικές η συγκέντρωση πρέπει να είναι 2μM. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται παρουσιάζεται στον **Πίνακα 7.1**.

Πίνακας 7.1. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τη διόρθωση αλληλεπικάλυψης των φασμάτων των φθορίζουσών χρωστικών

Θερμοκρασία	Χρόνος	Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας (C°/s)	Λήψη σήματος	Κύκλοι
95°C	0s	4,4	-	1
40°C	30s	2,2	-	
95°C	0s	0,11	Συνεχής	

7.1.4. Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Οι πειραματικές συνθήκες της πολλαπλής RT-qPCR βελτιστοποιήθηκαν με λεπτομέρεια αναφορικά με τη θερμοκρασία και το χρόνο υβριδισμού των εκκινητών, τη βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και των ανιχνευτών, και τέλος, για τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος, του MgCl₂, των dNTPs, της Taq πολυμεράσης και του BSA. Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συνθήκες παρατίθενται στους **Πίνακες 7.2** και **7.3**.

Πίνακας 7.2. Συστατικά της αντίδρασης πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης για το γονίδιο *AR-full length*, των εναλλακτικών μεταγράφων του (*AR-V7*, *AR-567*) και του *AR-total*

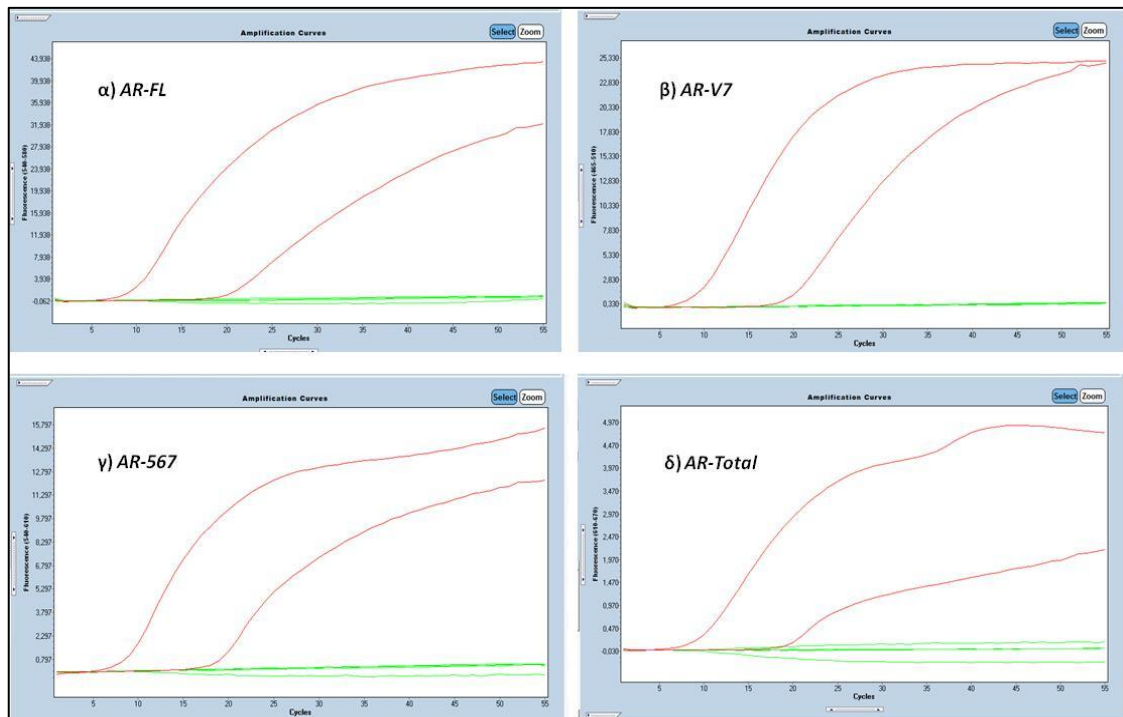
Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	4,12	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	1	0,5x
MgCl ₂ (25mM)	2,4	6mM
dNTPs (10mM)	0,2	200μM
Μείγμα εκκινητών (10μM)	0,3	0,30μM
Μείγμα ανιχνευτών (3μM)	0,83	0,25 μM
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,15	0,075U/μL
cDNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 7.3. Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης για το γονίδιο *AR-full length*, των εναλλακτικών μεταγράφων του (*AR-V7*, *AR-567*) και του *AR-total*

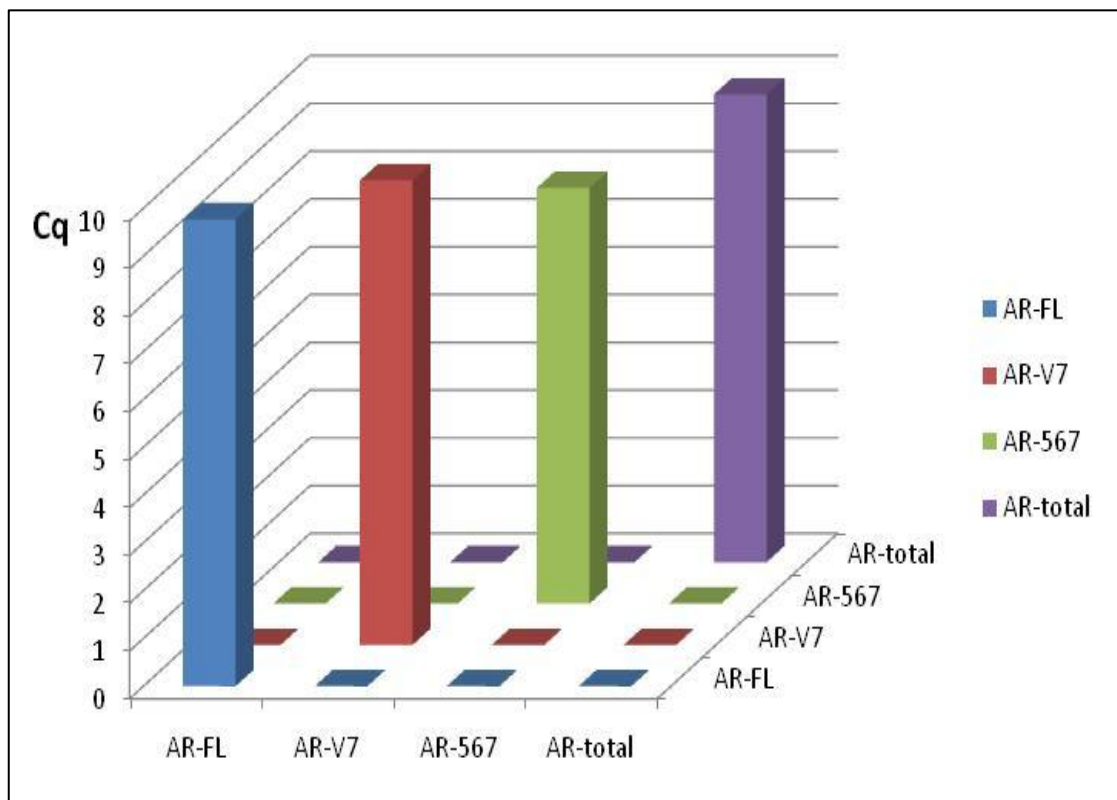
Στάδιο RT- PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	59°C	40s	✓	
Ψύξη	40°C	30s		

7.1.5. Μελέτη αναλυτικής ειδικότητας

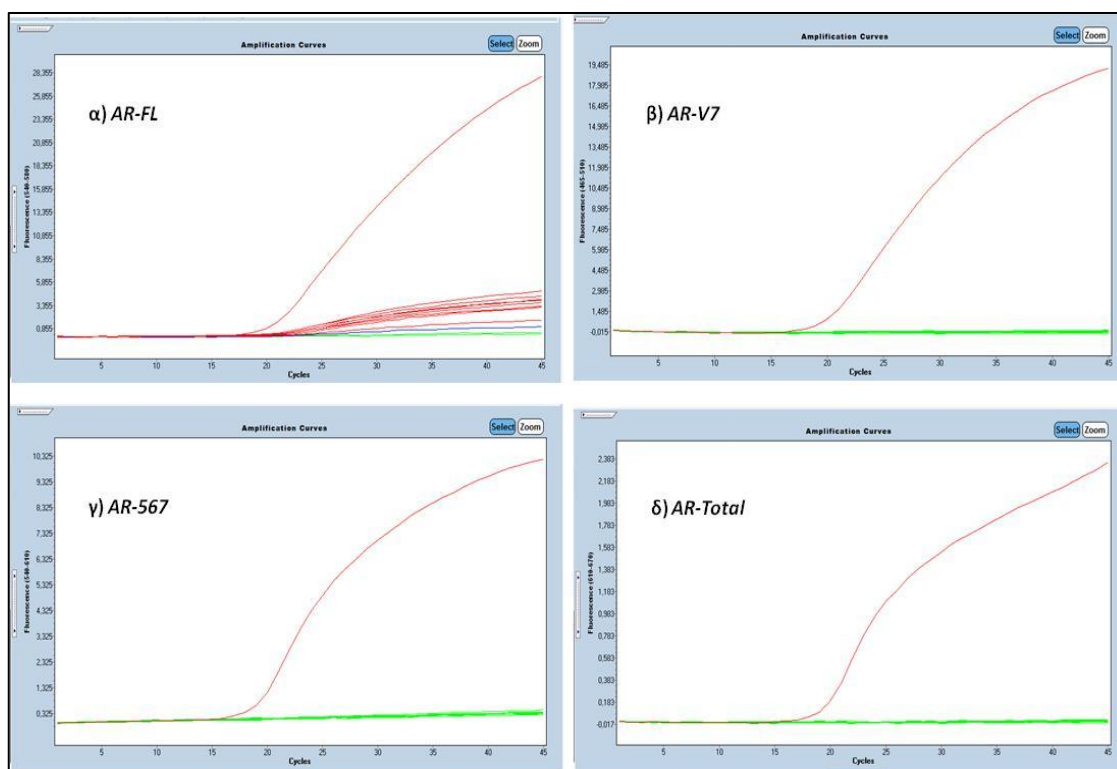
Για την αξιολόγηση της αναλυτικής ειδικότητας της πολλαπλής RT-qPCR ελέγχθηκαν πρώτα *in silico* οι εκκινητές και στη συνέχεια στην αντίδραση PCR. Η αναλυτική ειδικότητα στην PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τέσσερα συνθετικά δείγματα ελέγχου (IDT, USA), ένα για το κάθε μετάγραφο (*AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567*, *AR-total*). Με τη χρήση των συνθετικών δειγμάτων, προστέθηκε το μείγμα της αντίδρασης σε τέσσερις διαφορετικές θέσεις της πλάκας 96-θέσεων (Σχήμα 7.2 και Σχήμα 7.3). Με αυτό τον τρόπο διαπιστώθηκε κατά πόσον οι εκκινητές και οι ανιχνευτές των τριών γονιδίων δύνανται να ενισχύσουν το τέταρτο γονίδιο. Επίσης μελετήθηκε η έκφραση των *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* σε 10 δείγματα γενωμικού DNA, όπου δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση των γονιδίων (Σχήμα 7.4). Με βάση τα ανωτέρω, συμπεραίνουμε ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ειδικότητα.



Σχήμα 7.2. Μελέτη ειδικότητας με τη χρήση συνθετικών δειγμάτων ελέγχου για τα γονίδια α) *AR-FL*, β) *AR-V7*, γ) *AR-567* και δ) *AR-total*



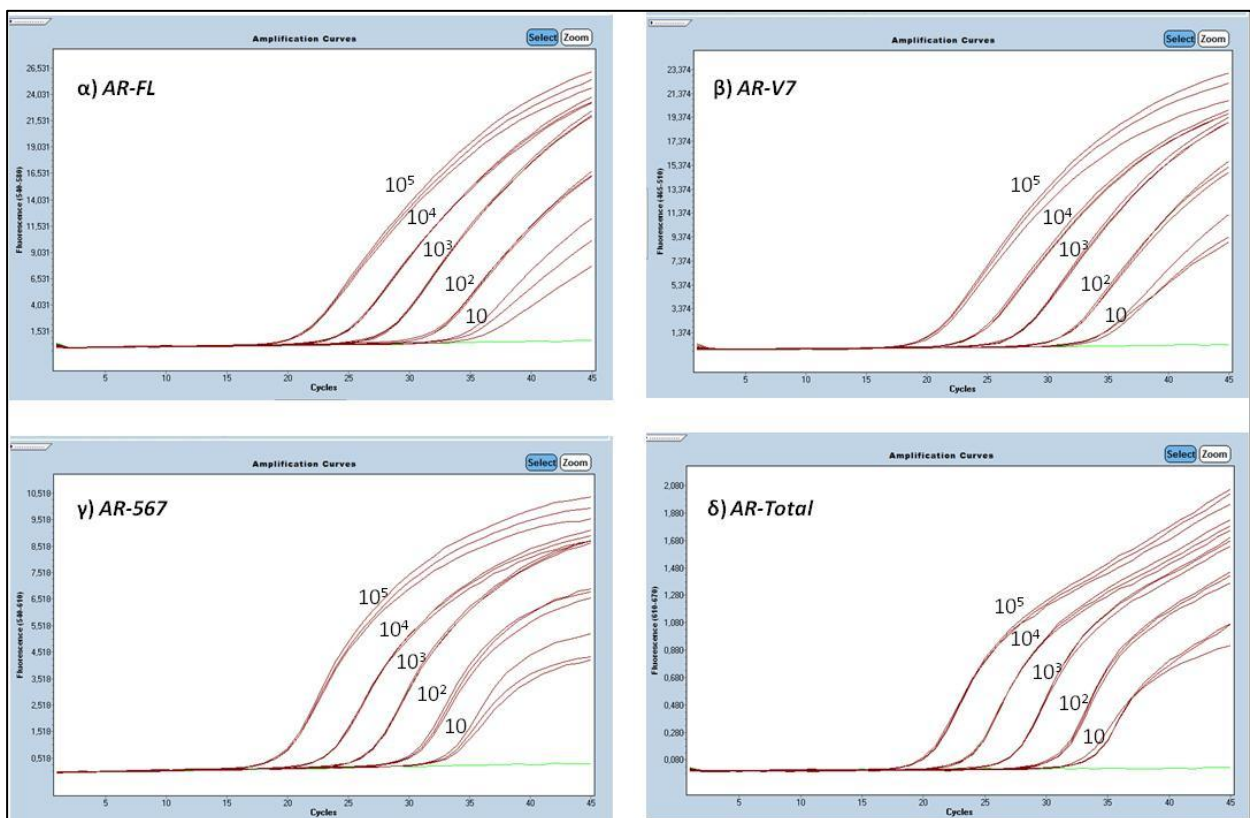
Σχήμα 7.3. Μελέτη αναλυτικής ειδικότητας της αναπτυχθείσας πολλαπλής RT-qPCR για τα εναλλακτικά μετάγραφα του AR



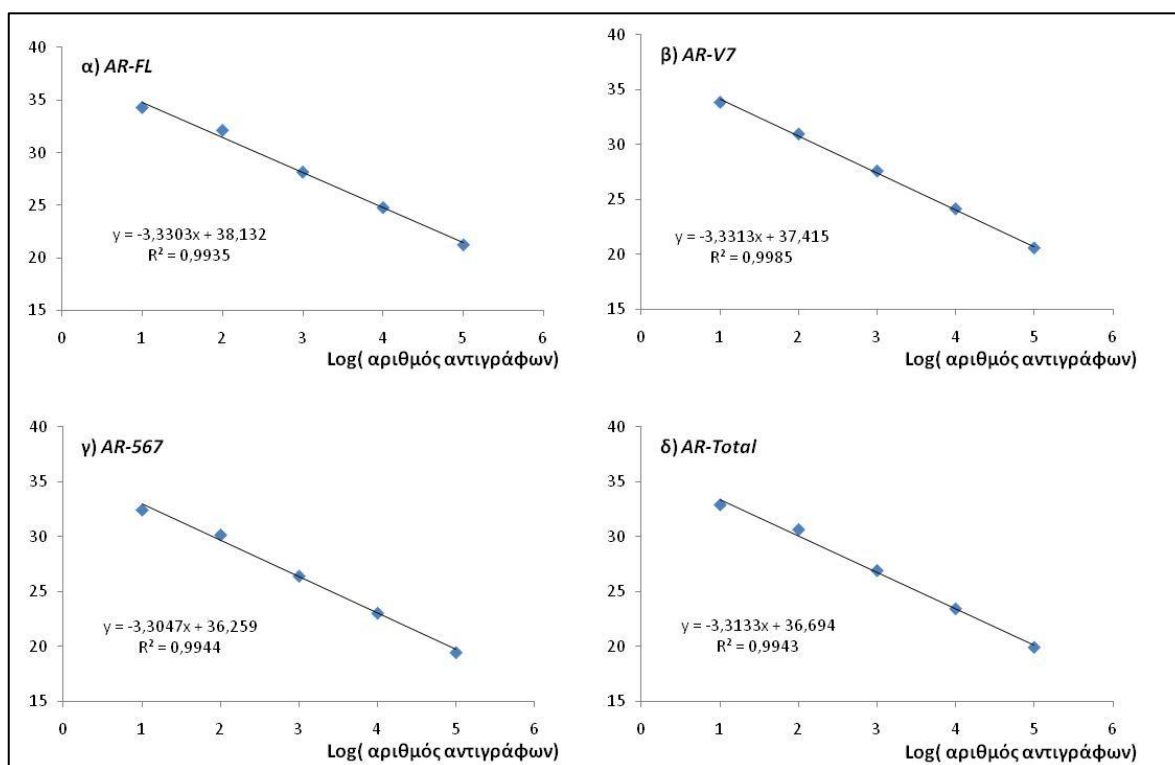
Σχήμα 7.4. Μελέτη ειδικότητας ως προς την ενίσχυση του gDNA απομονωμένου από υγιή αιμοδόχη για τα γονίδια α) AR-FL, β) AR-V7, γ) AR-567 και δ) AR-total

7.1.6. Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας

Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε με τη χρήση συνθετικών δειγμάτων ελέγχου που περιέχουν γνωστό αριθμό αντιγράφων για τα *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*. Προκειμένου να κατασκευαστεί το διάγραμμα βαθμονόμησης της PCR σε πραγματικό χρόνο ώστε να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα άγνωστα δείγματα, παρασκευάστηκαν τέσσερα διαλύματα γνωστού αριθμού αντιγράφων (10^6 αντίγραφα/ μL διαλύματος) συνθετικών δειγμάτων ελέγχου για κάθε ένα γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την μίξη 10^6 αντιγράφων των *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* κατασκευάστηκε ένα κοινό αρχικό πρότυπο διάλυμα γνωστού αριθμού αντιγράφων (10^6 αντίγραφα/ μL διαλύματος) και για τα τέσσερα γονίδια (stock solution). Με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 του αρχικού πρότυπου διαλύματος, προκύπτει μια σειρά προτύπων διαλυμάτων γνωστού αριθμού αντιγράφων των συνθετικών δειγμάτων ελέγχου *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, που καλύπτουν το εύρος από $1,0 \times 10^1$ έως $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα. Πιο συγκεκριμένα, μετρώντας την ένταση φθορισμού των δειγμάτων που αντιστοιχούν από $1,0 \times 10^1$ έως $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα, ελήφθη ένα χαρακτηριστικό καταγράφημα που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 7.5**. Στο ακόλουθο **Σχήμα 7.6**, παρουσιάζονται τα αντιπροσωπευτικά διαγράμματα βαθμονόμησης και για τα τέσσερα γονίδια.



