



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *NR2F1* ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ**

**ΓΕΩΡΓΙΤΣΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2019**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη μεθύλιωσης του γονιδίου *NR2F1* στον καρκίνο μαστού και ωοθηκών

ΓΕΩΡΓΙΤΣΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

A.M. : 71701

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :

ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας,
Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1.ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α

2. ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΡΟΥΠΗΣ , Επικ. Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ

3.ΑΜΑΝΤΑ ΨΥΡΡΗ, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογίας Ογκολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 11/07/2019

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καρκίνοι μαστού και ωθηκών είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος στις γυναίκες μετά την ηλικία των 40 ετών και αποτελούν τις πλέον θανατηφόρες γυναικολογικές κακοήθειες. Σε αρκετά μεγάλο ποσοστό, περίπου στο 30%, είναι οικογενείς, δηλαδή κληρονομικοί και συνδέονται με συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε κάποια γονίδια. Στο υπόλοιπο περίπου 70% έχουν τη σποραδική μορφή, δηλαδή εμφανίζονται χωρίς την ύπαρξη γενετικής μετάλλαξης, μπορεί να οφείλονται και σε επιγενετικές τροποποιήσεις και δεν αφορά πολλά μέλη της ίδιας οικογένειας. Μία από τις κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελεί η μεθυλίωση του DNA.

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, εμφανίζουν υπερμεθυλίωση στις CpG νησίδες των υποκινητών αρκετών γονιδίων και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την σίγασή τους. Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια, που λόγω υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή οδηγούνται στην αποσιώπηση μετά την μεταγραφή, ανήκουν στην οικογένεια των ογκοκατασταλτικών. Αυτά τα γονίδια δεν υπόκεινται στη διαδικασία της μετάφρασης και κατά συνέπεια δεν αποκτούν λειτουργικό ρόλο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της μεθυλίωσης της CpGνησίδας του υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* σε δύο τύπους καρκίνου, στον καρκίνο του μαστού και στον καρκίνο των ωθηκών. Το συγκεκριμένο γονίδιο, σύμφωνα με διεθνή βιβλιογραφία, συνδέεται με τη διαδικασία της υποτροπής και μετάστασης, αφού έχει συνδεθεί με τη διαδικασία του καρκινικού λήθαργου (cancer dormancy). Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα προερχόμενα από περιφερικό αίμα ασθενών με πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο μαστού, καθώς και δείγματα ιστού προερχόμενα από πρωτοπαθή όγκο ασθενών με καρκίνο ωθηκών. Για τον καρκίνο μαστού εξετάστηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από όπου απομονώθηκε το κυκλοφορούν καρκινικό DNA, (circulating tumor DNA, ctDNA) και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, (circulating tumor cells, CTCs), τόσο από ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο όσο και από ασθενείς με μετάσταση. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 25 δείγματα ctDNA και 97 δείγματα CTCs.

Για τον καρκίνο των ωθηκών χρησιμοποιήθηκαν 61 δείγματα καρκινικού ιστού εγκυβωτισμένου σε παραφίνη, (Formalin Fixed Paraffin Embedded FFPEs) από

πρωτοπαθείς όγκους, από τον οποίο απομονώθηκε το γενωμικό DNA που στη συνέχεια τροποποιήθηκε χημικά με όξινο θειώδες νάτριο. Ακολούθησε η ανίχνευση της μεθυλίωσης με Methylation Specific PCR (MSP) σε πραγματικό χρόνο (real-time MSP). Η βασική αρχή της μεθόδου συνίσταται στην εκλεκτική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας, που επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση των κατάλληλων ζευγών εκκινητών.

Στον καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου, στους πρωτοπαθείς όγκους σε ποσοστό περίπου 10% και στους μεταστατικούς σε ποσοστό 15%. Το αντίστοιχο ποσοστό στον καρκίνο ωοθηκών ήταν 8.2%. Με βάση τα αποτελέσματά μας δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση στατιστικά μεταξύ της μεθυλίωσης και των διαθέσιμων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, όμως ο συνολικός αριθμός των περιστατικών είναι πολύ μικρός. Βρέθηκε όμως σημαντική συσχέτιση με το διάστημα χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression Free Survival, PFS) για τον καρκίνο των ωοθηκών.

Στο παρελθόν έχει γίνει ξανά μελέτη για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* για τον καρκίνο του μαστού, ωστόσο, όμως, τα ποσοστά δεν ήταν ικανά να εξάγουν κάποιο συμπέρασμα για το γονίδιο. Πρώτη φορά γίνεται διερεύνηση στον καρκίνο ωοθηκών. Είναι απαραίτητο, όμως, να διερευνηθεί περαιτέρω η μεθυλίωση του συγκεκριμένου γονιδίου σε μεγαλύτερο αριθμό παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων. Επίσης, αναμένεται να προσδιορισθεί η προγνωστική και η προβλεπτική σημασία της μεθυλίωσης, με τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με περισσότερα κλινικά χαρακτηριστικά.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μεθυλίωση του DNA

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, κυκλοφορούν καρκινικό DNA, μεθυλίωση DNA, MSP σε πραγματικό χρόνο, *NR2F1*, επιγενετική, μετάσταση, αδράνεια, καρκίνος μαστού, καρκίνος ωοθηκών

ABSTRACT

Breast cancer and ovarian cancer are the most frequent forms of cancer in women after the age of 40 years old and constitute the most lethal gynecological malignancies. In a high percentage, almost 30%, both types are hereditary diseases and connected with specific mutations in some genes, but the rest of the percentage, almost 70%, it has the sporadic form, which means that there is not a germline mutation but is due to epigenetics changes and it is not associated with family members. One of the most important epigenetic changes is the methylation of DNA.

It has been proved, experimentally, that cancer cells, in contrast with the normal ones, are characterized by hypermethylation on the CpG islands of the promoter region of several genes leading to their transcriptional silencing. That means that they can not be translated to proteins and will not be functional. It has been found that the majority of these genes normally act like tumor suppressor genes.

The purpose of this study is to investigate the methylation on the CpG island of the promoter region of *NR2F1* gene and was examined in breast and ovarian cancer. This specific gene, according to the international bibliography, relates to the process of relapse and metastasis, because it has been associated with cancer dormancy. In this study, methylation was examined in tumor samples from patients' peripheral blood with primary and metastatic breast cancer and also in tissue samples from patients with primary ovarian cancer. In the breast cancer case, samples from patients' peripheral blood were used for the extraction of ctDNA and CTCs. In particular, 25 samples of ctDNA and 97 samples of CTCs were examined in both primary and metastatic tumors.

In the ovarian cancer case, 61 FFPEs samples from primary tumors were examined. These FFPEs samples were used for the extraction of genomic DNA, followed by sodium bisulfite conversion. Then, real time methylation specific PCR (MSP) was performed for the detection of methylation. The guiding principle of this method consists of the selective amplification of the methylated sequence, which is achieved by using the appropriate pairs of primers.

In breast cancer, methylation of the promoter of *NR2F1* was observed in 10% of the samples in primary tumors and the percentage of methylation in metastatic tumors

was 15%. While the percentage of promoter's methylation in *NR2F1* for ovarian cancer was 8.2%. According to our results, no statistically significant correlation was found between methylation of gene and the available clinicopathological characteristics of patients, but the total number of samples was limited. However, there was an important correlation with Progression Free Survival in the case of ovarian cancer.

In the last decade, a study for the detection of methylation of the promoter of *NR2F1* gene, in breast cancer case, was conducted from our research group, but the results were not capable to extract some conclusions about the gene. In this study, methylation of *NR2F1* gene promoter was detected for the first time in ovarian cancer. However, it is necessary to further investigate the methylation status of this gene. The prognostic and predictive significance of the methylation of this gene can also be determined, with the association of the results to more clinicopathological characteristics.

SUBJECT AREA: DNA methylation

KEY WORDS: CTCs, ctDNA, FFPEs, DNA methylation, real-time MSP, *NR2F1*, epigenetics, metastasis, dormancy, ovarian cancer, breast cancer

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	25
ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	25
1.1 Ο καρκίνος.....	27
1.2 Παράγοντες κινδύνου	31
1.3 Συμπτώματα	33
1.4 Οι διάφοροι τύποι καρκίνου	35
1.5 Πώς αναπτύσσεται ο καρκίνος.....	36
1.6 Μετάσταση και καρκίνος	39
1.7 Πρόγνωση και θεραπεία της νόσου.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	47
ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....	47
2.1 Οι μοριακοί στόχοι της Υγρής Βιοψίας στον όγκο	52
2.1.1 Circulating Tumor Cells, CTCs.....	52
2.1.1α. Αναλυτικά συστήματα για απομόνωση, καταμέτρηση και ανίχνευση των CTCs ..	53
2.1.1β. Κλινικές μελέτες για τα CTCs.....	56
2.1.2 Circulating Tumor DNA, ctDNA	60
2.1.2α. Κλινικές μελέτες του ctDNA.....	62
2.2 Υγρή βιοψία και επιγενετικές τροποποιήσεις	65
2.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	69
ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	69
3.1 Εισαγωγή.....	69
3.1 Μεθυλίωση του DNA.....	70
3.1.1 Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην γονιδιακή ρύθμιση	71
3.2 ΤΕΤένζυμα και η απομεθυλίωση του DNA	74
3.3 Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	83
ΛΗΘΑΡΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>NR2F1</i>	83
4.1 Εκδηλώσεις του καρκινικού λήθαργου	87
4.2 Καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου-Μοντέλα καρκινικού λήθαργου	90
4.2.1 Κυτταρικός λήθαργος.....	91
4.2.2 Αγγειογενετικός λήθαργος	95
4.2.3 Ανοσολογικός λήθαργος	96

4.3 Το γονίδιο <i>NR2F1</i>	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	103
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	105
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	105
6.1.2 Κλινικά δείγματα και κυτταρικές σειρές στον καρκίνο των ωθηκών	106
6.2 Απομόνωση γενωμικούDNA από ορό ή πλάσμα	106
6.2.1 Αρχή μεθόδου.....	106
6.2.2 Αντιδραστήρια και υλικά	107
6.2.3 Πειραματική πορεία	107
6.3 Απομόνωση γενωμικούDNA από FFPEs.....	109
6.3.1 Αρχή μεθόδου.....	109
6.3.2 Αντιδραστήρια και υλικά	109
6.3.3 Πειραματική πορεία	110
6.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός DNA	112
6.4.1 Πειραματική πορεία	113
6.5 Χημική τροποποίηση του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (sodium bisulfite DNA conversion)	114
6.5.1 Αρχή μεθόδου.....	114
6.5.2 Αντιδραστήρια και υλικά	116
6.5.3 Πειραματική πορεία	116
6.6 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων με real-timePCR	118
6.7 Real-Time Methylation Specific PCR (MSP)	121
6.7.1 Οργανολογία της MSP για το γονίδιο <i>NR2F1</i>	122
6.7.2 Συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο <i>NR2F1</i>	124
6.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	127
ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ <i>NR2F1</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	127
7.1 Πειραματική πορεία	127
7.2 Μελέτη μεθυλίωσης για το γονίδιο <i>NR2F1</i>	129
7.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	135
ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ <i>NR2F1</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	135
8.1 Πειραματική πορεία	135
8.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	138
8.4 Αποτελέσματα των real-timeMSP στα φυσιολογικά δείγματα	142

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	143
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	143
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	145

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου [American Association for Cancer Research (AACR), Cancer Progress Report 2012].....	31
Σχήμα 1.2 Η διαδικασία της μετάστασης.	39
Σχήμα 1.3 Φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά	41
Σχήμα 1.4 Στάδια ελέγχου θεραπείας για τη νόσο του καρκίνου	45
Σχήμα 2.1 Απεικόνιση υγρής βιοψίας.....	48
Σχήμα 2.2 Οι αναλύσεις που περιλαμβάνει η υγρή βιοψία και οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται.....	51
Σχήμα 2.3 Τεχνολογίες για τον εμπλουτισμό, την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs και του ctDNA.....	60
Σχήμα 2.4: Θεραπευτικοί στόχοι και μηχανισμοί αντίστασης	63
Σχήμα 2.5 Μεθοδολογίες ανίχνευσης του ctDNA	65
Σχήμα 3.1 Τα ένζυμα DNMT προσθέτουν μια μεθυλομάδα στον άνθρακα-5 συμμετρικά συγγενών βάσεων κυτοσίνης σε ένα CpG	73
Σχήμα 3.2 Τα ένζυμα TET διοξυγενάσης οξειδώνουν την μεθυλομάδα της 5-μεθυλοκυτοσίνης για να παράγουν 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη, 5-φορμυλοκυτοσίνη και 5-καρβοξυλοκυτοσίνη	76
Σχήμα 3.3 Μεθυλίωση του DNA, κατάσταση αποσιώπησης και αποκατάσταση	77
Σχήμα 4.1 Ο καρκινικός λήθαργος ως στοιχείο της εξέλιξης της νόσου.....	85
Σχήμα 4.2 Εκδήλωση της ληθαργικής κατάστασης του όγκου	88
Σχήμα 4.3 Βιολογικοί μηχανισμοί της ληθαργικής κατάστασης του καρκίνου	91
Σχήμα 4.4 Τα μοριακά μονοπάτια της κυτταρικής ληθαργικής κατάστασης	94
Σχήμα 4.5 Τα DTCs σε ληθαργική κατάσταση, διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος και επάγουν τη διαδικασία της μετάστασης.....	97
Σχήμα 4.6 Πιθανά θεραπευτικά σενάρια για ασθενείς με μακροχρόνια MRD	101
Σχήμα 6.1 Χαρακτηριστικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA	113

Σχήμα 6.2 Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στη διαδικασία του DNA conversion.....	115
Σχήμα 6.4 χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο	118
Σχήμα 7.1 Πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1 σε κλινικά δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή όγκο	127
Σχήμα 7.2 Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1σεκλινικά δείγματα από ασθενείς με μεταστατικό όγκο.....	128
Σχήμα 7.3 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1 στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού.....	129
Σχήμα 7.4 Καμπύλη διερεύνησης μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1στα πρώτα 9 δείγματα από το πλάσμα φυσιολογικών ατόμων.....	130
Σχήμα 7.5 Καμπύλη διερεύνησης της μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1 σε κλινικά δείγματα από μεταστατικό καρκίνο του μαστού	131
Σχήμα 7.6 Καμπύλη διερεύνησης της μεθυλίωσης για το γονίδιο NR2F1σε δείγματα από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού	131
Σχήμα 7.7 Εκτίμηση του διαστήματος επιβίωσης χωρίς δραστηριότητα της νόσου (DFI) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου NR2F1, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων.....	132
Σχήμα 7.8 Εκτίμηση του διαστήματος ολικής επιβίωσης (OS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου NR2F1, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων	133
Σχήμα8.1 Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1σεκλινικά δείγματα από ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο ωοθηκών	135
Σχήμα 8.2 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών και σε κλινικά δείγματα φυσιολογικών(* τα ενισχυόμενα δείγματα αντικατοπτρίζουν τις καμπύλες των θετικών μαρτύρων).....	136
Σχήμα 8.3 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1σε κλινικά δείγματα από καρκινικό ιστό.....	137
Σχήμα 8.4 Διερεύνηση μεθυλίωσης του γονιδίου NR2F1 σε κλινικά δείγματα καρκινικού ιστού.....	137

Σχήμα 8.5 Εκτίμηση του διαστήματος επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου NR2F1, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (N=61)**139**

Σχήμα 8.6 Εκτίμηση του διαστήματος ολικής επιβίωσης (OS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου NR2F1, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (N=61).....**140**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Διαιρούμενο καρκινικό κύτταρο από καρκίνο μαστού	36
Εικόνα 6.1 Φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000	112
Εικόνα 6.2 Θέση της κεφαλής και του βραχίονα του οργάνου.....	114
Εικόνα 6.3 Ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler® epgradient.....	117
Εικόνα 6.4 Θάλαμος προετοιμασίας της αντίδρασης PCR.....	121
Εικόνα 6.5 Όργανο Lightcycler® 2.0 (Roche)	123
Εικόνα 6.6 Αναπαράσταση της οργανολογίας του Lightcycler.....	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Εκτίμηση περιπτώσεων και θανάτων των πιο κοινών τύπων καρκίνου	29
Πίνακας 1.2 Οι πιο κοινές μεταστάσεις από διάφορους τύπους καρκίνου.....	40
Πίνακας 6.1 Οι αλληλουχίες των εκκινητών και ο ανιχνευτής για το γονίδιο ACTB.....	120
Πίνακας 6.2 Τα συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο ACTB	120
Πίνακας 6.3 Οι εκκινητές για τη real-time MSP για το γονίδιο <i>NR2F1</i>	122
Πίνακας 6.4 Τα συστατικά της αντίδρασης MSP για το γονίδιο <i>NR2F1</i>	125
Πίνακας 8.1 Σύσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>NR2F1</i> των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε. Λιανίδου.

Θα ήθελα να ξεκινήσω ευχαριστώντας όλους όσους με βοήθησαν στην διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την διευθύντρια του εργαστηρίου και την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών της κλινικής χημείας Καθηγήτρια κ. Ε. Λιανίδου τόσο για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος όσο για τη βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη της στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου ένα τόσο σοβαρό θέμα καθώς επίσης και για το συνεχές ενδιαφέρον, την καθοδήγηση και την στήριξή της μέχρι το τέλος της διπλωματικής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Sabine Kasimir Bauer, από το Πανεπιστήμιο του Essen, για τη διάθεση κλινικών δειγμάτων, καθώς και σημαντικού μέρους των απαραίτητων αντιδραστηρίων.

Εν συνεχεία ευχαριστώ την διδάκτορα Σοφία Μαστοράκη για τις συμβουλές της στην αρχή της διπλωματικής και την διδάκτορα Μαρία Χειμωνίδου για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μεθυλίωσης για το συγκεκριμένο γονίδιο. Ακόμα, ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Λυδία Γιαννοπούλου για όλη την καθοδήγηση, τις συμβουλές της, το ενδιαφέρον που επέδειξε σε μένα και την εκπαίδευσή μου στις αναλυτικές τεχνικές του εργαστηρίου. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα κορίτσια του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας τόσο στο εργαστήριο όσο και στο γραφείο. Με τη σειρά, λοιπόν, τις διδάκτορες Αθηνά Μάρκου, Αρετή Στρατή, Μάρθα Ζαβρίδου, καθώς και τις δακτορικούς Αλίκη Ντζίφα, Δήμητρα Στεργιοπούλου, Δώρα Λόντρα και Έλενα Τζανίκου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ πάρα πολύ τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Χρυσάνθη Παντελή, ΑϊλνταΓκιοντούμι και Σταυρούλα Σμίλκου για το ειλικρινές και ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, για τη στήριξη και την συμπαράσταση που υπήρχε μεταξύ μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους τους δικούς μου ανθρώπους για την ηθική συμπαράσταση, την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν. Τους ευχαριστώ γιατί είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε οποιαδήποτε επιλογή μου και μου δίνουν δύναμη και ενθάρρυνση για να συνεχίσω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος είναι η υπέρμετρη ανάπτυξη των μη φυσιολογικών κυττάρων σε οποιοδήποτε σημείο του ανθρώπινου σώματος. Αριθμούνται μέχρι στιγμής 200 τύποι καρκίνου. Οτιδήποτε μπορεί να προκαλέσει σε ένα φυσιολογικό κύτταρο τη μη φυσιολογική ανάπτυξη, δυνητικά μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη όγκου. Γενικά κατηγορίες που σχετίζονται με καρκίνο ή παράγοντες που προκαλούν τη νόσο είναι οι εξής : έκθεση σε χημικές ή τοξικές ουσίες, όπως είναι για παράδειγμα ο καπνός του τσιγάρου ή η ακτινοβολία, κάποιες από τις παθολογικές ή η γενετική ταυτότητα.

Ο καρκίνος, ως επί το πλείστον, είναι μία ασυμπτωματική νόσος, παρόλα αυτά, τα συμπτώματα ή τα σημάδια της νόσου, εξαρτώνται από τον τύπο καρκίνου και από το στάδιο ανάπτυξης του όγκου. Όμως υπάρχουν συμπτώματα που εμφανίζονται γενικά σε ασθενείς με καρκίνο και δεν έχουν ειδικότητα σε συγκεκριμένο τύπο, κάποια από αυτά τα συμπτώματα είναι η κόπωση, απώλεια βάρους, αλλαγή στην λειτουργία του εντέρου και της ουροδόχου κύστεως, μη συνήθης αιμορραγία, επίμονος βήχας ή αλλαγή φωνής, πυρετός, εξογκώματα ή διόγκωση των ιστών. Βέβαια, υπάρχουν πολλά τεστ απεικόνισης και πιθανής διάγνωσης του καρκίνου, με εξέχουσα θέση μεταξύ των εξετάσεων την **βιοψία** -ιστική ή υγρή- δειγμάτων ιστών ή αίματος από ασθενείς με υποψία ύπαρξης της νόσου.

Το στάδιο του καρκίνου συχνά καθορίζεται από τα αποτελέσματα της βιοψίας και βοηθάει στον καθορισμό του τύπου του καρκίνου καθώς επίσης και στην διασπορά της νόσου. Η σταδιοποίηση του όγκου, καθορίζει επίσης και το πρωτόκολλο θεραπείας που θα ακολουθηθεί. Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι όσο πιο μεγάλο είναι το στάδιο της νόσου (αριθμείται από το 0 έως το 4) τόσο πιο επιθετικός είναι ο τύπος του καρκίνου και τόσο πιο μεγάλη η διασπορά της νόσου στο ανθρώπινο σώμα. Οι μέθοδοι σταδιοποίησης διαφέρουν από τύπο σε τύπο και χρειάζεται εκτενής συζήτηση με τον θεράποντα.

Όπως αναφέρθηκε, τα πρωτόκολλα θεραπείας που ακολουθούνται ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο της νόσου. Ωστόσο, οι περισσότερες θεραπείες

περιλαμβάνουν ένα από τα ακόλουθα ή ακόμα και συνδυασμό των εξής : χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία και θεραπεία με ακτινοβολία.

Η πρόγνωση της νόσου μπορεί να είναι πολύ καλή έως πολύ κακή και εξαρτάται από τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου. Στους πολύ επιθετικούς τύπους καρκίνου και σε αυτούς που βρίσκονται σε πολύ υψηλό στάδιο (3 ή 4) η πρόγνωση της νόσου τείνει στο να είναι πολύ κακή.

1.1 Ο καρκίνος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο καρκίνος προκύπτει από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων και μπορεί να εμφανιστεί οπουδήποτε στο ανθρώπινο σώμα. Τα καρκινικά κύτταρα ή κακοήθη κύτταρα ή κύτταρα όγκου, έχουν την ικανότητα διείσδυσης σε οποιοδήποτε φυσιολογικό ιστό του ανθρώπινου σώματος. Πολλοί τύποι καρκίνου και τα κύτταρά τους που συνθέτουν τον καρκινικό ιστό έχουν ταυτοποιηθεί από το όνομα του ιστού που προέρχονται τα μη φυσιολογικά κύτταρα, για παράδειγμα καρκίνος μαστού, καρκίνος πνεύμονα ή κολοορθικός καρκίνος.

Ο καρκίνος δεν περιορίζεται στον άνθρωπο, αλλά εμφανίζεται στα ζώα και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Επίσης φαίνεται τι προκύπτει όταν ένα κύτταρο που έχει υποστεί ζημιά ή δεν έχει επιδιορθωθεί, δεν πεθαίνει και μετατρέπεται σε καρκινικό όπου αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Σε αυτή την περίπτωση δημιουργείται μία μάζα όγκου με μεγάλη ετερογένεια κυττάρων στο εσωτερικό της. Με μεγάλη συχνότητα, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και να ταξιδέψουν μέσω του αίματος ή της λέμφου και να μετοικίσουν σε άλλα όργανα είτε κοντά είτε απομακρυσμένα από το πρωτοπαθές όργανο, όπου και συνεχίζουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεταστατικού όγκου. Αυτή, λοιπόν, η διαδικασία όπου τα καρκινικά κύτταρα εγκαταλείπουν την μία περιοχή και αναπτύσσονται σε μία άλλη περιοχή του ανθρώπινου σώματος καλείται **μεταστατική διασπορά ή μετάσταση**. Για παράδειγμα, εάν τα κύτταρα από τον καρκίνο του μαστού μεθίστανται στο μυελό των οστών, αυτό μεταφράζεται στο άτομο ότι έχει εμφανίσει μεταστατικό καρκίνο μαστού στο μυελό των οστών. Δεν είναι το ίδιο με τον πρωτοπαθή όγκο μυελού των οστών, γιατί σε αυτή την περίπτωση ο καρκίνος έχει ξεκινήσει από εκεί και δεν έχει λάβει χώρα κάποια μεταστατική διαδικασία.


Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου στους άντρες, τις γυναίκες και τα παιδιά στην Αμερική, σύμφωνα με έρευνα του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (National Cancer Institute, NIC), είναι οι εξής:

Άντρες: καρκίνος προστάτη, πνεύμονα και ορθού

Γυναίκες: καρκίνος μαστού, πνεύμονα και ορθού

Παιδιά: λευχαιμία, λέμφωμα και καρκίνος εγκεφάλου.

Πίνακας 1.1 Εκτίμηση περιπτώσεων και θανάτων των πιο κοινών τύπων καρκίνου [National Cancer Institute 2016]

Cancer Type	Estimated New Cases	Estimated Deaths
Bladder	76,960	16,390
Breast (Female – Male)	246,660 – 2,600	40,450 – 440
Colorectal Cancer	134,490	49,190
Endometrial	60,050	10,470
Kidney (Renal Cell and Renal Pelvis) Cancer	62,700	14,240
Leukemia (All Types)	60,140	24,400
Lung (Including Bronchus)	224,390	158,080
Melanoma	76,380	10,130
Non-Hodgkin Lymphoma 	72,580	20,150
Pancreatic	53,070	41,780
Prostate	180,890	26,120
Thyroid	64,300	1,980

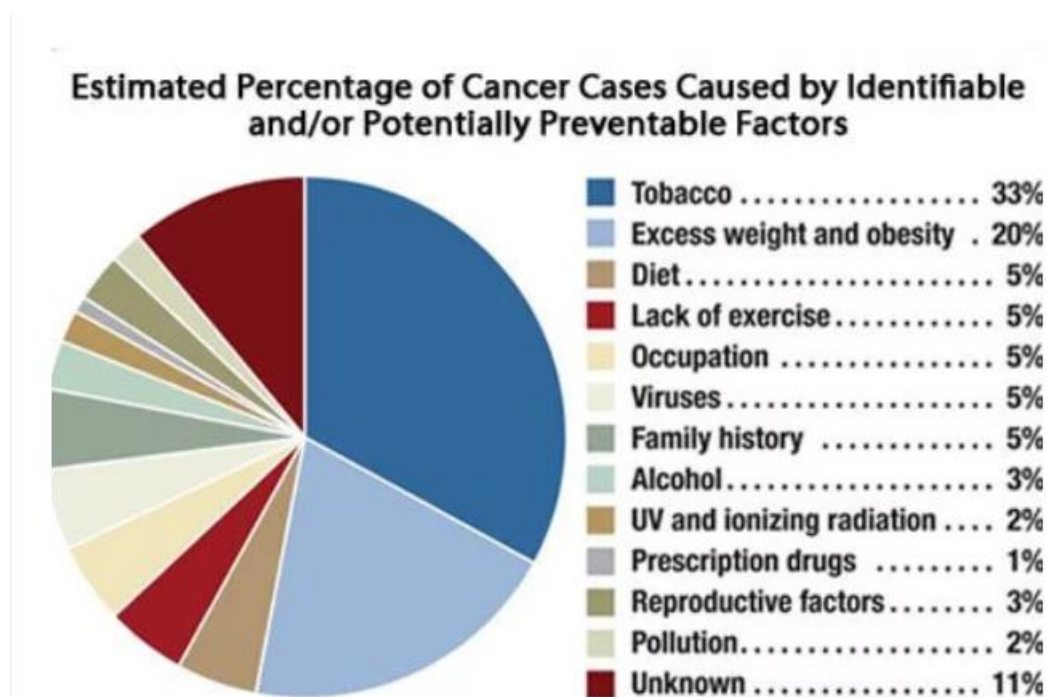
Οι διάφοροι τύποι καρκίνου επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ηλικία, το φύλο, η φυλή, οι τοπικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, η διατροφή και η γενετική. Συνεπώς τόσο ο καρκίνος όσο και οι διάφοροι τύποι εξαρτώνται από ποικίλους παράγοντες. Για παράδειγμα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) παρέχει τις εξής πληροφορίες για τον καρκίνο παγκοσμίως:

- Ο καρκίνος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ευθύνεται για 8,2 εκατομμύρια θανάτους (περίπου 22% όλων των θανάτων που δεν σχετίζονται με μεταδοτικές ασθένειες, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας)
- Ο καρκίνος του πνεύμονα, του στομάχου, του ήπατος, του ορθού και του μαστού προκαλούν τους περισσότερους θανάτους κάθε χρόνο
- Το ποσοστό θανάτου από τον καρκίνο συνεχίζει να αυξάνεται κάθε χρόνο, σύμφωνα με τον παγκόσμιο χάρτη από το WHO, με μία εκτίμηση ότι το 2030, ο αριθμός των θανάτων θα έχει ανέλθει στα 13.1 εκατομμύρια (περίπου 70% αύξηση).