Σχήμα 7.5. Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας της πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό γονιδίων (*AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*) με ανιχνευτές υδρόλυσης



Σχήμα 7.6. Διαγράμματα βαθμονόμησης της πολλαπλής RT-qPCR από $1,0 \times 10^1$ αντίγραφα έως $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα

Στη συνέχεια, ακολουθούν τέσσερις πίνακες με τις τιμές Cq και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων των AR-FL, AR-V7, AR-567 και AR-total (Πίνακες 7.4-7.7).

Πίνακας 7.4. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές Cq και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του πλήρους μεταγράφου του AR (AR-full length)

Αριθμός αντιγράφων	AR-FL			Cq ^α	SD
	Cq#1	Cq#2	Cq#3		
$1,0 \times 10^5$	21,27	21,29	21,33	21,30	0,031
$1,0 \times 10^4$	24,92	24,81	24,71	24,81	0,105
$1,0 \times 10^3$	28,19	28,20	28,13	28,17	0,038
$1,0 \times 10^2$	32,11	32,21	32,07	32,13	0,072
$1,0 \times 10^1$	34,17	34,07	34,63	34,29	0,299
Κλίση				-3,3303	
Σημείο τομής				38,13	
R²				0,9935	
E^β				0,9965	
E%				99,70%	

α: μέση τιμή

β: $E = 10^{-1/\kappa \text{κλίση}}$

Πίνακας 7.5. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές Cq και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του AR-V7

Αριθμός αντιγράφων	AR-V7			Cq ^α	SD
	Cq#1	Cq#2	Cq#3		
1,0×10 ⁵	20,57	20,56	20,62	20,58	0,03
1,0×10 ⁴	24,24	24,17	24,03	24,15	0,11
1,0×10 ³	27,62	27,59	27,55	27,59	0,04
1,0×10 ²	30,53	30,9	31,43	30,95	0,45
1,0×10 ¹	33,77	34,18	33,56	33,84	0,32
Κλίση				-3,3313	
Σημείο τομής				37,42	
R²				0,9985	
E^β				0,9962	
E%				99,70%	

α: μέση τιμή
β: E=10^{-1/κλίση}

Πίνακας 7.6. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές Cq και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του AR-567

Αριθμός αντιγράφων	AR-567			Cq ^α	SD
	Cq#1	Cq#2	Cq#3		
1,0×10 ⁵	19,5	19,49	19,53	19,51	0,02
1,0×10 ⁴	23,21	23,09	22,96	23,09	0,13
1,0×10 ³	26,49	26,40	26,48	26,46	0,05
1,0×10 ²	30,04	30,26	30,32	30,21	0,15
1,0×10 ¹	32,08	32,59	32,74	32,47	0,35
Κλίση				-3,3305	
Σημείο τομής				36,26	
R²				0,9944	
E^β				0,9965	
E%				99,70%	

α: μέση τιμή
β: E=10^{-1/κλίση}

Πίνακας 7.7. Χαρακτηριστικά πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης: Τιμές Cq και αναλυτικά χαρακτηριστικά διαγράμματος βαθμονόμησης ποσοτικού προσδιορισμού αντιγράφων του AR-total

Αριθμός αντιγράφων	AR-Total			Cq ^α	SD
	Cq#1	Cq#2	Cq#3		
1,0×10 ⁵	19,98	19,77	20,01	19,92	0,13
1,0×10 ⁴	23,51	23,46	23,31	23,43	0,10
1,0×10 ³	26,91	26,91	26,90	26,91	0,01
1,0×10 ²	30,59	30,69	30,62	30,63	0,05
1,0×10 ¹	32,43	33,06	33,16	32,88	0,40
Κλίση				-3,3133	
Σημείο τομής				36,70	
R²				0,9943	
E^β				1,0036	
E%				100,00%	

α: μέση τιμή
β: E=10^{-1/κλίση}

7.1.7. Μελέτη επαναληψιμότητας

Για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν η πολλαπλή RT-qPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση του AR-FL, των εναλλακτικών μεταγράφων του AR-V7 και AR-567, και του AR-total. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνθετικών δειγμάτων ελέγχου που περιείχαν γνωστό αριθμό αντιγράφων (1,0 x 10² και 1,0 x 10⁵ αντίγραφα) για τα AR-FL, AR-V7, AR-567 και AR-total. Στον Πίνακα 7.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης για την επαναληψιμότητα εντός της ίδιας μέρας (n=3) που προκύπτουν από την καμπύλη ευαισθησίας με τη χρήση εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης.

Πίνακας 7.8. Επαναληψιμότητα εντός της ίδιας μέρας (n=3) πολλαπλής RT-qPCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

	Αριθμός αντιγράφων	Cq ± SD	CV%	Αντίγραφα ± SD	CV%
AR-FL	1,0×10 ⁵	21,29 ± 0,03	0,14	1,10(±0.02)×10 ⁵	2,10
	1,0×10 ²	32,13 ± 0,07	0,22	63,47 ± 3,1	4,90
AR-V7	1,0×10 ⁵	20,58 ± 0,03	0,15	1,13(±0.02)×10 ⁵	2,20
	1,0×10 ²	31,15 ± 0,27	0,85	77 ± 13,9	18,0
AR-567	1,0×10 ⁵	19,51 ± 0,02	0,11	1,2(±0.02)×10 ⁵	1,4
	1,0×10 ²	30,21 ± 0,14	0,48	68,7 ± 7,1	10,5
AR-Total	1,0×10 ⁵	19,92 ± 0,13	0,65	1,2(±0.11)×10 ⁵	9,2
	1,0×10 ²	30,63 ± 0,05	0,002	67,51 ± 2,4	(3,54)

7.1.8. Μελέτη αναπαραγωγιμότητας

Για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας της πολλαπλής RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν πειράματα επαναληψιμότητας της μεθόδου μεταξύ τεσσάρων ημερών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνθετικών δειγμάτων ελέγχου που περιείχαν γνωστό αριθμό αντιγράφων ($1,0 \times 10^2$ και $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα) για τα *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*. Στον Πίνακες 7.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης για την αναπαραγωγιμότητα της πολλαπλής RT-qPCR μεταξύ τεσσάρων ημερών (n=4)

Πίνακας 7.9. Αναπαραγωγιμότητα της πολλαπλής RT-qPCR σε διάστημα τεσσάρων ημερών (n=4)

	Αριθμός αντιγράφων	Cq ± SD	CV%	Αντίγραφα ± SD	CV%
<i>AR-FL</i>	$1,0 \times 10^5$	21,44 ± 0,11	0,53	$1,02(\pm 0.08) \times 10^5$	7,82
	$1,0 \times 10^2$	32,56 ± 0,22	0,68	47,45 ± 7,25	15,28
<i>AR-V7</i>	$1,0 \times 10^5$	20,65 ± 0,05	0,25	$1,07(\pm 0.04) \times 10^5$	3,52
	$1,0 \times 10^2$	31,58 ± 0,18	0,57	62,6 ± 6,94	12,23
<i>AR-567</i>	$1,0 \times 10^5$	19,52 ± 0,18	0,90	$1,2(\pm 0.15) \times 10^5$	12,48
	$1,0 \times 10^2$	30,38 ± 0,10	0,34	60,23 ± 4,25	7,06
<i>AR-Total</i>	$1,0 \times 10^5$	19,97 ± 0,17	0,88	$1,1(\pm 0.14) \times 10^5 \pm$	12,43
	$1,0 \times 10^2$	30,76 ± 0,20	0,64	62,12 ± 8,45	13,61

7.2. Εφαρμογή του αναπτυχθέντος πρωτοκόλλου σε CTCs και εξωσώματα ασθενών με ενουχοάντοχο καρκίνο προστάτη

7.2.1. Πειραματική πορεία

Αρχικά συλλέχθηκε περιφερικό αίμα (20mL) σε K₂EDTA σωληνάρια συλλογής (BD Vacutainer, Plymouth,UK) από 62 ασθενείς με mCRPC από το «Αρεταίειον» πανεπιστημιακό νοσοκομείο (Υπεύθυνος ιατρός: Ε. Μπουρνάκης) και από 10 υγιείς αιμοδότες. Η απομόνωση του πλάσματος πραγματοποιήθηκε εντός 3h μετά τη συλλογή του δείγματος. 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.

Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια K₂EDTA, αναδεύτηκαν ελαφρώς και το πλάσμα απομονώθηκε εντός 2-4h από την συλλογή. 20mL περιφερικού αίματος μεταφέρονται σε Falcon των 50mL, ακολουθεί απομόνωση πλάσματος με φυγοκέντρηση στα 530g για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την απομόνωση, το πλάσμα

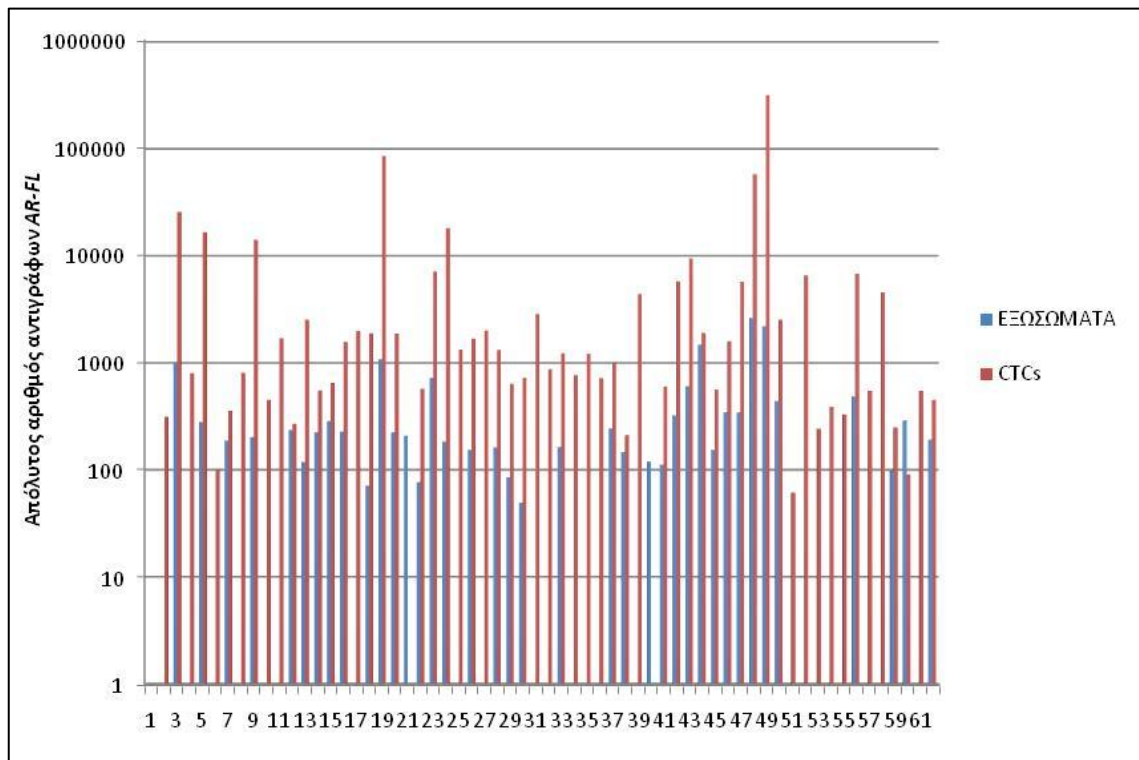
φυγοκεντρήθηκε και πάλι στα 2000g για 10min, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf και ακολούθησε αποθήκευση στους -70°C. Για την απομόνωση εξωσωμάτων από 2mL πλάσματος, χρησιμοποιήθηκε το exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (υποκεφάλαιο 4.9).

Μετά την απομόνωση του πλάσματος στο Falcon των 50mL πραγματοποιήθηκε απομόνωση των CTCs με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, με τη χρήση σφαιριδίων (υποκεφάλαιο 4.2.3). Τέλος, πραγματοποιήθηκε λύση των απομονωμένων κυττάρων με προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου TRIzol-LS και αποθήκευση στους -70°C.

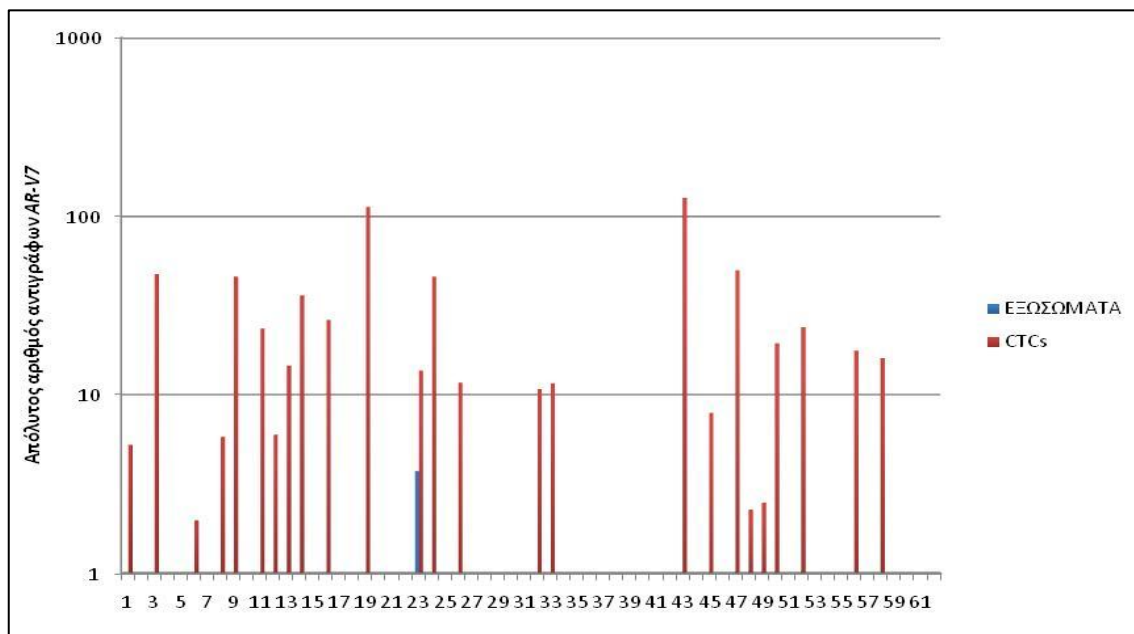
Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS (υποκεφάλαιο 4.4). Ακολούθησε η προσθήκη χλωροφορμίου στα σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf που περιείχαν το 1mL TRIzol-LS. Μετά τη λήψη της υδατικής φάσης (ανώτερη στιβάδα), που περιέχει το ολικό RNA, ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης RNA όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στο υποκεφάλαιο 4.4. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση του High capacity RNA to cDNA kit (υποκεφάλαιο 4.7). Το περιφερικό αίμα από τον κάθε υγιή αιμοδότη είχε υποστεί την ίδια διαδικασία απομόνωσης πλάσματος και εμπλουτισμού με τα δείγματα των ασθενών και ακολούθησε η απομόνωση του RNA, η σύνθεση του cDNA και οι αναλύσεις multiplex RT-qPCR (*AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*) έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εφαρμόσαμε τη πολλαπλή RT-qPCR μεθοδολογία για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-FL*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567*, και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης, στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Η ποιότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με την RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL cDNA σε 9μL μείγματος αντίδρασης. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή.

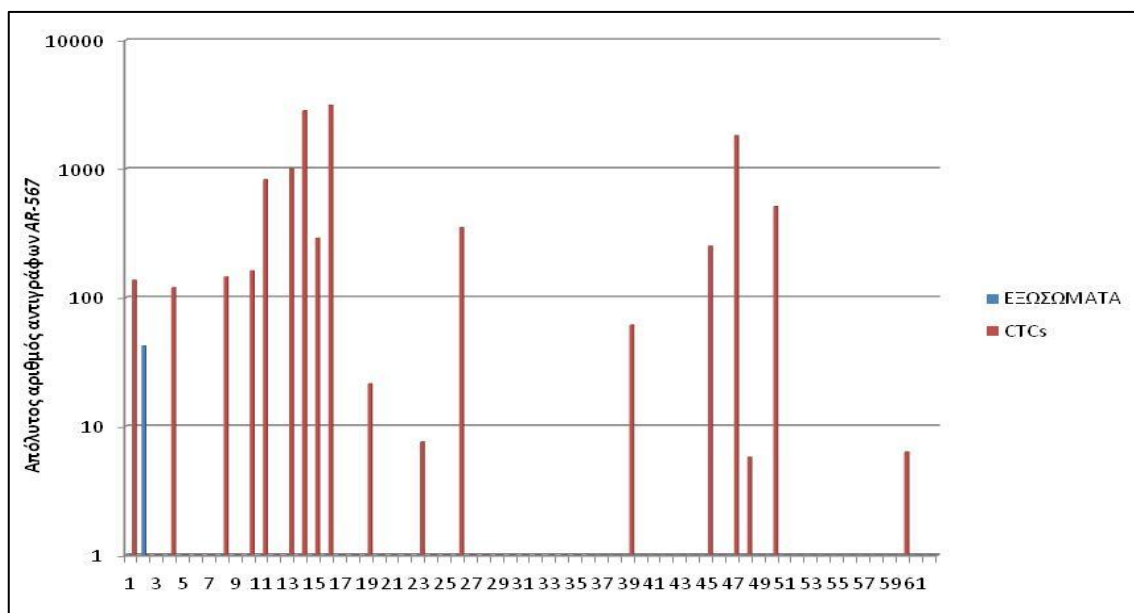
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του αριθμού των αντιγράφων των *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* στα εξωσώματα και στα CTCs των ασθενών με mCRPC. Η έκφραση του *AR-FL* ανιχνεύτηκε τόσο στα CTCs όσο και τα εξωσώματα σε 36/62 (58,1%) των δειγμάτων ασθενών με mCRPC. Το μοναδικό δείγμα που βρέθηκε θετικό για το *AR-V7* στα εξωσώματα ήταν επίσης θετικό και στα CTCs. Η έκφραση του *AR-total* ανιχνεύτηκε τόσο στα CTCs όσο και τα εξωσώματα σε 25/62 (40,3%) δείγματα ασθενών με mCRPC. Για το μετάγραφο *AR-567* δεν παρατηρήθηκε συμφωνία στην έκφραση μεταξύ των CTCs και των εξωσωμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα CTCs είχαν μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων σε σχέση με τα εξωσώματα τόσο στο *AR-FL* όσο και στα εναλλακτικά μετάγραφα *AR-V7*, *AR-567* και στο *AR-total* (Σχήματα 7.8-7.11). Συνεπώς στα CTCs, ο απόλυτος αριθμός αντιγράφων ήταν τουλάχιστον δέκα φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τα εξωσώματα. Η παρατήρηση αυτή, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα εξωσώματα έχουν απομονωθεί από 2mL πλάσματος, που αντιστοιχεί περίπου σε 4mL περιφερικού αίματος, ενώ η απομόνωση των CTCs έχει πραγματοποιηθεί από 20mL περιφερικού αίματος.



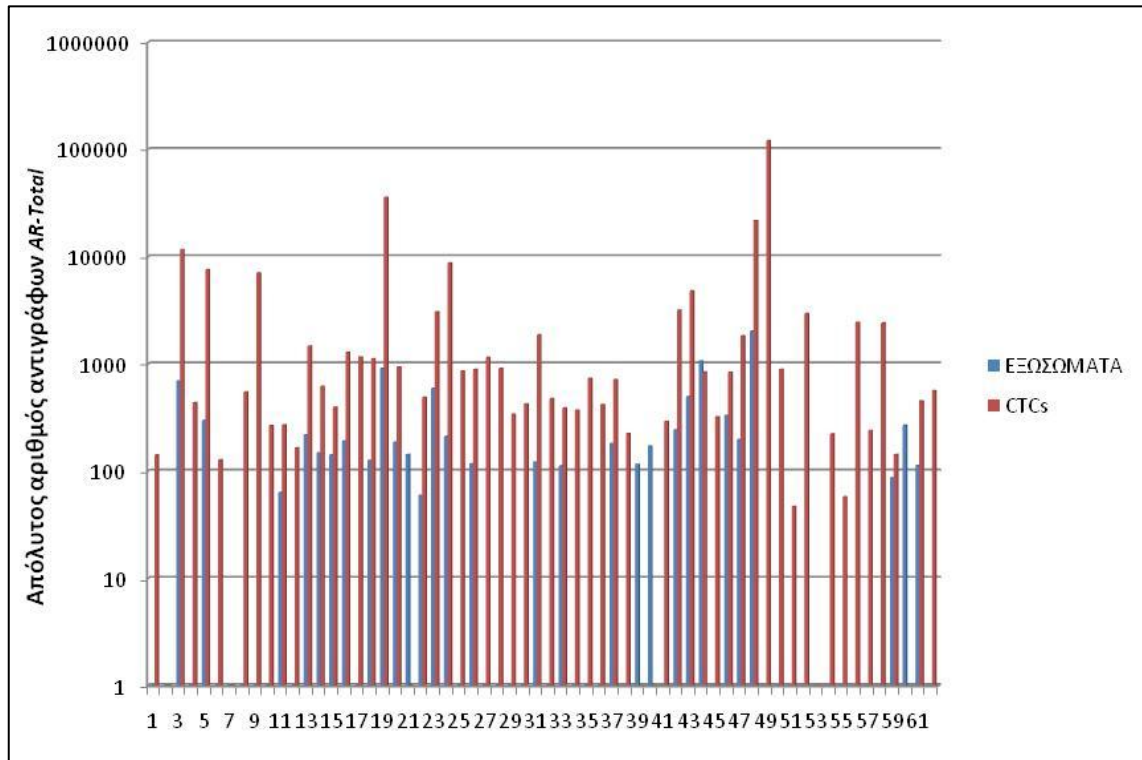
Σχήμα 7.8. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του *AR-FL* στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62)



Σχήμα 7.9. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του AR-V7 στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62)



Σχήμα 7.10. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του AR-567 στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62)



Σχήμα 7.11. Σύγκριση του απόλυτου αριθμού αντιγράφων του *AR-Total* στα εξωσώματα και στα αντίστοιχα CTCs ασθενών με mCRPC (n=62)

7.3. Συμπεράσματα-συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μεθοδολογία πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-FL*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567*, και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Αξιολογήθηκε η εφαρμογή της μεθοδολογίας στα CTCs και στα αντίστοιχα εξωσώματα ασθενών με mCRPC.

Για την ανάπτυξη της τετραπλής RT-qPCR αρχικά πραγματοποιήθηκε *in silico* σχεδιασμός των εκκινητών και των ανιχνευτών ώστε κάθε γονίδιο να μπορεί να ενισχύεται εκλεκτικά παρουσία των άλλων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών για τη θερμοκρασία και το χρόνο υβριδισμού των εκκινητών, για τη βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και των ανιχνευτών, και τέλος για τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος, του $MgCl_2$, των dNTPs, της Taq πολυμεράσης και του BSA. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την αξιολόγηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθοδολογίας. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι η τετραπλή RT-qPCR χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και είναι κατάλληλη για εφαρμογή σε κλινικά δείγματα. Το γεγονός ότι τα CTCs είναι εξαιρετικά σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου προς ανάλυση

δείγματος είναι πολύ περιορισμένη, παραμένει μια τεράστια αναλυτική και τεχνική πρόκληση. Η μεθοδολογία πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-FL*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και τέλος του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης καταφέρνει να ξεπεράσει αυτούς τους περιορισμούς. Δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης των *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση, εξοικονομώντας ποσότητα πολύτιμου δείγματος, χρόνο, αντιδραστήρια και αναλώσιμα.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε CTCs και εξωσώματα από κλινικά δείγματα ασθενών με mCRPC. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στα CTCs όσο και στα εξωσώματα. Τα CTCs είχαν μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων σε σχέση με τα εξωσώματα τόσο στο *AR-FL* όσο και στα εναλλακτικά μέταγραφα *AR-V7*, *AR-567* και στο *AR-total*. Στα CTCs, ο απόλυτος αριθμός αντιγράφων ήταν τουλάχιστον δέκα φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τα εξωσώματα. Η παρατήρηση αυτή, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα εξωσώματα έχουν απομονωθεί από 2mL πλάσματος, που αντιστοιχεί περίπου σε 4mL περιφερικού αίματος, ενώ η απομόνωση των CTCs έχει πραγματοποιηθεί από 20mL περιφερικού αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CTCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ mCRPC

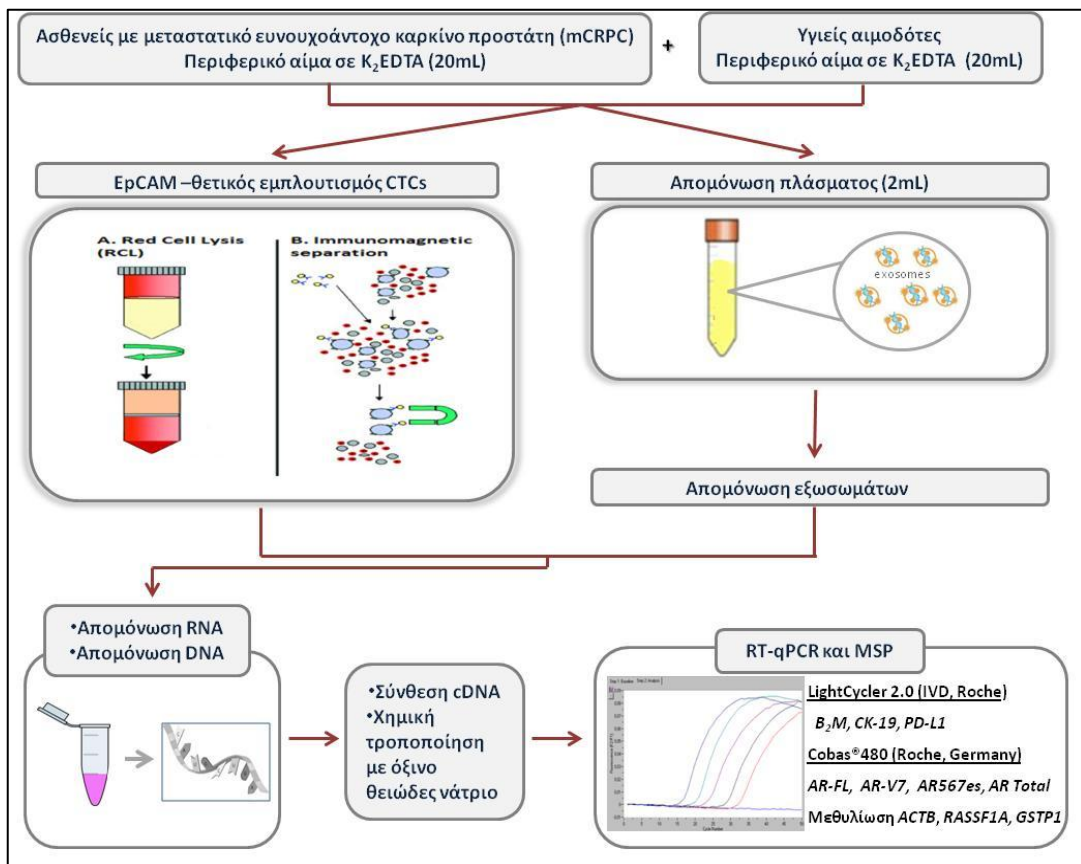
8.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs σε δείγματα ασθενών με mCRPC

8.1.1. Εισαγωγή

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί το μοριακό προφίλ των CTCs ασθενών με ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*.

8.1.2. Πειραματική πορεία

Σε όλα τα βήματα της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε ο ανάλογος έλεγχος ποιότητας, όπως αυτός περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.1.3.1 της παρούσας διατριβής. Το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας παρουσιάζεται στο **Σχήμα 8.1**.



Σχήμα 8.1. Διάγραμμα ροής της μελέτης για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs από περιφερικό αίμα ασθενών με mCRPC

8.1.2.1. Κλινικά δείγματα

Αρχικά συλλέχθηκαν 80 δείγματα περιφερικού αίματος (20mL) σε K₂EDTA σωληνάρια συλλογής (BD Vacutainer, Plymouth,UK) από ασθενείς με mCRPC από το «Αρεταίειον» πανεπιστημιακό νοσοκομείο (Υπεύθυνος ιατρός: Ε. Μπουρνάκης) και από 9 υγιείς αιμοδότες. Η απομόνωση του πλάσματος και των CTCs πραγματοποιήθηκε εντός 2-4h μετά τη συλλογή του δείγματος. 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.

8.1.2.2. Απομόνωση των CTCs με χρήση EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού

Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια K₂EDTA, αναδεύτηκαν ελαφρώς και το πλάσμα απομονώθηκε εντός 2-4h από την συλλογή. 20mL περιφερικού αίματος μεταφέρονται σε Falcon των 50mL, ακολουθεί απομόνωση πλάσματος 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 αποθήκευση στους -70°C.

Μετά την απομόνωση του πλάσματος στο Falcon των 50mL πραγματοποιήθηκε απομόνωση των CTCs με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, με τη χρήση σφαιριδίων (υποκεφάλαιο 4.2.3). Τέλος, πραγματοποιήθηκε λύση των απομονωμένων κυττάρων με προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου TRIzol-LS και αποθήκευση στους -70°C.

8.1.2.3. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol-LS (υποκεφάλαιο 4.4). Ακολούθησε η προσθήκη χλωροφορμίου στα σωληνάρια συλλογής τύπου Eppendorf που περιείχαν το 1mL TRIzol-LS. Μετά τη λήψη της υδατικής φάσης (ανώτερη στιβάδα), που περιέχει το ολικό RNA, ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης RNA όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στο υποκεφάλαιο 4.4. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση του High capacity RNA to cDNA kit (υποκεφάλαιο 4.7). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εφαρμόσαμε τις προηγούμενα σχεδιασμένες, επικυρωμένες, ειδικές και εξαιρετικά ευαίσθητες RT-qPCR μεθοδολογίες για τα γονίδια *PD-L1* (184), *CK-19* (243,244) και *B2M* (χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς) καθώς επίσης και την μέθοδο πολλαπλής RT-qPCR που αναπτύξαμε για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-FL*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και τέλος του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics). Τα πειράματα RT-qPCR για τα γονίδια *PD-L1*, *CK-19* και *B2M* πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler 2.0 (IVD, Roche Diagnostics). Η ποιότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με την RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL cDNA σε 9μL μείγματος αντίδρασης. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς κι ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών για τα γονίδια *B2M*, *CK-19* δίνονται στο κεφάλαιο 5. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών για τα *PD-L1*, *EGFR* και *TWIST1* δίνονται στο κεφάλαιο 6. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών της πολλαπλής RT-qPCR δίνονται στο υποκεφάλαιο 8.1.

Τα EpCAM θετικά κλάσματα των υγιών αιμοδοτών έχουν υποστεί την ίδια διαδικασία απομόνωσης με τα δείγματα των ασθενών. Ακολούθησε η απομόνωση του RNA, η σύνθεση του cDNA και οι αναλύσεις με RT-qPCR (*B2M*, *PD-L1* και *CK-19*) και multiplex RT-qPCR (*AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*) έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

8.1.2.4. Απομόνωση DNA, χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) και real-time MSP

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 4.5. Το απομονωμένο DNA αναδιαλύθηκε σε 30μL NaOH 8mmol/L και αποθηκεύτηκε στους -70 °C μέχρι τη χρήση του.

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* (278). 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 4.12) και το SB-treated DNA αποθηκεύτηκε στους -70°C . Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, συμπεριλάβαμε dH_2O και 100% μεθυλιωμένο DNA ως αρνητικό και θετικό πρότυπο ελέγχου, αντίστοιχα. Η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε με μεθοδολογία real-time MSP για το γονίδιο αναφοράς *ACTB*. Τέλος, το ανθρώπινο πλακουντιακό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control (0% μεθυλιωμένο) της real-time MSP μετά τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ η κυτταρική σειρά SKBR3 ως το θετικό δείγμα ελέγχου για το *RASSF1A* και το *GSTP1*. Το 100% μεθυλιωμένο DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA), χρησιμοποιήθηκε ως το πλήρως μεθυλιωμένο, θετικό control για όλες τις μεθοδολογίες.

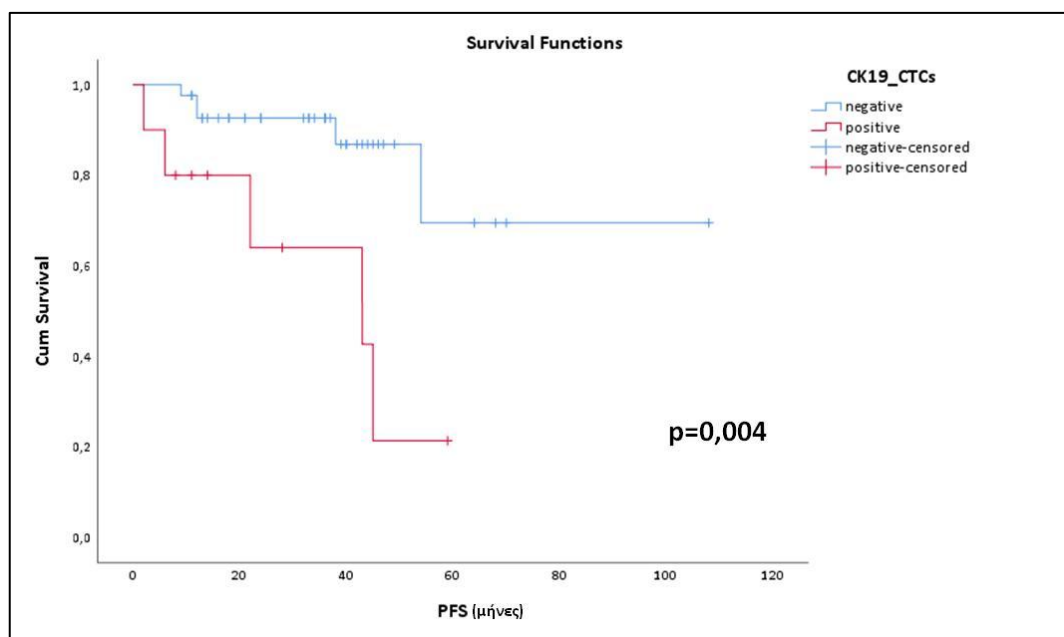
Χρησιμοποιήσαμε προηγούμενα *in-silico* σχεδιασμένους εκκινητές των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* (279), ειδικούς για εφαρμογές MSP με χρήση του λογισμικού Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft, USA), αποφεύγοντας τον σχηματισμό σταθερών δομών φουρκέτας, διμερών και ψευδών σημείων εκκίνησης. Για τη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων αλληλίων, και οι δύο εκκινητές περιείχαν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια. Επιπλέον, περιείχαν βάσεις θυμίνης οι οποίες έχουν προέλθει από μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες κατά την αντίδραση της χημικής τροποποίησης, ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός χημικά επεξεργασμένου από μη-χημικά επεξεργασμένο DNA. Οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, USA) και οι αλληλουχίες των *GSTP1* και *RASSF1A* παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 7.