Σε κάποιες περιοχές ίσως επικρατούν κάποιοι τύποι καρκίνου περισσότερο από κάποιες άλλες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο καρκίνος στομάχου που εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στην Ιαπωνία από ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αυτό συνήθως αποτυπώνει ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων.

1.2 Παράγοντες κινδύνου

Οτιδήποτε μπορεί να προκαλέσει μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, δυνητικά μπορεί να προκαλέσει και καρκίνο. Πολλοί από τους παράγοντες που προκαλούν κυτταρικές ανωμαλίες έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου. Μερικές από τις αιτίες της νόσου παραμένουν άγνωστες, τη στιγμή που στους περισσότερους τύπους καρκίνου, το περιβάλλον και ο τρόπος ζωής αποτελούν εναύσματα ανάπτυξης της νόσου, όπως είναι για παράδειγμα το κάπνισμα. Μερικοί τύποι καρκίνου αναπτυξιακά επηρεάζονται από το γενετικό ιστορικό του κάθε ατόμου. Πολλοί από τους ασθενείς, λοιπόν, αναπτύσσουν καρκίνο εξαιτίας ενός συνδυασμού αυτών των παραγόντων. Αν και είναι συχνά δύσκολο έως αδύνατο να καθορίσουμε τα γεγονότα που αποτελούν εναρκτήριες αίτιες ανάπτυξης της νόσου, η έρευνα έχει παράσχει στους κλινικούς ένα μεγάλο αριθμό αιτιών που δρουν κατά μόνας ή συνδυαστικά με άλλες αιτίες, που αποτελούν υποψήφιους παράγοντες ανάπτυξης της νόσου.



Σχήμα 1.1 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου [American Association for Cancer Research (AACR), Cancer Progress Report 2012]

Παρακάτω ακολουθεί μία λίστα με τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου, όπως αυτές έχουν διαπιστωθεί μέσα από μελέτες ερευνών :

- **Έκθεση σε χημικές ή τοξικές ενώσεις:** ενώσεις κυκλικών υδρογονανθράκων όπως είναι το βενζόλιο, νικέλιο, κάδμιο, βινυλοχλωρίδιο, νιτροζαμίνες, ο καπνός του τσιγάρου που περιλαμβάνει τουλάχιστον 66 γνωστές ενώσεις που δυνητικά προκαλούν καρκινογένεση και φυσικά είναι τοξικές για τον οργανισμό.
- **Ακτινοβολία:** ουράνιο, ράδιο, υπεριώδης (Ultraviolet, UV) ακτινοβολία από τις ακτίνες του ήλιου, ακτινοβολία α, β, γ ή X
- **Παθογόνοι παράγοντες:** ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV), ιός Epstein-Barr virus, EBV ένα είδος ερπετοϊού, ιοί της ηπατίτιδας Β και C, Καρσί'σάρκωμα-σχετικό με τον ιό του έρπητα
- **Γενετικοί παράγοντες:** ένας αριθμός συγκεκριμένων τύπων καρκίνου συνδέεται με τα ανθρώπινα γονίδια και είναι οι εξής: καρκίνος μαστού, ωοθηκών, κολορρθικός, προστάτη, δέρματος και μελάνωμα

*αξίζει να αναφερθεί ότι δεν αναφέρονται όλοι οι παράγοντες που προκαλούν τη νόσο, αλλά μόνο μερικοί.

Είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι όλοι μας κατά τη διάρκεια της ζωής μας εκτιθέμεθα σε πολλούς παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης της νόσου, όπως είναι για παράδειγμα η ηλιακή ακτινοβολία ή το παθητικό κάπνισμα ή οι ακτίνες X, αλλά μόνο μερικοί νοσούν και όχι όλοι. Επιπλέον, υπάρχουν πολλοί άνθρωποι που ενώ έχουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο δεν αναπτύσσουν τη νόσο. Γιατί; Αν και οι ερευνητές μπορεί να αδυνατούν να δώσουν μία ικανοποιητική απάντηση για τον κάθε ένα ξεχωριστά, είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερη έκθεση έχει ένας άνθρωπος στους παράγοντες που προκαλούν τη νόσο, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να την αναπτύξει. Ακόμα, άνθρωποι που σχετίζονται γενετικά με τη νόσο μπορεί να μην την αναπτύξουν για ποικίλους λόγους, για παράδειγμα έλλειψη του ερεθίσματος που καθιστά λειτουργικά αυτά τα γονίδια που συνδέονται με τον καρκίνο. Ένας άλλος λόγος είναι ότι μερικοί άνθρωποι μπορεί να έχουν υψηλή απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος το οποίο είτε ελέγχει είτε εξαλείφει τα κύτταρα που είναι ή δύνανται να γίνουν καρκινικά. Υπάρχει απόδειξη

ότι μία σωστή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο συνδυαστικά με το ανοσοποιητικό σύστημα για να επιτρέψει ή να αποτρέψει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Πρόσφατα έχουν προστεθεί και άλλοι παράγοντες κινδύνου που προκαλούν αύξηση πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου. Ειδικότερα το κόκκινο κρέας, έχει κατηγοριοποιηθεί από το διεθνή οργανισμό για την έρευνα στον καρκίνο, σαν παράγοντας υψηλού κινδύνου που δυνητικά μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Κάποιες άλλες καθορισμένες καταστάσεις που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι η χρόνια φλεγμονή, λήψη ορμονών, ιδιαίτερα αυτές που χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν κάποια θεραπεία, παχυσαρκία και έλλειψη άσκησης. Ακόμα, στη λίστα των πιθανών καρκινογενετικών παραγόντων κατέχει εξέχουσα θέση το κινητό τηλέφωνο. Έχει διαπιστωθεί, κατόπιν ερευνών, ότι η χαμηλής ενέργειας ακτινοβολία που εκπέμπει ένα κινητό τηλέφωνο, μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

Η επίσημη θέση του NCI είναι ότι θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθούν και άλλοι παράγοντες που πιθανά έχουν σχέση με τη νόσο. Αυτό το μη ικανοποιητικό συμπέρασμα προέκυψε λόγω του ότι τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι στιγμής για τη πρόκληση της νόσου είναι αντιφατικά. Όπως και να είναι, μία άκρως λογική συμβουλή που προκύπτει είναι να αποφεύγεται η έκθεση του οργανισμού σε όλους αυτούς τους παράγοντες κινδύνου.

1.3 Συμπτώματα

Τα συμπτώματα και τα σημάδια της νόσου εξαρτώνται από συγκεκριμένους παράγοντες όπως είναι ο τύπος του καρκίνου, πού έχει αναπτυχθεί και πού έχει υπάρξει πιθανή μετάσταση. Για παράδειγμα, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να παρουσιάσει ένα εξόγκωμα στο μαστό ή μία εμφανή αλλοίωση στη θηλή, ενώ ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού έχει συμπτώματα πόνου, εάν η μετάσταση είναι στο μυελό των οστών, υπερβολικής κόπωσης (μετάσταση στον πνεύμονα), κρίσεις (μετάσταση στον εγκέφαλο). Σε μερικούς ασθενείς δεν εμφανίζονται καθόλου σημάδια ή συμπτώματα της νόσου, μέχρι αυτή να εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό.

Η Αμερικανική Κοινότητα για τον Καρκίνο (American Cancer Society) περιγράφει επτά προειδοποιητικά συμπτώματα για την ύπαρξη της νόσου. Αν κάποιο άτομο έχει κάποιο από τα ακόλουθα συμπτώματα πρέπει άμεσα να υποβληθεί σε ιατρική παρακολούθηση.

- Αλλαγές στη λειτουργία του εντέρου ή της ουροδόχου κύστεως
- Ερέθισμα στο λαιμό που δεν επουλώνεται
- Ασυνήθιστη αιμορραγία ή αλλοίωση (για παράδειγμα έκκριμα από τη θηλή)
- Εξόγκωμα στο μαστό, στους όρχεις ή οπουδήποτε αλλού
- Εμφανής αλλαγή στο μέγεθος, χρώμα, σχήμα ή πάχος ενός θηλώματος στο δέρμα ή ενός εξογκώματος
- Χρόνια στομαχική διαταραχή ή δυσκολία κατάποσης
- Επίμονος βήχας ή τραχύτητα λαιμού

Υπάρχουν και άλλα συμπτώματα βέβαια που μπορεί να προειδοποιούν για πιθανότητα ύπαρξης κάποιας μορφής καρκίνου και είναι τα εξής:

- Ανεξήγητη απώλεια βάρους ή απώλεια όρεξης
- Πόνος στα οστά ή σε οποιοδήποτε άλλο μέρος του σώματος που σταθερά χειροτερεύει ή χάνεται και επανέρχεται και δεν μοιάζει με πόνους που μπορεί να είχε το άτομο στο παρελθόν
- Επίμονη κόπωση, ναυτία και εμετός
- Ανεξήγητη υποθερμία που μπορεί να επιμένει ή να εμφανίζεται σταδιακά
- Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις που δεν αντιμετωπίζονται με τη συνήθη θεραπεία

Οποιοσδήποτε με αυτά τα συμπτώματα θα πρέπει να συμβουλευτεί το γιατρό του. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει πως είναι συμπτώματα μιας καρκινικής κατάστασης, αλλά μπορεί να εμφανιστούν και χωρίς την ύπαρξη όγκου.

Πολλοί τύποι καρκίνου μπορούν να αναπτύξουν κάποια από τα παραπάνω συμπτώματα αυτά επίσης εξαρτώνται και από τον τύπο καρκίνου που εξετάζουμε κάθε φορά. Για παράδειγμα στον καρκίνο του πνεύμονα, μικροκυτταρικό ή μη, το πιο κοινό σύμπτωμα είναι ο πόνος και συνήθως τοποθετείται στην περιοχή του στήθους.

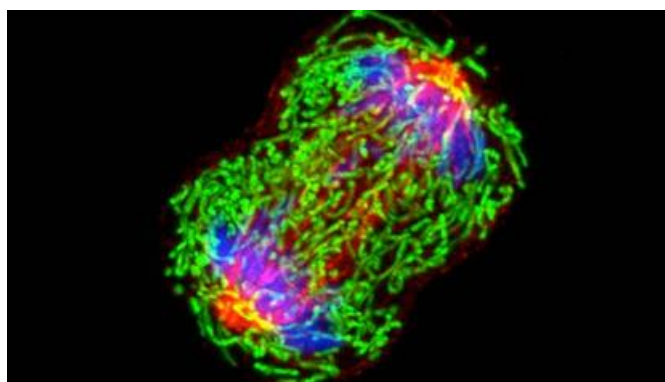
Ο ασθενής μπορεί να έχει ασυνήθιστη αιμορραγία αλλά αυτό είναι αποτέλεσμα ενός έντονου βήχα και συνήθως έχουν δύσπνοια και έντονη κόπωση.

1.4 Οι διάφοροι τύποι καρκίνου

Υπάρχουν πάνω από 200 τύποι καρκίνου συνολικά. Ωστόσο το National Cancer Institute έχει δημιουργήσει λίστα με κάποιες γενικές κατηγορίες. Παρακάτω θα αναφερθούν κάποιες από τις κατηγορίες όμως αξίζει να σημειωθεί ότι δεν περιλαμβάνονται όλες.

- **Καρκίνωμα** : καρκίνος που ξεκινάει από το δέρμα ή τον ιστό που συνδέεται ή καλύπτει τα έσω όργανα, όπως είναι οι πνεύμονες, το πάγκρεας, το παχύ έντερο, οι ωθήκες κοκ. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ο επιθηλιακός καρκίνος, το μελάνωμα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, θήλωμα και αδένωμα [1].
- **Σάρκωμα** : καρκίνος που ξεκινάει από τα οστά, τους χόνδρους, τους μύες, το λίπος, τα αγγεία του αίματος και γενικά κάθε συνδετικό ή υποστηρικτικό ιστό. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το οστεοσάρκωμα, λιποσάρκωμα, αγγειοσάρκωμα, ινώδες σάρκωμα κοκ [1].
- **Λευχαιμία** : καρκίνος που ξεκινά από είδη ιστών του αίματος όπως είναι ο μυελός των οστών και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού μη φυσιολογικών κυττάρων που εισέρχονται στην κυκλοφορία. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ηξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (acutelymphocytic leukemia, ALL), χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chroniclymphocytic leukemia, CLL), μυελογενής λευχαιμία, οξεία και χρόνια, λευχαιμία T κυττάρων και λευχαιμία τριχοειδών κυττάρων [1].
- **Λέμφωμα και μυέλωμα** : καρκίνος που ξεκινά από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το λέμφωμα T και B κυττάρων ανοσοποιητικού, λέμφωμα ή νόσος Hodgkin (καρκίνος λεμφοκυττάρων που εξαπλώνεται μέσω μιας συγκεκριμένης ομάδας λεμφαδένων), non-Hodgkin λέμφωμα και λεμφοπολλαπλασιαστική νόσος [1].
- **Καρκίνος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)**: καρκίνος που ξεκινά από τους ιστούς του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι όγκοι του εγκεφάλου, και του νωτιαίου μυελού, γλοιώμα εγκεφάλου, μηνιγγίωμα, αδένωμα υπόφυσης, καλοήθης όγκος περιφερικών νεύρων, πρωτοπαθές λέμφωμα ΚΝΣ, αρχέγονος νευροεκτοδερμικός όγκος [1].

Αυτό που δεν συμπεριλαμβάνεται στις παραπάνω λίστες είναι οι μεταστατικοί καρκίνοι. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κύτταρα που προέρχονται από μεταστατικούς όγκους αφενός μεν εγείρονται από τον πρωτοπαθή όγκο και αφετέρου η μόνη διαφορά από τα κύτταρα του πρωτοπαθούς είναι ότι πια τα μεταστατικά εμφανίζονται σε διαφορετικό ιστό από τον πρωταρχικό (περιοχή μετάστασης). Συνεπώς, εάν ο όρος ‘μεταστατικός καρκίνος’ χρησιμοποιείται, θα πρέπει για ακρίβεια να αναφέρεται ο ιστός του πρωτοπαθούς όγκου από τον οποίο προέκυψαν τα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, ένας ασθενής που έχει διαγνωστεί με μεταστατικό καρκίνο, για μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιείται στην διάγνωση και η ονομασία της πρωτοπαθούς εστίας, παραδείγματος χάριν ‘μεταστατικός καρκίνος μαστού με διασπορά στο μυελό των οστών’.



Εικόνα 1.1 Διαιρούμενο καρκινικό κύτταρο από καρκίνο μαστού [National Cancer Institute / Univ. of Pittsburgh Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, updated: Feb 2015]

1.5 Πώς αναπτύσσεται ο καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μία γενετική ασθένεια που προκαλείται από αλλαγές σε γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων, ειδικότερα τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσονται και διαιρούνται.

Γενετικές αλλαγές που έχουν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του όγκου μπορεί να έχουν κληρονομηθεί από συγγενείς πρώτου βαθμού. Επίσης μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου, ως αποτέλεσμα λαθών που έχουν προκύψει κατά την κυτταρική διαίρεση, εξαιτίας βλάβης του DNA που έχει προέλθει από την έκθεση σε διαφόρους περιβαλλοντικούς παράγοντες είτε ηλιακή ακτινοβολία είτε κάπνισμα κοκ.

Σε αυτή την περίπτωση αναφερόμαστε σε επιγενετικές αλλαγές, όπως είναι η μεθυλίωση που έχει προκύψει από προσθήκη μεθυλομάδων στις κυτοσίνες, βάσεις του DNA.

Ο όγκος σε κάθε ασθενή έχει μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών. Όσο εξελίσσεται η νόσος, προκύπτουν συνεχώς νέες μεταλλάξεις στο μικροπεριβάλλον του. Ακόμα και όταν αναφερόμαστε στον ίδιο όγκο, σε διαφορετικά κύτταρα προκύπτουν διαφορετικές γενετικές μεταλλάξεις. Αυτό εξηγεί και την μεγάλη ετερογένεια των όγκων, δηλαδή ότι στον ίδιο όγκο υπάρχουν πολλές διαφορετικές τροποποιήσεις γονιδίων. Γενικά, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν, όπως είναι φυσικό, περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις από τα φυσιολογικά. Αυτές οι μεταλλάξεις μεταλλάξεις του DNA. Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να μην σχετίζονται με τον καρκίνο αλλά να είναι αποτέλεσμα της νόσου και όχι αιτία.

Οι γενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου τείνουν να επηρεάζουν τρεις κύριους τύπους γονιδίων: πρωτοογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά και γονίδια επιδιόρθωσης DNA.

Τα πρωτοογκογονίδια συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων. Ωστόσο όταν αυτά τα γονίδια μεταλλάσσονται χάνουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και μετατρέπονται σε γονίδια που προκαλούν καρκίνο, αφήνοντας τα κύτταρα να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν ενώ δεν θα έπρεπε [2].

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, επίσης συμμετέχουν, στον έλεγχο της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Όταν υπάρχουν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα [2].

Τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, όπως είναι φυσικό, συμμετέχουν στην επιδιόρθωση τυχόν βλαβών στο μόριο του DNA. Κύτταρα με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια τείνουν να αναπτύσσουν επιπλέον μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια, λόγω του λειτουργικού τους ρόλου. Συνδυαστικά όλες αυτές οι μεταλλάξεις έχουν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.

Συμπερασματικά και κατόπιν πολλών ερευνών, έχουμε μάθει περισσότερα για τις μοριακές αλλαγές που οδηγούν στον καρκίνο και έχουν βρεθεί πολλές κοινές μεταλλάξεις που υπάρχουν σε πολλούς τύπους καρκίνου. Εξαιτίας αυτού, πολλοί τύποι καρκίνου χαρακτηρίζονται από τον τύπο της γενετικής μετάλλαξης που έχει

οδηγήσει στην ανάπτυξη του όγκου και όχι από το μέρος του σώματος στο οποίο έχει αναπτυχθεί ο καρκίνος ή από την εικόνα των κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο [2].

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά σε πολλά σημεία που τους επιτρέπουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και να γίνονται επιθετικά. Μία από τις κύριες διαφορές τους είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο εξειδικευμένα από τα φυσιολογικά, δηλαδή όταν τα φυσιολογικά ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε διάφορους τύπους κυττάρων με εξειδικευμένες λειτουργίες, τα καρκινικά δεν το κάνουν. Αυτός είναι και ένας λόγος που, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά συνεχίζουν να διαιρούνται ασταμάτητα [2].

Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να αγνοήσουν τα σήματα που σταματούν την κυτταρική διαίρεση ή που ξεκινούν τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή την διαδικασία της απόπτωσης, που ο οργανισμός υποκινεί με σκοπό να καταστρέψει κύτταρα που δεν έχουν πια λειτουργικό ρόλο.

Ακόμα μία ικανότητα των καρκινικών κυττάρων είναι να χρησιμοποιούν τα φυσιολογικά κύτταρα, καθώς και διάφορα μόρια και αγγεία αίματος με σκοπό την τροφοδότηση του όγκου, γνωστό και ως μικροπεριβάλλον του όγκου. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν φυσιολογικά που επικοινωνούν με τα αγγεία του αίματος, με σκοπό της παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών απαραίτητων για την ανάπτυξη του όγκου. Αυτά τα αγγεία επίσης απομακρύνουν και συστατικά-απόβλητα από το μικροπεριβάλλον του όγκου.

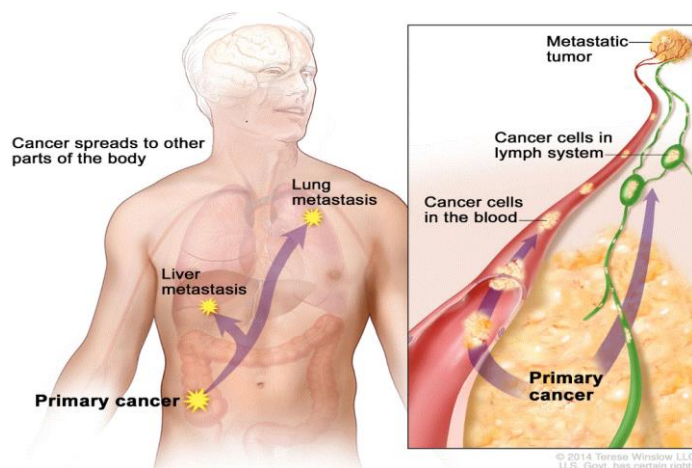
Τα καρκινικά κύτταρα είναι επίσης ικανά να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος ή να μετριάζουν την παρουσία της ανοσολογικής απόκρισης [3-8], ενός δικτύου οργάνων, ιστών και εξειδικευμένων κυττάρων που προστατεύουν τον οργανισμό από μολύνσεις και διάφορους παθογόνους παράγοντες. Αν και το ανοσοποιητικό σύστημα αφαιρεί κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή μη φυσιολογικά, από το σώμα, τα καρκινικά έχουν την ικανότητα να ξεγελούν και να κρύβονται από το ανοσοποιητικό. Ένα παράδειγμα είναι η δράση του προγραμματισμένου συνδέτη θανάτου 1, (Programmed Death-Ligand 1, PD-L1).

Ο παράγοντας PD-L1 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ο λειτουργικός της ρόλος είναι να ρυθμίζει την ανοσοαπόκριση μέσω καταστολής των κυττάρων του ανοσοποιητικού σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων ή εγκυμοσύνης κοκ. Στην

περίπτωση του καρκίνου η χρήση του αντισώματος PD-L1 σαν σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού από τη μίαεπέρχεται αύξηση της έκφρασης του παράγοντα, συμβάλλοντας στην πρόγνωση των ασθενών με επιθετικό συμπαγή όγκο [9], από την άλλη,τα κύτταρα του όγκου ξεγελώντας το ανοσοποιητικό, εντείνουν τη δράση του PD-L1 με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται το ανοσοποιητικό από τα ίδια τα δικά του μόρια-πρωτεΐνες[10][11].

1.6 Μετάσταση και καρκίνος

Η διασπορά του όγκου από την πρωτοπαθή εστία ανάπτυξής του, σε ένα άλλο μέρος του ανθρώπινου σώματος καλείται μεταστατικός καρκίνος και η διαδικασία με την οποία τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω την φλεβικής κυκλοφορίας και της λέμφου, ονομάζεται μετάσταση. Ο μεταστατικός καρκίνος έχει το ίδιο όνομα και τον ίδιο τύπο καρκινικών κυττάρων με αυτών της πρωτοπαθούς εστίας από την οποία προήλθαν. Για παράδειγμα, αν ο καρκίνος του μαστού κάνει μετάσταση στους πνεύμονες δεν καλείται καρκίνος πνεύμονα αλλά μεταστατικός καρκίνος του μαστού, όπως έχει ήδη αναφερθεί.



Σχήμα 1.2 Η διαδικασία της μετάστασης. Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο μέσω του φλεβικού συστήματος και της λέμφου και η ανάπτυξη μεταστατικού όγκου [TereseWinslowLLC, U.S. Govt., 2014, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#drivers-of-cancer>, update: Feb 2015]

Κάτω από το μικροσκόπιο, τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα γενικά έχουν την ίδια εικόνα με τα κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου. Επιπλέον, έχουν συνήθως κοινά μοριακά χαρακτηριστικά όπως είναι για παράδειγμα η παρουσία συγκεκριμένων

χρωμοσωμικών αλλαγών. Η θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στην επιμήκυνση της ζωής ασθενών με μεταστατικό καρκίνο. Ωστόσο, γενικά ο πρωταρχικός στόχος των θεραπειών στο μεταστατικό καρκίνο είναι να ελέγξουν την ανάπτυξη του όγκου ή να αμβλύνουν συμπτώματα που προκαλούν τη νόσο. Οι μεταστατικοί όγκοι μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στις λειτουργίες του οργανισμού και το μεγαλύτερο ποσοστό των θανάτων από καρκίνο οφείλονται στη μεταστατική νόσο. Αξίζει να σημειωθεί ότι για πολλούς τύπους καρκίνου η μετάσταση καλείται επίσης στάδιο 4 του καρκίνου (βλ. σταδιοποίηση του καρκίνου 0 έως 4).

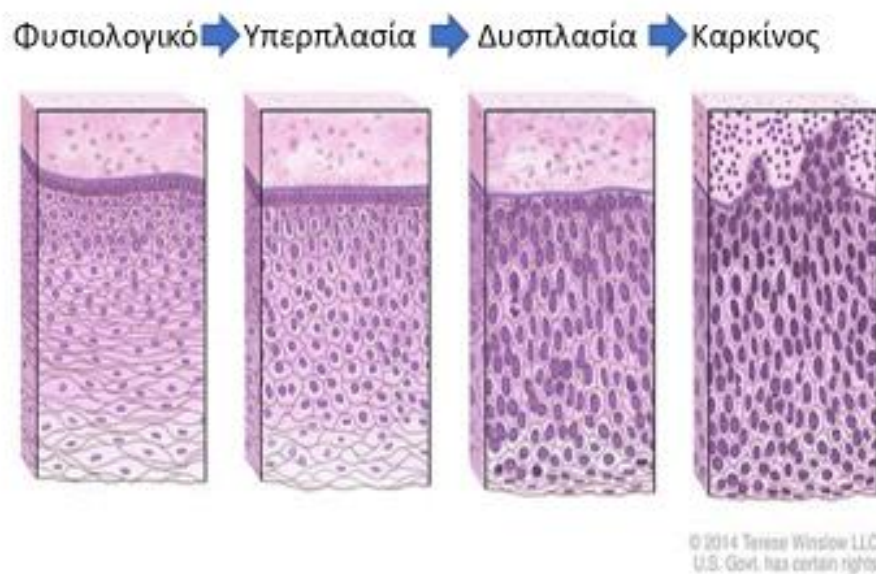
Υπάρχουν περιπτώσεις που γίνεται διάγνωση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο και ο γιατρός αδυνατεί να βρει την πρωτοπαθή εστία του όγκου. Αυτός ο τύπος καρκίνου ονομάζεται καρκίνος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (Cancer of Unknown Primary, CUP) ή δευτερογενής καρκίνος. Οι κύριοι λόγοι που αδυνατούν οι γιατροί να βρουν τον πρωταρχικό όγκο είναι είτε γιατί ότι ο δευτερογενής (μεταστατικός) έχει αναπτυχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό σε σχέση με τον πρωτογενή είτε γιατί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς έχει καταπολεμήσει επιτυχώς τον αρχικό όγκο [12]. Οι δευτερογενείς καρκίνοι είναι σπάνιοι. Συνήθως, στις πιο πολλές περιπτώσεις όταν κάποιος ασθενής είχε διαγνωστεί με τη νόσο και επανεμφανίζει καρκίνο ξανά, σημαίνει ότι ο αρχικός όγκος επέστρεψε.