Η κάθε αντίδραση για τα γονίδια *RASSF1A* (279) και *GSTP1*, πραγματοποιήθηκε στο Cobas z480 (Roche, Germany) σε 96 well-plate και σε τελικό όγκο 10 μL . Τα συστατικά της αντίδρασης για την ανίχνευση της μεθυλίωσης των *RASSF1A* και *GSTP1* και οι θερμοκρασιακές συνθήκες της real-time MSP παρατίθενται κεφάλαιο 7. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεθοδολογίες real-time MSP δεν είναι ποσοτικές, επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε cut-off τιμών. Πιο συγκεκριμένα, ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν ανιχνεύεται σήμα ενίσχυσης στη real-time PCR με $\text{C}_q < 41,00$, ενώ αρνητικό χαρακτηρίζεται το δείγμα εκείνο που δεν παρουσιάζει ενίσχυση ή καταγράφεται τιμή $\text{C}_q > 41,00$.

8.1.3.3. Κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων *CK-19* και *PD-L1* καθώς και της μεθυλίωσης του *GSTP1* στα CTCs ασθενών με mCRPC

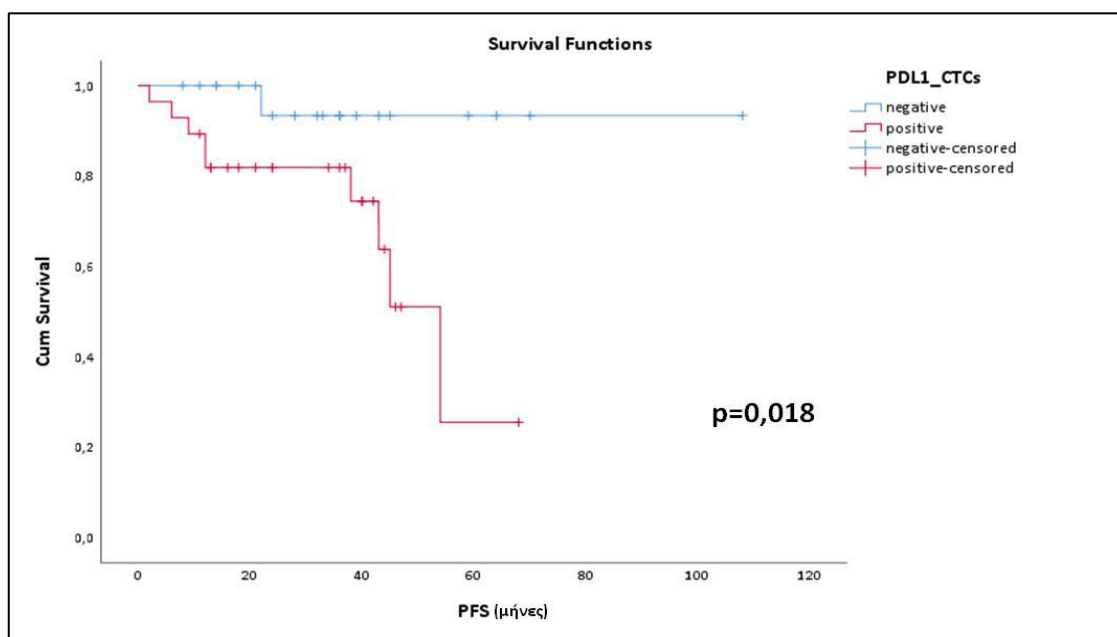
Η κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων *CK-19* και *PD-L1* καθώς και της μεθυλίωσης του *GSTP1* πραγματοποιήθηκε μόνο για τους 54 ασθενείς με mCRPC για τους οποίους υπήρχαν πληροφορίες για την κλινική έκβαση της νόσου. Η αξιολόγηση στηρίχθηκε σε καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για το χρονικό διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη νόσου (Progression Free Survival, PFS) των ασθενών αυτών.

Η καμπύλη επιβίωσης για την έκφραση της *CK-19* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα, ασθενείς με θετικά CTCs στην έκφραση της *CK-19* είχαν σημαντικά διαφοροποιημένο (για την ακρίβεια μειωμένο) PFS ($p=0,004$) σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν παρατηρήθηκε έκφραση της *CK-19* στα CTCs (Σχήμα 8.4).



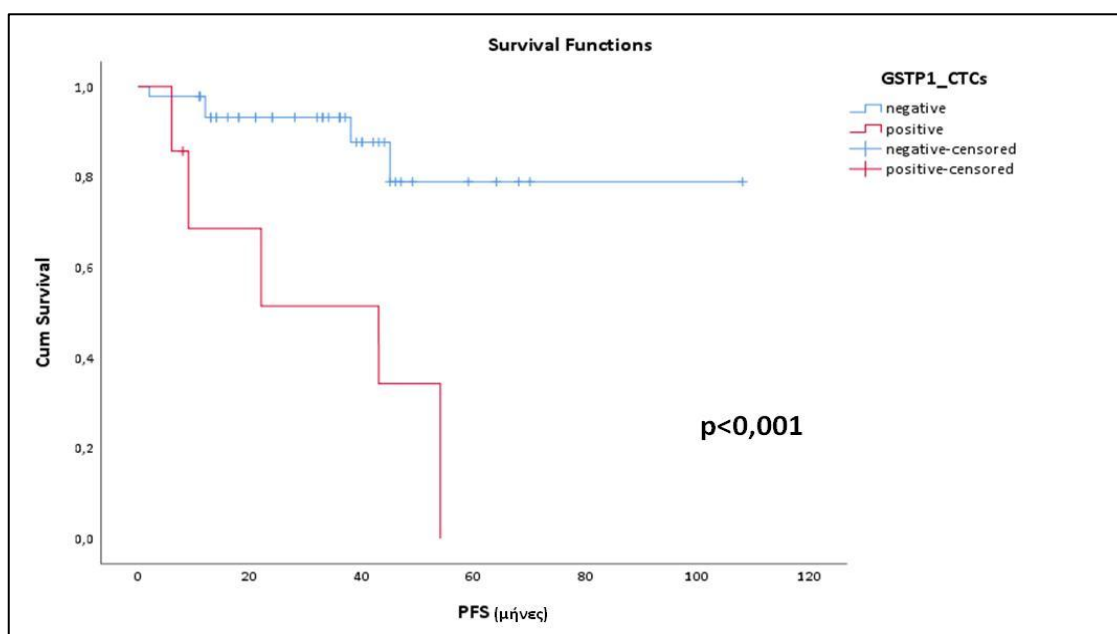
Σχήμα 8.4. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την έκφραση της *CK-19* στα CTCs ασθενών με mCRPC

Η καμπύλη επιβίωσης για την υπερέκφραση του *PD-L1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του *PD-L1* συνδέεται με μειωμένο PFS ($p=0,018$) στους ασθενείς με mCRPC (Σχήμα 8.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι 9/10 (90%) ασθενείς που παρουσίασαν εξέλιξη νόσου ήταν θετικοί στην έκφραση του *PD-L1* στα CTCs.



Σχήμα 8.5. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για την έκφραση του *PD-L1* στα CTCs ασθενών με mCRPC

Η καμπύλη επιβίωσης για τη μεθυλίωση του *GSTP1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα, ασθενείς με μεθυλίωση του *GSTP1* είχαν σημαντικά διαφοροποιημένο (για την ακρίβεια μειωμένο) PFS ($p < 0,001$) σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση του γονιδίου *GSTP1* στα CTCs (Σχήμα 8.4).



Σχήμα 8.6. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για τη μεθυλίωση του *GSTP1* στα CTCs ασθενών με mCRPC

Πίνακας 8.1. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα CTCs με την ολική επιβίωση

CTCs	Death	Alive	Σύνολο
<i>CK-19</i>			
Θετική	9	1	10
Αρνητική	23	19	42
Σύνολο	32	20	52
P	0,068 (Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>PD-L1</i>			
Θετικό	17	11	28
Αρνητικό	15	7	22
Σύνολο	32	18	50
P	0,768 (Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>AR-V7</i>			
Θετικό	13	6	19
Αρνητικό	19	13	32
Σύνολο	32	19	51
P	0,567 (Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>AR-567</i>			
Θετικό	8	4	12
Αρνητικό	24	15	39
Σύνολο	32	19	51
P	1(Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>GSTP1</i>			
Μεθυλιωμένο	6	0	6
Μη-μεθυλιωμένο	26	20	46
Σύνολο	32	20	52
P	0,071(Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>RASSF1A</i>			
Μεθυλιωμένο	3	1	4
Μη-μεθυλιωμένο	29	19	48
Σύνολο	32	20	52
P	1(Fisher's Exact test)		

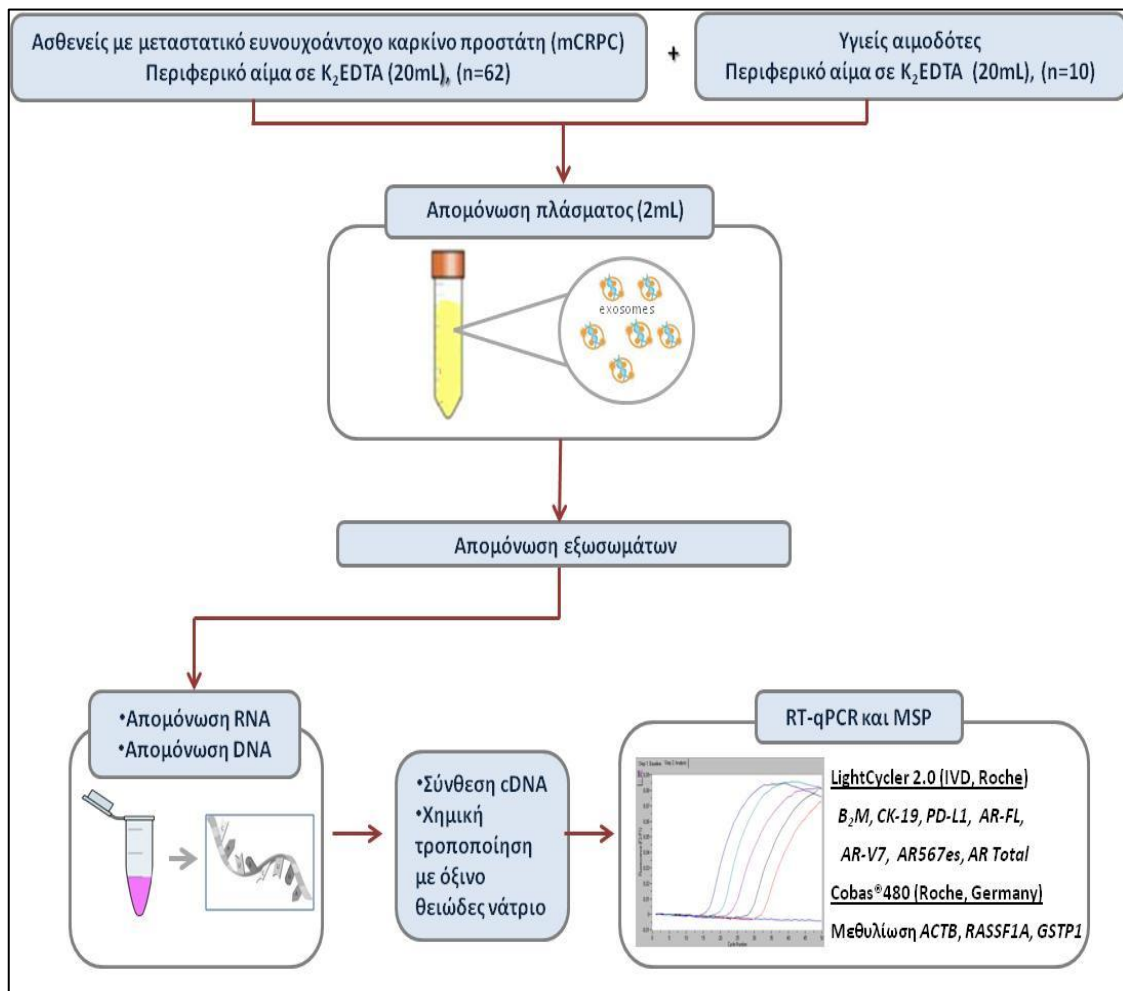
8.2. Μοριακός χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων

8.2.1. Εισαγωγή

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί για πρώτη φορά το μοριακό προφίλ των εξωσωμάτων από το πλάσμα ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς επίσης και το προφίλ της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* στα εξωσώματα.

8.2.2. Πειραματική πορεία

Ακολουθεί το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας (Σχήμα 8.7)



Σχήμα 8.7. Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας για την απομόνωση και το μοριακό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων

8.2.2.1. Κλινικά δείγματα

Αρχικά, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα (20mL) σε K₂EDTA σωληνάρια συλλογής (BD Vacutainer, Plymouth,UK) από 62 ασθενείς με mCRPC από το «Αρεταίειον» πανεπιστημιακό νοσοκομείο (Υπεύθυνος ιατρός: Ε. Μπουρνάκης) και 10 υγιείς αιμοδότες. Η απομόνωση του πλάσματος πραγματοποιήθηκε εντός 3h μετά τη συλλογή του δείγματος. 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.

8.2.2.2. Απομόνωση πλάσματος

Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια K₂EDTA, 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 exoRNeasy serum/plasma MAXI kit χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων από 2mL πλάσματος (υποκεφάλαιο 4.9).

8.2.2.3. Απομόνωση εξωσωμάτων

Η απομόνωση των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου exoRNeasy serum/plasma MAXI kit από 2mL πλάσματος (υποκεφάλαιο 4.9). Το exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (QIAGEN[®], Germany) βασίζεται στην απομόνωση των εξωσωμάτων με την σύνδεσή τους στη μεμβράνη της στήλης. Τα εξωσώματα συνδέονται στη μεμβράνη της στήλης ανεξάρτητα από το μέγεθός τους και την κυτταρική τους προέλευση.

Η επιλογή του exoRNeasy serum/plasma MAXI kit (QIAGEN[®], Germany) έγινε μετά από συγκριτική μελέτη πρωτοκόλλων απομόνωσης εξωσωμάτων από το πλάσμα με τα εμπορικά διαθέσιμα kit EXO-Prep (HansaBioMed LLC, Estonia) και Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit (NORGEN BIOTEK.CORP., Canada). Η απομόνωση με τη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης με ακινητοποίηση σε μεμβράνη πυριτίου με το exoRNeasy serum/plasma MAXI kit είναι περισσότερο αποδοτική σε σχέση με τα άλλα δυο εμπορικά διαθέσιμα kit αντιδραστηρίων. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται στην ποσοτικοποίηση τόσο του γονιδίου αναφοράς *B2M* όσο και των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR*.

8.2.2.4. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA των εξωσωμάτων από τις στήλες exoEasy Maxi Spin πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Qiazol[®] (QIAGEN[®], Germany). 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 που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη παρουσία μίας οργανικής φάσης από φαινόλη/χλωροφόρμιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση.

Η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάριο και προστίθεται αιθανόλη ώστε να επιτευχθούν κατάλληλες συνθήκες πρόσδεσης όλων των μορίων RNA. Το δείγμα στη συνέχεια περνά από τη στήλη RNeasy[®] MinElute[®] Spin Column όπου το RNA δεσμεύεται στη μεμβράνη. Η φαινόλη και άλλες ουσίες που επιμολύνουν και παρεμποδίζουν την απομόνωση του RNA απομακρύνονται με διαδοχικές εκπλύσεις της στήλης. Το καθαρό RNA εκλύεται με νερό ελεύθερο RNασών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύνθεση του cDNA με τη χρήση του High capacity RNA to cDNA kit (υποκεφαλαίο 4.7). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε στο όργανο Nanodrop-100 Spectrophotometer.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εφαρμόσαμε τις επικυρωμένες, ειδικές και εξαιρετικά ευαίσθητες RT-qPCR μεθοδολογίες που αναπτύξαμε και αναφέραμε ήδη για τα γονίδια *B2M*, *CK-19* (243,244), *PD-L1*(184) και την πολλαπλή RT-qPCR (multiplex RT-qPCR) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-full length* και των εναλλακτικών μεταγράφων του (*AR-V7*, *AR-567es*, *AR-total*). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ποιότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με RT-qPCR για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler 2.0 (IVD, Roche Diagnostics), με συνθήκες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 10μL, με αναλογία 1μL cDNA σε 9μL μίγματος αντίδρασης. Κάθε πειραματική σειρά περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, ώστε να εξασφαλισθεί ότι το σήμα που λαμβάνεται δεν οφείλεται σε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων της PCR από γενωμικό DNA, καθώς και ένα δείγμα θετικού ελέγχου για να εξασφαλισθεί ότι αφενός η αντίδραση της PCR έχει πραγματοποιηθεί και αφετέρου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι η επιθυμητή. Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε cDNA από MCF-7 κύτταρα για τις αναλύσεις των *B2M* και *CK-19*, cDNA από PBMCs για το *PD-L1* και συνθετικά δείγματα ελέγχου για το *AR* και τα εναλλακτικά μετάγραφα του.

8.2.2.5. Απομόνωση DNA, χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (SB-treatment) και real-time MSP

Μετά την προσθήκη 750μL Qiazol[®] (QIAGEN[®], Germany) για την απομόνωση των εξωσωμάτων από τις στήλες exoEasy Maxi Spin και φυγοκέντησή τους, ακολούθησε μεταφορά του διηθήματος σε σωληνάριο συλλογής τύπου Eppendorf και προσθήκη χλωροφορμίου. 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 4.5. Το απομονωμένο DNA αναδιαλύθηκε σε 30μL NaOH 8mmol/L και αποθηκεύτηκε στους -70 °C μέχρι τη χρήση του.

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* (278). 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 4.12) και το SB-treated DNA αποθηκεύτηκε στους -70°C. Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, συμπεριλάβαμε dH₂O και 100% μεθυλιωμένο DNA ως αρνητικό και θετικό πρότυπο ελέγχου, αντίστοιχα. Η ποιότητα του SB-treated DNA ελέγχθηκε με μεθοδολογία real-time MSP για το γονίδιο αναφοράς *ACTB* (Πίνακες 8.1-8.3). Τέλος, το ανθρώπινο πλακουντιακό DNA (Deoxyribonucleic acid from female human placenta, Sigma-Aldrich, USA) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control (0% μεθυλιωμένο) της real-time MSP μετά τη χημική επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ η κυτταρική σειρά SKBR3 ως το θετικό δείγμα ελέγχου για το *RASSF1A* και το *GSTP1*. Το 100% μεθυλιωμένο DNA (Universal Methylated Human DNA Standard, ZYMO Research, USA), χρησιμοποιήθηκε ως το πλήρως μεθυλιωμένο, θετικό control για όλες τις μεθοδολογίες.

Χρησιμοποιήσαμε προηγούμενα *in-silico* σχεδιασμένους εκκινητές των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* (279), ειδικούς για εφαρμογές MSP με χρήση του λογισμικού Primer Premier 5.0 (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 από 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: DNA 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 *GSTP1* και *RASSF1A* παρουσιάζονται στους Πίνακες 8.4 και 8.7.

Η κάθε αντίδραση για τα γονίδια *RASSF1A* (279) και *GSTP1*, πραγματοποιήθηκε στο cobas[®] 4800 (Roche, Germany) σε 96 well-plate και σε τελικό όγκο 10μL. Τα συστατικά της αντίδρασης για την ανίχνευση της μεθυλίωσης των *GSTP1* και *RASSF1A* παρατίθενται στους Πίνακες 8.5 και 8.8. Ακολούθως, οι θερμοκρασιακές συνθήκες της real-time MSP για το *GSTP1* και *RASSF1A* δίνονται στους Πίνακες 8.6 και 8.9. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες real-time MSP assay δεν είναι ποσοτικές, επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε 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. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *ACTB*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>ACTB</i>	Πρόσθιος εκκινητής	GGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG	56,9	130
	Ανάστροφος εκκινητής	CCAATAAAACCTACTCCTCCCT	56,6	
	Ανιχνευτής υδρόλυσης	FAM-TGTGTTTGTATTGTGTGTTGGGTGG-BBQ	67,5	

Πίνακας 8.2. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ACTB*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	2,94	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	3	1,5x
MgCl ₂ (25mM)	1,2	3,0mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,30	0,30μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,30	0,30μM
Ανιχνευτής υδρόλυσης (3μM)	0,66	0,2μM
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
SB-converted DNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 8.3. Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το γονίδιο *ACTB*

Στάδιο real-time PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	55°C	20s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s	✓	
Ψύξη	40°C	30s		

Πίνακας 8.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *GSTP1*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>GSTP1</i>	Πρόσθιος εκκινητής	TTCGGGGTGTGCGGTCGTC	61,8	
	Ανάστροφος εκκινητής	AACCGCACGTACTCACTAATAACG	60,8	

Πίνακας 8.5. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *GSTP1*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	3,55	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl ₂ (25mM)	1,2	3,0mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,40	0,40μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,40	0,40μM
LC-Green (10X)	1	1X
Taq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
SB-converted DNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 8.6. Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *GSTP1*

Στάδιο real-time MSP	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	3min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	64°C	15s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	10s	✓	
Ανάλυση καμπυλών τήξης	95°C (ramp rate:0,2°C/sec)	0s	✓	
	95°C	1s		
Ψύξη	40°C	20s		

Πίνακας 8.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτή υδρόλυσης για το γονίδιο *RASSF1A*

Γονίδιο		Αλληλουχία 5'-3'	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>RASSF1A</i>	Πρόσθιος εκκινητής	GTTGGTATTCGTTGGGCGC	61,1	163
	Ανάστροφος εκκινητής	ATCGCACCACGTATACGTAACG	60,5	

Πίνακας 8.8. Συστατικά της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *RASSF1A*

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	4,35	-
5x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2	1x
MgCl ₂ (25mM)	0,8	2,0mM
dNTPs (10mM)	0,20	200μM
BSA (10μg/μL)	0,15	0,15μg/μL
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,50	0,50μM
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,50	0,50μM
LC-Green (10X)	1	1X
Ταq πολυμεράση (5U/μL)	0,10	0,05U/μL
SB-converted DNA	1	
Συνολικός όγκος	10,00	

Πίνακας 8.9. Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *RASSF1A*

Στάδιο real-time MSP	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	2min		
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10s		45
Υβριδισμός εκκινητών	65°C	15s		
Επέκταση εκκινητών	72°C	20s	✓	
Ανάλυση καμπυλών τήξης	95°C (ramp rate:0,2°C/sec)	0s	✓	
	95°C	1s		
Ψύξη	40°C	30s		

8.2.3. Αποτελέσματα

8.2.3.1. Μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε εξωσώματα που απομονώθηκαν από το πλάσμα ασθενών με μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο προστάτη

Το πλάσμα από τον κάθε υγιή αιμοδότη είχε υποστεί την ίδια διαδικασία απομόνωσης εξωσωμάτων με τα δείγματα των ασθενών και ακολούθησε η απομόνωση του RNA, η σύνθεση του cDNA και οι αναλύσεις με RT-qPCR (*B2M*, *PD-L1* και *CK-19*) και multiplex RT-qPCR (*AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*) έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Όλα τα δείγματα ήταν εξαιρετικής ποιότητας όπως αυτό πιστοποιήθηκε από τις τιμές του *B2M*.

Η επεξεργασία της κανονικοποίησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *PD-L1* στα εξωσώματα πραγματοποιείται σύμφωνα με την έκφραση του *B2M*, ως γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (242), η οποία έχει περιγραφεί αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 6.2.4. Στην παρούσα μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των εξωσωμάτων ασθενών με μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο του προστάτη ανιχνεύτηκε υπερέκφραση του *PD-L1* σε 15/62 (24,2%) δείγματα.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε multiplex RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-FL*, των εναλλακτικών του μεταγράφων (*AR-V7* και *AR-567*) και του *AR-total*. Στα δείγματα των υγιών αιμοδοτών ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 6/10 (60,0%). Κανένα από τα 10 δείγματα των υγιών αιμοδοτών δεν βρέθηκε θετικό στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR*, *AR-V7* 0/10 (0,0%) και *AR-567* 0/10 (0,0%). Στα δείγματα των υγιών αιμοδοτών, ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-total* σε 7/10 (70,0%). Στα δείγματα των ασθενών με mCRPC ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 38/62 (61,3%). Η έκφραση του *AR-V7* ανιχνεύθηκε σε 1/62 (1,6%) δείγματα ασθενών με mCRPC, ενώ η έκφραση του *AR-567* ανιχνεύθηκε σε 1/62 (1,6%) δείγματα. Η έκφραση του *AR-total* ήταν θετική σε 29/62 (46,7%) ασθενών με mCRPC.

Η έκφραση του γονιδίου *CK-19* ανιχνεύτηκε σε 4/10 (40%) δείγματα των υγιών αιμοδοτών. Στους mCRPC ασθενείς η έκφραση του *CK-19* ανιχνεύθηκε σε 28/62 (45,2%) δείγματα. Στο **Σχήμα 8.8** (Heatmap) παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα της έκφρασης γονιδίων στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC.

Πίνακας 8.10. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα εξωσώματα με την ολική επιβίωση

ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ	Death	Alive	Σύνολο
<i>PD-L1</i>			
Θετικό	13	6	19
Αρνητικό	11	7	18
Σύνολο	24	13	37
P	0,737 (Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>GSTPI</i>			
Μεθυλιωμένο	5	0	5
Μη-μεθυλιωμένο	11	6	17
Σύνολο	16	6	22
P	0,266(Fisher's Exact test)		
	Death	Alive	Σύνολο
<i>RASSF1A</i>			
Μεθυλιωμένο	5	0	5
Μη-μεθυλιωμένο	11	6	17
Σύνολο	16	6	22
P	0,266 (Fisher's Exact test)		

8.3. Σύγκριση CTCs και εξωσωμάτων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης των *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* στα κοινά δείγματα ασθενών (n=62) με mCRPC στα CTCs και στα εξωσώματα. Στόχος της συσχέτισης αυτής στα δυο είδη δειγμάτων ήταν να φανεί σε ποιο βαθμό τα δεδομένα που προέρχονται από τα CTCs αντικατοπτρίζονται και στα εξωσώματα (**Πίνακας 8.11**).

Στη συνέχεια, συσχετίστηκε η μεθυλίωση των γονιδίων *GSTPI* και *RASSF1A* στα κοινά δείγματα ασθενών (n=38) με mCRPC στα CTCs και στα εξωσώματα (**Πίνακας 8.12**).

Πίνακας 8.11. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* σε εξωσώματα και CTCs ασθενών με mCRPC

	<i>PD-L1</i> CTCs	
	Θετικό	Αρνητικό
<i>PD-L1</i> Εξωσώματα		
Θετικό	11	4
Αρνητικό	23	24
Concordance	57%	
P	0,139 (Fisher's Exact test)	
	<i>AR-FL</i> CTCs	
	Θετικό	Αρνητικό
<i>AR-FL</i> Εξωσώματα		
Θετικό	34	2
Αρνητικό	35	1
Concordance	57%	
P	1 (Fisher's Exact test)	
	<i>AR-V7</i> CTCs	
	Θετικό	Αρνητικό
<i>AR-V7</i> Εξωσώματα		
Θετικό	1	0
Αρνητικό	24	37
Concordance	58%	
P	0,403(Fisher's Exact test)	
	<i>AR-567</i> CTCs	
	Θετικό	Αρνητικό
<i>AR-567</i> Εξωσώματα		
Θετικό	0	1
Αρνητικό	18	43
Concordance	69%	
P	1(Fisher's Exact test)	
	<i>AR-Total</i> CTCs	
	Θετικό	Αρνητικό
<i>AR-Total</i> Εξωσώματα		
Θετικό	25	4
Αρνητικό	30	3
Concordance	45%	
P	0,696(Fisher's Exact test)	

Πίνακας 8.12. Συσχέτιση της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTPI* και *RASSF1A* σε εξωσώματα και CTCs ασθενών με mCRPC

	<i>GSTPI</i> CTCs	
	Μεθυλιωμένο	Μη-μεθυλιωμένο
<i>GSTPI</i> Εξωσώματα		
Μεθυλιωμένο	7	7
Μη-μεθυλιωμένο	3	21
Concordance	74%	
P	0,021 (Fisher's Exact test)	
	<i>RASSF1A</i> CTCs	
	Μεθυλιωμένο	Μη-μεθυλιωμένο
<i>RASSF1A</i> Εξωσώματα		
Μεθυλιωμένο	5	5
Μη-μεθυλιωμένο	3	25
Concordance	79%	
P	0,019 (Fisher's Exact test)	

8.4. Συμπεράσματα-συζήτηση

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων και η παρακολούθηση των ασθενών με mCRPC μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση κατάλληλων βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες αυτοί πρέπει να είναι μετρήσιμοι, με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, να συσχετίζονται με την κλινική έκβαση των ασθενών και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πράξη.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, διερευνηθήκε το μοριακό προφίλ των CTCs ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την παρουσία μεθυλίωσης των γονιδίων αυτών στα CTCs ασθενών με mCRPC.

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). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα CTCs ανιχνεύτηκε υπερέκφραση του *PD-L1* σε 47/80 (58,8%) δείγματα ασθενών με mCRPC. Η καμπύλη επιβίωσης για την υπερέκφραση του *PD-L1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση του *PD-L1* συνδέεται με μειωμένο PFS ($p=0,018$).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε multiplex RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-FL*, των εναλλακτικών του μεταγράφων *AR-V7* και *AR-567*, και του *AR-total*. Στα δείγματα των υγιών αιμοδοτών ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 9/9 (100,0%) και του *AR-total* σε 8/9 (88,9%). Κανένα από τα εννέα δείγματα των υγιών αιμοδοτών δεν βρέθηκε θετικό στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-V7* 0/9 (0,0%) και *AR-567* 0/9 (0,0%). Στα δείγματα των ασθενών με mCRPC ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 75/80 (93,8%). Η έκφραση του *AR-V7* ανιχνεύθηκε σε 32/80 (40,0%) δείγματα ασθενών με mCRPC, ενώ η έκφραση του *AR-567* ανιχνεύθηκε σε 21/80 (26,3%) δείγματα. Η έκφραση του *AR-total* ήταν θετική σε 70/80 (87,5%) ασθενών με mCRPC.

Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, για την ανίχνευση του *AR-V7*, με υψηλή αναλυτική ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια είναι πολύ σημαντική για την εφαρμογή αυτού του βιοδείκτη στην κλινική πράξη (280,281). Οι Antonarakis et al. ανέπτυξαν για πρώτη φορά μια απλή RT-qPCR για την ανίχνευση των *AR-V7* και *AR-FL* σε CTCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με mCRPC και ακολούθησαν πολλές άλλες ερευνητικές ομάδες (214,221,238,280–282).

Η έκφραση του γονιδίου *CK-19* δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα εννέα δείγματα των υγιών αιμοδοτών. Στους mCRPC ασθενείς η έκφραση του *CK-19* ανιχνεύτηκε σε υψηλό ποσοστό. Η καμπύλη επιβίωσης για την έκφραση της *CK-19* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα, ασθενείς με θετικά CTCs στην έκφραση της *CK-19* είχαν σημαντικά διαφοροποιημένο (μειωμένο) PFS ($p=0,004$) σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν παρατηρήθηκε έκφραση της *CK-19* στα CTCs.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* στα CTCs ασθενών με mCRPC. Κανένα από τα εννέα δείγματα του φυσιολογικού πληθυσμού (0/9, 0%) δεν βρέθηκε μεθυλιωμένο τόσο για το *GSTP1* όσο και για το *RASSF1A*. Έπειτα, αξιολογήσαμε τη μεθυλίωση των υποκινητών του *GSTP1* και του *RASSF1A* στα 80 δείγματα ασθενών με mCRPC, όπου το γονίδιο βρέθηκε μεθυλιωμένο για το *GSTP1* σε 21/80 (26,3%) των δειγμάτων αυτών και το *RASSF1A* σε 16/80 (20,0%) αντίστοιχα. Η καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για τη μεθυλίωση του *GSTP1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Οι ασθενείς με μεθυλίωση του *GSTP1* είχαν μειωμένο PFS ($p<0,001$) σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση του *GSTP1*.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε για πρώτη φορά το μοριακό προφίλ των εξωσωμάτων από το πλάσμα ασθενών με mCRPC. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ανιχνεύτηκε υπερέκφραση του *PD-L1* σε 15/62 (24,2%) δείγματα στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC, ωστόσο παρατηρήθηκε έκφραση της *CK-19* σε 28/62 (45,2%) δείγματα ασθενών με mCRPC, αλλά και σε 4/10 (40,0%) δείγματα υγιών αιμοδοτών. Κατά συνέπεια, η έκφραση του γονιδίου *CK-19* δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στα εξωσώματα.

Η καμπύλη επιβίωσης για την υπερέκφραση του *PD-L1* έδειξε ότι σχετίζεται με το PFS. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του *PD-L1* στα εξωσώματα συνδέεται με μειωμένο PFS ($p=0,006$) στους ασθενείς με mCRPC.

Παράλληλα, εφαρμόστηκε multiplex RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-FL*, των εναλλακτικών του μεταγράφων *AR-V7* και *AR-567*, καθώς και του *AR-total*. Στα δείγματα των ασθενών με mCRPC ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 38/62 (61,3%), του *AR-V7* σε 1/62 (1,6%), ενώ η έκφραση του *AR-567* ανιχνεύθηκε σε 1/62 (1,6%) δείγματα. Η έκφραση του *AR-total* ήταν θετική σε 29/62 (46,7%) ασθενών με mCRPC. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα

συμφωνούν επίσης με την πρόσφατη μελέτη από τους Marzia Del Re et al., όπου η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου *AR-V7* παρατηρήθηκε στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC (283).