Πίνακας 1.2 Οι πιο κοινές μεταστάσεις από διάφορους τύπους καρκίνου

[<https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer#ui-id-2>]

Τύπος καρκίνου	Κύριες μεταστάσεις
Ουροδόχου κύστεως	Οστά, ήπαρ, πνεύμονας
Μαστού	Ωθήκες, οστά, ήπαρ, πνεύμονας, εγκέφαλος
Παχέως εντέρου	Ήπαρ, πνεύμονας, περιτόναιο
Νεφρού	Επινεφρίδια, οστά, ήπαρ, πνεύμονας, εγκέφαλος
Πνεύμονα	Επινεφρίδια, οστά, ήπαρ, πνεύμονας, εγκέφαλος
Μελάνωματος	Οστά, εγκέφαλος, ήπαρ, πνεύμονας, δέρμα, μύες
Ωθηκών	Μαστός, ήπαρ, περιτόναιο, πνεύμονας
Παγκρέατος	Ήπαρ, πνεύμονας, περιτόναιο
Προστάτη	Επινεφρίδια, οστά, ήπαρ, πνεύμονας
Ορθού	Ήπαρ, πνεύμονας, περιτόναιο

Οι καρκινικοί όγκοι είναι ως επί το πλείστον κακοήθεις. Αυτό τους δίνει το χαρακτηριστικό της διασποράς και της διήθησης των ιστών με αποτέλεσμα τη μετάσταση και συνεπώς την ανάπτυξη νέων όγκων κοντά ή και μακριά από τον πρωταρχικό. Υπάρχουν και καλοήθεις όγκοι οι οποίοι δεν διασπείρονται, δεν διηθούν και δεν καταστρέφουν κοντινούς ιστούς. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να αυξήσουν πολύ το μέγεθός τους. Όταν αφαιρεθούν επεμβατικά, συνήθως δεν επανεμφανίζονται, κάτι που δεν συμβαίνει με τους κακοήθεις. Αξίζει να αναφερθεί, ότι οι καλοήθεις όγκοι εγκεφάλου μπορούν να αποτελέσουν απειλή για την ζωή του ασθενούς.



Σχήμα 1.3 Φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά. Πριν τα καρκινικά αναπτυχθούν στους ιστούς του σώματος, τα κύτταρα υπόκεινται σε κάποιες μη φυσιολογικές αλλοιώσεις. [TereseWinslowLLC, U.S. Govt, 2014]

1.7 Πρόγνωση και θεραπεία της νόσου

Η έρευνα κάνει αλματώδεις προσπάθειες για να καταπολεμήσει, αν όχι να εξαλείψει τον καρκίνο. Ο κύριος στόχος είναι η έγκαιρη διάγνωση και η πρόγνωση της νόσου μη επεμβατικά. Αυτό μπορεί να γίνει με τη χρήση ενός πολύτιμου εργαλείου, της Υγρής Βιοψίας που θα αναφερθεί στο επόμενο κεφάλαιο εκτενώς. Παρόλα αυτά, βασική αρχή αποτελεί η βελτίωση της έκβασης των ασθενών με καρκίνο. Οι προσπάθειες της έρευνας περιλαμβάνουν την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και λιγότερο τοξικών θεραπειών, όπως είναι οι στοχευμένες θεραπείες, ανοσοθεραπεία,

εμβόλια για τον καρκίνο όπως γίνεται στην περίπτωση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV virus), καθώς επίσης και οι θεραπείες που ήδη υπάρχουν όπως είναι η χημειοθεραπεία, ακτινοβολία αλλά και η αφαίρεση του όγκου με χειρουργική επέμβαση. Επιπλέον, κάποιες μελέτες προσπαθούν να διαχειριστούν την τοξική επίδραση των θεραπειών στον άνθρωπο και με αυτόν τον τρόπο να βελτιώσουν την ικανότητα των ασθενών να λαμβάνουν αποτελεσματική θεραπεία [2].

Δεκαετίες ερευνών πάνω στη βιολογία του καρκίνου ανακάλυψαν τους βασικούς μηχανισμούς σε μοριακό επίπεδο. Εκτός βέβαια από πιστοποιημένες γενετικές, επιγενετικές και μοριακές αλλαγές, που προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου, οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει και τους τρόπους με τους οποίους αναπτύσσεται ο όγκος στο ανθρώπινο σώμα. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι οι όγκοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν τα δικά τους συστήματα τροφοδοσίας, να χειραγωγούν το ανοσοποιητικό σύστημα, να καταστέλλουν ανοσοαποκρίσεις και να στρατολογούν τα φυσιολογικά κύτταρα για να τα βοηθήσουν στην ανάπτυξη του. Εξίσου σημαντικό είναι και το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα παρακάμπτουν μηχανισμούς που προγραμματίζουν τον κυτταρικό θάνατο είτε σε κύτταρα που πεθαίνουν φυσιολογικά είτε σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη και πρέπει να πεθάνουν.

Αυτές οι ανακαλύψεις, έχουν θέσει το έδαφος για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, οι οποίες στοχεύουν συγκεκριμένες αλλαγές, με μεγαλύτερη συχνότητα τις πρωτεΐνες που αποτελούν τη βάση της ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου. Ένα παράδειγμα αποτελεί η στόχευση του ογκογονιδίου *HER2* σε περιπτώσεις ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο μαστού, που έχουν βρεθεί θετικές στον ανθρώπινο υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2*). Ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drugs Administration, FDA) στην Αμερική ενέκρινε τον Φεβρουάριο του 2019, μία ενέσιμη μορφή του φαρμάκου Herceptin (χημική ονομασία: Trastuzumab), που ονομάζεται HerceptinHylecta (χημική ονομασία: Trastuzumab and hyaluronidase-oysk) με σκοπό τη στόχευση και τη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο μαστού *HER2* θετικό [13].

Η χειρουργική επέμβαση, η θεραπεία με ακτινοβολία και η συμβατική χημειοθεραπεία θα συνεχίσουν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία, αλλά η ανάδειξη τα τελευταία χρόνια των στοχευμένων θεραπειών και των ανοσοθεραπειών που αξιοποιούν τη δύναμη του ανοσοποιητικού συστήματος για να καταπολεμήσουν τον καρκίνο, έχουν διευρύνει τις επιλογές για τις διαθέσιμες θεραπείες σε ασθενείς που νοσούν από συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.

Άλλη μία σημαντική δυνατότητα εγείρεται από ένα εύρημα ότι παρόμοιες μοριακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Πρόσφατη έρευνα από το The Cancer Genome Atlas (TCGA) πιστοποίησε γενετικές ομοιότητες μεταξύ του καρκίνου του ενδομήτριου και άλλων τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένων του μαστού, των ωοθηκών και του κολοορθικού [14]. Συνεπώς, θεραπείες που στοχεύουν σε συγκεκριμένες μοριακές αλλαγές, ίσως είναι αποτελεσματικές όχι μόνο ενάντια σε συγκεκριμένο τύπο καρκίνου για τον οποίο αναπτύχθηκαν, αλλά και ενάντια σε όγκους από άλλα μέρη του σώματος που εμφανίζουν τις ίδιες μοριακές μεταλλάξεις.

Είναι δεδομένο ότι τις τελευταίες δεκαετίες έχουν υπάρξει μεγάλες εξελίξεις στη στοχευμένη θεραπεία για τον καρκίνο, παρόλα αυτά πολλές προκλήσεις παραμένουν με σκοπό να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα για τους ανθρώπους που έχουν διαγνωστεί με τη νόσο. Όπως για παράδειγμα ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών που περιλαμβάνουν την εξακρίβωση καλών μοριακών στόχων, στόχων που έχουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων που χτυπούν αποτελεσματικά ή συνδέονται σε αυτούς τους στόχους. Βέβαια, μερικοί πιθανοί στόχοι που έχουν ταυτοποιηθεί εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα που καταπολεμούν τη νόσο. Αυτό αποτελεί έναν ακόμα μεγάλο στόχο, ο σχεδιασμός του φαρμάκου που θα στοχεύει αποτελεσματικά αυτούς τους στόχους. Η ανθεκτικότητα στα φάρμακα, τόσο στα συμβατικά χημειοθεραπευτικά, όσο και στις νεότερες στοχευμένες θεραπείες, είναι ακόμα μία πρόκληση που πρέπει να ξεπεραστεί. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για την ανακάλυψη των μηχανισμών που προσδίδουν την ανθεκτικότητα και να ταυτοποιήσει τρόπους με σκοπό να την ξεπεράσει.

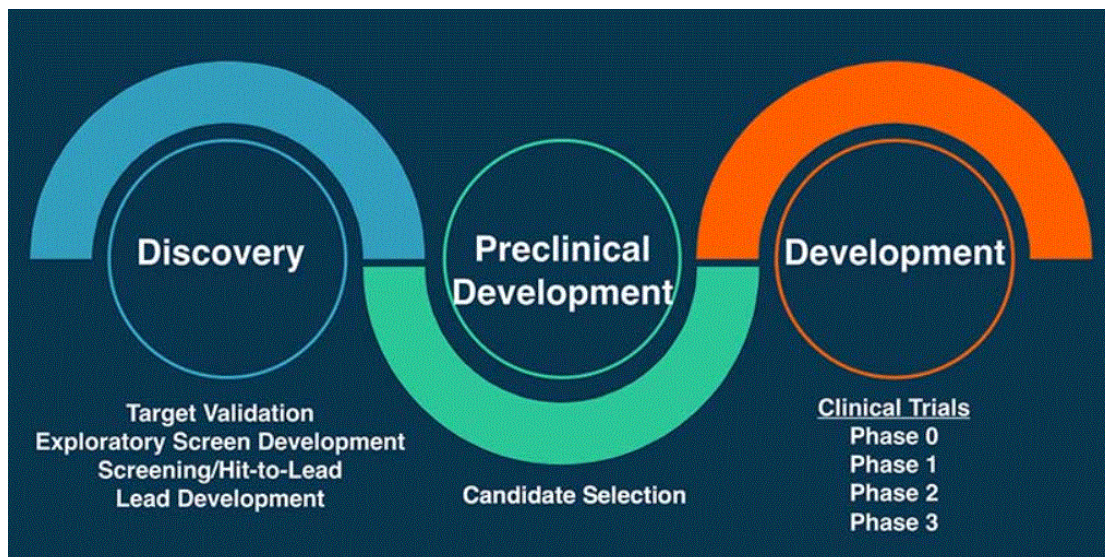
Ο γενωμικός χαρακτηρισμός των όγκων παρέχει δυνατότητες τόσο για τη θεραπεία όσο και για την επίτευξη των νέων προκλήσεων. Η ανακάλυψη ότι σε κάθε όγκο ξεχωριστά υπάρχει ένας μοναδικός καταγισμός γενετικών μεταλλαγών και

τροποποιήσεων, αυξάνει την πολυπλοκότητα της ταυτοποίησης θεραπειών που θα έχουν άψογη αποτελεσματικότητα όταν χορηγηθούν σε έναν ασθενή με καρκίνο. Ωστόσο, ακόμα και όταν αναφερόμαστε στον ίδιο ασθενή και στον ίδιο όγκο, ακόμα και σε μεταστάσεις του ίδιου ασθενούς, οι μοριακές μεταλλάξεις που υπάρχουν, σε μεγάλο ποσοστό, δεν είναι όμοιες. Αυτό, καταρχάς, εξηγεί την ετερογένεια του καρκίνου και δεύτερον, αυξάνει την πιθανότητα ένα φάρμακο να είναι αποτελεσματικό για ένα μέρος του όγκου και να μην λειτουργεί καθόλου σε ένα άλλο μέρος του ίδιου όγκου [14].

Πολλές προκλήσεις παραμένουν, συμπεριλαμβανομένου του πως θα αξιοποιηθεί με τον καλύτερο τρόπο η ανοσοαπόκριση για την εξάλειψη της νόσου, την ώρα που ο καρκίνος διαφεύγει του ανοσοποιητικού και προκαλούνται αυτοάνοσες βλάβες σε φυσιολογικούς ιστούς. Μία επιπλέον πρόκληση είναι να καθοριστεί η αιτία που οι πρόσφατες ανοσοθεραπείες λειτουργούν σε κάποιους ασθενείς και σε άλλους όχι. Έρευνες που διεξάγονται έχουν φέρει στο προσκήνιο έντονα το θέμα της ανοσοθεραπείας, τόσο αμιγώς όσο και συνδυαστικά με συμβατικές θεραπείες. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός ανοσοθεραπείας και ακτινοβολίας. Στην πραγματικότητα, ερευνητές ανακάλυψαν ότι καθώς τα ακτινοβολούμενα καρκινικά κύτταρα πεθαίνουν, πυροδοτούν μία ανοσοαπόκριση που λειτουργεί όπως τα εμβόλια.

Οι *Robert et al.* δοκίμασαν την ιδέα ότι η ανοσοαπόκριση πυροδοτείται από την ακτινοβολία και μπορεί να βελτιωθεί περισσότερο σε συνδυασμό με τους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού, ένας τύπος θεραπείας που ενισχύει την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να σκοτώσει τον καρκίνο [11]. Το 2015, λοιπόν, η ερευνητική ομάδα, παρουσίασε τα αποτελέσματα των πρώτων κλινικών δοκιμών της θεραπείας με ακτινοβολία συνδυασμένης με τον αναστολέα του σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού, Ipilimumab (Yervoy®), ενάντια στην πρωτεΐνη *CTLA-4*. Αυτή η συνδυαστική θεραπεία δοκιμάστηκε σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα και τα αποτελέσματα δεν ήταν πολύ ωφέλιμα. Παρόλα αυτά οι έρευνες συνεχίζονται με πρόσφατες δοκιμασίες που περιλαμβάνουν περισσότερων του ενός αναστολέων [11].

Είναι τεράστιο το πεδίο ερευνών τόσο στη θεραπεία όσο και στην πρόγνωση και τη διάγνωση της νόσου. Οι στοχεύσεις και οι προκλήσεις παραμένουν και σίγουρα το μέλλον επιφυλάσσει σπουδαία πράγματα στο πεδίο του καρκίνου.



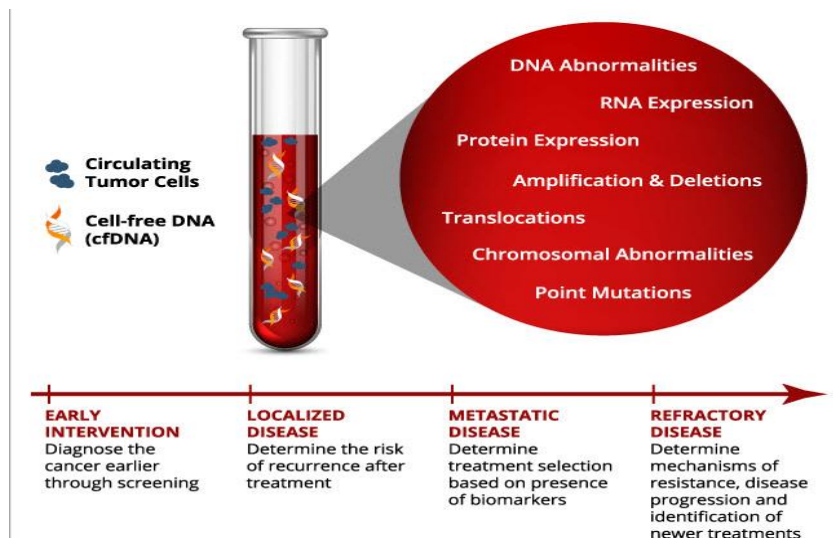
Σχήμα 1.4 Στάδια ελέγχου θεραπείας για τη νόσο του καρκίνου
[https://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/news-events/cancer-currents-blog/2018/next-pipeline-enlarge._v20037334.jpg]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

Η υγρή βιοψία είναι μια ελάχιστα επεμβατική προσέγγιση που βασίζεται στο αίμα και παρέχει πληροφορίες σχετικά με την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση, την ανταπόκριση στα θεραπευτικά σχήματα και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία [15]. Αποτελεί ένα σημαντικό συμπληρωματικό διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο για την ιστική βιοψία στην ογκολογία. Η υγρή βιοψία επικεντρώνεται στην ανίχνευση και απομόνωση CTCs, ctDNA και εξωσωμάτων, ως πηγή γενομικών και πρωτεομικών πληροφοριών σε ασθενείς με καρκίνο. Η υγρή βιοψία αναμένεται να προσφέρει την απαραίτητη προωθητική δύναμη για την εφαρμογή της ογκολογίας ακριβείας σε κλινικές εφαρμογές, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση της ετερογένειας του καρκίνου, επιτρέποντας ταυτόχρονα και τη δυναμική απεικόνιση στην ανταπόκριση της θεραπείας και των γενομικών τροποποιήσεων. Ωστόσο, παρότι είναι διαδεδομένη εφαρμογή της υγρής βιοψίας στη θεραπεία που στηρίζεται στους βιοδείκτες, εξακολουθεί να βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Οι τεχνολογικές εξελίξεις έχουν επιλύσει πολλά από τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι μεθοδολογίες της υγρής βιοψίας αλλά δεν έχει ακόμα επιτευχθεί η επαρκής κλινική και τεχνολογική επικύρωση για την ειδικότητα και την ευαισθησία ώστε να μπει στην κλινική ρουτίνα.

Δεκαετίες μιας εκπληκτικής έρευνας για τον καρκίνο έχουν ορίσει τη νόσο του καρκίνου σαν μία ασθένεια που περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του κυττάρου [16]. Τυχαίες μεταλλάξεις που γεννιούνται εξαιτίας μιας γονιδιακής αστάθειας στα καρκινικά κύτταρα, αποτελούν έναν πολύ γνωστό παράγοντα που ενορχηστρώνει και προωθεί την σηματοδότηση για την ανάπτυξη της νόσου όπως είναι η διατήρηση του σήματος του πολλαπλασιασμού, η διαφυγή από τα μόρια-καταστολείς για την ανάπτυξη των κυττάρων, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και η ενεργοποίηση μηχανισμών επιβίωσης τους, η πρόκληση αγγειογένεσης και η ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης [4].



Σχήμα 2.1 Απεικόνιση υγρής βιοψίας. [<https://www.healio.com/hematology-oncology/learn-genomics/introduction-to-liquid-biopsies/what-is-a-liquid-biopsy>]

Σύμφωνα με την παγκόσμια βάση δεδομένων για τον καρκίνο, GLOBOCAN 2018, τα περιστατικά για τον καρκίνο και η θνησιμότητα από τη νόσο ανέρχονται σε 18.1 εκατομμύρια νοσούντες και 9.6 εκατομμύρια θανάτους αντίστοιχα. Ο καρκίνος υπολογίζεται ότι είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, με εξέχοντες τους εξής πέντε τύπους: καρκίνος πνευμόνων (18,4%), καρκίνος παχέος εντέρου (9,2%), γαστρικός καρκίνος (8,2%), ηπατοκυτταρικός (8,2%), καρκίνος μαστού (6,6%) [17].

Η ογκολογία ακριβείας στη βιολογία του καρκίνου είναι απαραίτητη σαν ένα πανίσχυρο εργαλείο στρατηγικής στην ογκολογία, που σκοπό έχει να παρέχει την πιο ακριβή και αποτελεσματική θεραπεία σε κάθε ασθενή με καρκίνο που βασίζεται στο γενετικό προφίλ του καρκίνου και στην μοναδικότητα του κάθε όγκου μέσα από αυτό. Η ακριβής ογκολογία ορίζεται ως ο μοριακός προσδιορισμός των όγκων και χρησιμοποιείται στον εντοπισμό των στοχευμένων αλλοιώσεων και, όπως προαναφέρεται αποτελεί σημαντικό εργαλείο για αυτό αναπτύσσεται ταχέως και έχει εισέλθει στην κλινική πρακτική [18]. Εξαιτίας της γενετικής ποικιλομορφίας και των συχνών δυναμικών αλλαγών στα γενομικά προφίλ μεταξύ των ασθενών, η αποτελεσματικότητα στη θεραπεία πηγάζει από τη μετάβαση της εκδοχής που λέει ‘ένα για όλα’, στην εκδοχή που λέει σχεδιασμός θεραπείας εφαρμοστός σε κάθε όγκο ξεχωριστά. Δηλαδή σχεδιασμός ενός φαρμάκου που είναι ‘κομμένο και ραμμένο’ για ένα μοναδικό όγκο, **εξειδίκευση** και **ειδικότητα** θεραπειών [19]. Η ακρίβεια στην

ογκολογία αναμένεται να ξεπροβάλει σαν μία πρωτοβουλία με στόχο να ξεπεραστούν τα εμπόδια που υπάρχουν στο ζήτημα της διαχείρισης της νόσου. Όπως για παράδειγμα, η ανεξήγητη αντίσταση στα φάρμακα, η γενετική ετερογένεια του όγκου και η έλλειψη κατάλληλων μεθόδων απεικόνισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία [20].

Μία από τις κύριες προκλήσεις στην κλινική εφαρμογή της ογκολογίας ακριβείας είναι να πιστοποιήσει και να ανιχνεύσει μοριακούς βιοδείκτες που μπορούν να προβλέψουν την πρόγνωση της ασθένειας, την ευαισθησία και την αντίσταση σε συγκεκριμένη μονήρη θεραπεία ή συνδυασμό θεραπειών ή συγκεκριμένη θεραπεία που σχετίζεται με ανεπιθύμητες παρενέργειες του φαρμάκου [21]. Σε αυτό το σενάριο, η υγρή βιοψία πρόσφατα, έχει αποκτήσει ευρεία προσοχή διεθνώς σαν κάτι εναλλακτικό και συμπληρωματικό με τη κλασική βιοψία στο πεδίο της θεραπείας του καρκίνου, 'cancertheranostics'. Αποτελεί ένα ελάχιστα επεμβατικό προγνωστικό και διαγνωστικό εργαλείο που έχει την ικανότητα να δώσει μία εκτίμηση της γενετικής τοπογραφίας ποικίλων συμπαγών όγκων.

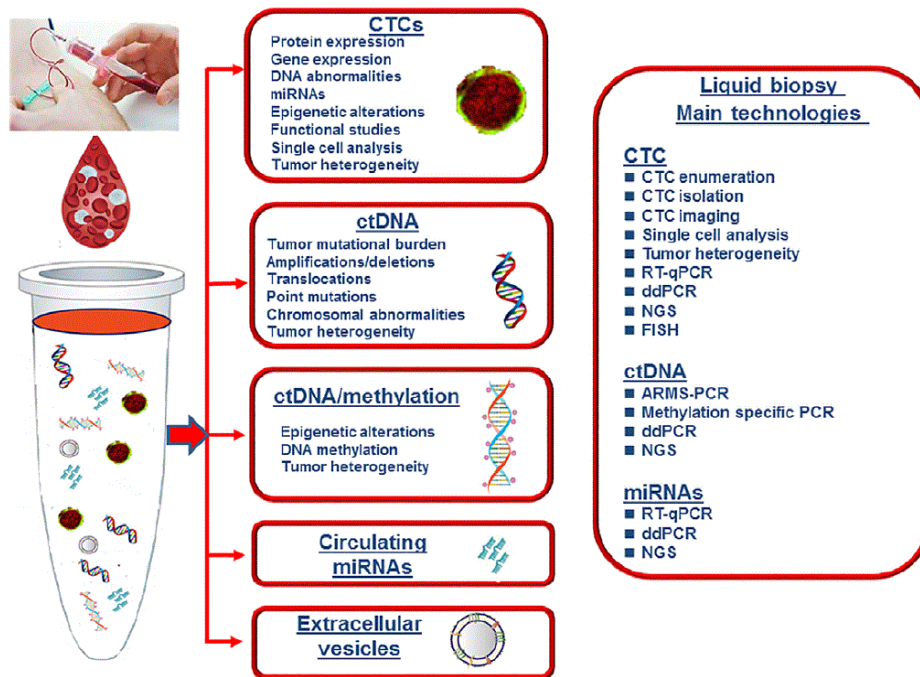
Η υγρή βιοψία έχει αναδειχθεί σαν μία επαναστατική προσέγγιση που νέες προοπτικές και διαστάσεις στο πεδίο της ιατρικής ογκολογίας. Συνίσταται για την ανίχνευση και την απομόνωση των CTCs, του ctDNA, και των εξωσωμάτων σαν μία πηγή γενομικών και πρωτεομικών πληροφοριών σε ασθενείς με καρκίνο [22]. Η χειρουργική βιοψία ακόμα αποτελεί τον 'χρυσό κανόνα' για τη διάγνωση και την επιλογή θεραπείας σε ασθενείς που περιλαμβάνουν γενετική αστάθεια όπως είναι και η νόσος του καρκίνου [23]. Ωστόσο, η ιστική βιοψία έχει σχετιστεί με εγγενείς ανεπάρκειες όπως είναι:

- Περιορισμένη πρόσβαση στον ιστό του όγκου κατά τη διάρκεια της κλασικής βιοψίας αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ενός λανθασμένα αρνητικού αποτελέσματος (false-negative) [24].
- Έλλειψη πληροφοριών οφείλονται στην χρονική και στην χωροταξική ετερογένεια του όγκου [25]
- Η γενετική τοπογραφία του όγκου ίσως μεταβληθεί εξαιτίας της εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία των κλώνων που είναι ολιγάριθμοι στους πρωτοπαθείς όγκους [25]

- Προβλήματα εξαιτίας των υλικοτεχνικών και τεχνολογικών επιπλοκών όπως είναι η αποθήκευση του ιστού που οδηγούν σε λανθασμένα θετικά (false-positive) αποτελέσματα και με αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται τόσο η απόφαση για τη θεραπεία όσο και η φροντίδα του ασθενή [26]
- Ο κίνδυνος μιας ανεπιθύμητης συνέπειας στον ασθενή από τη διαδικασία της βιοψίας [24] και
- Το μεγάλο συνολικό κόστος [27]

Αυτά τα μειονεκτήματα καθιστούν την κλασική βιοψία μία επιλογή αδύνατη για απεικονιστική προσέγγιση του όγκου για μεγάλο διάστημα. Η υγρή βιοψία αποκτάται με μία μικρή ποσότητα ολικού αίματος ή οποιουδήποτε άλλου υγρού του ανθρώπινου σώματος (ούρα, ENY, περιτοναϊκό υγρό κοκ), ξεπερνά τα περισσότερα ελλείματα της ιστικής και μπορεί να παρέχει γρήγορη ανίχνευση στη γενετική του όγκου είτε μιας *de novo* μετάλλαξης είτε μιας ανθεκτικής μετάλλαξης σε κάποια θεραπεία [28].

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την ανάλυση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA), του ελεύθερου κυτταρικού DNA (cell-freeDNA), των εξωσωμάτων, του RNA (mRNA, microRNA) και των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), από τα υγρά του σώματος με σκοπό τον καθορισμό του μεταλλαξιακού προφίλ [29]. Το FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες ενέκρινε την πρώτη δοκιμασία υγρής βιοψίας 1^η Ιουνίου του 2016 για την ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, (epidermal growth factor receptor) *EGFR* σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC). Η ανάλυση έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας του cobas *EGFR* Mutation Test v2, μία δοκιμασία αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR), που ταυτοποιεί 42 μεταλλάξεις των εξωνίων 18, 19, 20, 21 του *EGFR* γονιδίου, συμπεριλαμβανομένης και της μετάλλαξης T790M. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την ανίχνευση υποκαταστάσεων του εξωνίου 18, απαλοιφών του εξωνίου 19, εισαγωγές και υποκαταστάσεις στο εξώνιο 20 και υποκαταστάσεις στο εξώνιο 21 και υποδεικνύεται για την επιλογή ασθενών, οι οποίοι είναι υποψήφιοι για τη θεραπεία με τη χρήση αναστολέων του *EGFR* [30][31].



Σχήμα 2.2 Οι αναλύσεις που περιλαμβάνει η υγρή βιοψία και οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται. [Lianidou E, Pantel K. Liquidbiopsies. Genes Chromosomes Cancer. 2019; 58:219–232.]

Παρακάτω παρατίθενται κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας επιγραμματικά. Τα πλεονεκτήματα είναι τα εξής:

1. Βοηθάει στην κατανόηση της χωροταξικής και χρονικής ετερογένειας του όγκου [32]
2. Απαιτεί μία πολύ μικρή ποσότητα αίματος του ασθενή (συνήθως 6-10 mL αίματος) [33]
3. Σχεδόν καθόλου επεμβατική [34]
4. Πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου, ακόμα και σε στάδιο που δεν έχει εμφανιστεί ο όγκος [35]
5. Υπάρχει δυνατότητα απεικόνισης σε πραγματικό χρόνο για ανταπόκριση ή αντίσταση στη θεραπεία μέσω επαναλαμβανόμενων αναλύσεων [36]
6. Συντομότερος χρόνος ανακύκλωσης του γονοτύπου των μεταλλάξεων [33]
7. Σημαντικό εργαλείο στην ιατρική ακριβείας [37]

Τα μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας είναι τα εξής:

1. Απουσία τυποποίησης των τεχνικών [38]

2. Η επαρκής κλινική και τεχνική επικύρωση δεν έχει ακόμα επιτευχθεί, κάτι που απαιτείται για την εφαρμογή της υγρής βιοψίας στη κλινική ρουτίνα [39]
3. Σε κάποιους τύπους καρκίνων, για παράδειγμα καρκίνος πνεύμονα, η διάγνωση και η εύρεση υποτύπου είναι ανέφικτες με τη χρήση της υγρής βιοψίας και υφίστανται μόνο μέσω της ιστολογικής ανάλυσης [40]

2.1 Οι μοριακοί στόχοι της Υγρής Βιοψίας στον όγκο

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ανίχνευση των γενετικών ανωμαλιών είναι εφικτή με τη χρήση της Υγρής Βιοψίας, χρησιμοποιώντας βιοδείκτες όπως είναι το ctDNA, τα CTCs και τα εξωσώματα.

2.1.1 Circulating Tumor Cells, CTCs

Η γνώση ότι τα καρκινικά κύτταρα ταξιδεύουν μέσω του αγγειακού συστήματος σε απομακρυσμένες περιοχές οργάνων, υπάρχει από το 1874 [41], ενώ η ύπαρξη των CTCs προβλέφθηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Tomas Ashworth, ο οποίος ήταν ο πρώτος που περιέγραψε ότι τα κύτταρα του περιφερικού αίματος, θυμίζουν πάρα πολύ εκείνα των όγκων. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ταξιδεύουν μέσω του φλεβικού ή αγγειακού συστήματος, έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής εξαιτίας σκληρών συνθηκών που είτε τα αναγκάζουν σε απόπτωση είτε σε εξάλειψη από το ανοσοποιητικό σύστημα ή από μηχανισμούς αποκοπής ή λόγω αστάθειας των υγρών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μόνο ένα μικρό κλάσμα να έχει τη δυνατότητα της επιβίωσης και κατ' επέκταση της μετάστασης. Η θεωρία που λέει ότι το μοτίβο τη μεταστατικής εξάπλωσης του καρκίνου δεν εξελίσσεται με τυχαίο τρόπο, αλλά τα καρκινικά κύτταρα που κάνουν μεταστάσεις σε όργανα έχουν συγκεκριμένες προτιμήσεις, μία θεωρία που είναι γνωστή, επίσης, ως 'seed and soil' ή αλλιώς 'σπορά και έδαφος', διατυπώθηκε και αναπτύχθηκε από τον Stephen Paget και επανεξετάστηκε από τους Langley και Fidler [42]. Ουσιαστικά, αυτή η θεωρία μας λέει ότι τα καρκινικά κύτταρα, κατά τη διαδικασία της μετάστασης αναζητούν όσο το δυνατόν καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη και την εξέλιξή τους.

Τα CTCs έχουν την ικανότητα να υποστούν μετάβαση από τον επιθηλιακό χαρακτήρα στον μεσεγχυματικό (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Τα αποτελέσματα

αυτής της μετάβασης δημιουργούν σημαντικές αλλαγές στον φαινότυπο των κυττάρων εξαιτίας της απενεργοποίησης των επιθηλιακών δεικτών και της απόκτησης των ιδιοτήτων των μεσεγχυματικών, όπως είναι η αύξηση της ικανότητας μετανάστευσης και διήθησης, προκαλώντας έντονη διαταραχή στη βασική και εξωκυττάρια μήτρα [43]. Η EMT δεν αποτελεί μόνο βασική και θεμελιώδη εξέλιξη του μεταστατικού καταρράκτη, καθώς έχει την ικανότητα να αποσυσχετίζει τα CTCs από την πρωτοπαθή εστία, αλλά επιπλέον έχει μία πολύ σημαντική επίδραση στην ενίσχυση των CTCs, επειδή η πλειοψηφία των αναλυτικών συστημάτων που ανιχνεύουν τα CTCs βασίζονται στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη *EpCAM* (Epithelial Cell Adhesion Molecule)[44]. Με αυτόν τον τρόπο, ο υπότυπος των CTCs με απουσία της έκφρασης του μοριακού δείκτη *EpCAM*, αλλά εκφράζοντας μεσεγχυματικούς δείκτες, μπορεί να χαθεί, εκτός και αν το EMT σχετιστεί με άλλους δείκτες, όπως είναι οι *TWIST* και *ALDH1* (Aldehyde Dehydrogenase 1), που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους[45]. Τα μεσεγχυματικά CTCs έχουν σχετιστεί με την εξέλιξη της νόσου στον καρκίνο του μαστού, ενώ η μετάβασή τους στην επιθηλιακή κατάσταση, διαμέσου της αντίστροφης διαδικασίας, MET (Mesenchymal-epithelial transition), παίζει ρόλο-κλειδί, επιτρέποντας στα CTCs να διασπείρονται στα απομακρυσμένα όργανα και να καθιερώνουν τη μετάσταση[44].

2.1.1α. Αναλυτικά συστήματα για απομόνωση, καταμέτρηση και ανίχνευση των CTCs

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των CTCs απαιτεί υπερβολικά ευαίσθητες και εξειδικευμένες αναλυτικές τεχνικές που περιλαμβάνουν συνδυασμό διαδικασιών ενίσχυσης και ανίχνευσης[29][46].

Το σύστημα CellSearch είναι το μόνο εγκεκριμένο σύστημα από το FDA για μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτη και κολοορθικού, που επιτρέπει την τυποποίηση του EpCAM, βασισμένη στον εμπλουτισμό και την αρίθμηση των CTCs [47]. Το CellSearch είναι υψηλά αναπαράξιμο, ημιαυτοματοποιημένο και έχει την ικανότητα να ταυτοποιήσει τα CTCs στο περιφερικό αίμα, σε 7,5 mL σε μεταστατικούς καρκίνους και 22,5 mL σε περιπτώσεις πρωτοπαθών καρκίνων. Η ταυτοποίηση και η αρίθμηση των CTCs γίνεται μέσω του ανοσομαγνητικού τους εμπλουτισμού βασισμένο στο EpCAM. Τα καταγεγραμμένα κύτταρα επεξεργάζονται

περαιτέρω για την έκφραση άλλων επιθηλιακών δεικτών, όπως είναι οι κυτταροκερατίνες (cytokeratin, CK) 8, 18 και 19.

Ωστόσο, η καταμέτρηση των CTCs έχει περιορισμένες δυνατότητες ως προγνωστικός δείκτης, λόγω της αδυναμίας διαστρωμάτωσης των ασθενών σε μία συγκεκριμένη θεραπεία. Με σκοπό να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, ένα πλήθος μελετών έχει εστιάσει στο μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs και μέχρι στιγμής τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, λοιπόν, είναι πολλά υποσχόμενος για την ταυτοποίηση των θεραπευτικών στόχων, των μηχανισμών αντίστασης και της αποτελεσματικότητας των συστημικών θεραπειών με απεικόνιση πραγματικού χρόνου. Σε αυτή την κατεύθυνση ένα πλήθος τεχνολογιών εμπλουτισμού και ανίχνευσης έχουν αναπτυχθεί με σκοπό τον χαρακτηρισμό των CTCs σε μοριακό επίπεδο, δηλαδή ανακάλυψη αντιγόνων που σχετίζονται άμεσα με τη θεραπεία, τα μεταγραφικά προφίλ των κυττάρων, επιγενετικές τροποποιήσεις των CTCs και γενωμικές ατέλειες, ακόμα και σε επίπεδο μονήρους κυττάρου [15]. Επιπλέον, ο μοριακός χαρακτηρισμός μπορεί να ρίξει φως στην ετερογένεια και στον γενωμικό χάρτη των όγκων που χαρακτηρίζονται ως κακοήθεις. Αυτή η κατανόηση αποτελεί ένα κομβικό σημείο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Διαφορετικές πλατφόρμες έχουν παρουσιαστεί με σκοπό να επιτραπεί ο εμπλουτισμός των CTCs ανεξάρτητα από την έκφραση επιθηλιακών αντιγόνων, δεδομένου ότι αυτά μπορεί να μειώνονται είτε λόγω EMT είτε λόγω βλαστικών κυττάρων. Διαφορετικοί δείκτες έχουν προταθεί και για τα CTCs, δηλαδή CTCs με χαρακτηριστικά EMT και CTCs με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία που να συσχετίζουν αυτούς τους δείκτες με λειτουργικά γνωρίσματα και χαρακτηριστικά για τα βλαστικά κύτταρα και για τα κύτταρα που υπόκεινται σε EMT [48].

Μία καινοτόμα τεχνολογία επιτρέπει την *in vivo* απομόνωση των CTCs διά μέσου της εισαγωγής ενός Nano-ανιχνευτή, GILUPI Cell collector, μέσα στη βραχιόνια φλέβα του ασθενή, με τη χρήση βελόνας κοινού πλάτους. Τα κυκλοφορούντα EpCAM-θετικά CTCs, προσδένονται *in vivo* στα αντί-EpCAM αντισώματα, τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα στον Nano-ανιχνευτή, ενώ τα μόρια που λειτουργούν στην επιφάνεια εμποδίζουν την μη ειδική πρόσδεση άλλων συστατικών του αίματος [49-52]. Αυτή η τεχνολογία πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, όπου τα σχετικά με τον όγκο μετάγραφα των *EGFR* και

PSMA (prostate membrane antigen), ανιχνεύτηκαν σε 42.8% και 14.3% αντίστοιχα, των δειγμάτων που αναλύθηκαν [50]. Με τη χρήση αυτού του συστήματος απομόνωσης, ανιχνεύονταν μεταλλάξεις των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*, που σχετίζονταν με θεραπείες, σε *in vivo* καταγεγραμμένα CTCs, σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα [51]. Αυτή η τεχνολογία που περιεγράφηκε παραπάνω, πρόσφατα συγκρίθηκε με το CellSearch και τη μέθοδο PSA-EPISPOT [52]. Ο επιτυχής συνδυασμός της *in vivo* απομόνωσης του CTC με τη μοριακή ανάλυση του RNA είναι λιγότερο επιρρεπής σε προαναλυτικά σφάλματα κάτι που συνήθως προκύπτει από την αστάθεια των CTCs στο περιφερικό αίμα κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των δειγμάτων στα εργαστήρια για το επόμενο στάδιο που είναι η ανάλυση των CTCs, επειδή έχουν αμέσως λυθεί στο Trizol, όπου τα νουκλεϊκά οξέα παραμένουν σταθερά[53].

Συστήματα απομόνωσης των CTCs που βασίζονται σε τεχνική μικροροής, επιτρέπουν τον εμπλουτισμό. CTC ανεξάρτητα από την έκφραση ειδικών αντιγόνων στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά με βάση το μέγεθός τους. Η χρήση συσκευών (Parsortix system, Angle PLC etc.), σε συνδυασμό με μία μεθοδολογία πολυπαραγοντικού προφίλ RNA για μονήρη CTCs, αποκάλυπταν διακριτά υποσύνολα των CTCs. Αυτή η προσέγγιση παρέχει πληροφορίες για τα δίκτυα ρύθμισης των γονιδίων που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου και την θεραπεία[54]. Το ίδιο σύστημα όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την ανάλυση μονήρων CTC, αποκάλυψε την ετερογένεια των μεταλλάξεων της *PIK3CA* σε συνδυασμό ασθενών με υψηλή έκφραση ErCAM και ασθενών με χαμηλή έκφραση ErCAM/αρνητικών στα CTCs[55]. Αυτό το σύστημα απομόνωσης είναι πολλά υποσχόμενο στον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs καθώς είναι πολύ αποτελεσματικό στο να απομακρύνει τα κύτταρα που έχουν υποστεί μόλυνση. Η μέθοδος φθορισμού EPISPOT βασίζεται στην ταυτοποίηση βιώσιμων κυττάρων μέσω της ανίχνευσης πρωτεϊνών που έχουν είτε κρυφτεί είτε απελευθερωθεί είτε αποβληθεί από μονήρη λειτουργικά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Συνδυασμός των μεθόδων επιτρέπουν την διεξαγωγή ποικίλων μελετών στα CTCs. Ποικίλα συστήματα έχουν αναπτυχθεί για τον εμπλουτισμό των CTCs και για τις μεθόδους ανάλυσης που θα ακολουθήσουν στο μέλλον [29].

Οι μοριακές μέθοδοι αξιοποιούν την εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR, η οποία μπορεί να σχεδιαστεί *in silico* με υψηλή απόδοση και υπόκειται σε εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας.

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από βιώσιμα CTCs, ακολουθεί η ενίσχυση με αντίδραση πραγματικού χρόνου PCR αντίστροφης μεταγραφάσης, real-time (reverse transcription) PCR, (RT-PCR) από όπου μπορούν να προκύψουν σπουδαίες πληροφορίες για την έκφραση ποικιλίας ειδικών δεικτών στο περιβάλλον του όγκου ή επιθηλιακών δεικτών. Πολλές ομάδες έχουν επιβεβαιώσει την σημασία των μοριακών αναλύσεων με σκοπό μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs. Μοριακοί προσδιορισμοί που βασίζονται στην RT-PCR, πραγματοποιούνται σε νουκλεϊκά οξέα, όπως το RNA και το γενωμικό DNA, που απομονώνονται από κλάσμα CTC ErCAM-θετικό και δίνουν πολύτιμες πληροφορίες για το μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε επίπεδο έκφρασης γονιδίου [56-60], ακόμα και σε επίπεδο μονήρους κυττάρου [54]. Μοριακοί προσδιορισμοί έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στη μελέτη του επιπέδου έκφρασης των miRNAs στα CTCs, αντίστοιχα σε πλάσμα και πρωτοπαθείς όγκους [61]. Συγκεκριμένα, η χρήση της δοκιμασίας RT-PCR πολλαπλών δεικτών μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία και την ειδικότητα στην ανίχνευση των CTCs και δίνει την δυνατότητα αποθήκευσης ποσότητας δείγματος, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο το κόστος και τον χρόνο ανάλυσης [53].

2.1.1β. Κλινικές μελέτες για τα CTCs

Καρκίνος του μαστού. Η ερευνητική ομάδα Trapp et al. εκτίμησε την αξία των CTCs πριν από 3 χρόνια, μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, με καρκίνο μαστού πρώιμου σταδίου [62]. Αυτοί οι ασθενείς πήραν μέρος στην φάση III της δοκιμασίας SUCCESSA, μία δοκιμασία δύο διαφορετικών επικουρικών χημειοθεραπειών που ακολουθήθηκε για 2 χρόνια σε αντιδιαστολή με την θεραπεία 3 χρόνων με τη χορήγηση του φαρμάκου zoledronate (χημική ονομασία: zoledronic acid). Μετά από 2 χρόνια χημειοθεραπείας, 198 ασθενείς από τους 1.087 συνολικά, δηλαδή το 18.2% του συνόλου των ασθενών, είχαν ανιχνεύσιμα CTCs, με θετικό προφίλ CTC στον συγκεκριμένο χρονικό σημείο, είχαν κακή πρόγνωση με σύντομο διάστημα ελεύθερο νόσου, DFS (disease free-survival) και μικρό προσδόκιμο επιβίωσης, OS (overall survival) [62].

Τουλάχιστον το 50% των ασθενών με καρκίνο μαστού με υποδοχέα ορμονών θετικό (hormone receptor, HR), εμφανίζουν υποτροπή με λανθάνουσα περίοδο της νόσου από 5 χρόνια και πάνω. Το 2018, η ερευνητική ομάδα Sparano et al., απέδειξε ότι η παρουσία CTCs -5 χρόνια μετά τη διάγνωση- προβλέπει την καθυστέρηση εμφάνισης

υποτροπής της νόσου, σε ασθενείς με χειρουργήσιμο HER2-αρνητικό καρκίνο μαστού [63]. Μεταξύ των 353 ασθενών με HR θετική νόσο, το ποσοστό υποτροπής ανά άτομο-έτος της μελέτης παρακολούθησης στην ομάδα των CTC-θετικών ήταν 21.4% (7 υποτροπές ανά 32.7 άτομα-έτη), ενώ στην ομάδα των CTC-αρνητικών μόλις το 2.0% εμφάνισε υποτροπή (16 υποτροπές ανά 796.3 άτομα-έτη). Από αποτελέσματα αναλύσεων με πολλαπλές τεχνικές, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ανίχνευση των CTC αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής 13.1 φορές. Ωστόσο, σε 193 ασθενείς HR-αρνητικοί, μόνο ένας ασθενής είχε υποτροπιάζουσα νόσο και ο συγκεκριμένος δεν είχε ανιχνεύσιμα CTCs. Επίσης, υπήρχαν 8 ασθενείς με ανιχνεύσιμα CTCs και κανείς δεν εμφάνισε υποτροπή. Επίσης, την ίδια χρονιά, μία άλλη ερευνητική ομάδα, Goodman et al., ανέφεραν ευρήματα από μία αναδρομική μελέτη για την αλληλεπίδραση μεταξύ της χορήγησης πρώιμης ακτινοβολίας, CTCανίχνευσης και κλινικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού πρώιμου σταδίου [64]. Ήταν αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η θεραπεία με ακτινοβολία σχετίστηκε με μεγάλο διάστημα επιβίωσης, OS, καθώς επίσης και με μεγάλο διάστημα ελεύθερο νόσου χωρίς την εμφάνιση υποτροπής, DFS. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε από την ομάδα ασθενών που είχαν ανιχνεύσιμα CTCs πριν τη χορήγηση της πρώιμης θεραπείας αλλά δεν ίσχυε για αυτούς που δεν είχαν ανιχνεύσιμα CTCs. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, υποδηλώνεται ότι η ανίχνευση CTC μετά από χειρουργική επέμβαση μπορεί να είναι ένας προγνωστικός δείκτης που ωφελεί την πρώιμη ακτινοβολία. Ωστόσο, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της μελέτης πρέπει να επικυρωθούν σε μια μελλοντική παρεμβατική δοκιμή [65].

Οι πρώιμοι δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία που αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια την κλινική έκβαση, απαιτούνται στην κλινική έρευνα και την κλινική πρακτική.

Συγκεκριμένα, οι κλινικές μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο μαστού πρώιμου σταδίου απαιτούν μεγάλες ομάδες και μακράς διάρκειας παρακολούθηση, προκειμένου να επιτευχθούν τα συνήθη κλινικά τελικά σημεία, όπως η επιβίωση χωρίς υποτροπή, RFS (relapse free survival), το διάστημα ελεύθερο νόσου, DFS και ακόμη περισσότερο σημαντικό, το διάστημα επιβίωσης, OS. Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ή προστάτη, οι μεταβολές στις μετρήσεις των CTCs μετά τη θεραπεία συσχετίζονται με το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου, PFS (progression free survival) , καθώς και το διάστημα επιβίωσης, OS [66],[67]. Η

επέκταση αυτής της εργασίας σε μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού (MBC, metastatic breast cancer), από την ερευνητική ομάδα Ignatiadis et al., έδειξε ότι η θεραπεία με Transtuzumab δεν μείωσε το ποσοστό ανίχνευσης CTC σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνο μαστού HER2 μη ενισχυμένο. Το αποτέλεσμα αυτό βρισκόταν σε πλήρη συμφωνία με τα αρνητικά αποτελέσματα μιας μεγάλης τυχαιοποιημένης δοκιμασίας της αποτελεσματικότητας του Transtuzumab σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών [68]. Σε αντίθεση, αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας έδειξαν ότι η θεραπεία με Transtuzumab μειώνει τις μεταβολές των μετρήσεων των CTCs, σε πληθυσμό ασθενών στον οποίο ο παράγοντας αυτός είναι αποτελεσματικός, όπως είναι οι ασθενείς με HER2-θετικό καρκίνο μαστού [69]. Έτσι, μπορεί κανείς να προβλέψει ότι οι μετρήσεις CTC θα μπορούσαν ενδεχομένως να αναπτυχθούν σε ένα πρώιμο υποκατάστατο τελικό σημείο, το οποίο προβλέπει την επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και πιθανόν και σε άλλους τύπους καρκίνου [65].

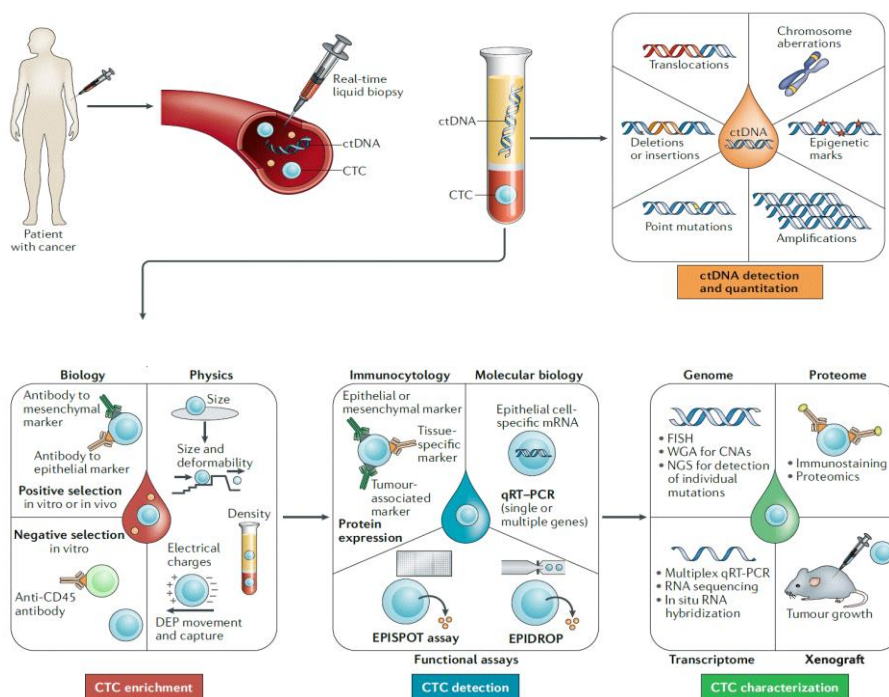
Κολοορθικός καρκίνος. Σε μία μεμονωμένη μελέτη από την ερευνητική ομάδα Van Dalum et al., 183 ασθενείς με μη μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, υποβλήθηκαν σε παρακολούθηση εκτίμησης της νόσου με το CellSearch, για ένα μέσο όρο 5,1 ετών από την αρχική διάγνωση [70]. Η ανάλυση 30mL αίματος αποκάλυψε την ύπαρξη CTCs σε 44 ασθενείς (24%) πριν το χειρουργείο και η ανίχνευση των CTCs σχετίστηκε με μη επιθυμητά αποτελέσματα. Δηλαδή, 5 χρόνια διάστημα χωρίς εμφάνιση υποτροπής (RFS) και διάστημα επιβίωσης από τη νόσο (OS) κατά 61% και 69% αντίστοιχα, έναντι 75% και 83% σε ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα CTCs, με σημαντικότητα $P=0.014$ στην 1^η περίπτωση, κάτι που μαρτυρά κακή συσχέτιση των δύο μεταβλητών και $P=0.002$ στην 2^η με αξιολόγηση πολύ καλή συσχέτισης. Η παρουσία CTCs εβδομάδες μετά το χειρουργείο και πριν από την έναρξη της επικουρικής θεραπείας δεν ήταν σχετική με την κλινική έκβαση, ενώ οι ασθενείς που είχαν ανιχνεύσιμα CTCs, 2-3 χρόνια μετά το χειρουργείο, είχαν κακή πρόγνωση, κάτι που υποδηλώνει ότι η ύπαρξη υπολειμματικής ασθένειας MRD (minimal residual disease), όπως αυτή αντανακλάται από την CTC ανίχνευση, αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την εμφάνιση υποτροπής στον κολοορθικό καρκίνο, CRC (colorectal cancer).

Καρκίνος πνεύμονα. Η παρακολούθηση της ασθένειας που βασίζεται στην ύπαρξη CTC έχει επίσης διερευνηθεί σε πληθυσμό με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε προχωρημένο στάδιο, NSCLC (Non small cell lung cancer).

Οι ασθενείς αυτοί είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις υπήρξε συνδυασμός χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας. Μεταξύ των 70 ασθενών σταδίου III-IV, αυτοί που είχαν πάνω από 5 ανιχνεύσιμα CTCs σε 7.5 mL αίματος, με τη χρήση του συστήματος CellSearch, μετά από ένα κύκλο χημειοθεραπείας, είχαν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση από εκείνους που είχαν λιγότερα από 5 ανιχνεύσιμα CTCs [71]. Συγκεκριμένα, τα στατιστικά αποτελέσματα της έρευνας ήταν τα εξής: για το PFS, ο λόγος κινδύνου HR (hazard ratio) ήταν 5.15, το διάστημα εμπιστοσύνης 95% CI ήταν 1.44-18.46 και P=0.012. Για το OS HR 8.3, 95% CI 2.09–32.91, P = 0.003. Επιπλέον, μια ανάλυση ομάδας 18 ασθενών έδειξε ότι ο αριθμός CTC μπορεί να διαμορφωθεί με θεραπευτική παρέμβαση και οι αλλαγές στον αριθμό των ανιχνεύσιμων CTCs, μετά τη θεραπεία, φάνηκαν να συσχετίζονται με PFS (P <0,001) και OS (P = 0,009), πιο ευνοϊκές από εκείνων με μειωμένο αριθμό CTCs. Αυτοί οι ερευνητές επίσης ανίχνευσαν CTC σε 77 (85%) από 97 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, SCLC (small cell lung cancer) χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο [72]. Η συχνότητα με υψηλή CTC-θετικότητα είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη που αναφέρθηκε σε ασθενείς με NSCLC (21% στην αρχή της μελέτης στην προαναφερθείσα μελέτη 68) και σε άλλους τύπους όγκων. Επιπλέον, οι μετρήσεις CTC ήταν σημαντικά υψηλότερες σε ασθενείς με SCLC από ό, τι σε εκείνους με NSCLC. Συνεπώς, η προγνωστική αποκοπή που χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με SCLC ήταν 50 CTC ανά 7,5 ml αίματος [73], σε σύγκριση με 5 CTCs ανά 7,5 ml σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο NSCLC [74] και καρκίνο του μαστού [66] ή του προστάτη [75]. Στην ομάδα SCLC, οι μετρήσεις των CTCs (≥ 50 έναντι < 50) πριν και μετά από ένα κύκλο χημειοθεραπείας ήταν ανεξάρτητα προγνωστικά του OS (HR 2.45, 95% CI 1.39–4.30, P = 0.002 και HR 5.49, 95% CI 1.78–16.91, P = 0.003, αντίστοιχα). Αυτά τα δεδομένα υπογραμμίζουν την έντονη διασπορά του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, που θεωρείται συστηματικά και αντιμετωπίζεται ως συστηματική νόσος.

Καρκίνος του προστάτη. Μια διπλή ανάλυση σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο προστάτη υψηλού κινδύνου 3 μήνες πριν και μετά τη ριζική προστατεκτομή, έδειξε ότι το ποσοστό ανίχνευσης CTC με τη χρήση του CellCollector, μιας εξαρτώμενης EPCAM *in vivo* συσκευής, μειώθηκε σημαντικά μετά από τη χειρουργική επέμβαση (66% έως 34%, P =0.031) [30]. Αυτό το εύρημα δείχνει ότι ο πρωτοπαθής όγκος είναι μία κύρια πηγή EPCAM-θετικών CTCs. Τα CTCs έχουν σύντομο χρόνο ημιζωής στο

αίμα (1.0-2.4 ώρες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού) [76] και συνεπώς παρατηρούνται CTCs 3 μήνες μετά την εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου που κατά πάσα πιθανότητα προέρχονται από κλινικά, μη φανερές, βλάβες που καταλήγουν σε MRD. Αντίθετα, η ανάλυση με τη χρήση της μεθόδου EPISPOT, η οποία είναι ανεξάρτητη από την τεχνολογία EpCAM, αποκάλυψε μία τάση προς αύξηση του αριθμού των CTC στους 3 μήνες μετά τη χειρουργική επέμβαση (48% έως 71%, $P = 0,052$).