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* στα εξωσώματα. Το γονίδιο *GSTP1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 11q13, διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από κυτταροτοξικά φάρμακα και καρκινογόνους παράγοντες και εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς σε διάφορα επίπεδα σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Μεταβολές στη δραστηριότητα και στην έκφραση του *GSTP1* έχουν αναφερθεί σε πολλούς όγκους και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υπερμεθυλίωσης του DNA του γονιδίου *GSTP1*, στις νησίδες CpG του 5' υποκινητή του γονιδίου (284,285). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, σε 40 δείγματα εξωσωμάτων από ασθενείς με mCRPC, ο υποκινητής του *GSTP1* βρέθηκε μεθυλωμένος σε 14/40 (35,0%) των δειγμάτων αυτών.

Τέλος, μελετήθηκε η μεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A* σε 40 δείγματα εξωσωμάτων από ασθενείς με mCRPC, όπου το γονίδιο βρέθηκε μεθυλωμένο σε 12/40 (30,0%) των δειγμάτων αυτών. 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 (286). 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 (287). Το *RASSF1A* είναι από τα πιο συχνά υπερμεθυλωμένα γονίδια στον καρκίνο κι έχει αναφερθεί ο ρόλος του ως προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο των νεφρών (288), το μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (289), στο νευροβλάστωμα (291), στον καρκίνο των ωοθηκών (279) και στον καρκίνο του μαστού (290). Η μεθυλίωση των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A* δεν έχει μελετηθεί ως τώρα στα εξωσώματα ασθενών με καρκίνο. Είναι η πρώτη φορά λοιπόν που καταγράφεται ότι τα γονίδια *GSTP1* και *RASSF1A* είναι μεθυλωμένα στα εξωσώματα ασθενών που απομονώθηκαν από το πλάσμα ασθενών με mCRPC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υγρή βιοψία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των γενετικών και επιγενετικών μεταβολών κατά την εξέλιξη της νόσου, όπως και την παρακολούθηση των ασθενών, μέσω απλών επαναλαμβανόμενων αιμοληψιών, σε πραγματικό χρόνο (1,2). Η σύγχρονη έρευνα στο πεδίο διάγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου στρέφεται πλέον στην ανεύρεση βιοδεικτών στο αίμα και συγκεκριμένα στα CTCs, στο ctDNA και στα κυκλοφορούντα miRNAs (7,8). Εξαιτίας της ετερογένειας του καρκινικού ιστού, η απομόνωση και ανάλυση των CTCs, του ctDNA, των miRNAs και των EVs παρέχει μια ολοκληρωμένη σκιαγράφηση της μοριακής ταυτότητας του όγκου.

Με το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα μοριακά και συνοδά διαγνωστικά τεστ, η ανάπτυξη και η εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων ελέγχου ποιότητας σε όλα τα στάδια της διαδικασίας είναι κρίσιμη για την επιτυχή εφαρμογή τους (247). Η ανάπτυξη μοριακών αναλύσεων στο περιφερικό αίμα με σκοπό την πρόγνωση και διάγνωση του καρκίνου έχει δημιουργήσει μια ανάγκη για χρήση αντιπηκτικών και συντηρητικών με σκοπό τη διατήρηση των κυττάρων του αίματος για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (248). Για να ελαχιστοποιηθούν τα προαναλυτικά σφάλματα λόγω της σταθερότητας των CTCs στο περιφερικό αίμα κατά τη μεταφορά τους, έχει κατασκευαστεί μια πληθώρα εμπορικά διαθέσιμων σωληναρίων συλλογής περιφερικού αίματος με τη χρήση συγκεκριμένων συντηρητικών ή αντιπηκτικών που έχουν ως στόχο να παρατείνουν το χρόνο μεταξύ της λήψης του αίματος και της απομόνωσης των CTCs.

Η κλινική χρησιμότητα των δοκιμασιών υγρής βιοψίας μπορεί να αξιολογηθεί μόνο όταν βασίζεται σε προτυποποιημένες και αυστηρά ελεγχόμενες διαδικασίες, καθώς η έλλειψη προτυποποιημένης διαδικασίας αναλύσεων παρεμποδίζει σοβαρά την εφαρμογή των διαγνωστικών εξετάσεων, που βασίζονται σε CTC και ctDNA (250).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ολοκληρώσαμε την ανάπτυξη και η κλινική αξιολόγηση νέων μη-επεμβατικών μεθόδων μοριακής διαγνωστικής για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο. Συγκεκριμένα:

1) Αξιολογήσαμε την επίδραση των προαναλυτικών συνθηκών για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στα CTCs, ενώ παράλληλα προτείναμε μια ολοκληρωμένη διαδικασία ελέγχου ποιότητας όλων των βημάτων που συμπεριλαμβάνονται στην πειραματική πορεία για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα υγρής βιοψίας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι αναλύσεις των CTCs σε επίπεδο mRNA επηρεάζονται σημαντικά από τα συντηρητικά ή/και τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα σωληνάρια συλλογής περιφερικού

αίματος. Όταν το περιφερικό αίμα των υγιών αιμοδοτών, εμβολιασμένο με 100 κύτταρα MCF-7, αποθηκεύτηκε σε K₂EDTA σωληνάρια, ανιχνεύτηκε η έκφραση του γονιδίου *CK-19* σε όλα τα χρονικά διαστήματα (T₀, T₂₄ και T₄₈). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι σε σωληνάρια cfDNA-Streck και σε ACD-A με προσθήκη τιροφιμπάνης, παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *CK-19* σε T₀, T₂₄ και T₄₈ αλλά με πολύ χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων σε σύγκριση με αυτά των K₂EDTA. Στα σωληνάρια cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *CK-19* μόνο σε χρόνο T₀, δείχνοντας την αρνητική επίδραση των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών που περιέχονται σε αυτά στην μέτρηση του mRNA των CTCs. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* είναι χαμηλότερη στα cfRNA-Streck, Cellsave και Transfix συγκρινόμενη με τα K₂EDTA. Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης των CTCs επηρεάζεται σημαντικά από τα αντιπηκτικά ή τα συντηρητικά που περιέχονται στα συγκεκριμένα σωληνάρια. Τα K₂EDTA αποτελούν τη βέλτιστη επιλογή για τις αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης στα CTCs. Οι προαναλυτικοί παράγοντες, αν δεν λαμβάνονται υπόψη και δεν ελέγχονται επαρκώς, μπορούν να έχουν σοβαρή επίδραση τόσο στην ποιότητα του δείγματος όσο και στην ποιότητα της μοριακής ανάλυσης.

2) Αξιολογήσαμε την επίδραση προαναλυτικών παραμέτρων στην ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σταθερότητα των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα που έχει απομονωθεί από περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών σε διαφορετικά σωληνάρια συλλογής του περιφερικού αίματος και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους απομόνωσης (T₀, T₂₄ και T₄₈). Η αξιολόγηση της επίδρασης των αντιπηκτικών ή των συντηρητικών των σωληναρίων συλλογής του περιφερικού αίματος στηρίχθηκε στον συνδυασμό των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων δυο ενδογενών miRNAs, του miR-21 και του miR-191 καθώς και του εξωγενούς προτύπου cel-miR-39 που προστέθηκε στα δείγματα. Η έκφραση των miRNAs δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τα συντηρητικά ή/και τα αντιπηκτικά των σωληναρίων συλλογής του περιφερικού αίματος.

Τα CTCs αποτελούν έναν ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό, επομένως η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσής τους 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 (259). Η EMT οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του EpCAM (13), επομένως ο ανεξάρτητος των EpCAM εμπλουτισμός των CTCs έχει τη δυνατότητα να απομονώνει κύτταρα που βρίσκονται σε EMT φάση (260,261). Το σύστημα

Parsortix, χρησιμοποιώντας μία τεχνολογία μικροροών, πραγματοποιεί απομόνωση των CTCs βάσει της μικρότερης τάσης τους για παραμόρφωση και στο συνηθέστερα μεγαλύτερο μέγεθός τους συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος.

3) Μελέτη επιλογής του καταλληλότερου συστήματος απομόνωσης/εμπλουτισμού για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs στον HNSCC. Σύγκριση του συστήματος Parsortix με τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs με βάση το EpCAM, από το ίδιο περιφερικό αίμα ασθενών με HNSCC. Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε επίπεδο έκφρασης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν σαφώς ότι ο πληθυσμός των CTCs που απομονώθηκε με το σύστημα Parsortix είναι υψηλότερης καθαρότητας σε σχέση με τον πληθυσμό των CTCs που απομονώθηκε με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τα επίπεδα έκφρασης του *B2M* δείχνουν χαμηλότερη επιμόλυνση των CTCs που απομονώθηκαν με Parsortix σε σχέση με τα CTC που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Ένα υψηλότερο ποσοστό *PD-L1* και *CK-19* θετικών δειγμάτων βρέθηκε στα CTC που απομονώθηκαν με Parsortix σε σχέση με τα CTC που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Η έκφραση του *EGFR* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα εξεταζόμενο δείγμα χρησιμοποιώντας και τις δυο μεθοδολογίες. Δεν υπήρξε καμία απολύτως συσχέτιση των EMT βιοδεικτών (*TWIST1* και *CDH2*) ανάμεσα στο Parsortix και στον EpCAM-θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ξεχωριστοί (διακριτοί) πληθυσμοί CTC απομονώνονται με την εφαρμογή αυτών των δυο διαφορετικών μεθόδων εμπλουτισμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να εξηγηθούν με βάση την ετερογένεια των CTCs. Συμπερασματικά λοιπόν, ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs σε επίπεδο έκφρασης, από CTCs απομονωμένα με το σύστημα Parsortix παρέχει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον EpCAM- θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό για ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Η κλινική σημασία της ανίχνευσης των CTCs χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση συνιστά περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση σε μια ομάδα ασθενών επιλεγμένη με σαφώς καθορισμένα κριτήρια.

4) Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες δυνατότητες που προσφέρει η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο είναι η ικανότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού πολλαπλών στόχων στην ίδια αντίδραση PCR (multiplex RT-qPCR). Ιδανικά μία multiplex RT-qPCR θα πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύει, να διαφοροποιεί, και να εξασφαλίζει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα για πολλούς διαφορετικούς στόχους, χωρίς η παρουσία του ενός στόχου να επηρεάζει τον προσδιορισμό κάποιου άλλου (διασταυρούμενη αντίδραση), χωρίς να χάνεται η ευαισθησία. Είναι γεγονός ότι λόγω του περιορισμένου αριθμού των φθορίζοντων ιχνηθετών και της σημαντικής αλληλεπικάλυψης των

φασμάτων εκπομπής, η ποσοτικοποίηση πολλαπλών προϊόντων αντίδρασης είναι δύσκολη και συχνά μη εφικτή για περισσότερους από δύο στόχους (269). **Στην παρούσα διατριβή αναπτύξαμε μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδο πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-full length (AR-FL)*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης στο όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics).** Η επιλογή του γονιδίου *AR* και των συγκεκριμένων εναλλακτικών του μεταγράφων, δεν έγινε τυχαία. Όπως είναι γνωστό, η ελλειμματική καρβοξυτελική περιοχή του *AR*, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά *AR* μετάγραφα με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες (270,271). Για την ανάπτυξη της τετραπλής RT-qPCR αρχικά πραγματοποιήθηκε *in silico* σχεδιασμός των εκκινητών και των ανιχνευτών ώστε κάθε γονίδιο να μπορεί να ενισχύεται εκλεκτικά παρουσία των άλλων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών για τη θερμοκρασία και το χρόνο υβριδισμού των εκκινητών, για τη βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και των ανιχνευτών, και τέλος για τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος, του $MgCl_2$, των dNTPs, της Taq πολυμεράσης και του BSA. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την αξιολόγηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθοδολογίας. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι η τετραπλή RT-qPCR χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και είναι κατάλληλη για εφαρμογή σε κλινικά δείγματα. Το γεγονός ότι τα CTCs είναι εξαιρετικά σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου προς ανάλυση δείγματος είναι πολύ περιορισμένη, παραμένει μια τεράστια αναλυτική και τεχνική πρόκληση. Η μεθοδολογία πολλαπλής RT-qPCR για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *AR-FL*, των εναλλακτικών μεταγράφων του *AR-V7* και *AR-567* και τέλος του *AR-total* με ανιχνευτές υδρόλυσης καταφέρνει να ξεπεράσει αυτούς τους περιορισμούς. Δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης των *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total* με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση, εξοικονομώντας ποσότητα πολύτιμου δείγματος, χρόνο, αντιδραστήρια και αναλώσιμα.

5) Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε κλινικά στα CTCs και στα εξωσώματα ασθενών με μεταστατικό ενουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στα CTCs όσο και στα εξωσώματα. Τα CTCs είχαν μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων σε σχέση με τα εξωσώματα τόσο στο *AR-FL* όσο και στα εναλλακτικά μετάγραφα *AR-V7*, *AR-567* και στο *AR-total*. Στα CTCs, ο απόλυτος αριθμός αντιγράφων ήταν τουλάχιστον δέκα φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τα εξωσώματα.

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων και η παρακολούθηση των ασθενών με mCRPC μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση κατάλληλων βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες αυτοί πρέπει να είναι μετρήσιμοι, με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, να συσχετίζονται με την κλινική έκβαση των ασθενών και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πράξη.

6) Διερευνήθηκε το μοριακό προφίλ των CTCs ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTP1* και *RASSF1A*. Τα αποτελέσματά μας, υποδεικνύουν ότι 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). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα CTCs ανιχνεύτηκε υπερέκφραση του *PD-L1* σε 47/80 (58,8%) δείγματα ασθενών με mCRPC. Η καμπύλη επιβίωσης για την υπερέκφραση του *PD-L1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση του *PD-L1* συνδέεται με μειωμένο PFS. Τα γονίδια *GSTP1* και *RASSF1A* βρέθηκαν μεθυλιωμένα στα CTCs ασθενών με mCRPC. Η καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για τη μεθυλίωση του *GSTP1* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε multiplex RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-FL*, των εναλλακτικών του μεταγράφων *AR-V7* και *AR-567*, και του *AR-total*. Στα δείγματα των υγιών αιμοδοτών ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 9/9 (100,0%) και του *AR-total* σε 8/9 (88,9%). Κανένα από τα εννέα δείγματα των υγιών αιμοδοτών δεν βρέθηκε θετικό στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-V7* 0/9 (0,0%) και *AR-567* 0/9 (0,0%). Στα δείγματα των ασθενών με mCRPC ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 75/80 (93,8%). Η έκφραση του *AR-V7* ανιχνεύθηκε σε 32/80 (40,0%) δείγματα ασθενών με mCRPC, ενώ η έκφραση του *AR-567* ανιχνεύθηκε σε 21/80 (26,3%) δείγματα. Η έκφραση του *AR-total* ήταν θετική σε 70/80 (87,5%) ασθενών με mCRPC. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, για την ανίχνευση του *AR-V7*, με υψηλή αναλυτική ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια είναι πολύ σημαντική για την εφαρμογή αυτού του βιοδείκτη στην κλινική πράξη (280,281). Η έκφραση του γονιδίου *CK-19* δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα εννέα δείγματα των υγιών αιμοδοτών. Στους mCRPC ασθενείς η έκφραση του *CK-19* ανιχνεύθηκε σε υψηλό ποσοστό. Η καμπύλη Kaplan-Meier για την έκφραση της *CK-19* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το PFS.

7) Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε για πρώτη φορά το μοριακό προφίλ των εξωσωμάτων που απομονώθηκαν από το πλάσμα ασθενών με mCRPC. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *PD-L1*, *CK-19*, των εναλλακτικών μεταγράφων *AR-FL*, *AR-V7*, *AR-567* και *AR-total*, καθώς και το προφίλ της

μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTPI* και *RASSF1A*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ανιχνεύτηκε υπερέκφραση του *PD-L1* σε 15/62 (24,2%) δείγματα στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC, ωστόσο παρατηρήθηκε έκφραση της *CK-19* σε 28/62 (45,2%) δείγματα ασθενών με mCRPC, αλλά και σε 4/10 (40,0%) δείγματα υγιών αιμοδοτών. Κατά συνέπεια, η έκφραση του γονιδίου *CK-19* δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στα εξωσώματα. Στα εξωσώματα των ασθενών με mCRPC η ανάλυση καμπυλών Kaplan-Meier επέδειξε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του *PD-L1* και μειωμένου PFS. Η αξιολόγηση της υπερέκφρασης του *PD-L1* αξίζει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών και σε άλλους τύπους καρκίνου με στόχο την επικύρωσή του ως ένα μη-επεμβατικό βιοδείκτη καρκίνου.

Παράλληλα, εφαρμόστηκε multiplex RT-qPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του *AR-FL*, των εναλλακτικών του μεταγράφων *AR-V7* και *AR-567*, καθώς και του *AR-total*. Στα δείγματα των ασθενών με mCRPC ανιχνεύτηκε έκφραση του *AR-FL* σε 38/62 (61,3%), του *AR-V7* σε 1/62 (1,6%), ενώ η έκφραση του *AR-567* ανιχνεύθηκε σε 1/62 (1,6%) δείγματα. Η έκφραση του *AR-total* ήταν θετική σε 29/62 (46,7%) ασθενών με mCRPC. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων *GSTPI* και *RASSF1A* στα εξωσώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, σε 40 δείγματα εξωσωμάτων από ασθενείς με mCRPC, ο υποκινητής του *GSTPI* βρέθηκε μεθυλιωμένος σε 14/40 (35,0%) των δειγμάτων αυτών. Τέλος, μελετήθηκε η μεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A* σε 40 δείγματα εξωσωμάτων από ασθενείς με mCRPC, όπου το γονίδιο βρέθηκε μεθυλιωμένο σε 12/40 (30,0%) των δειγμάτων αυτών. Είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται ότι τα συγκεκριμένα γονίδια είναι μεθυλιωμένα στα εξωσώματα ασθενών με mCRPC. Η περαιτέρω διερεύνηση των δεικτών αυτών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων με γνωστά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά θα βοηθήσει σημαντικά στην κατοχύρωση νέων επιγενετικών δεικτών υγρής βιοψίας με στόχο την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενών με mCRPC.