Σχήμα 2.3 Τεχνολογίες για τον εμπλουτισμό, την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs και του ctDNA [Review Article | Published: 22 February 2019, Liquid biopsy and minimal residual disease-latest advances and implications for cure, Klaus Pantel & Catherine Alix-Panabières, Nature Reviews Clinical Oncology 16, (2019)]

2.1.2 Circulating Tumor DNA, ctDNA

Η ανακάλυψη του ελεύθερου κυτταρικού DNA, cfDNA (cell freeDNA), χρονολογείται πίσω στο 1948, όταν οι Mantel και Métais, πρώτοι ανέφεραν την παρουσία του cfDNA στο αίμα υγιών ατόμων [74]. Τριάντα χρόνια αργότερα, σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του cfDNA βρέθηκαν σε μεταστατικούς καρκίνους συγκρινόμενα με μη μεταστατικούς και σημαντική, επίσης, μείωση του επιπέδου του cfDNA συσχετίστηκε με ανταπόκριση στη θεραπεία [77]. Το ctDNA βρίσκεται στο

ελεύθερο-κυτταρικό κλάσμα του αίματος και αντιπροσωπεύει μόνο ένα μεταβλητό και μικρό κλάσμα του συνολικού κυκλοφορούντος DNA [78][79]. Σήμερα, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του ctDNA χρησιμοποιείται επιτυχώς για τον προσδιορισμό της εξέλιξης του όγκου και εκτιμά την πρόγνωση, τη διάγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία σε πολλούς τύπους καρκίνου [80][81].

Το ctDNA περιέχει συγκεκριμένες μεταλλάξεις που έχουν λάβει χώρα σε πρωτογενείς και / ή δευτερογενείς όγκους. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, οι νέοι υποκλώνιοι που προκύπτουν καταλήγουν σε διαφορές στις συγκεκριμένες ατέλειες μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων. Συνεπώς, οι διερευνητικοί δείκτες σε πολλαπλά χρονικά σημεία παρέχουν ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα, καθώς αντιπροσωπεύουν μια σημαντική υπογραφή του τοπίου των μεταλλάξεων σε δεδομένη χρονική στιγμή [65].

Όπως είναι λογικό, αντιπροσωπεύουν και την ετερογένεια του όγκου. Το ctDNA μπορεί να χρησιμεύσει ως αναπληρωματικός δείκτης για το καρκινικό φορτίο σε διάφορους τύπους καρκίνου [82][83].

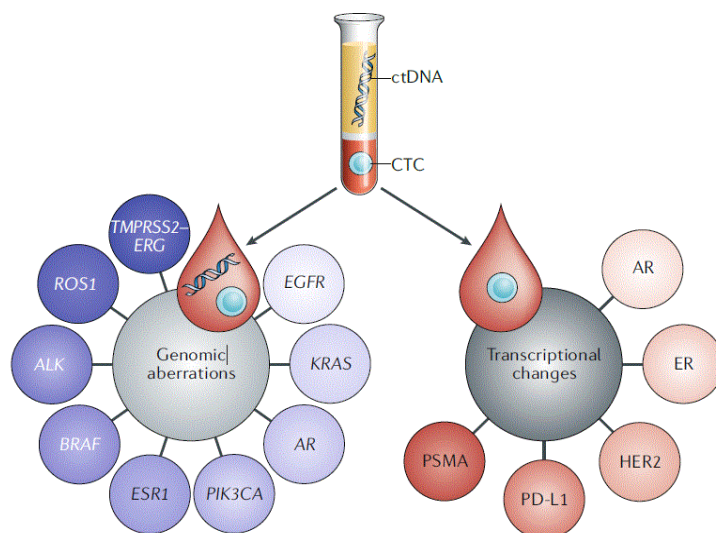
Η ανάλυση ctDNA είναι πολύ υποσχόμενη, ακόμη και για την πρόιμη ανίχνευση του καρκίνου [4]. Πρόσφατα, μια νέο-ανεπτυγμένη δοκιμασία αίματος, που ονομάζεται CancerSEEK, μπορεί να ανιχνεύσει οκτώ κοινούς τύπους καρκίνου μέσω της εκτίμησης των επιπέδων των κυκλοφορούντων πρωτεϊνών και των μεταλλάξεων σε cell-freeDNA [84]. Ωστόσο, η ευαισθησία για ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού και για την ανίχνευση πρόιμων όγκων ήταν μάλλον χαμηλή. Μια άλλη μελέτη, έχει επίσης δείξει ότι η απεικόνιση βασισμένη στο ctDNA και η ανίχνευση MRD που βασίζονται κυρίως στο NGS σύστημα (Next Generation Sequencing) αποτελούν πρόκληση για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα πρόιμου σταδίου (NSCLC) [85].

Η ανάλυση ctDNA του πλάσματος είναι ελκυστική λόγω της ευκολίας με την οποία το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και να αναλυθεί χωρίς προηγούμενη ανάγκη εμπλουτισμού και απομόνωσης ενός σπάνιου πληθυσμού κυττάρων. Ωστόσο, το κλάσμα του cell-free DNA που προέρχεται από όγκο είναι χαμηλό και το υπόβαθρο του cell-free DNA που προέρχεται από αποπτωτικά φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να ποικίλει από ασθενή σε ασθενή και μεταξύ δύο χρονικών σημείων ανάλυσης αίματος. Η ανάλυση του ctDNA μπορεί επίσης να εφαρμοστεί ως στρατηγική υψηλής

απόδοσης για την αξιολόγηση κλινικών δειγμάτων, αλλά περιορίζεται στην ανάλυση των σημειακών μεταλλάξεων, των δομικών αναδιατάξεων, των αποκλίσεων του αριθμού των αντιγράφων και των αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA [15]. Οι μεταλλάξεις του EGFR στο cfDNA που απομονώθηκαν από το πλάσμα των ασθενών με NSCLC μπορούν να διαστρωματώσουν τους ασθενείς που μπορεί να ωφεληθούν από εξειδικευμένες θεραπείες [86]. Η ανάλυση των μεταλλάξεων του EGFR στο προερχόμενο από πλάσμα ctDNA έχει πρόσφατα εγκριθεί από το FDA.

2.1.2α. Κλινικές μελέτες του ctDNA

Καρκίνος του μαστού. Οι πρωταρχικές γνώσεις σχετικά με τη χρησιμότητα των μετρήσεων του ctDNA στην παρακολούθηση του MRD σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου υψηλού κινδύνου παρέχονται από την ερευνητική ομάδα των Garcia-Murillas et al. το 2015 [87]. Σε αυτή τη μελέτη, λοιπόν, εξατομικευμένες αναλύσεις με τη χρήση της αντίδρασης ψηφιακής PCR (digital PCR, dPCR), έγιναν για την ανίχνευση δειγμάτων cfDNA από 55 ασθενείς για την παρουσία σωματικών μεταλλάξεων που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στους πρωτοπαθείς όγκους τους. Παραλήφθηκαν μονά ή σειριακά δείγματα αίματος από διαφορετικά μετεγχειρητικά χρονικά σημεία (όλοι οι ασθενείς είχαν λάβει, επίσης, neoadjuvant χημειοθεραπεία) και η ανίχνευση του ctDNA συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο μεταστατικής υποτροπής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε ότι η ανίχνευση του ctDNA προηγήθηκε της κλινικής διάγνωσης της υποτροπής της νόσου, με διάμεση τιμή 7,9 μηνών.



Σχήμα 2.4:Θεραπευτικοί στόχοι και μηχανισμοί αντίστασης [Review Article | Published: 22 February 2019, Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure, Klaus Pantel & Catherine Alix-Panabières, Nature Reviews Clinical Oncology 16]

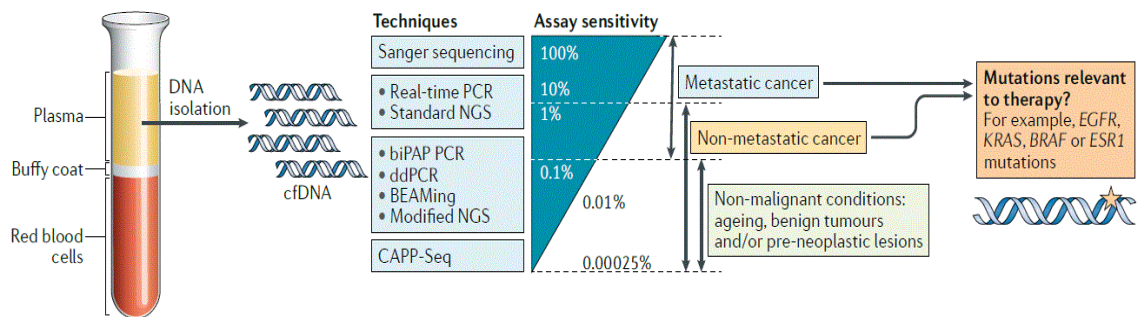
Μία άλλη κατευθυντήρια μελέτη από την ερευνητική ομάδα Chen et al., χρησιμοποίησε το OncoPrint Research Panel που αποτελείται από 134 γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο για να εκτιμηθεί η καταλληλότητα του ctDNA ως βιοδείκτης υπολειμματικής νόσου MRD. Από τους 38 ασθενείς που είχαν υπολειμματική τριπλά αρνητική νόσο, *ER(-)*, *PR(-)*, *HER2(-)* (Triple negative breast cancer, TNBC), μετά από χορήγηση neoadjuvant χημειοθεραπείας, 33 ασθενείς είχαν τουλάχιστον μία μετάλλαξη ταυτοποιημένη στον πρωτοπαθή όγκο, από τους οποίους μόνο 4 είχαν ανιχνευμένες μεταλλάξεις σε δείγματα cfDNA που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της επικουρικής θεραπείας (ένα σύνολο 3 μεταλλάξεων *TP53*, 1 μετάλλαξη *AKT1* και 1 μετάλλαξη *CDKN2A*) [88]. Παρ' όλα αυτά, οι 4 ασθενείς με ανιχνεύσιμο ctDNA είχαν υποτροπή της νόσου σε χρονικό διάστημα εντός 9 μηνών. Φυσικά, αυτή η ομάδα είναι προφανώς πολύ μικρή για να διεξάγει σταθερά συμπεράσματα.

Μια άλλη μελέτη σε 46 ασθενείς με μη μεταστατικό TNBC διεξήχθη από την ερευνητική ομάδα των Riva et al. με σκοπό να διερευνηθεί αν η ανίχνευση ctDNA μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την ανταπόκριση του όγκου στη neoadjuvant χημειοθεραπεία. Αναλύθηκαν σειριακά δείγματα αίματος για το ctDNA που φιλοξενεί ειδικές μεταλλάξεις *TP53* ασθενούς, χρησιμοποιώντας εξατομικευμένες αναλύσεις με αντίδραση ψηφιακής PCR ροής, ddPCR (droplet

digital PCR). Το ctDNA ανιχνεύθηκε κατά την έναρξη της μελέτης σε 27 (75%) από τους 36 αξιολογήσιμους ασθενείς, ενώ τα επίπεδα του ctDNA μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας σε σχεδόν όλους αυτούς τους ασθενείς [89]. Όσον αφορά μία πιθανή σύνδεση μεταξύ των μεταβλητών και του ctDNA, η ανίχνευση ctDNA μετά από έναν κύκλο neoadjuvant χημειοθεραπείας, συσχετίστηκε με τα μικρότερα διαστήματα DFS και OS.

Καρκίνος του πνεύμονα. Οι δημοσιευμένες πληροφορίες σχετικά με τις μετεγχειρητικές μετρήσεις ctDNA σε ασθενείς με αρχικό στάδιο NSCLC σήμερα είναι πολύ περιορισμένες [85]. Σε μια μελέτη ορόσημο, η ερευνητική ομάδα των Abbosh et al., ανέπτυξε δοκιμασίες πίνακα μεταλλάξεων ειδικών για τον ασθενή (που περιλαμβάνουν 12-30 παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου, single nucleotide variants (SNVs)), που βασίζονται σε NGS και που χρησιμοποιήθηκαν για απεικόνιση του γεωγραφικού μήκους του προφίλ του ctDNA σε 24 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη TRACERx, για τον καρκίνο του πνεύμονα, με συνοδευτικές κλινικές και ακτινολογικές αξιολογήσεις παρακολούθησης [81]. Παρά το μικρό μέγεθος της ομάδας, η ανίχνευση SNVs στο ctDNA φαινόταν να συσχετίζεται με κλινικές ενδείξεις υποτροπής NSCLC. Το κατώφλι της ανίχνευσης ctDNA ήταν <0,1% και ο διάμεσος χρόνος μέχρι την κλινική και ακτινολογική ανίχνευση της υποτροπής της νόσου ήταν 70 ημέρες, με ένα ευρύ φάσμα 10-346 ημερών.

Η ερευνητική ομάδα των Chaudhuri et al., έχουν δείξει ότι η ανάλυση ctDNA μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς προηγούμενη γνώση της γενετικής του πρωτοπαθούς όγκου [83]. Σε 40 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σταδίου I-III, ένα σύνολο 128 γονιδίων στοχεύθηκε, χρησιμοποιώντας CAPP-Seq και το ctDNA ανιχνεύθηκε στο πρώτο δείγμα αίματος μετά τη θεραπεία, σε διάστημα εντός 4 μηνών από την αρχική θεραπεία, στο 94% των ασθενών με επακόλουθη υποτροπή. Στο 72% των ασθενών, το ctDNA ανιχνεύθηκε πριν από την επαναληπτική χορήγηση της ακτινοθεραπείας, με μέσο χρόνο εμφάνισης 5,2 μηνών. Σε 1 από τους 5 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση και σε χημειοθεραπεία, το ctDNA ήταν ανιχνεύσιμο σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση 0,04% >20 μήνες, πριν από τις ακτινολογικές ενδείξεις υποτροπής.



Σχήμα 2.5 Μεθοδολογίες ανίχνευσης του ctDNA. [Review Article | Published: 22 February 2019, Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure, Klaus Pantel & Catherine Alix-Panabières, Nature Reviews Clinical Oncology 16]

2.2 Υγρή βιοψία και επιγενετικές τροποποιήσεις

Η υγρή βιοψία όταν συνδυάζεται με μεθυλίωση του DNA μπορεί να αποτελέσει μια πολύτιμη πηγή κυκλοφορούντων επιγενετικών βιοδεικτών. Τα πρότυπα μεθυλίωσης DNA στο πλάσμα πρόσφατα απέκτησαν μεγάλη προσοχή καθώς είναι γνωστό ότι εμφανίζονται νωρίς κατά την παθογένεια του καρκίνου. Η κατάσταση μεθυλίωσης γονιδίων καταστολέων όγκων και μετάστασης σε CTCs και ctDNA θα μπορούσε να αποτελεί πλούσια πηγή πληροφοριών, καθώς μπορεί να απουσιάζει εντελώς ή ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά στο αίμα υγιών δοτών. Η πρώτη αναφορά για τις επιγενετικές τροποποιήσεις στα CTCs επικεντρώθηκε στην μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *SOX17* και αποκάλυψε μια στενή συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του *SOX17* σε CTC και του αντίστοιχου ctDNA πλάσματος σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [90][91]. Μια λεπτομερής συγκριτική μελέτη επιγενετικών δεικτών στα ίδια δείγματα πρωτοπαθών όγκων, CTC και πλάσματος-ctDNA, πραγματοποιήθηκε επίσης σε καρκίνο του μαστού [92]. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη από την ίδια ομάδα έδειξε ότι το *ESR1* (estrogen receptor 1) μπορεί να αποσιωπηθεί επιγενετικά σε CTCs, μέσω μεθυλίωσης και ότι αυτό όχι μόνο αντανακλάται στα συζευγμένα δείγματα ctDNA πλάσματος, αλλά έχει συνδεθεί επίσης έντονα με την έλλειψη ανταπόκρισης στο θεραπευτικό σχήμα everolimus/exemestane [93]. Η ανάλυση μεθυλίωσης πολλαπλού γονιδίου των εμπλουτισμένων CTCs, μπορεί επίσης να παρέχει προγνωστικές πληροφορίες για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μελέτης πρώιμου σταδίου, που εξέτασε την ποσοτική κατάσταση μεθυλίωσης εννέα γονιδίων σε CTCs εμπλουτισμένα μέσω συσκευής μικροδιηθήσεως [94]. Η ανάλυση μεθυλίωσης DNA με την τεχνολογία

ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων (single cell analysis), αποκάλυψε, όπως ήταν αναμενόμενο, μια επιγενετική ετερογένεια μεταξύ των CTCs και έδειξε μία ενεργή επιγενετική ρύθμιση εξειδικευμένη στον όγκο, των γονιδίων που σχετίζονται με ΕΜΤ κατά τη διάρκεια της διάδοσης μέσω αίματος [95].

2.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Η υγρή βιοψία είναι σχεδόν έτοιμη να προσφέρει ένα επιπλέον ανεκτίμητο εργαλείο για την τακτική διαχείριση ασθενών με καρκίνο: εκτός από το γεγονός ότι είναι μεγάλης σημασίας όταν οι ιστικές βιοψίες αδυνατούν να υλοποιηθούν γιατί δεν υπάρχει πρόσβαση στον όγκο, οι εξετάσεις που βασίζονται στην αιμοληψία μπορούν να επιτρέψουν μια στενή παρακολούθηση των δεικτών της νόσου, που προσφέρουν μια νέα προσέγγιση για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και ενδεχομένως τη βελτίωση της επιλογής θεραπευτικών επιλογών.

Η ανάλυση CTC είναι ελάχιστα επεμβατική και έχει ήδη αποδείξει προγνωστική και προβλεπτική ικανότητα σε πολλούς τύπους καρκίνου [15]. Η καταμέτρηση των CTCs είναι εγκεκριμένη από το FDA, καθώς παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες στη μεταστατική ρύθμιση του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου [15].

Επιπλέον, ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, παρέχει την δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης του όγκου ασθενών, σε πραγματικό χρόνο και θα μπορούσε να βοηθήσει στην ταυτοποίηση ασθενών που ίσως θα είχαν όφελος από επιπλέον θεραπείες όπως χημειοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία μετά από χειρουργική επέμβαση, ενώ είναι πολύτιμη η αξιολόγηση της ετερογένειας και της διαχρονικής παρακολούθησης της αντοχής σε εξειδικευμένες θεραπείες.

Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση ctDNA απαιτεί μια ελάχιστη ποσότητα πλάσματος (2 mL) και είναι ευκολότερη από την ανάλυση των CTCs από άποψη υλικοτεχνικής υποδομής. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει σε περιπτώσεις όπου ο στόχος είναι η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου. Τα κύρια πλεονεκτήματα έναντι της ανάλυσης CTC, είναι ότι η ανάλυση ctDNA είναι εύκολα ποσοτικοποιήσιμη, ευκολότερη στην εκτίμηση της ετερογένειας του όγκου, δίνει πληροφορίες για το μεταλλαγμένο τοπίο του όγκου, είναι ιδιαίτερα διαγνωστική και προγνωστική και μπορεί να ταυτοποιήσει την

παρουσία του όγκου [15]. Ωστόσο, μέσω αυτής της προσέγγισης έχουμε πληροφορίες μόνο σε επίπεδο DNA και δεν μπορούμε να ταυτοποιήσουμε την εμφάνιση μεταστάσεων, καθώς το ctDNA μπορεί να προέρχεται τόσο από νεκρωτικά όσο και από αποπτωτικά κύτταρα.

Ωστόσο, πρέπει να έχουμε υπόψιν μας ότι τα CTCs, το ctDNA και τα νέα μέλη της υγρής βιοψίας όπως τα miRNAs και εξωκυττάρια κυστίδια, EVs (extracellular vesicles) παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες. Υπάρχει άμεσα ανάγκη, πρώτον για τεχνική επικύρωση και δεύτερον, κλινική επικύρωση των δοκιμασιών της υγρής βιοψίας σε παρεμβατικές μελέτες για την καθιέρωση της κλινικής χρησιμότητάς τους. Προς αυτή την κατεύθυνση γίνεται και έντονη προσπάθεια των διεθνών κοινοπραξιών, όπως το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα CANCER ID (www.cancer-id.eu) και το Αμερικάνικο πρόγραμμα cancer moonshot (www.cancer.gov/research/key-initiatives/moonshot-cancer-initiative) και αναμένεται να επιταχύνουν την εφαρμογή της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη [15].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.1 Εισαγωγή

Η μεθυλίωση του DNA αντιπροσωπεύει μια θεμελιώδη επιγενετική τροποποίηση που ρυθμίζει την αρχιτεκτονική της χρωματίνης και τη μεταγραφή του γονιδίου. Πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, παρουσιάζουν παρεκκλίνουσες μορφές μεθυλίωσης που συμβάλλουν στον φαινότυπο της ασθένειας. Οι αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA έχουν χρησιμοποιηθεί για να σταματήσουν την μεθυλίωση των γονιδίων από την οποία εξαρτάται η αποσιώπησή τους, για να θεραπεύσουν αιμοποιητικές νεοπλασίες και για να αποκαταστήσουν την έκφραση γονιδίων που έχουν αποσιωπηθεί εξελικτικά. Ωστόσο, αυτοί οι αναστολείς διακόπτουν τη μεθυλίωση συνολικά και παρουσιάζουν σημαντικές τοξικότητες που δεν στοχεύονται. Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην έκφραση των γονιδίων και στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι πολύ σημαντικός και καθοριστικός. Επίσης, πολύ σημαντική είναι η δομή και η λειτουργία των πρωτεϊνών της περιοχής δέσμευσης της 5-μεθυλοκυτοσίνης καθώς και η στόχευση αυτών των μορίων για θεραπευτικό σκοπό.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πιο βασικός παράγοντας πρόκλησης της μεθυλίωσης, είναι ο καπνός του τσιγάρου. Περίπου το ένα τέταρτο των θανάτων από καρκίνο οφείλεται στη χρήση καπνού [96]. Ο πνεύμονας είναι ο πρωταρχικός ιστός που επηρεάζεται από τον καπνό και στον καπνό οφείλεται το 87% των θανάτων λόγω καρκίνου του πνεύμονα[96]. Πιο Συγκεκριμένα, το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, ένας τύπος μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, (NSCLC), είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, ανιχνεύονται ευρέως σε καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση [97].

Η έκθεση σε καπνό τσιγάρου συνδέεται με αλλοιωμένη μεθυλίωση του DNA σε πολλές θέσεις σε όλο το γονιδίωμα. Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση αίματος, επιγενετικού εύρους για τη μεθυλίωση του DNA, με χρήση Illumina450K Beadchip, σε 6.685 νεογνά από 13 μελέτες στην κοινοπραξία εγκυμοσύνης και παιδικής επιγενετικής (PACE, pregnancyandchilderipigenetics), αναγνώρισε πάνω από 6.000 θέσεις CpG διαφορεικά μεθυλιωμένες σε σχέση με το μητρικό κάπνισμα κατά τη

διάρκεια της εγκυμοσύνης [98].Αυτά τα διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης DNA,αποδείχτηκαν στη συνέχεια ως αξιόπιστος βιοδείκτης της έκθεσης του μητρικού καπνίσματος στα νεογνά[99].

Στους ενήλικες, το ενεργητικό κάπνισμα σχετίζεται με εκτεταμένη διαφοροποίηση της μεθυλίωσης γονιδίων, σε μια μετα-ανάλυση 16 ομάδων (n = 15,907) στην κοινοπραξία Cohorts for Heart and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE) [100]. Η έκθεση στον καπνό τσιγάρων συνδέεται με αναπαραγώγιμες και συγκεκριμένες τροποποιήσεις του DNA λόγω μεθυλίωσης τόσο στο αίμα των νεογέννητων όσο και στο αίμα των ενηλίκων. Είναι γεγονός ότι το αίμα είναι άμεσα διαθέσιμο σε μελέτες μεγάλης κλίμακας, σε αντίθεση με τα δείγματα ιστών που δεν είναι. Αρκετές έρευνες έχουν συγκρίνει τις ενώσεις που μεθυλιώνουν το DNA των γονιδίων που σχετίζονται με τους πνεύμονες, οι οποίοι αποτελούν το πρωταρχικό ζωτικό όργανο που εκτίθεται στον καπνό και τον κύριο στόχο της καρκινογένεσης που σχετίζεται με το κάπνισμα. Σε μία υποομάδα της Ευρωπαϊκής Προοπτικής Διερεύνησης για τον Καρκίνο και τη Διατροφή (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) (n = 374), δύο υποψήφια CpGs στο γονίδιο καταστολέα υποδοχέα αρυλίου-υδρογονανθράκων (*AHRR*), ήταν διαφορετικά μεθυλιωμένα σε σχέση με το κάπνισμα στο αίμα καθώς και διαφορετικά σε ιστό του ανθρώπινου πνεύμονα, με την ίδια κατεύθυνση επίδρασης [101]. Μια μελέτη συσχέτισης με επιγονιδιακή έκφραση καπνού στον πνευμονικό ιστό, βρήκε οκτώ θέσεις CpG με μειωμένη μεθυλίωση σε καπνιστές, πέντε από τις οποίες είχαν προηγουμένως εντοπιστεί σε μελέτες που εξετάζουν τη μεθυλίωση του DNA στο αίμα, σε σχέση με το κάπνισμα [102]. Ωστόσο, οι ‘υπογραφές’ καπνίσματος από το νεογέννητο ή το ενήλικο αίμα δεν έχουν συγκριθεί συστηματικά με τις ‘υπογραφές’ ενός πολύ σχετικού ιστού-στόχου για τις επιδράσεις στην υγεία που σχετίζονται με το κάπνισμα, όπως είναι ο ιστός του πνεύμονα.

3.1 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA, αποτελεί ένα θεμελιώδη επιγενετικό μεσολαβητή της γονιδιακής ρύθμισης, που εμπλέκει πρωτίστως την προσθήκη μίας ομάδας μεθυλίου στον άνθρακα-5 μιας βάσης κυτοσίνης, δημιουργώντας 5-μεθυλοκυτοσίνη και προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε βιολογικό υλικό το 1925 [103]. Σημαντικές

πρώιμες μελέτες που δείχνουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης της κυτοσίνης και της γονιδιακής έκφρασης έδωσαν μια εξήγηση για το πώς η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ελέγξει τη γονιδιακή έκφραση [104]. Η 5-αζακυτιδίνη, ένα ανάλογο της πυριμιδίνης που εντείνει την κυτταρική διαφοροποίηση, μπλοκάροντας τη μεθυλίωση, έγινε ο πρώτος επιγενετικός τροποποιητής που χρησιμοποιήθηκε κλινικά [105] και παραμένει μία από τις ελάχιστες θεραπείες που έχουν εγκριθεί από τοFDA [106]. Την ίδια στιγμή, η ερευνητική ομάδα των Bird et al., δήλωσε ότι η μεθυλίωση του DNA προκύπτει αποκλειστικά σχεδόν στις βάσεις της κυτοσίνης σε ένα δινουκλεοτίδιο κυτοσίνης-γουανωσίνης (CpG), με σκοπό να δημιουργήσει ένα συμμετρικό μεθυλιωμένο δινουκλεοτίδιο (mCpG) [107]. Αξίζει να αναφερθεί ότι το p, στο δινουκλεοτίδιο CpG, συμβολίζει το φωσφοδιεστερικό δεσμό των βάσεων. Επομένως, η κυτταρική διαίρεση παράγει δύο θυγατρικά κύτταρα με ημιμεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε πλήρως μεθυλιωμένες θέσεις για να διατηρηθεί η συμμετρική τροποποίηση.

Αυτές οι θεμελιώδεις μελέτες ανακάλυψαν ένα μηχανισμό μέσω του οποίου οι επιγενετικές πληροφορίες θα μπορούσαν να μεταδοθούν διαμέσου της κυτταρικής διαίρεσης και οδήγησαν στο σημαντικό πεδίο της επιγενετικής. Παρά την εκτεταμένη έρευνα τα τελευταία σαράντα χρόνια και την κλινική εμπειρία με παράγοντες υπομεθυλίωσης, ο ακριβής μηχανιστικός ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην γονιδιακή ρύθμιση δεν είναι πλήρως κατανοητός και έχουν αναπτυχθεί μόνο μερικά φάρμακα που καταργούν τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης του DNA για θεραπευτικό όφελος. Σημαντικό κομμάτι είναι ο τρόπος που ερμηνεύεται το σήμα μεθυλίωσης από την οικογένεια πρωτεϊνών της περιοχής δέσμευσης 5-μεθυλοκυτοσίνης (MBD, 5-methylcytosine binding domain) και η διερεύνηση της δυνατότητας εκλεκτικής στόχευσης αυτών των πρωτεϊνών και συμπλοκών πρωτεϊνών για θεραπεία [108].

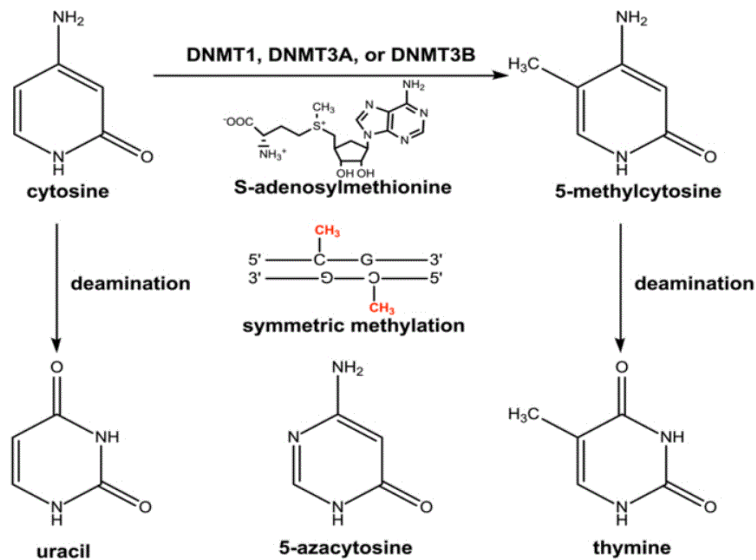
3.1.1 Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην γονιδιακή ρύθμιση

Η μεθυλίωση του DNA είναι παρούσα και στους τρεις κλάδους της ζωής, αλλά η λειτουργία και η κατανομή ποικίλλουν. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί μεθυλιώνουν τόσο τις βάσεις της αδενοσίνης (6-μεθυλαδενοσίνης) όσο και της κυτοσίνης (4- και 5-μεθυλοκυτοσίνες) για να ρυθμίσουν δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης περιορισμού,

τη γονιδιακή έκφραση και τα transposons, τα οποία είναι αλληλουχίες DNA που μπορούν να αλλάξουν τη θέση τους μέσα στο γονιδίωμα και να δημιουργήσουν πολλές φορές μεταλλάξεις [109]. Όσον αφορά τον άνθρωπο, τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT, DNA Methyltransferase), προσθέτουν μεθυλομάδες στον άνθρακα 5 των βάσεων κυτοσίνης (5-μεθυλοκυτοσίνη), κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά σε εκείνες που βρίσκονται σε CpGs. Γενικά, μεθυλιώνουν την πλειονότητα των CpGs σε όλο το γονιδίωμα τους, προστατεύοντας μόνο τις βάσεις που εμφανίζονται σε περιοχές με σχετικά αυξημένο αριθμό CpGs, γνωστές ως CpG νησιά (CGIs, CpG islands). Αυτά τα CGIs είναι σε μεγάλο βαθμό μη μεθυλιωμένα και αλληλεπικαλύπτονται με τους υποκινητές των περισσότερων γονιδίων. Όταν ένα CGI που σχετίζεται με τον υποκινητή είναι μεθυλιωμένο, τότε το συγκεκριμένο γονίδιο τείνει στην αποσιώπηση. Ως εκ τούτου, το μοτίβο της μεθυλίωσης CpG και η συσχέτιση με την αποσιώπηση γονιδίων υποδεικνύει ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ρυθμίσει άμεσα την γονιδιακή έκφραση με κληρονομικό τρόπο.

Η αυθόρμητη απαμίνωση των 5-μεθυλοκυτοσινών παράγει μεταβολές μετάπτωσης C → T και G → A [110]. Συνεπώς, τα δινουκλεοτίδια CpG είναι μια κοινή πηγή μετάλλαξης στο γονιδίωμα των ανθρώπων.

Πέρα από τα εξελικτικά χρονοδιαγράμματα, τα δινουκλεοτίδια CpG έχουν χαθεί, πιθανώς μέσω αυθόρμητης αφαίρεσης, οδηγώντας σε εμφανή ανεπάρκεια CpG (1,0%) και περίσσεια δινουκλεοτιδίων TpG (7,4%) στο ανθρώπινο γονιδίωμα [111]. Ως εκ τούτου, τα CGIs καθορίζονται από μια σχετική αύξηση της πυκνότητας CpG σε σύγκριση με το υπόλοιπο γονιδίωμα, αλλά αυτή η πυκνότητα συχνά προσεγγίζει το επίπεδο με τυχαίο τρόπο.



Σχήμα 3.1 Τα ένζυμα DNMT προσθέτουν μια μεθυλομάδα στον άνθρακα-5 συμμετρικά συγγενών βάσεων κυτοσίνης σε ένα CpG. Η αυθόρμητη απομόνωση της κυτοσίνης και της 5-μεθυλοκυτοσίνης παράγει ουρακίλη και θυμίνη αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης είναι μια κοινή αιτία των μεταβατικών μεταλλάξεων C → T και G → A. Η 5-αζακυτοσίνη περιέχει ένα άζωτο στη θέση 5 της βάσης το οποίο, όταν ενσωματώνεται στο DNA, αναστέλλει τη μεθυλίωση από τα ένζυμα DNMT. [Pharmacol Ther. 2018 Apr; 184:98-111. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.002. Epub 2017 Nov 8., Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets., Ginder GD1, Williams DC Jr2.

Μία κοινή περιγραφή ενός CGI απαιτεί συχνότητα εμφάνισης CpGs σε 200 ζεύγη-βάσεων (bp, base-pair) ή μεγαλύτερο μήκος DNA, να είναι μεγαλύτερη από το 60% εκείνης που αναμένεται για μία τυχαία ακολουθία που περιέχει συγκρίσιμη περιεκτικότητα GC [107][112]. Αυτή η παρατήρηση εγείρει ένα σημαντικό ερώτημα, η δραστική αναστολή της μεθυλίωσης στους υποκινητές μειώνει αυθόρμητα την απαμίνωση κατά αυτόν τον τρόπο με σκοπό την αύξηση της πυκνότητας των CpG, ή η πυκνότητα CpG διατηρείται επιλεκτικά για λειτουργικούς σκοπούς που περιλαμβάνουν την έλλειψη της μεθυλίωσης. Αυτό το ερώτημα αναγνωρίστηκε από τις πρώτες μελέτες της ρύθμισης γονιδίων που εξαρτώνται από τη μεθυλίωση.

Πριν από χρόνια, διαπιστώθηκε ότι η μεταγραφή περιλαμβάνει τη δέσμευση παραγόντων που σταματούν την πρόσβαση του DNMT στο DNA, έτσι ώστε τα CGIs που σχετίζονται με τον υποκινητή να απεικονίζουν την παθητική απομεθυλίωση των

ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων. Αντίθετα, οι μελέτες της ρύθμισης της 5-αζακυτιδίνης και της σφαιρίνης έδειξαν ότι η απομεθυλίωση των εξελικτικά ρυθμιζόμενων γονιδίων θα μπορούσε να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή [113][114]. Αυτή η γονιδιακή ενεργοποίηση απαιτεί επιπρόσθετους επιγενετικούς τροποποιητές ή μεταγραφικούς παράγοντες, οδηγώντας στην εκδοχή ότι ένα μη μεθυλιωμένο CGI αντικατοπτρίζει μια επιτρεπτή αλλά όχι ρυθμιστική κατάσταση για μεταγραφή. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει σε μη ρυθμιστικές θέσεις, έτσι ώστε οι μεταβολές στη συνολική μεθυλίωση να μην αντανakλούν απαραίτητως μεταβολές στη μεταγραφή. Επομένως, μεγάλες μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA μπορούν να αποκρύψουν τη διαφορική μεθυλίωση, κάτι που συμβάλλει στην εξέλιξη της γονιδιακής ρύθμισης και της καρκινογένεσης [115]. Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA συμβάλλει στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, στη γενετική αποτύπωση και στην αναστολή των transposons, ενώ η ενισχυμένη μεθυλίωση του DNA των συγκεκριμένων γονιδίων συνδέεται στενά με τη μεταγραφική σίγαση. Ως εκ τούτου, ενώ η διαφωνία συνεχίζεται, η γενική συναίνεση είναι ότι η μεθυλίωση ενός CGI που αλληλεπικαλύπτεται με τον υποκινητή, αντανakλά συχνά την μακρόχρονη σίγαση, ενώ η μεθυλίωση των γονιδίων συσχετίζεται συχνά με ενεργή μεταγραφή και είναι απαραίτητη η απομεθυλίωση των CGIs που σχετίζονται με τον υποκινητή, αλλά όχι επαρκής, για τη μεταγραφή [116].

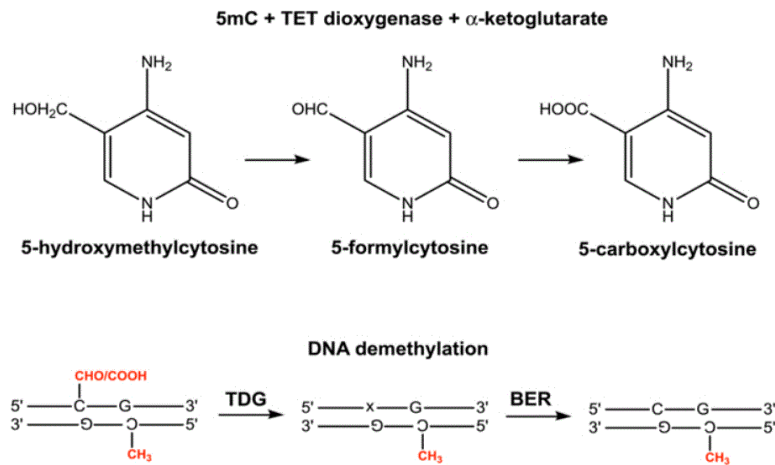
3.2 TETένζυμα και η απομεθυλίωση του DNA

Τα ένζυμα metazoan (αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών σερίνης και εκτελούν βασικές λειτουργίες στη σύνθεση και διατήρηση πεπτιδογλυκάνης, βασικό συστατικό κυτταρικής μεμβράνης) DNMT χρησιμοποιούν την S-αδενοσυλ μεθειονίνη για να προστεθεί μεθυλομάδα στον άνθρακα-5 της βάσης κυτοσίνης. Οι de novo (πρωταρχικές) μεθυλοτρανσφεράσες, DNMT3A και DNMT3B, τροποποιούν συμμετρικά σχετικές βάσεις κυτοσίνης σε δινουκλεοτίδιο CpG, ενώ η μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης, DNMT1, αναγνωρίζει τις ημιμεθυλιωμένες θέσεις και αποκαθιστά τη συμμετρική μεθυλίωση κατά τη διάρκεια της αντιγραφής [117]. Με αυτόν τον τρόπο καθιερώνεται, ο ενζυματικός μηχανισμός με τον οποίο εισάγονται και διατηρούνται νέες μεθυλιωμένες θέσεις διαμέσου κυτταρικής διαίρεσης. Μέχρι πρόσφατα, ωστόσο, παρέμεινε ασαφές εάν ή πώς η μεθυλίωση απομακρύνεται ενεργά από το DNA.

Απουσία μιας ενζυμικής απομεθυλάσης, οι 5-μεθυλοκυτοσίνες μπορούν να χαθούν μέσω ενός παθητικού μηχανισμού, μέσα στον οποίο το DNMT1 αποτυγχάνει να αποκαταστήσει τη συμμετρική μεθυλίωση μετά την κυτταρική διαίρεση. Αυτός ο μηχανισμός, όμως, δεν μπορεί να εξηγήσει την απομεθυλίωση κατά την πρόιμη εμβρυογένεση και απουσία κυτταρικής διαίρεσης [118].

Η ανακάλυψη των ενζύμων Ten-eleven-translocation (TET) dioxygenase ήταν μια από τις μεγαλύτερες πρόσφατες ανακαλύψεις στην επιγενετική. Παρείχαν μια μηχανιστική βάση για μια σχεδόν υποθετική οδό, την ενεργή απομεθυλίωση του DNA. Τα ένζυμα ονομάζονται έτσι για μια κοινή μετατόπιση σε καρκίνους. Μια μετατόπιση μπορεί να συμβεί μεταξύ των χρωμοσωμάτων 10 και 11 δημιουργώντας μια πρωτεΐνη σύντηξης MLL-TET1 [119]. Μέχρι πρόσφατα αυτό ήταν γνωστό για την πρωτεΐνη. Τα τελευταία 5 χρόνια, οι πρωτεΐνες TET έχουν καταδειχθεί ότι καταλύουν τα στάδια της επαναληπτικής απομεθυλίωσης της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5mC) [120]. Η 5mC πρώτα μετατρέπεται σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC), στη συνέχεια 5-φορμυλοκυτοσίνη (5fC), στη συνέχεια 5-καρβοξυλοκυτοσίνη (5caC), το καθένα από TET1 έως 3 [121]. Οι 5fC και 5caC μπορούν και οι δύο να μετατραπούν σε μη τροποποιημένη κυτοσίνη με τερματική δεοξυνουκλεοτιδυλ τρανσφεράση (TdT).

Οι δυνητικοί βιολογικοί ρόλοι αυτών των ενζύμων καθίστανται σαφείς. Υπάρχει υπόνοια ότι τα TETs και τα παράγωγα των 5mC είναι σημαντικά στην ανάπτυξη. Η δραστική απομεθυλίωση του DNA των πατρικών χρωμοσωμάτων είναι ένα σημαντικό μέρος της πρόιμης ανάπτυξης του γονιμοποιημένου κυττάρου. Η απομεθυλίωση του DNA με τη μεσολάβηση TET είναι πιθανόν να είναι κρίσιμη για αυτή τη διαδικασία.

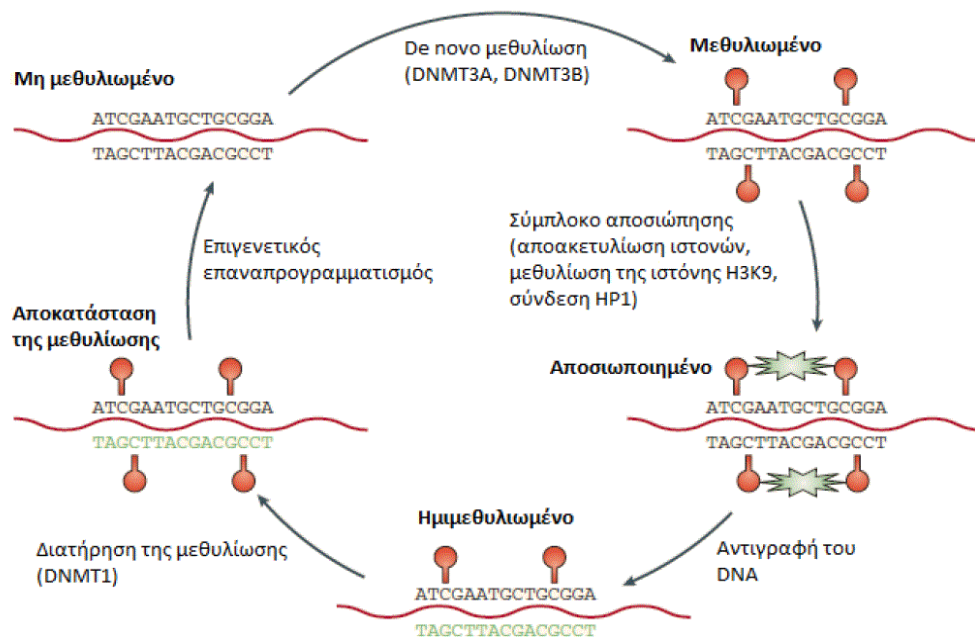


Σχήμα 3.2 Τα ένζυμα TET διοξυγενάσης οξειδώνουν την μεθυλομάδα της 5-μεθυλοκυτοσίνης για να παράγουν 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη, 5-φορμυλοκυτοσίνη και 5-καρβοξυλοκυτοσίνη[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29128342>].

3.3 Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο

Οι μεταβολές στο μοτίβο της μεθυλίωσης του DNA έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση και, ως εκ τούτου, έχουν τεκμηριωθεί και διερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία σαράντα χρόνια [122]. Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών ή με εκείνες που οδηγούν σε ενεργοποίηση της λειτουργίας των ογκογονιδίων, η μεθυλίωση του DNA που εξαρτάται από τις μεταβολές στην μεταγραφή, είναι δυνητικά αναστρέψιμη χωρίς γονιδιακή επεξεργασία. Ως εκ τούτου, καθώς τα γονίδια καταστολής όγκου περιέχουν συχνά πλούσιους υποκινητές σε CpG, κάτι που οδηγεί σε αποσιώπηση του γονιδίου και εν τέλει σε όγκους, οι αναστολείς μεθυλίωσης του DNA έχουν τη μοναδική ικανότητα αποκατάστασης της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η ερευνητική ομάδα του Vogelstein, απέδειξε πρώτα ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA προηγούνται της ανάπτυξης του διηθητικού καρκίνου του παχέος εντέρου[123]. Τα αδενώματα δυσπλασίας έδειξαν συνολικά υπομεθυλίωση, με επιλεκτική υπερμεθυλίωση γονιδίων καταστολής όγκων. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στην υπόθεση ότι η επιγενετική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμβάλλει στην καρκινογένεση και προτείνει μέσω της αναστροφής αυτής της σίγασης θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου και ενδεχομένως να αποτρέψει την εξέλιξή του. Μεταγενέστερη εργασία αποκάλυψε ότι πολλά από τα

μεθυλιωμένα CpG islands στον καρκίνο του παχέος εντέρου επίσης μεθυλιώνονται στο φυσιολογικό κόλον όσο αυξάνεται ο δείκτης της ηλικίας [124].



Σχήμα 3.3 Μεθυλίωση του DNA, κατάσταση αποσιώπησης και αποκατάσταση [Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. Nat Rev Cancer 4, 988-993,2004]

Ωστόσο, σε ένα υποσύνολο του κολορθητικού καρκίνου, υπάρχει μεθυλίωση ενός διακριτού συνόλου γονιδίων, που είναι μη μεθυλιωμένα στο φυσιολογικό επιθήλιο του παχέος εντέρου, οδηγώντας στην έννοια ενός φαινοτύπου που χαρακτηρίζεται από συνεχόμενες μεθυλίωσεις των CpG islands σε όλο σχεδόν το γονιδίωμα. Αυτός ο φαινότυπος ονομάζεται **CIMP, CpG Island Methylator Phenotype**. Οι CIMP κολορθητικοί καρκίνοι περιέχουν συχνά μεθυλιωμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το *CDKN2A*, και συχνά παρουσιάζουν μία περιφερική αστάθεια με σχετική μεθυλίωση και σίγαση του γονιδίου επιδιόρθωσης DNA, *MLH1* [125]. Πολύ ισχυρές αναλύσεις της μεθυλίωσης του υποκινητή έχουν υποστηρίξει στην εκδοχή των CIMP καρκίνων, ότι εμφανίζουν μικροπεριφερική αστάθεια και διαπίστωσαν συσχετισμούς με συγκεκριμένες μεταλλάξεις όπως η πιο συχνή και επικίνδυνη μετάλλαξη V600E του γονιδίου *BRAF* που εμφανίζεται σε σοβαρούς τύπους μελανώματος [126]. Ωστόσο, δεν προέκυψε σαφής άποψη για τον τρόπο προσδιορισμού του CIMP, ούτε για τη συνολική προγνωστική σημασία αυτής της κατηγορίας καρκίνων [127].

Η έννοια CIMP έχει επεκταθεί και σε άλλους συμπαγείς όγκους. Για παράδειγμα, ένα υποσύνολο γλοιωμάτων, όγκων εγκεφάλου, χαμηλού βαθμού περιέχει μεταλλάξεις οδηγούστηsocitratehydrogenase (IDH) και υπερμεθυλίωση κατά μήκος του στο γονιδιώματος τους. Ειδικές μεταλλάξεις των IDH1 ή IDH2 δημιουργούν νεομορφική ενζυμική δραστηριότητα με την παραγωγή του ογκομεταβολίτη D-2-hydroxyglutarate σε αντίθεση με τον φυσιολογικό μεταβολίτη α -ketoglutarate [123]. Τα αυξημένα επίπεδα D-2-υδροξυγλουταρικού αναστέλλουν τα ένζυμα TET, καθώς και άλλα ένζυμα εξαρτώμενα από α -κετογλουταρικό, εμποδίζοντας έτσι την απομεθυλίωση του DNA [128]. Κατά συνέπεια, οι μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες IDH που σχετίζονται με όγκους εγκεφάλου χαμηλού βαθμού και δευτεροταγούς γλοιωβλαστώματος, εμφανίζουν γενική αύξηση της μεθυλίωσης του DNA [129]. Στους όγκους του εγκεφάλου, η προκύπτουσα αλλαγή στο πρότυπο μεθυλίωσης αναστέλλει τη δέσμευση του DNA με τον παράγοντα δέσμευσης και CCCTC, παράγοντας μεταγραφής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CTFC* και συμβάλλει στη ρύθμιση της μεταγραφής [130][131], το οποίο επίσης διαταράσσει την τοπολογική συσχέτιση των περιοχών και απελευθερώνει ογκογονίδια[132]. Αυτό το μοντέλο μεθυλίωσης που εξαρτάται από την δημιουργία σχετικών τοπολογικά περιοχών, αναπαριστά μία από τις πιο συναρπαστικές εξελίξεις σε αυτό το πεδίο, παρέχοντας νέες πληροφορίες για το πώς η μεθυλίωση του DNA μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή ρύθμιση. Πρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνδεση μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA, του νουκλεοσώματος και της σύνδεσης με τον παράγοντα δέσμευσης CCCTC, επεκτείνεται τόσο στην φυσιολογική ανάπτυξη όσο και σε άλλους καρκίνους [133][134][135].

Οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA παίζουν, επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο στα αιμοποιητικά νεοπλάσματα [136][137]. Μερικές από τις πιο κοινές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στη μυελοδυσπλασία, την οξεία μυελογενή λευχαιμία και το λέμφωμα περιλαμβάνουν τα ένζυμα TET, DNMT3A και IDH [138]. Αυτές οι μεταλλάξεις είτε οδηγούν σε μειωμένα (DNMT3A) είτε σε αυξημένα (TET και IDH) επίπεδα μεθυλίωσης του DNA, αν και αυτές οι αλλαγές δεν παρατηρούνται συνολικά. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι κλώνοι που φιλοξενούν αυτές τις μεταλλάξεις σε αυτά τα ένζυμα, μαζί με άλλα γονίδια, μπορούν να βρεθούν με τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία, σε κανονικά μυελώματα των οστών [139][140]. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιμοποιητικού νεοπλάσματος και συχνά

επιμένουν ακόμη και μετά την ύφεση της νόσου [141][142]. Η παρατήρηση ότι οι κλώνοι που φιλοξενούν αυτές τις μεταλλάξεις δεν οδηγούν αναγκαστικά σε αιματολογικές κακοήθειες, αλλά μπορεί να προέρχονται από την εκδοχή του CHIP (Clonal hematopoiesis of indeterminate potential), της κλωνικής αιμοποίησης του απροσδιόριστου δυναμικού, ενός νέου φορέα που βρίσκονται σωματικές μεταλλάξεις στα κύτταρα του αίματος ή των οστών. Οι μεταλλάξεις CHIP δεν επαρκούν για την ανάπτυξη ενός αιμοποιητικού νεοπλασματος αλλά μπορεί να θέσουν τα θεμέλια για την ανάπτυξη λευχαιμίας, προωθώντας την αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων [143]. Η παρατήρηση ότι οι μεταλλάξεις CHIP βρίσκονται σε φυσιολογικά κύτταρα μυελού των οστών και σχετίζονται τόσο με αυξημένα, όσο και με μειωμένα επίπεδα της συνολικής μεθυλίωσης του DNA, εγείρουν ερωτήματα σχετικά με τον μηχανιστικό ρόλο που παίζει η μεθυλίωση του DNA στην μη φυσιολογική αιμοποίηση. Στην πραγματικότητα, μια πρόσφατη μελέτη από την ερευνητική ομάδα Leyetal., υποδεικνύει ότι η αυξημένη μεθυλίωση του DNA σε μεταλλαγμένη λευχαιμία *DNMT3A* μπορεί να είναι συνέπεια του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων αντί για τον οδηγό της λευχαιμογένεσης [144].

Επίσης, παρόμοιες αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA έχουν καταδειχθεί σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Οι επιγενετικές αλλαγές, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι πολύ σημαντικές στην ανάπτυξη του καρκίνου, επειδή τα γονίδια καταστολής όγκων και μετάστασης μπορεί να αποσιωπηθούν μέσω μεθυλίωσης του DNA των υποκινητών τους [145] [146] και επηρεάζουν ουσιαστικά κάθε στάδιο στην εξέλιξη του όγκου [147]. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις προηγούνται των γενετικών αλλαγών και συνήθως εμφανίζονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης του όγκου. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις προσφέρουν καλύτερη κατανόηση των επιγενετικών αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και παρέχουν πληροφορίες για την ανακάλυψη πιθανών επιγενετικών βιοδεικτών για διάγνωση, πρόγνωση, αξιολόγηση κινδύνου και παρακολούθηση ασθενειών [148].

Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA σε CTCs μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη μοριακή και βιολογική φύση αυτών των κυττάρων. Η επιγενετική σίγαση των γονιδίων-καταστολέων όγκων και μεταστάσεων παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στη ρύθμιση του μεταστατικού δυναμικού [91]. Η δική μας ερευνητική ομάδα, ήταν η πρώτη που απέδειξε επιγενετικές μεταλλαγές μέσω της μεθυλίωσης σε δείγματα CTCs και στα αντίστοιχα δείγματα ctDNA [149][90]. Η

κατάσταση μεθυλίωσης γονιδίων καταστολής όγκων και μετάστασης σε CTCs και ctDNA είναι μια πολύ ελπιδοφόρα προσέγγιση, διότι το αρχικό υλικό προσέρχεται μη επεμβατικά και πολύ χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης DNA ανιχνεύονται σε υγιείς δότες. Η μεθυλίωση του DNA και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης επηρεάζουν την πρόσβαση σε λειτουργικές, ανταποκρινόμενες στο οιστρογόνο περιοχές του γονιδιώματος, και με αυτόν τον τρόπο καθορίζουν την ενδοκρινική απόκριση. Πρόσφατη έρευνα έδειξε το ρόλο της μεθυλίωσης στην λειτουργικότητα του υποδοχέα οιστρογόνων 1, *ESR1* (Estrogen Receptor 1) και στην αλλοίωση του γονιδίου μέσω μεθυλίωσης που οδηγεί στη σίγαση του και εν τέλει στην ανάπτυξη καρκίνου μαστού [93]. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα οιστρογόνου, έναν μεταγραφικό παράγοντα ενεργοποιημένο με συνδέτη που αποτελείται από αρκετές περιοχές σημαντικές για τη δέσμευση των ορμονών, τη δέσμευση του DNA και την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η μη αποδεκτή ενεργοποίηση του δικτύου σηματοδότησης *ESR1* στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, αποτελεί βάση για ογκογόνο μετασχηματισμό και οδηγεί στον θετικό καρκίνο του μαστού *ESR1+* [150]. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία εμφανίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις και συχνά αντικατοπτρίζει μια αλλαγή στην κατάσταση του *ER*. Πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν ότι σε *ER*-θετικούς όγκους, τα επίπεδα μεθυλίωσης CpG συσχετίζονται αντίστροφα με την κατάσταση έκφρασης του *ER*, υποδηλώνοντας ότι η μοναδική θέση CpG παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της *ER* μεταγραφής [151]. Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στη μεθυλίωση του *ESR1* σε διάφορους τύπους καρκίνου [152-154], αλλά μόνο ένας περιορισμένος αριθμός αποδεικνύει την κλινική σημασία όσον αφορά τη διάγνωση, την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία [155][156].