Η παρούσα διατριβή συμβάλλει στην προτυποποίηση αναλύσεων και στη βελτιστοποίηση μεθόδων για την κατοχύρωση νέων μη-επεμβατικών μεθόδων μοριακής διαγνωστικής με στόχο την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Σύντμηση	Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
ACTB	<i>Actin-beta</i>	<i>Ακτίνη-β</i>
AR	Androgen Receptor	Ανδρογονικός υποδοχέας
CAMLs	Cancer-Associated Macrophage-Like cells	Μακροφάγα σχετιζόμενα με καρκίνο
CDx	Companion Diagnostics	Συνοδές διαγνωστικές εξετάσεις
CEA	Carcinoembryonic Antigen	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
cfDNA	Cell-free DNA	Εξωκυττάριο DNA
CK	Cytokeratins	Κυτταροκερατίνες
CTCs	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
ctDNA	Circulating tumor DNA	Εξωκυττάριο καρκινικό DNA
EGFR	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Επιθηλιακό μόριο κυτταρικής προσκόλλησης
EVs	Extracellular Vesicles	Εξωκυτταρικά κυστίδια
HD-CTC	High-definition Circulating Tumor Cell	Τεχνολογία υψηλής ευκρίνειας για την ανίχνευση CTC
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor 2	Υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου
HPV16	Human Papilloma Virus 16	Ιός ανθρώπινων θηλωμάτων 16
ISET	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells	Απομόνωση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων βάσει μεγέθους
mCRPC	metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	Μεταστατικός ευνουχοάντοχος καρκίνος προστάτη
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
PBSCs	Peripheral Blood Stem Cells	Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
PSA	Prostate-specific Antigen	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative	Αντίστροφης μεταγραφής ποσοτική

	PCR	PCR
RCL	Red cell lysis buffer	Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων
RASSF1A	Ras association domain Family member 1A	Γονίδιο της οικογένειας <i>Ras</i>
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

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. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes, Chromosom Cancer*. 2019 Apr;58(4):219–32.
3. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2016 Mar 8;35(10):1216–24.
4. 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.
5. 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 23;359(6378):926–30.
6. Giannopoulou L, Zavridou M, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: the potential of circulating miRNAs and exosomes. *Transl Res*. 2019 Mar;205:77–91.
7. Jeffrey SS, Toner M. Liquid biopsy: a perspective for probing blood for cancer. *Lab Chip*. 2019;19(4):548–9.
8. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*. 2019 Feb 8;20(2):71–88.
9. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*. 2017 Feb 13;31(2):172–9.
10. 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.
11. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J cancer*. 2011 Jun 1;128(11):2527–35.
12. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Nov 8;15(2):81–94.
13. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med*. 2017 Feb 24;95(2):133–42.
14. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Feb 20;20(2):69–84.
15. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110–8.
16. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2013 Jan;73(1):8–11.
17. 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.
18. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Mar;40(3):172–86.
19. Lianidou ES. Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells: Holy Grail for Personalized Cancer Treatment? *Clin Chem*. 2014 Oct 1;60(10):1249–51.

20. 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.
21. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Feb 22;
22. 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;8(346):346ra92.
23. Ulz P, Heitzer E, Geigl JB, Speicher MR. Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA. *Int J Cancer*. 2017 Sep;141(5):887–96.
24. 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;16:190–5.
25. 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 Jul 17;15(7):459–66.
26. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
27. Mostert B, Sieuwerts AM, Martens JWM, Sleijfer S. Diagnostic applications of cell-free and circulating tumor cell-associated miRNAs in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Apr 9;11(3):259–75.
28. Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes, Chromosom Cancer*. 2019 Apr;58(4):244–53.
29. Schwarzenbach H. Clinical Relevance of Circulating, Cell-Free and Exosomal microRNAs in Plasma and Serum of Breast Cancer Patients. *Oncol Res Treat*. 2017;40(7–8):423–9.
30. Barbato S, Solaini G, Fabbri M. MicroRNAs in Oncogenesis and Tumor Suppression. In: *International review of cell and molecular biology*. 2017. p. 229–68.
31. Van Roosbroeck K, Calin GA. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. In: *Advances in cancer research*. 2017. p. 119–49.
32. Drusco A, Croce CM. MicroRNAs and Cancer: A Long Story for Short RNAs. In: *Advances in cancer research*. 2017. p. 1–24.
33. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Mar 4;11(3):145–56.
34. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Sep 21;15(9):541–63.
35. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun 12;11(6):426–37.
36. Fabbri M. MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2018 Jan 5;373(1737):20160486.
37. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jun 7;8(8):467–77.
38. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J*

- Haematol. 1967 May;13(3):269–88.
39. Crawford N. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *Br J Haematol.* 1971 Jul;21(1):53–69.
 40. Dalton AJ. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus ‘virus-like’ particles. *J Natl Cancer Inst.* 1975 May;54(5):1137–48.
 41. Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem J, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1981 Jun;645(1):63–70.
 42. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):9412–20.
 43. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983 Aug;97(2):329–39.
 44. Kalluri R, LeBleu VS. Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2016;81:275–80.
 45. Barros FM, Carneiro F, Machado JC, Melo SA. Exosomes and Immune Response in Cancer: Friends or Foes? *Front Immunol.* 2018 Apr 11;9:730.
 46. Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Feb;72(4):659–71.
 47. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1208–15.
 48. Kurywchak P, Tavormina J, Kalluri R. The emerging roles of exosomes in the modulation of immune responses in cancer. *Genome Med.* 2018 Dec 26;10(1):23.
 49. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun 7;9(6):654–9.
 50. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373–83.
 51. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013 Mar 15;119(6):1159–67.
 52. Li Z, Ma Y-Y, Wang J, Zeng X-F, Li R, Kang W, et al. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Onco Targets Ther.* 2016 Dec;9:139–48.
 53. Melo SA, Sugimoto H, O’Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2014 Nov 10;26(5):707–21.
 54. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec 16;10(12):1470–6.
 55. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014 Feb 14;289(7):3869–75.

56. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015 Jul 24;523(7559):177–82.
57. Armstrong D, Wildman DE. Extracellular Vesicles and the Promise of Continuous Liquid Biopsies. *J Pathol Transl Med*. 2018 Jan 15;52(1):1–8.
58. Junqueira-Neto S, Batista IA, Costa JL, Melo SA. Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytol*. 2019 Feb 15;1–10.
59. 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;10(4):R69.
60. Pamme N. On-chip bioanalysis with magnetic particles. *Curr Opin Chem Biol*. 2012 Aug;16(3–4):436–43.
61. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1033–67.
62. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):329–40.
63. 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;61(1):259–66.
64. 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;9(1):70.
65. Zborowski M, Chalmers JJ. Rare cell separation and analysis by magnetic sorting. *Anal Chem*. 2011 Nov;83(21):8050–6.
66. 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.
67. 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;13(3):920–8.
68. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14):4218–24.
69. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 21;23(7):1420–30.
70. 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;10(20):6897–904.
71. Andreopoulou E, Yang L-Y, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™

- system. *Int J cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1590–7.
72. Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A, Giannini G, De Falco E, Chimenti I, et al. Circulating tumor cells. *Cancer Biol Ther*. 2014 May 12;15(5):496–503.
 73. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990 Jan 1;11(2):231–8.
 74. Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee B-N, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition and Stem Cell Markers in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Nov 1;11(11):2526–34.
 75. 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;106(10):3970–5.
 76. 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(5):e33788.
 77. Deng G, Krishnakumar S, Powell AA, Zhang H, Mindrinos MN, Telli ML, et al. Single cell mutational analysis of PIK3CA in circulating tumor cells and metastases in breast cancer reveals heterogeneity, discordance, and mutation persistence in cultured disseminated tumor cells from bone marrow. *BMC Cancer*. 2014 Dec 19;14(1):456.
 78. Kim S, Park SH, Lee J, Park YS, Kim HC. 201 Transcriptome analysis of CD133-positive stem cells and prognostic value of survivin in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014 Nov 1;50:65.
 79. Nagrath S, Sequist L V., Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ullkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007 Dec 20;450(7173):1235–9.
 80. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, Chanel-Vos C, et al. Functional Characterization of Circulating Tumor Cells with a Prostate-Cancer-Specific Microfluidic Device. *Kyprianou N, editor. PLoS One*. 2012 Apr 27;7(4):e35976.
 81. 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 Nov 28;14(1):147–56.
 82. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol*. 2011 Apr 19;2011:252361.
 83. Kalinsky K, Mayer JA, Xu X, Pham T, Wong KL, Villarín E, et al. Correlation of hormone receptor status between circulating tumor cells, primary tumor, and metastasis in breast cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2015 Jul 23;17(7):539–46.
 84. 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.
 85. Sheng W, Ogunwobi OO, Chen T, Zhang J, George TJ, Liu C, et al. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab Chip*. 2014 Nov 28;14(1):89–98.
 86. 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.

87. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016 Mar 1;10(3):374–94.
88. Saliba A-E, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard F-C, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14524–9.
89. Autebert J, Coudert B, Champ J, Saias L, Guneri ET, Lebofsky R, et al. High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection. *Lab Chip*. 2015 Apr 21;15(9):2090–101.
90. Earhart CM, Hughes CE, Gaster RS, Ooi CC, Wilson RJ, Zhou LY, et al. Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips. *Lab Chip*. 2014 Nov 28;14(1):78–88.
91. Winer-Jones JP, Vahidi B, Arquilevich N, Fang C, Ferguson S, Harkins D, et al. Circulating Tumor Cells: Clinically Relevant Molecular Access Based on a Novel CTC Flow Cell. Kyprianou N, editor. *PLoS One*. 2014 Jan 29;9(1):e86717.
92. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Transl Oncol*. 2013 Oct 1;6(5):528-IN1.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc*. 2014 Mar 27;9(3):694–710.
97. 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.
98. 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;4:281.
99. 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.
100. 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 cytomorphologic criteria for the diagnosis of cancer. *Lung Cancer*. 2014 Aug;85(2):182–5.
101. Kruspe S, Dickey DD, Urak KT, Blanco GN, Miller MJ, Clark KC, et al. Rapid and Sensitive Detection of Breast Cancer Cells in Patient Blood with Nuclease-Activated Probe Technology. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep 15;8:542–57.

102. Yanagita M, Luke JJ, Hodi FS, Jänne PA, Paweletz CP. Isolation and characterization of circulating melanoma cells by size filtration and fluorescent in-situ hybridization. *Melanoma Res.* 2018 Apr;28(2):89–95.
103. 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.
104. 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;111(9):3514–9.
105. 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.
106. 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 Jan 4;141(2):669–78.
107. 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).
108. 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.
109. Franken A, Driemel C, Behrens B, Meier-Stiegen F, Endris V, Stenzinger A, et al. Label-Free Enrichment and Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells from Diagnostic Leukapheresis Products. *Clin Chem.* 2019 Feb 8;clinchem.2018.296814.
110. 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.
111. 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;28(17):e288–9; author reply e290.
112. 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;49(4):150–8.
113. 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.
114. Clawson GA, Kimchi E, Patrick SD, Xin P, Harouaka R, Zheng S, et al. Circulating Tumor Cells in Melanoma Patients. Rota R, editor. *PLoS One.* 2012 Jul 19;7(7):e41052.
115. Pratt ED, Huang C, Hawkins BG, Gleghorn JP, Kirby BJ. Rare Cell Capture in Microfluidic Devices. *Chem Eng Sci.* 2011 Apr;66(7):1508–22.
116. 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;108(6):1358–67.

117. 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;85(17):8219–24.
118. 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.
119. 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;16(5):445.
120. 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 Nov 28;14(1):63–77.
121. Warkiani ME, Guan G, Luan KB, Lee WC, Bhagat AAS, Kant Chaudhuri P, et al. Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab Chip.* 2014 Nov 28;14(1):128–37.
122. 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.
123. Markou A, Lazaridou M, Paraskevopoulos P, Chen S, Świerczewska M, Budna J, et al. Multiplex Gene Expression Profiling of In Vivo Isolated Circulating Tumor Cells in High-Risk Prostate Cancer Patients. *Clin Chem.* 2018 Feb;64(2):297–306.
124. 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;41(4):1241–50.
125. 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;110(41):16580–5.
126. Greene BT, Hughes AD, King MR. Circulating Tumor Cells: The Substrate of Personalized Medicine? *Front Oncol.* 2012 Jul 2;2:69.
127. Nieva J, Wendel M, Lutgen MS, Marrinucci D, Bazhenova L, Kolatkar A, et al. High-definition imaging of circulating tumor cells and associated cellular events in non-small cell lung cancer patients: a longitudinal analysis. *Phys Biol.* 2012 Feb 1;9(1):016004.
128. Hillig T, Horn P, Nygaard A-B, Haugaard AS, Nejlund S, Brandslund I, et al. In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biol.* 2015 Jun 22;36(6):4597–601.
129. Galanzha E, Zharov V, Galanzha EI, Zharov VP. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers (Basel).* 2013 Dec 10;5(4):1691–738.
130. 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.
131. Lara O, Tong X, Zborowski M, Farag SS, Chalmers JJ. Comparison of two immunomagnetic separation technologies to deplete T cells from human blood samples. *Biotechnol Bioeng.* 2006 May 5;94(1):66–80.

132. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, et al. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Feb;4(2):343–8.
133. 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.
134. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, Drovetto N, Clein AC, Varshavskaya P, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer.* 2015 Dec 6;15(1):360.
135. Harouaka RA, Zhou M-D, Yeh Y-T, Khan WJ, Das A, Liu X, et al. Flexible micro spring array device for high-throughput enrichment of viable circulating tumor cells. *Clin Chem.* 2014 Feb 1;60(2):323–33.
136. Zhou M-D, Hao S, Williams AJ, Harouaka RA, Schrand B, Rawal S, et al. Separable Bilayer Microfiltration Device for Viable Label-free Enrichment of Circulating Tumour Cells. *Sci Rep.* 2015 May 9;4(1):7392.
137. Mu Z, Benali-Furet N, Uzan G, Znaty A, Ye Z, Paolillo C, et al. Detection and Characterization of Circulating Tumor Associated Cells in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 30;17(12):1665.
138. Kolostova K, Spicka J, Matkowski R, Bobek V. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am J Transl Res.* 2015;7(7):1203–13.
139. Qin X, Park S, Duffy SP, Matthews K, Ang RR, Todenhöfer T, et al. Size and deformability based separation of circulating tumor cells from castrate resistant prostate cancer patients using resettable cell traps. *Lab Chip.* 2015 May 5;15(10):2278–86.
140. Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, Donaldson MC, Zeinali M, Hamza B, et al. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat Methods.* 2015 Jul 18;12(7):685–91.
141. Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, et al. ApoStreamTM, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics.* 2012 Jun;6(2):24133.
142. Casavant BP, Mosher R, Warrick JW, Maccoux LJ, Berry SMF, Becker JT, et al. A negative selection methodology using a microfluidic platform for the isolation and enumeration of circulating tumor cells. *Methods.* 2013 Dec 1;64(2):137–43.
143. López-Riquelme N, Minguela A, Villar-Permuy F, Ciprian D, Castillejo A, Álvarez-López M-R, et al. Imaging cytometry for counting circulating tumor cells: comparative analysis of the CellSearch vs ImageStream systems. *APMIS.* 2013 Dec;121(12):1139–43.
144. Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgren 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):016003.
145. Das M, Riess JW, Frankel P, Schwartz E, Bennis R, Hsieh H Ben, et al. ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression-free survival (PFS) in patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer.* 2012 Aug;77(2):421–6.
146. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014 Oct

- 11;30(1):255–89.
147. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc cell Biol.* 2006 Apr;Chapter 3(1):Unit 3.22.
 148. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 2017;7(3):789–804.
 149. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov A V. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015 Apr 1;2015(4):319–23.
 150. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PST, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 May;292(5):F1657-61.
 151. Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2005 Feb 21;3(1):9.
 152. Heinemann ML, Ilmer M, Silva LP, Hawke DH, Recio A, Vorontsova MA, et al. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J Chromatogr A.* 2014 Dec 5;1371:125–35.
 153. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Armengol MP, Menezes-Neto A, Portillo HA Del, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell Vesicles.* 2015 Jan 28;4(1):27369.
 154. Kang D, Oh S, Ahn S-M, Lee B-H, Moon MH. Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2008 Aug;7(8):3475–80.
 155. Petersen KE, Manangon E, Hood JL, Wickline SA, Fernandez DP, Johnson WP, et al. A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Dec 2;406(30):7855–66.
 156. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, Zocco D, Lari E, Radano G, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods.* 2015 Oct 1;87:46–58.
 157. Contreras-Naranjo JC, Wu H-J, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip.* 2017 Oct 25;17(21):3558–77.
 158. Ko J, Hemphill MA, Gabrieli D, Wu L, Yelleswarapu V, Lawrence G, et al. Smartphone-enabled optofluidic exosome diagnostic for concussion recovery. *Sci Rep.* 2016 Nov 8;6(1):31215.
 159. Shao H, Chung J, Lee K, Balaj L, Min C, Carter BS, et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nat Commun.* 2015 May 11;6(1):6999.
 160. Davies RT, Kim J, Jang SC, Choi E-J, Gho YS, Park J. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip.* 2012 Dec 21;12(24):5202–10.
 161. Cho S, Jo W, Heo Y, Kang JY, Kwak R, Park J. Isolation of extracellular vesicle from blood plasma using electrophoretic migration through porous membrane. *Sensors Actuators B Chem.* 2016 Oct;233(233):289–97.
 162. Woo H-K, Sunkara V, Park J, Kim T-H, Han J-R, Kim C-J, et al. Exodisc for Rapid, Size-

- Selective, and Efficient Isolation and Analysis of Nanoscale Extracellular Vesicles from Biological Samples. *ACS Nano*. 2017 Feb 28;11(2):1360–70.
163. Wang Z, Wu H, Fine D, Schmulen J, Hu Y, Godin B, et al. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab Chip*. 2013 Aug 7;13(15):2879–82.
 164. Rezeli M, Gidlöf O, Evander M, Bryl-Górecka P, Sathanoori R, Gilje P, et al. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated by Acoustic Trapping or Differential Centrifugation. *Anal Chem*. 2016 Sep 6;88(17):8577–86.
 165. Lee K, Shao H, Weissleder R, Lee H. Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano*. 2015 Mar 24;9(3):2321–7.
 166. Santana SM, Antonyak MA, Cerione RA, Kirby BJ. Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomed Microdevices*. 2014 Dec 24;16(6):869–77.
 167. Liu C, Guo J, Tian F, Yang N, Yan F, Ding Y, et al. Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows. *ACS Nano*. 2017 Jul 25;11(7):6968–76.
 168. Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May;371(9625):1695–709.
 169. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7–30.
 170. 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.
 171. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 Mar 2;18(5):269–82.
 172. Malone E, Siu LL. Precision Medicine in Head and Neck Cancer: Myth or Reality? *Clin Med Insights Oncol*. 2018 Jan 4;12:117955491877958.
 173. Denaro N, Merlano MC. Immunotherapy in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2018 Dec 1;11(4):217–23.
 174. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 May 15;16(5):275–87.
 175. Bauman JE, Cohen E, Ferris RL, Adelstein DJ, Brizel DM, Ridge JA, et al. Immunotherapy of head and neck cancer: Emerging clinical trials from a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Planning Meeting. *Cancer*. 2017 Apr 1;123(7):1259–71.
 176. Tinhofer I, Staudte S. Circulating tumor cells as biomarkers in head and neck cancer: recent advances and future outlook. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Oct 3;18(10):897–906.
 177. Economopoulou P, Kotsantis I, Kyrodimos E, Lianidou ES, Psyrri A. Liquid biopsy: An emerging prognostic and predictive tool in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Focus on Circulating Tumor Cells (CTCs). *Oral Oncol*. 2017 Nov;74:83–9.
 178. Hristozova T, Korschak R, Stromberger C, Fusi A, Liu Z, Weichert W, et al. The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). *Ann Oncol*. 2011 Aug 1;22(8):1878–85.