Στον καρκίνο του μαστού, η αποσιώπηση του γονιδίου *ESR1* λόγω της μεθυλίωσης του, όπως προαναφέρθηκε, έχει σημαντικό ρόλο στην έκφραση πρωτεΐνης, ενώ η μεθυλίωση *ESR1* στο περιφερικό αίμα συσχετίζεται σημαντικά με την έλλειψη έκφρασης *ER* όπως διαπιστώθηκε από ιστό όγκου που έχει αφαιρεθεί [157]. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση της μεθυλίωσης *ESR1* μπορεί να έχει προγνωστική αξία στην ταυτοποίηση φαινοτύπων με κακή πρόγνωση και σε ασθενείς με δυνητικά μεγαλύτερη αντοχή στην ορμονική θεραπεία [157]. Η ερευνητική μας ομάδα, μελέτησε για πρώτη φορά την παρουσία μεθυλίωσης *ESR1* σε CTCs και ζεύγη ctDNA, σε δείγματα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού [93].

Η έκφραση *ER* και η μεθυλίωση *ESRI* βρέθηκαν να σχετίζονται αντίστροφα στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και το επίπεδο μεθυλίωσης του *ESRI* στο ctDNA του πλάσματος να βρίσκεται σε μεγάλη συμφωνία με την μεθυλίωση *ESRI* στα CTCs.

Επίσης, πρώτη φορά αναφέρθηκε ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *ESRI* σχετίζεται πολύ στενά με την έλλειψη ανταπόκρισης σε στοχευμένη θεραπεία με το θεραπευτικό σχήμα everolimus/exemestane. Συμπερασματικά, λοιπόν, προκύπτει ότι το *ESRI* μπορεί να αποσιωπηθεί επιγενετικά σε CTCs μέσω της μεθυλίωσης και ότι αυτό αντικατοπτρίζεται στα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος ctDNA. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η μεθυλίωση *ESRI* είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση της πρωτεΐνης *ER* σε πρωτοπαθείς όγκους μέσω IHC (immunohistochemistry).

Η δική μας ερευνητική ομάδα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στις επιγενετικές μεταβολές των CTCs [91][90] και απέδειξε στενή συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης *SOX17* σε CTCs και του αντίστοιχου ctDNA πλάσματος σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [90]. Επίσης, η ομάδα μας έχει δείξει για πρώτη φορά ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο στον καρκίνο του μαστού, *BRMS1*, είναι εξαιρετικά μεθυλιωμένο σε CTCs που απομονώνονται από ασθενείς με καρκίνο μαστού, που παρουσιάζουν πολύ χαμηλή έκφραση αυτής της πρωτεΐνης, όπως πιστοποιήθηκε από τον ανοσοφθορισμό [158].

Πρόσφατα, οι τεχνολογίες αλληλούχισης (sequencing technologies), έχουν επεκτείνει γρήγορα την βάση δεδομένων για τη μεθυλίωση του DNA, ωστόσο, αυτές οι πληροφορίες έχουν οδηγήσει σε πολλά νέα ερωτήματα και προκλήσεις. Όπως φαίνεται στο πεδίο της επιγενετικής, ένα απλό δυαδικό μοντέλο on-off, δεν μπορεί να καλύψει την πολυπλοκότητα της γονιδιακής ρύθμισης μέσω της μεθυλίωσης του DNA. Αντ' αυτού, η ερμηνεία του φαινομένου της επιγενετικής αλλοίωσης, εξαρτάται τόσο από το γενωμικό πλαίσιο, τον τύπο του κυττάρου όσο και από την πυκνότητα μεθυλίωσης. Παρ' όλα αυτά, η αναστολή της μεθυλίωσης του DNA έχει δείξει σαφές θεραπευτικό όφελος σε διάφορους τύπους καρκίνου και έχει τη δυνατότητα να αποκαταστήσει τα γονίδια που έχουν αποσιωπηθεί. Επομένως, αναμένουμε στο μέλλον ότι οι εναλλακτικές προσεγγίσεις για τον χειρισμό της

γονιδιακής ρύθμισης που εξαρτάται από τη μεθυλίωση, θα οδηγήσουν σε νέους θεραπευτικούς στόχους με την προοπτική της θεραπείας της νόσου του καρκίνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΛΗΘΑΡΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ

NR2F1

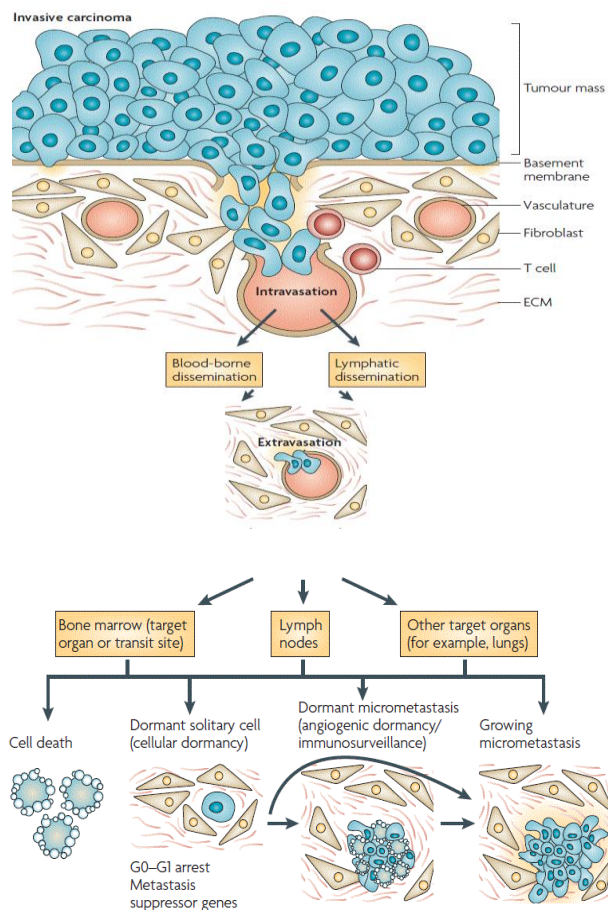
Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, αναπτύσσονται μεταστάσεις, μετά από μία περίοδο λήθαργου της νόσου, η οποία μπορεί να κυμανθεί από μερικά χρόνια έως κάποιες δεκαετίες. Τα καρκινικά κύτταρα, θα έλεγε κανείς, ότι βρίσκονται σε μία λανθάνουσα φάση, όπου παραμένουν σε ληθαργική κατάσταση. Η μετάσταση σταθερά προκύπτει από διασκορπισμένα καρκινικά κύτταρα (Disseminated Tumor Cells, DTCs), τα οποία συχνά υπόκεινται σε περιόδους αδράνειας [160]. Τα DTCs έχουν την ικανότητα να διαχωριστούν φυσιολογικά από τον πρωτοπαθή όγκο και να διασκορπιστούν σε διαφορετικές ανατομικές περιοχές είτε μέσω του φλεβικού συστήματος (κυκλοφορικό) είτε μέσω του λεμφαδενικού. Ο καρκινικός λήθαργος, (tumor dormancy), αποτελεί ένα στάδιο της εξέλιξης της νόσου στο οποίο η υπολειμματική νόσος υπάρχει, αλλά παραμένει ασυμπτωματική. Ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητός ο όρος καρκινικός λήθαργος και σίγουρα μειονεκτεί με βάση την κατανόηση της πολυπλοκότητας της ασθένειας. Πειραματικές και κλινικές έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη ποικίλων μηχανισμών που σχετίζονται με τον καρκινικό λήθαργο, συμπεριλαμβανομένων του αγγειογενετικού λήθαργου, της κυτταρικής αδράνειας (αναστολή G0-G1 κυτταρικού κύκλου), της ανοσοπαρακολούθησης. Η εξέλιξη σε αυτό το κομμάτι του καρκινικού λήθαργου, παρέχει μία αναδυόμενη εικόνα του τρόπου από τον οποίο προκύπτει η ληθαργική κατάσταση και πως αυτό εν τέλει μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο.

Μια τεράστια πλειοψηφία των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι αποτέλεσμα της μεταστατικής ανάπτυξης του όγκου η οποία ουσιαστικά προκαλεί βλάβη στη λειτουργία πολλών ζωτικών οργάνων [159]. Η επανεμφάνιση του όγκου έπειτα από χορήγηση θεραπείας, μετά από μεγάλες περιόδους αδράνειας της νόσου, είναι πολύ συχνό φαινόμενο. Για παράδειγμα, ποσοστό 20-45% των ασθενών με καρκίνο μαστού ή προστάτη, εμφανίζουν υποτροπή της νόσου χρόνια ή ακόμα και δεκαετίες αργότερα [161][162]. Στην πραγματικότητα οι περισσότεροι τύποι καρκίνου σχετίζονται με μεταστατική δραστηριότητα, μετά τη χορήγηση θεραπείας ίσως να έχει παραμείνει σαν ελάχιστη υπολειμματική νόσος (minimal residual disease, MRD). Στην ελάχιστη υπολειμματική νόσο τα καρκινικά κύτταρα που έχουν απομείνει μετά

τη χορήγηση θεραπείας και δεν μπορούν να ανιχνευτούν με συμβατικές κλινικές μεθόδους. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να επιμείνουν στην αρχική περιοχή ανάπτυξης του όγκου ή σαν DTCs να μπουν στην φάση του λήθαργου. Ωστόσο, η έλλειψη γνώσεων για τους μηχανισμούς που ακολουθούνται σε αυτό το στάδιο αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα στην κατανόηση της πολυπλοκότητας της μεταστατικής ανάπτυξης.

Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών διαγνώστηκαν με καρκίνο που προήλθε από υπολειμματικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία είχαν την ικανότητα αναζωπύρωσης τοπικά ή επανεμφάνισης σε απομακρυσμένο όργανο [206]. Η ικανότητα των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο, να επιμείνουν και επίσης να καλυφθούν μεταξύ της ηρεμίας και της διάδοσης μπορεί να είναι αποτέλεσμα επαναπρογραμματισμού επιγενετικών μηχανισμών [207]. Ωστόσο, μηχανισμοί που ταυτοποιούν ληθαργικά κύτταρα που αναπτύσσονται είναι μη διαθέσιμοι.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των DTCs είναι πολύ σημαντικός επειδή αυτά τα κύτταρα είναι πολύ πιθανό να περιέχουν την πληροφορία για την μελλοντική εξέλιξη της νόσου και φυσικά αναφερόμαστε στην μεταστατική εξέλιξη. Για την πλήρη κατανόηση της ληθαργικής κατάστασης, θα πρέπει να γίνει χαρακτηρισμός των κυττάρων ακριβώς σε αυτό το στάδιο. Δεδομένου ότι αυτά τα κύτταρα βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών τύπων καρκίνων, η πληροφορία συλλέγεται από μελέτες για την ληθαργική κατάσταση του καρκίνου και εφαρμόζεται σε ένα ικανό αριθμό ασθενών.



Σχήμα 4.1 Ο καρκινικός λήθαργος ως στοιχείο της εξέλιξης της νόσου [Julio A. Aguirre-Ghiso et al., Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, Nature Rev. Cancer 7, 834-846 (2007)]

Ο λήθαργος των καρκινικών κυττάρων μπορεί να διαχωριστεί με βάση τους μηχανισμούς που αποστρέφονται την διεύρυνση των διασπασμένων καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών (αδράνεια μάζας, tumor mass dormancy) και τους μηχανισμούς που έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (κυτταρική αδράνεια, cellular dormancy). Κανονικά τα καρκινικά κύτταρα συνήθως διαίρονται, αλλά η βλάβη δεν επεκτείνεται πέρα από το επιτρεπτό (με κατάχρηση του όρου επιτρεπτό), εξαιτίας των οριοθετήσεων τόσο των παροχών του αίματος που χρειάζεται ένας όγκος για να αναπτυχθεί όσο της αντίδρασης ενός ενεργού ανοσολογικού συστήματος έναντι του όγκου [163].

Ο κυτταρικός λήθαργος μπορεί να προκύψει όταν τα καρκινικά κύτταρα μπαίνουν στο στάδιο της ηρεμίας. Αυτοί οι γενικοί μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν την

αδρανή στάση των υπολειμματικών κυττάρων μετά τη χορήγηση θεραπείας, που προκαλούν εξέλιξη του όγκου είτε σε ζωτικά όργανα που βρίσκονται τοπικά κοντά είτε σε απομακρυσμένα και επανεμφανίζονται σε διαφορετικά χρονικά πλαίσια.

Η ληθαργική κατάσταση του καρκίνου αποτελεί μέρος της εξέλιξης της νόσου και στόχευση για την ανταπόκριση στη θεραπεία [163].

- Στην κλινική πράξη, αυτή η κατάσταση παρατηρείται σε τοπικές επανεμφανίσεις ή μεταστάσεις. Συχνά αναφέρεται στο χρόνο μετά τη θεραπεία που ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός αλλά ακόμα κουβαλάει τοπικά υπολείμματα ή DTCs που δεν αναπτύσσονται σε εμφανείς βλάβες.
- Η ληθαργική κατάσταση του όγκου επακολουθεί όταν ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων εξουδετερώνεται από άλλους μηχανισμούς όπως είναι η απόπτωση εξαιτίας της πρόκλησης βλαβών ή της ανοσοπαρακολούθησης. Έτσι ο λήθαργος προκαλείται όταν τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε αναστολή της ανάπτυξής τους.
- Αυτή η ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ένα σχετικό πρόβλημα επειδή η πλειοψηφία των συμπαγών όγκων και των αιματολογικών κακοηθειών υπόκεινται σε μία περίοδο ηρεμίας, η οποία χαρακτηρίζεται ως ελάχιστη υπολειμματική νόσος και η διάρκειά της μπορεί να είναι από μερικά χρόνια έως δεκαετίες. Επειδή η μετάσταση πάντα αναγεννιέται από τα DTCs, είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε την βιολογία των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο.
- Αρκετοί μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν την διαδικασία του λήθαργου στον καρκίνο. Αυτό περιλαμβάνει τη διακοπή της σχέσης μεταξύ αυξητικών παραγόντων και προσηλωμένης σηματοδότησης, αποτρέποντας τα καρκινικά κύτταρα να αντιληφθούν το μικροπεριβάλλον τους, οδηγώντας τα σε κυτταρική αδράνεια, μέσω της αναστολής των G0-G1 φάσεων του κυτταρικού κύκλου, ή της διαφοροποίησης, καθιστώντας τα ανίκανα να στρατολογήσουν τα αγγεία του αίματος παρόλη τη γρήγορη εξάπλωση. Και τέλος με την ανοσοπαρακολούθηση, η οποία αποτρέπει την εξάπλωση των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων.
- Η έκφραση γονιδίων που καταστέλλουν εκλεκτικά την μετάσταση ίσως λειτουργούν μέσω της πρόκλησης του λήθαργου. Επίσης η σίγαση των

καρκινικών ‘βλαστικών’ κυττάρων μπορεί να μην υφίσταται και να είναι αδρανή καρκινικά κύτταρα. Τελικά, αυτά τα κύτταρα φαίνεται να έχουν ενεργούς μηχανισμούς αντίστασης στα φάρμακα, οι οποίοι τα προστατεύουν από τη θεραπεία.

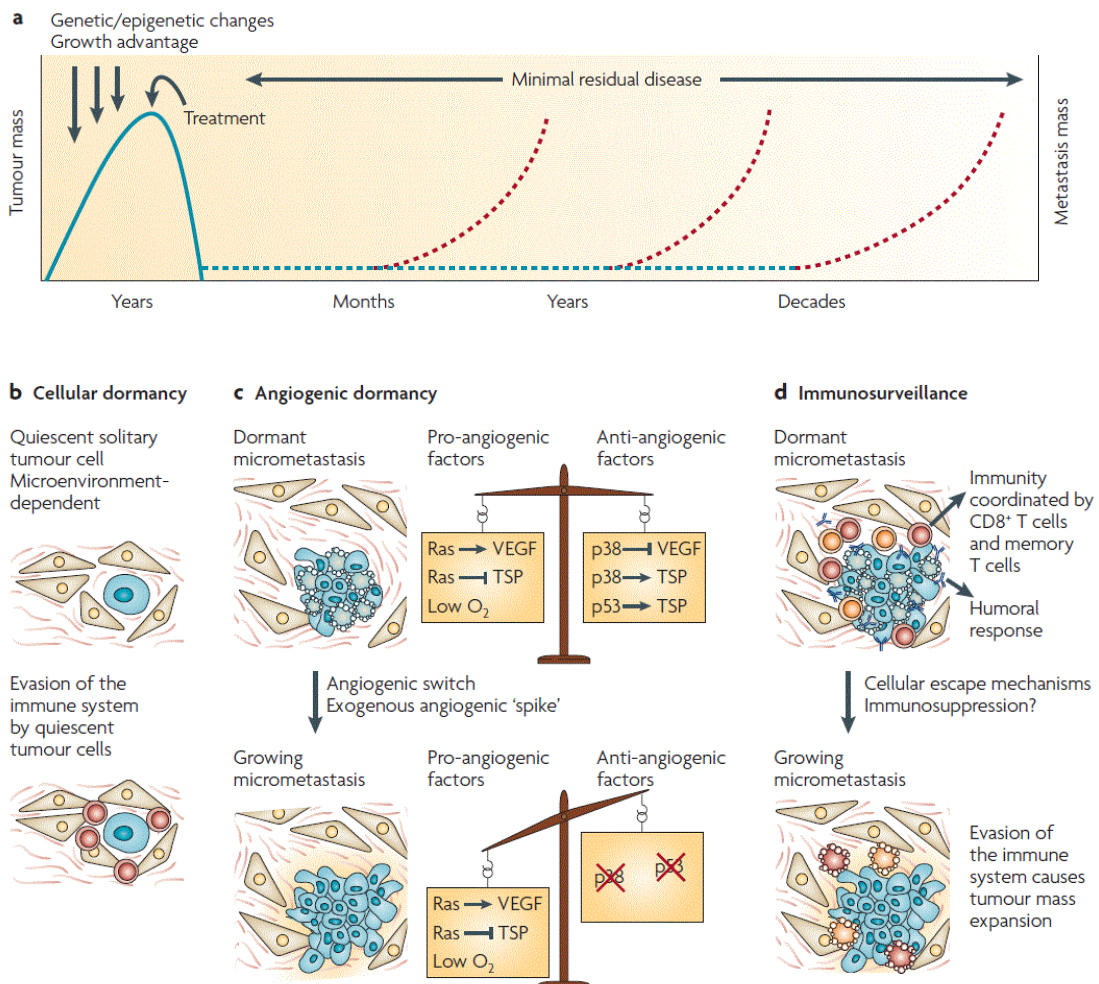
- Οι θεραπευτικές ευκαιρίες που προκύπτουν από την κατανόηση του φαινομένου του λήθαργου, συμπεριλαμβάνουν την πιθανότητα πρόκλησης ή διατήρησης της αδράνειας των κυττάρων του όγκου και πρόκλησης κυτταρικού θανάτου στα υπολειμματικά ληθαργικά κύτταρα στοχεύοντας τους μηχανισμούς επιβίωσης και αντίστασης.
- Αυτές οι μελέτες, που προσδιορίζουν ασθενείς με ληθαργικό τύπο καρκίνου και τον μηχανισμό δράσης της ασθένειας, θα είναι καθοριστικές στην πιστοποίηση βιοδεικτών σε καρκίνους που βρίσκονται στη φάση του λήθαργου

4.1 Εκδηλώσεις του καρκινικού λήθαργου

Θεωρείται ότι τα γενετικά κατάλληλα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζονται στον πρωτοπαθή όγκο, (το οποίο προτείνεται να είναι ένα «καθυστερημένο» γεγονός στην πρόοδο του καρκίνου) θα είναι σε θέση να κάνουν μετάσταση [4][164]. Αυτό θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στον χρόνο που έπρεπε να περάσουν τα κύτταρα όγκου να μεταλλαχθούν και να αποκτήσουν χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να περάσουν από τα διάφορα στάδια του μεταστατικού καταρράκτη. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διάδοση των κυττάρων του όγκου μπορεί να εμφανιστεί νωρίς (δηλαδή με λιγότερα γενετικά προχωρημένα κύτταρα) και ότι τα διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προχωρούν προς πιο επιθετικούς φαινοτύπους, που θα οδηγήσουν σε μεταστατική ανάπτυξη παράλληλα με τον πρωτοπαθή όγκο [165]. Εάν τα DTCs που παραμένουν μετά τη θεραπεία πολλαπλασιάζονται συνεχώς, ο χρόνος υποτροπής αναμένεται πολύ νωρίτερα από ό,τι παρατηρείται [166]. Ως εκ τούτου, η παύση στην εξέλιξη, κάτι που είναι η ληθαργική κατάσταση, πρέπει να θεωρηθεί ως η πιο πιθανή εξήγηση για την απόκλιση μεταξύ των εκτιμώμενων και των παρατηρούμενων περιόδων ελεύθερων νόσου [166]. Ο λήθαργος του όγκου παρατηρείται σε τοπικές υποτροπές ή μεταστάσεις. Στην περίπτωση ενός πρωτοπαθούς όγκου, ο όρος που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η λανθάνουσα κατάσταση ο χρόνος που διαχωρίζει την καρκινογόνο προσβολή από την κλινική

ανίχνευση του όγκου. Σε όλες τις περιπτώσεις ένα μέρος της περιόδου της λανθάνουσας κατάστασης μπορεί να αποδοθεί στην αργή συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε 'αθανатоποίηση', μη απόπτωση, δηλαδή, απώλεια *TP53*, *RBI* (ρετινοβλάστωμα 1), *p16* (αναστολέας κινάσης) και / ή κέρδος της τελομεράσης και ούτω καθεξής. Επίσης, μετασχηματισμό (δηλαδή, δημιουργία μεταλλάξεων που ενεργοποιούν το γονίδιο *Ras*, το *ERBB2* επίσης γνωστό ως *HER2*, μετάλλαξη ενεργοποίησης γονιδίου *BRAF* κ.ά.) μετά και / ή κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης [4].

Ωστόσο, μετά από πλήρη μεταμόρφωση των κυττάρων του όγκου δεν είναι σαφές πόσο από τη λανθάνουσα φάση τους οφείλεται σε λήθαργο της μάζας του όγκου ή σε κυτταρικό λήθαργο.



Σχήμα 4.2 Εκδήλωση της ληθαργικής κατάστασης του όγκου. **a** . Μετά από θεραπεία που οδηγεί σε παλινδρόμηση του όγκου, η υπολειμματική ασθένεια μπορεί να ανιχνεύεται μετά μεγάλες περιόδους (διακεκομμένη μπλε γραμμή). Μετά από αυτό το διάστημα, η μάζα του όγκου μπορεί να αυξηθεί ξανά, αλλά τώρα σε απομακρυσμένα δευτερεύοντα όργανα

(διακεκομμένες κόκκινες γραμμές). b . κυτταρικός λήθαργος. c . Ο αγγειογενής λήθαργος προκύπτει από την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αγγειογόνων παραγόντων (όπως αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF και θρομβοσπονδίνη TSP, αντίστοιχα). d . Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όγκου διατηρούνται σε μικρούς αριθμούς (υποκλινικά) από ένα ενεργό ανοσοποιητικό σύστημα. [Julio A. Aguirre-Ghiso et al., Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, Nature Rev., Cancer 7, 834-846 (2007)]

Ο λήθαργος, λόγω ανόμοιων τοπικών αλλοιώσεων, διάχυτων κυττάρων όγκου ή μικρομεταστάσεων αναφέρεται στην παύση της εξέλιξης του καρκίνου και στην απουσία κλινικών συμπτωμάτων μετά τη θεραπεία της πρωτοπαθούς βλάβης [167][168].

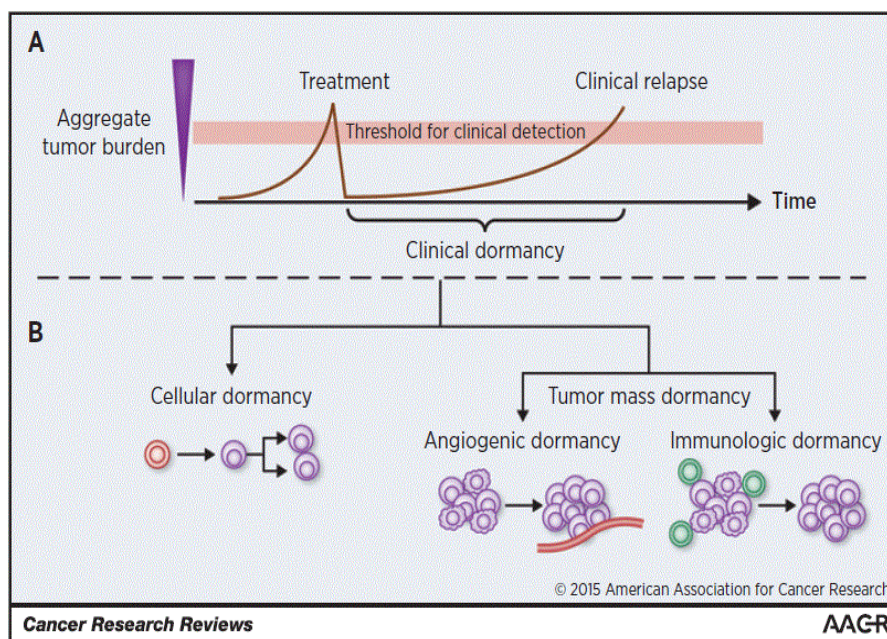
Στην περίπτωση των DTCs ή των μικρομεταστάσεων, στους τελικούς τους προορισμούς (για παράδειγμα, μυελός των οστών, λεμφαδένες, πνεύμονες ή ήπαρ), αυτά τα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητά τους να μπορούν να συνεχίσουν να αναπτύσσονται. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένας λόγος για αυτό μπορεί να είναι ότι η διάδοση μπορεί να συμβεί πολύ νωρίς από μη-επεμβατικές βλάβες [160][165]. Μελέτες που χρησιμοποιούν συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (CGH, Comparative genomic hybridization) έχουν δείξει ότι η πρόωμη διάδοση κυττάρων όγκου μαστού με περιορισμένες γενετικές ανωμαλίες μπορεί να ακολουθείται από συστηματική πρόοδο και μικροεξέλιξη. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι, οι υπάρχουσες γενετικές ανωμαλίες στη διαγνωσμένη μεταστατική νόσο εμφανίζουν ομοιογένεια, κάτι που σημαίνει ότι οι μεταστάσεις μοιράζονται τις ίδιες γενετικές μεταλλάξεις μεταξύ των ασθενών, και η στοχαστική και παρατεταμένη φύση της μεταστατικής νόσου μπορεί να εξαρτάται από το ρυθμό με τον οποίο οι γενετικές ανωμαλίες εξελίσσονται στα πρώιμα DTCs. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι στη συντριπτική πλειονότητα των ασθενών η υποτροπή ή ο χρόνος προόδου, περίπου 5 ετών, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων, προηγείται της υποτροπής [169]. Εναλλακτικά, μια πραγματική κατάσταση λήθαργου, η οποία πιθανότατα συνεπάγεται κυτταρική ληθαργική κατάσταση του όγκου, μπορεί να παραμείνει πέραν των 5 ετών σε μερικούς ασθενείς, παρά την παρουσία πρόσθετων γενετικών μεταλλαγών στα DTCs [169]. Εάν η πρόωμη διάδοση είναι εφαρμόσιμη σε άλλους όγκους, μπορεί να εξηγηθεί ένα μέρος του χρόνου της 'ηρεμίας' της νόσου, δηλαδή μη εξέλιξης της νόσου. Ωστόσο, αυτά τα κύτταρα

πρέπει να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια του «χρόνου προόδου», ενώ φαίνεται να έχει διακοπεί η ανάπτυξή τους [170]. Αυτό υποδηλώνει ότι αν και τα μονοπάτια επιβίωσης είναι λειτουργικά, οι μηχανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη της πρώιμης αλλοίωσης είναι ανεπαρκείς για μεταστατική ανάπτυξη. Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον και το γονιδίωμα του ξενιστή ενδέχεται να επηρεάσουν τη γενετική εξέλιξη. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ογκογόνος σηματοδότηση μπορεί να μην είναι πάντα κυρίαρχη και ότι άλλα προγράμματα, όπως η σηματοδότηση του στρες ή οι περιορισμοί του μικροπεριβάλλοντος, θα μπορούσαν να ξεπεράσουν τα ογκογονικά σήματα επιτρέποντας την επιβίωση των κυττάρων του όγκου σε αδρανή κατάσταση. Είναι γεγονός ότι οι ελεύθερες νόσου περίοδοι σε ασθενείς μπορεί να διαρκέσουν περίπου από 5 έως 20-25 χρόνια, για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού [171]. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι μια παύση στην εξέλιξη της νόσου συμβαίνει συχνά και μπορεί να εξηγηθεί με διαφορετικές ληθαργικές μορφές και θα μπορούσε να είναι χαρακτηριστικό της εξέλιξης του καρκίνου. Πότε επέρχεται η ληθαργική κατάσταση και ποιοι μηχανισμοί λειτουργούν σε διαφορετικούς καρκίνους, εξακολουθεί να είναι ασαφές. Ωστόσο, οι απαντήσεις σε αυτές τις ερωτήσεις είναι πιθανότερο να βρεθούν στα υπολειμματικά καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια των περιόδων ύφεσης μετά τη χορήγηση θεραπείας ενός διαγνωσμένου καρκίνου. Η κατανόηση της αδρανοποίησης των διασκορπισμένων κυττάρων που έχουν απομείνει ή των τοπικών κυττάρων όγκου είναι ζωτικής σημασίας, καθώς οι μεταστάσεις ή οι τοπικές υποτροπές, αντίστοιχα, προέρχονται πάντοτε από αυτά τα κύτταρα.