179. Wang Z, Cui K, Xue Y, Tong F, Li S. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Med Oncol*. 2015 May 22;32(5):164.
180. Balasubramanian P, Lang JC, Jatana KR, Miller B, Ozer E, Old M, et al. Multiparameter Analysis, including EMT Markers, on Negatively Enriched Blood Samples from Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Yeudall A, editor. *PLoS One*. 2012 Jul 26;7(7):e42048.
181. Buglione M, Grisanti S, Almici C, Mangoni M, Polli C, Consoli F, et al. Circulating Tumour Cells in locally advanced head and neck cancer: Preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer*. 2012 Nov 1;48(16):3019–26.
182. Tinhofer I, Hristozova T, Stromberger C, Keilholz U, Budach V. Monitoring of Circulating Tumor Cells and Their Expression of EGFR/Phospho-EGFR During Combined Radiotherapy Regimens in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Int J Radiat Oncol*. 2012 Aug 1;83(5):e685–90.
183. Grobe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schon G, Wikner J, et al. Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Blood and Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):425–33.
184. Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, Angelidis I, Zavridou M, Economopoulou P, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2017;28:1923–33.
185. Kulasinghe A, Perry C, Kenny L, Warkiani ME, Nelson C, Punyadeera C. PD-L1 expressing circulating tumour cells in head and neck cancers. *BMC Cancer*. 2017 Dec 16;17(1):333.
186. Kulasinghe A, Kapeleris J, Kimberley R, Mattarollo SR, Thompson EW, Thierry J-P, et al. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2018 Dec;7(12):5910–9.
187. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol*. 2016 Nov 10;34(32):3838–45.
188. 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.
189. Bettegowda 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;6(224):224ra24–224ra24.
190. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res*. 2018 Jun 7;97(6):701–8.
191. Schmidt H, Kulasinghe A, Kenny L, Punyadeera C. The development of a liquid biopsy for head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2016 Oct;61:8–11.
192. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015 Jun 24;7(293):293ra104–293ra104.
193. van Ginkel JH, Huibers MMH, van Es RJJ, de Bree R, Willems SM. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck

- cancer patients. *BMC Cancer*. 2017 Jun 19;17(1):428.
194. Chung CH, Guthrie VB, Masica DL, Tokheim C, Kang H, Richmon J, et al. Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015 Jun;26(6):1216–23.
 195. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1157–60.
 196. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 1;21(3):632–41.
 197. Spector ME, Farlow JL, Haring CT, Brenner JC, Birkeland AC. The potential for liquid biopsies in head and neck cancer. *Discov Med*. 2018;25(139):251–7.
 198. Balgkouranidou I, Liloglou T, Lianidou ES. Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomark Med*. 2013 Feb;7(1):49–58.
 199. 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;18(7):1506.
 200. Sathianathan NJ, Konety BR, Crook J, Saad F, Lawrentschuk N. Landmarks in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2018 Oct 31;15(10):627–42.
 201. Pantel K, Hille C, Scher HI. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin Chem*. 2019 Jan 2;65(1):87–99.
 202. van der Toom EE, Axelrod HD, de la Rosette JJ, de Reijke TM, Pienta KJ, Valkenburg KC. Prostate-specific markers to identify rare prostate cancer cells in liquid biopsies. *Nat Rev Urol*. 2019 Jan 27;16(1):7–22.
 203. Danila DC, Pantel K, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumors cells as biomarkers: progress toward biomarker qualification. *Cancer J*. 2011;17(6):438–50.
 204. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):3903–12.
 205. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 1;13(23):7053–8.
 206. Fletcher C. AR-v7 liquid biopsy for treatment stratification in prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2017 Sep;27(5):500–9.
 207. Knudsen KE, Penning TM. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 May 1;21(5):315–24.
 208. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2011 Sep 15;71(18):6019–29.
 209. Crespo M, van Dalum G, Ferraldeschi R, Zafeiriou Z, Sideris S, Lorente D, et al. Androgen receptor expression in circulating tumour cells from castration-resistant prostate cancer patients treated with novel endocrine agents. *Br J Cancer*. 2015 Mar;112(7):1166–74.
 210. Bastos DA, Antonarakis ES. CTC-derived AR-V7 detection as a prognostic and predictive biomarker in advanced prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Feb;18(2):155–63.

211. Sharp A, Coleman I, Yuan W, Sprenger C, Dolling D, Rodrigues DN, et al. Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *J Clin Invest.* 2019 Jan 2;129(1):192–208.
212. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2014 Sep;371(11):1028–38.
213. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol.* 2017 Jul;35(19):2149–56.
214. 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 1;64(3):536–46.
215. Tommasi S, Pilato B, Carella C, Lasorella A, Danza K, Vallini I, et al. Standardization of CTC AR-V7 PCR assay and evaluation of its role in castration resistant prostate cancer progression. *Prostate.* 2019 Jan;79(1):54–61.
216. De Laere B, van Dam P-J, Whittington T, Mayrhofer M, Diaz EH, Van den Eynden G, et al. Comprehensive Profiling of the Androgen Receptor in Liquid Biopsies from Castration-resistant Prostate Cancer Reveals Novel Intra-AR Structural Variation and Splice Variant Expression Patterns. *Eur Urol.* 2017 Aug;72(2):192–200.
217. Onstenk W, Sieuwerts AM, Kraan J, Van M, Nieuweboer AJM, Mathijssen RHJ, et al. Efficacy of Cabazitaxel in Castration-resistant Prostate Cancer Is Independent of the Presence of AR-V7 in Circulating Tumor Cells. *Eur Urol.* 2015 Dec;68(6):939–45.
218. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J, et al. Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017 Jun;71(6):874–82.
219. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, Jayaram A, Winkquist E, McLaughlin B, et al. Assessment of the Validity of Nuclear-Localized Androgen Receptor Splice Variant 7 in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2018 Sep 1;4(9):1179–86.
220. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, et al. Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Nov 1;2(11):1441.
221. Bernemann C, Schnoeller TJ, Luedeke M, Steinestel K, Boegemann M, Schrader AJ, et al. Expression of AR-V7 in Circulating Tumour Cells Does Not Preclude Response to Next Generation Androgen Deprivation Therapy in Patients with Castration Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017 Jan;71(1):1–3.
222. Nakazawa M, Lu C, Chen Y, Paller CJ, Carducci MA, Eisenberger MA, et al. Serial blood-based analysis of AR-V7 in men with advanced prostate cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 Sep;26(9):1859–65.
223. Armstrong AJ, Halabi S, Luo J, Nanus DM, Giannakakou P, Szmulewitz RZ, et al. The PROPHECY trial: Multicenter prospective trial of circulating tumor cell (CTC) AR-V7 detection in men with mCRPC receiving abiraterone (A) or enzalutamide (E). *J Clin Oncol.* 2018 May 20;36(15_suppl):5004–5004.
224. Wach S, Taubert H, Cronauer M. Role of androgen receptor splice variants, their clinical relevance and treatment options. *World J Urol.* 2019 Jan 19;

225. Danila DC, Anand A, Sung CC, Heller G, Leversha MA, Cao L, et al. TMPRSS2-ERG status in circulating tumor cells as a predictive biomarker of sensitivity in castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. *Eur Urol*. 2011 Nov;60(5):897–904.
226. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AHM, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN Gene Status in Circulating Tumor Cells from Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2009 Mar 24;69(7):2912–8.
227. Attard G, de Bono JS, Logothetis CJ, Fizazi K, Mukherjee SD, Joshua AM, et al. Improvements in Radiographic Progression-Free Survival Stratified by ERG Gene Status in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with Abiraterone Acetate. *Clin Cancer Res*. 2015 Apr 1;21(7):1621–7.
228. Reig Ò, Marín-Aguilera M, Carrera G, Jiménez N, Paré L, García-Recio S, et al. TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016 Nov;70(5):709–13.
229. Azad AA, Volik S V., Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2315–24.
230. Romanel A, Tandefelt DG, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, et al. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Nov 4;7(312):312re10-312re10.
231. Wyatt AW, Azad AA, Volik S V., Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2016 Dec 1;2(12):1598.
232. Wu A, Attard G. Plasma DNA Analysis in Prostate Cancer: Opportunities for Improving Clinical Management. *Clin Chem*. 2019 Jan;65(1):100–7.
233. Massari F, Ciccarese C, Calìo A, Munari E, Cima L, Porcaro AB, et al. Magnitude of PD-1, PD-L1 and T Lymphocyte Expression on Tissue from Castration-Resistant Prostate Adenocarcinoma: An Exploratory Analysis. *Target Oncol*. 2016 Jun 6;11(3):345–51.
234. Calagua C, Russo J, Sun Y, Schaefer R, Lis R, Zhang Z, et al. Expression of PD-L1 in Hormone-naïve and Treated Prostate Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Abiraterone Acetate plus Prednisone and Leuprolide. *Clin Cancer Res*. 2017 Nov 15;23(22):6812–22.
235. Ness N, Andersen S, Khanehkenari MR, Nordbakken C V, Valkov A, Paulsen E-E, et al. The prognostic role of immune checkpoint markers programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed death ligand 1 (PD-L1) in a large, multicenter prostate cancer cohort. *Oncotarget*. 2017 Apr 18;8(16):26789–801.
236. Gevensleben H, Dietrich D, Golletz C, Steiner S, Jung M, Thiesler T, et al. The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016 Apr 15;22(8):1969–77.
237. Isaacsson Velho P, Antonarakis ES. PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in advanced prostate cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018 May 4;11(5):475–86.
238. 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 1;62(11):1504–15.
239. Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. Epithelial to mesenchymal transition

- and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009 Dec;11(6):213.
240. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn.* 2013 Nov;15(6):827–34.
241. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 27;33(20):e179.
242. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001 Dec 1;25(4):402–8.
243. 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.
244. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer.* 2011;11:422.
245. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr 1;55(4):611–22.
246. Zavridou M, Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Lianidou E. Evaluation of Preanalytical Conditions and Implementation of Quality Control Steps for Reliable Gene Expression and DNA Methylation Analyses in Liquid Biopsies. *Clin Chem.* 2018 Oct;64(10):1522–33.
247. Zhang H, Korenková V, Sjöback R, Švec D, Björkman J, Kruhøffer M, et al. Biomarkers for monitoring pre-analytical quality variation of mRNA in blood samples. Wang J, editor. *PLoS One.* 2014 Nov 4;9(11):e111644.
248. Sandlin RD, Wong KHK, Boneschansker L, Carey TR, Miller KL, Rose G, et al. Preservative solution that stabilizes erythrocyte morphology and leukocyte viability under ambient conditions. *Sci Rep.* 2017 Jul 18;7(1):5658.
249. Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem medica.* 2014;24(1):31–44.
250. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Nov;53(12):1935–42.
251. Wong KHK, Tessier SN, Miyamoto DT, Miller KL, Bookstaver LD, Carey TR, et al. Whole blood stabilization for the microfluidic isolation and molecular characterization of circulating tumor cells. *Nat Commun.* 2017 Nov 23;8(1):1733.
252. Benoy IH, Elst H, Van Dam P, Scharpé S, Van Marck E, Vermeulen PB, et al. Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med.* 2006 Jan 1;44(9):1082–7.
253. 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.
254. 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.
255. 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;23(10):2471–7.
 256. Luk AWS, Ma Y, Ding PN, Young FP, Chua W, Balakrishnar B, et al. CTC-mRNA (AR-V7) Analysis from Blood Samples-Impact of Blood Collection Tube and Storage Time. *Int J Mol Sci*. 2017 May 12;18(5):1047.
 257. Rodríguez-Lee M, Kolatkar A, McCormick M, Dago AD, Kendall J, Carlsson NA, et al. Effect of Blood Collection Tube Type and Time to Processing on the Enumeration and High-Content Characterization of Circulating Tumor Cells Using the High-Definition Single-Cell Assay. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Feb;142(2):198–207.
 258. Qin J, Alt JR, Hunsley BA, Williams TL, Fernando MR. Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent. *Cancer Cell Int*. 2014 Mar 7;14(1):23.
 259. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. 2014;14(1):57–62.
 260. 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;62(4):571–81.
 261. 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.
 262. 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.
 263. 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 20;8(50):87710–7.
 264. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAM^{high} and EpCAM^{low}/negative CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 31;18(9):1885.
 265. Kozminsky M, Wang Y, Nagrath S. The incorporation of microfluidics into circulating tumor cell isolation for clinical applications. *Curr Opin Chem Eng*. 2016 Feb;11:59–66.
 266. Murlidhar V, Rivera-Báez L, Nagrath S. Affinity Versus Label-Free Isolation of Circulating Tumor Cells: Who Wins? *Small*. 2016 Sep;12(33):4450–63.
 267. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012 May 16;12(1):178.
 268. Vila A, Abal M, Muínelo-Romay L, Rodríguez-Abreu C, Rivas J, López-López R, et al. EGFR-Based Immunoisolation as a Recovery Target for Low-EpCAM CTC Subpopulation. Lee JW, editor. *PLoS One*. 2016 Oct 6;11(10):e0163705.
 269. Molenkamp R, van der Ham A, Schinkel J, Beld M. Simultaneous detection of five

- different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. *J Virol Methods*. 2007 May;141(2):205–11.
270. Dehm SM, Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Oct;18(5):R183-96.
271. Ho Y, Dehm SM. Androgen Receptor Rearrangement and Splicing Variants in Resistance to Endocrine Therapies in Prostate Cancer. *Endocrinology*. 2017 Jun 1;158(6):1533–42.
272. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):16–22.
273. Hu R, Isaacs WB, Luo J. A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate*. 2011 Nov;71(15):1656–67.
274. Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2012 Jul 15;72(14):3457–62.
275. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, et al. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. Dent P, editor. *PLoS One*. 2011 Apr 28;6(4):e19059.
276. Sun S, Sprenger CCT, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*. 2010 Aug;120(8):2715–30.
277. Antonarakis ES, Luo J. Prostate cancer: AR splice variant dimerization-clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2015 Aug;12(8):431–3.
278. 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.
279. 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;8(13):21429–43.
280. Lokhandwala PM, Riel SL, Haley L, Lu C, Chen Y, Silberstein J, et al. Analytical Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 Detection in a Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Laboratory Setting. *J Mol Diagn*. 2017 Jan;19(1):115–25.
281. Sieuwerts AM, Mostert B, van der Vlucht-Daane M, Kraan J, Beaufort CM, Van M, et al. An In-Depth Evaluation of the Validity and Logistics Surrounding the Testing of AR-V7 mRNA Expression in Circulating Tumor Cells. *J Mol Diagn*. 2018 May;20(3):316–25.
282. Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, Schnoeller TJ, Lennerz JK, Wurm C, et al. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(0).
283. Del Re M, Biasco E, Crucitta S, Derosa L, Rofi E, Orlandini C, et al. The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *Eur Urol*. 2017 Apr 1;71(4):680–7.

284. Harden S V., Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative Gstp1 Methylation Clearly Distinguishes Benign Prostatic Tissue And Limited Prostate Adenocarcinoma. *J Urol.* 2003 Mar;169(3):1138–42.
285. Attard G, Richards J, de Bono JS. New Strategies in Metastatic Prostate Cancer: Targeting the Androgen Receptor Signaling Pathway. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):1649–57.
286. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. *FEBS Lett.* 2014 Aug;588(16):2671–84.
287. Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br J Cancer.* 2015 Jul;113(3):372–81.
288. 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;21(8):1612–7.
289. 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.
290. 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.
291. 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;100(2):399–404.