4.2 Καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του όγκου-Μοντέλα καρκινικού λήθαργου

Τα διάσπαρτα κύτταρα όγκου, DTCs, συνήθως υποβάλλονται σε ένα μη-ορθοτοπικό μικροπεριβάλλον ιστού και η ικανότητά τους να αντιλαμβάνονται μπορεί να καθορίσει την τύχη των κυττάρων του όγκου [172]. Ως εκ τούτου, η αποτυχία επανέναρξης του πολλαπλασιασμού σε αυτές τις θέσεις μπορεί να προκύψει από σήματα στρες που έχουν ενεργοποιηθεί από ένα νέο μη επιτρεπτό μικροπεριβάλλον ή από μια θέση που ευνοεί την ηρεμία. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα που μπορούν να αναδιαμορφώσουν ή / και να αναπαραγάγουν ένα εξειδικευμένο ή ορθοτοπικό μικροπεριβάλλον που ευνοεί την επέκταση θα μπορούσαν να επαναφέρουν την ανάπτυξη [173-175]. Δεδομένα από διάφορες μελέτες που θα αναφερθούν παρακάτω,

εξάγουν το συμπέρασμα ότι η απορρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και των καρκινικών κυττάρων είναι εκείνη που θα αποφασίσει αν θα επέλθει πολλαπλασιασμός ή αναστολή ανάπτυξης [176][177]. Ορισμένες από αυτές τις μελέτες παρέχουν μηχανιστικές ενδείξεις για τον κυτταρικό λήθαργο του όγκου.



Σχήμα 4.3 Βιολογικοί μηχανισμοί της ληθαργικής κατάστασης του καρκίνου. Α. Κλινικός λήθαργος, με κατώφλι κλινικής ανίχνευσης από τη χορήγηση θεραπείας μέχρι την κλινική υποτροπή. Χωρίζεται σε Β. Κυτταρικό λήθαργο ή λήθαργο μάζας όγκου. [Albert C.Yeh and Sridhar Ramaswamy, Mechanisms of Cancer Cell Dormancy—Another Hallmark of Cancer?, Cancer Res; 75(23) December 1, 2015]

4.2.1 Κυτταρικός λήθαργος

Παρόλο που αρκετές σειρές αποδεικτικών στοιχείων έχουν καταδείξει την ύπαρξη αδρανοποιημένων καρκινικών κυττάρων, ο υποκείμενος μηχανισμός πίσω από την κυτταρική ληθαργική κατάσταση είναι ίσως ο λιγότερο καλά καθορισμένος, διότι γίνεται χαρακτηρισμός των μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων *in vivo* και αυτό παραμένει ένα σημαντικό τεχνικό εμπόδιο [163].

Η ταυτοποίηση των αδρανοποιημένων καρκινικών κυττάρων *in vivo* έχει στηριχθεί κατά κύριο λόγο στη στατική IHC, με τη χρήση χρωστικής Ki-67 ή TUNEL, η οποία παρέχει περιορισμένη εικόνα της δυναμικής διαδικασίας [178]. Πιο πρόσφατες

τεχνικές, όπως η απεικόνιση ζωντανών κυττάρων (live-cell imaging), ωστόσο, ήταν σε θέση να προσφέρουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη κινητικής σε επίπεδο μονήρους κυττάρου, σε πειραματικά μοντέλα και σε μία μελέτη που χρησιμοποιεί *in vivo* βιντεομικροσκοπία, η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονταν σε λήθαργο, παρουσιάστηκε έως 11 εβδομάδες μετά την έγχυση σε μοντέλα ποντικού με μετάσταση [179].

Κλινικές ενδείξεις κυτταρικού λήθαργου έχουν τεκμηριωθεί τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στις μεταστάσεις και έχει επίσης προταθεί ότι τα αδρανοποιημένα κύτταρα μπορεί να είναι ανθεκτικά στη θεραπεία. Σε πρόσφατη μελέτη ανάλυσης δειγμάτων ανθρώπινου ιστού από όγκο ασθενών με καρκίνο του μαστού, που υποβλήθηκαν σε neoadjuvant χημειοθεραπεία, υπήρξε σημαντικός εμπλουτισμός σε κύτταρα σε κατάσταση λήθαργου, σε δείγματα ιστών ασθενών, μετά από έκθεση σε χημειοθεραπεία συγκρινόμενα με εκείνα του ίδιου ατόμου πριν από τη θεραπεία [180]. Αν και παραμένει ασαφές αν αυτά τα κύτταρα προκλήθηκαν ή επιλέχθηκαν με χημειοθεραπεία, η μελέτη υποδηλώνει άμεση σύνδεση με τη θεραπεία των ασθενών. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των CTCs από ασθενείς, έχουν επίσης αποδείξει ότι πολλά από αυτά τα κύτταρα είναι σε ηρεμία ή έχουν περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα [181][182]. Σε μια μελέτη, η παρουσία των Ki-67 αρνητικών CTCs, που απομονώθηκαν από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού συσχετίστηκαν με την πρόοδο της νόσου και την αύξηση των επιπέδων του δείκτη του όγκου [181]. Επιπλέον, σε μια ομάδα ασθενών που είχαν υποβληθεί σε επικουρική χημειοθεραπεία και ήταν αρχικά αρνητικοί για CTCs, η επανάληψη της εξέτασης κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, αποκάλυψε την παρουσία των Ki-67 αρνητικών CTC, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κύτταρα που έχουν χάσει την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, μπορεί να είναι ανθεκτικά στη θεραπεία.

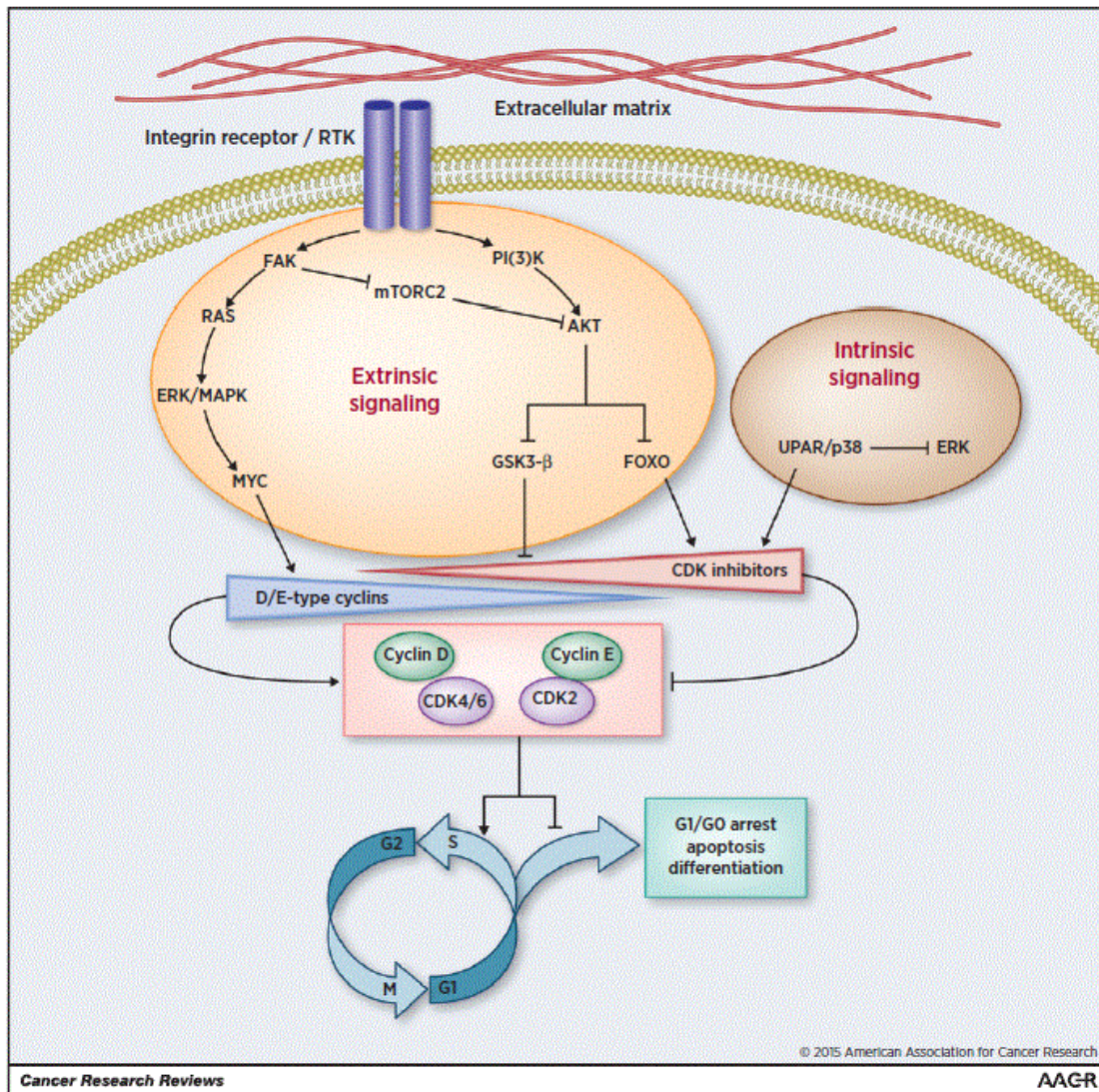
Δεδομένων των εγγενών δυσκολιών ανίχνευσης και χαρακτηρισμού μεμονωμένων κυττάρων ή μικρομεταστατικών βλαβών στον ασθενή, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η σχετική συνεισφορά διαφόρων μηχανισμών που εξηγούν τη ληθαργική κατάσταση στο κλινικό περιβάλλον. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον μηχανισμό που διέπει τον κυτταρικό λήθαργο, ωστόσο, έχουν βελτιώσει την κατανόηση για το πώς αυτό το περίπλοκο φαινόμενο μπορεί να διαδραματίσει έναν όλο και σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη των ανθρώπινων καρκίνων.

Σε αυτό το σημείο, είναι απαραίτητη μια βασική κατανόηση των οδών σηματοδότησης σε σχέση με τον κανονικό κυτταρικό κύκλο για τη σύνθεση μονοπατιών που εμπλέκονται σε αδρανοποίηση των καρκινικών κυττάρων[183].

Ενώ οι μηχανισμοί που ελέγχουν την είσοδο και την εξέλιξη διαμέσου της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο κυττάρου και το πλαίσιο, διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια πρέπει να συγκλίνουν στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων κυκλίνω-εξαρτώμενων από κινασών (CDK, cyclin-dependent kinases), οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν στην είσοδο σε S, G2 και M φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω σύνδεσης με διάφορες κυκλίνες. Τα στοιχεία που συσσωρεύτηκαν τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δείξει ότι το βασικό σημείο απόφασης για ένα κύτταρο που εισέρχεται στον κυτταρικό κύκλο, εμφανίζεται στο τέλος της φάσης G1, όπου η αποσύνδεση του παράγοντα μεταγραφής E2F από την Rb, πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος-ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, επιτρέπει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η χρονική στιγμή αυτού του γεγονότος, διέπεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυκλίνης τύπου D, CDK4/6 και CDK αναστολέων CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C και CDKN2A [183][184].

Πολλές πρόσφατες σειρές ερευνών, υποδεικνύουν ότι η απορρύθμιση των δύο πιο καλά μελετημένων μονοπατιών, ενεργοποιούμενων κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης, οι καταρράκτες σηματοδότησης RAS-MEK-ERK / MAPK και PI(3)K-AKT, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο του λήθαργου των καρκινικών κυττάρων [163][180]. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, δεδομένου ότι και τα δύο αυτά μονοπάτια ενεργοποιούν άμεσα την οδό του κανονικού κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, ο καταρράκτης κινάσης RAS-MEK-ERK/MAPK διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω σταθεροποίησης του πρωτο-ογκογονιδίου *MYC*, που κωδικοποιεί την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη και προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και που επάγει την έκφραση της κυκλίνης D1 και καταστέλλει τους αναστολείς της CDK, προωθώντας έτσι την ενεργοποίηση του CDK [35]. Με τον ίδιο τρόπο, ο άξονας σηματοδότησεως PI(3)K-AKT διευκολύνει την δραστηριότητα CDK μέσω αναστολής της κινάσης συνθετάσης γλυκογόνου 3-β, η οποία φυσιολογικά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό με αποσταθεροποίηση της κυκλίνης D και παρεμποδίζει τον πυρηνικό εντοπισμό των παραγόντων περιορισμού FOXO που ενεργοποιεί τους CDK αναστολείς, CDKN1A και CDKN1B [35].

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι έχει αποδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα με μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον άξονα PI(3)K-AKT, μπορούν ακόμη να απορρυθμίσουν αυτή την οδό όταν εισέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας, για παράδειγμα, μέσω αποικοδόμησης που προκαλείται από ουβικιτίνη [180][185]. Το γεγονός ότι υπάρχουν μηχανισμοί για την κατάργηση της υποτιθέμενης οδού που οδηγεί στη μεταλλαξιγένεση, υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο κυτταρικός λήθαργος προσφέρει ένα πλεονέκτημα στην εξέλιξη και την πρόοδο του όγκου.



Σχήμα 4.4 Τα μοριακά μονοπάτια της κυτταρικής ληθαργικής κατάστασης.[Albert C.Yeh and Sridhar Ramaswamy, Mechanisms of Cancer Cell Dormancy—Another Hallmark of Cancer?, Cancer Res; 75(23) December 1, 2015]

4.2.2 Αγγειογενετικός λήθαργος

Η υπόθεση ότι οι όγκοι εξαρτώνται από το σχηματισμό νέων αγγείων για να διατηρήσουν την ανάπτυξή τους αναπτύχθηκε στη δεκαετία του 1970, προκαλώντας αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανόηση του μηχανισμού πίσω από την αγγειογένεση [186]. Όταν μια αυξανόμενη μάζα όγκου εκτείνεται πέραν των 1 έως 2 mm, βασίζεται στον σχηματισμό νέων αγγειακών στρωμάτων για την επίτευξη επαρκούς οξυγόνου και θρεπτικού συστατικού για την ανάπτυξη προκαλώντας έκφραση του επαγόμενου από υποξία παράγοντα-1, hypoxia inducible factor-1 [187-189]. Αυτός ο περιορισμός έχει αναφερθεί ως επεξηγηματικό μοντέλο για το πώς οι μικροσκοπικοί θύλακες κακοήθων κυττάρων μπορούν να παραμείνουν κλινικά μη ανιχνεύσιμοι για χρόνια, πριν από έναν ‘αγγειογόνο διακόπτη’ που ρυθμίζεται από μια ισορροπία μεταξύ των προ- και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, που παράγονται από τον όγκο και το μικροπεριβάλλον του [31, 39]. Ένας καινοτόμος αυτού του μοντέλου, ο Judah Folkman, πρότεινε ότι τα ανθρώπινα σώματα διατηρούν συνεχώς μικρούς όγκους υπό έλεγχο, εμποδίζοντας έτσι την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν νέο απόθεμα αίματος [39].

Συγκεκριμένα, ο Folkman, επικαλείται τον όρο ‘αγγειογονική νάρκωση’ ως έναν τρόπο να εξηγήσει την ασυμφωνία μεταξύ της υψηλής συχνότητας των ανιχνευόμενων όγκων μαστού, προστάτη και θυρεοειδούς που βρέθηκαν στην αυτοψία και του χαμηλού ποσοστού με το οποίο αυτοί οι καρκίνοι καθίστανται κλινικά σημαντικοί σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, οι μικροσκοπικοί και μακροσκοπικοί όγκοι που είχαν χρωματιστεί με δείκτη ενδοθηλιακών κυττάρων, έδειξαν ότι μεγάλοι όγκοι είχαν καλά οργανωμένες αγγειακές δομές, ενώ οι μικροί όγκοι είχαν μόλις, λίγα μικρά αγγεία [31].

Υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο στοιχείων που αποδεικνύουν το μηχανισμό της αγγειογενετικής νάρκωσης σε μοντέλα ποντικών μέσω της εξέλιξης των αναπτυσσόμενων μαζών των όγκων [163],[189-191]. Ωστόσο, ο ρόλος του αγγειογενετικού λήθαργου, στην μεταστατική αδρανοποίηση είναι λιγότερο πειστικός. Τα πειράματα απεικόνισης ζωντανών κυττάρων των μεταστατικών μοντέλων που χρησιμοποιούν καρκινικά κύτταρα με σήμανση GFP στον ασθενή, έχουν δείξει ότι τα CTCs, πιθανόν αρχικά διασπείρονται και αναπτύσσονται σε ένα πλούσιο σε οξυγόνο περιβάλλον κοντά στα ενδοθηλιακά αγγεία, κάτι που υποδηλώνει

ότι ο λήθαργος σε επίπεδο μονήρους κυττάρου, πρέπει εξηγείται από κάποιο άλλο μηχανισμό [192].

4.2.3 Ανοσολογικός λήθαργος

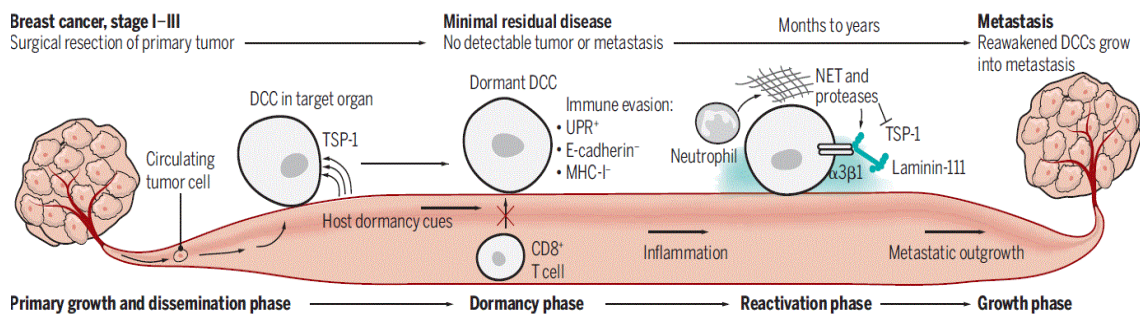
Ο ρόλος της ανοσίας στη διαμόρφωση της ανάπτυξης του καρκίνου, που υποβλήθηκε αρχικά από τον Ehrlich στις αρχές της δεκαετίας του 1900 και αναπτύχθηκε περαιτέρω αρκετές δεκαετίες μετά από τους Burnet και Thomas [193], έχει επανεξεταστεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια [194][195].

Ένα σύγχρονο μοντέλο που εξηγεί το ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στην εξέλιξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία τριών σταδίων: Εξάλειψη (Elimination), όπου τα καρκινικά κύτταρα αναγνωρίζονται και εξαλείφονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, Ισορροπία (Equilibrium), μια λιγότερο καλά καθορισμένη διαδικασία όπου το ανοσοποιητικό σύστημα ελέγχει αλλά δεν εξουδετερώνει πλήρως την κακοήγη ανάπτυξη και η Διαφυγή (Escape), όταν οι όγκοι που βρίσκονται σε λιγότερο ανοσογόνο κατάσταση δεν είναι πλέον ευαίσθητοι στην ανοσολογική παρακολούθηση [194]. Οι υποστηρικτές του ανοσολογικού λήθαργου, εργάστηκαν για την αποσαφήνιση του ρόλου της φάσης της ισορροπίας στην εξέλιξη του καρκίνου και πολλαπλές σειρές αποδείξεων σε μελέτες με ποντικούς που αποσκοπούσαν στην κατανόηση αυτής της φάσης, έδειξαν ότι η έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία μπορεί κρατήσει έναν αυξανόμενο όγκο υπό έλεγχο [196][197].

Η μετάδοση του καρκίνου από τους δότες μεταμόσχευσης οργάνων σε παραλήπτες, έχει αναφερθεί ως ένδειξη ανοσολογικού λήθαργου στην κλινική ρύθμιση [194]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, περίπτωσης μεταστατικού μελανώματος, αναπτύχθηκε 1 έως 2 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση σε δύο δέκτες του αλλομοσχεύματος, που έλαβαν τα νεφρά από τον ίδιο δότη που είχε υποβληθεί σε θεραπεία για πρωτοπαθές μελάνωμα 16 χρόνια πριν από το θάνατό του και θεωρήθηκε απαλλαγμένος κατά τη δωρεά οργάνων [198]. Αρκετές άλλες μελέτες κακοήθους μελανώματος σε αποδέκτες αλλομοσχεύματος επιβεβαιώνουν αυτήν την παρατήρηση [199-201]. Σε μια άλλη μελέτη που αναφερόταν σε παιδιατρική οξεία μυελογενή λευχαιμία, η τάση για υποτροπή σε ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία, με ή χωρίς αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών, συσχετίστηκε έντονα με τα επίπεδα CD8 + T λεμφοκυττάρων κατά των όγκων [202]. Οι ασθενείς με ύφεση είχαν ανιχνεύσιμα

κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, CTLs (cytotoxic T lymphocytes) κατά του όγκου μετά από επαγωγή και κανένας από αυτούς τους ασθενείς δεν υπέστη υποτροπή, με χρόνο παρακολούθησης έως 74 μήνες. Από την άλλη πλευρά, 7 από τους 8 ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα αντικαρκινικά CTLs, εμφάνισαν υποτροπή σε χρόνο από 2 έως 17 μήνες μετά τη θεραπεία.

Δεδομένων των εκτεταμένων κλινικών ευρημάτων για τους ασθενείς μετά την μεταμόσχευση με επαγόμενη ανοσοκαταστολή, κάποιος θα έκανε την πρόβλεψη ότι τέτοιοι ασθενείς έχουν υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης ευρέος φάσματος τύπων καρκίνου, καθώς διακυβεύεται η έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία. Ωστόσο, σε δύο μεγάλες μελέτες που έλαβαν μέρος περισσότεροι από 40.000 συνδυασμένοι ασθενείς, υπήρξε μόνο σημαντική αύξηση των καρκίνων που σχετίζονται με ιούς και καμία αύξηση του ποσοστού των κοινών καρκινωμάτων, όπως ο πνεύμονας, ο μαστός, ο προστάτης και το κόλον [203][204]. Παραμένει ασαφές ποιες κυτταρικές διεργασίες διέπουν αυτές τις κλινικές παρατηρήσεις, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει τόσο προ-πολλαπλασιαστικές όσο και αντί-πολλαπλασιαστικές λειτουργίες στην εξέλιξη του όγκου [205].



Σχήμα 4.5 Τα DTCs σε ληθαργική κατάσταση, διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος και επάγουν τη διαδικασία της μετάστασης. Τα DTCs διακόπτουν την έκφραση της e-cadherin, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της ρύθμισης της πρωτεΐνης UPR (unfolded protein response), το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη ρύθμιση του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας-I και την διαφυγή από τα CD8+ T λεμφοκύτταρα. Η φλεγμονή μπορεί να στρατολογήσει ουδετερόφιλα για να παράγει NETs, εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων που συνδέουν καρκινικά κύτταρα (Neutrophil extracellular traps) και αυτό προκαλεί την επαγόμενη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α3β1, που διακόπτει στην εσωκυτταρική προσκόλληση και ενεργοποιεί τα αδρανή DTCs που

πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν μετάσταση. [Julio A. Aguirre-Ghiso, How dormant cancer persists and reawakens, Insights reveal possible avenues to prevent metastasis, 28 September 2018, vol 361 issue 6409, sciencemag.org]

4.3 Το γονίδιο *NR2F1*

Το *NR2F1* είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας της υποοικογένειας 2, ομάδας F και μέλος 1 (nuclear receptor subfamily 2 group F member 1). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο δρα σαν ομοδιμερές και συνδέεται στην επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 5'-AGGTCA-3'. Ανωμαλία σε αυτό το γονίδιο σχετίζεται με διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στη θέση 15. Άλλες πιθανές ονομασίες του γονιδίου είναι οι εξής : BBSOAS, COUP-TFI, COUPTF1, EAR-3, EAR3, ERBAL3.

Η μετάσταση, όπως προαναφέρθηκε, είναι μία διαδικασία που προκαλείται από τα διασκορπισμένα καρκινικά κύτταρα (DTCs), τα οποία μπορεί να είναι σε αδράνεια για χρόνια πριν την επανενεργοποίησή τους. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι το *NR2F1* εκφράζεται σε περιπτώσεις αδρανών μοντέλων ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, καθώς επίσης και σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη με ανενεργή νόσο για διάστημα 7-18 χρόνια. Η σίγαση του *NR2F1* εξαρτάται από τους υποδοχείς *SOX9*, *RARβ* και *CDK*. Το *NR2F1* επιφέρει καθολική καταστολή της χρωματίνης και ενός μεταγραφικού παράγοντα που συνεισφέρει στην αδράνεια των DTCs στο μυελό των οστών. Όταν το *NR2F1* μπλοκάρεται *in vivo*, επέρχεται αναστολή της ανάπτυξης ή διακοπή της επιβίωσης των αδρανών DTCs σε διάφορα όργανα. Συμπερασματικά το *NR2F1* έχει κομβικό ρόλο στην επαγωγή του λήθαργου και στην συντήρηση αυτής της κατάστασης, ενσωματώνοντας επιγενετικά προγράμματα σίγασης και επιβίωσης των DTCs.

Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών διαγνώστηκαν με καρκίνο που προήλθε από υπολειμματικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία είχαν την ικανότητα αναζωπύρωσης τοπικά ή επανεμφάνισης σε απομακρυσμένο όργανο [206]. Η ικανότητα των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο, να επιμείνουν και επίσης να καλυφθούν μεταξύ της ηρεμίας και της διάδοσης μπορεί να είναι αποτέλεσμα επαναπρογραμματισμού επιγενετικών μηχανισμών [207]. Ωστόσο,

μηχανισμοί που ταυτοποιούν ληθαργικά κύτταρα που αναπτύσσονται είναι μη διαθέσιμοι.

Ανάμεσα στα άλλα γονίδια που φέρουν την υπογραφή της ληθαργικής κατάστασης [208-210], ταυτοποιήθηκε και το *NR2F1*, ένας νουκλεϊκός υποδοχέας όπως προειπαμε, που επιφέρει όρια στα επαναπρογραμματισμένα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και ρυθμίζει στοιχεία που δρουν βελτιωτικά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων στον άνθρωπο [211]. Αυτές οι διαδικασίες και το γονίδιο *NR2F1*, όπως έδειξαν κλινικές έρευνες, συνδέονται σε μία ενδιάμεση μετατροπή, ανάμεσα στην νέκρωση των καρκινικών κυττάρων και στη διάδοση. Επιπλέον, υπερέκφραση του *NR2F1* βρέθηκε ότι σχετίζεται με μακρά διαστήματα ελεύθερα νόσου μετά από ορμονική θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη [212]. Με αυτόν τον τρόπο, αλλαγές στα επίπεδα του γονιδίου σε πρωτοπαθείς όγκους ίσως επηρεάζουν την μοίρα των καρκινικών κυττάρων που έχουν απομείνει.

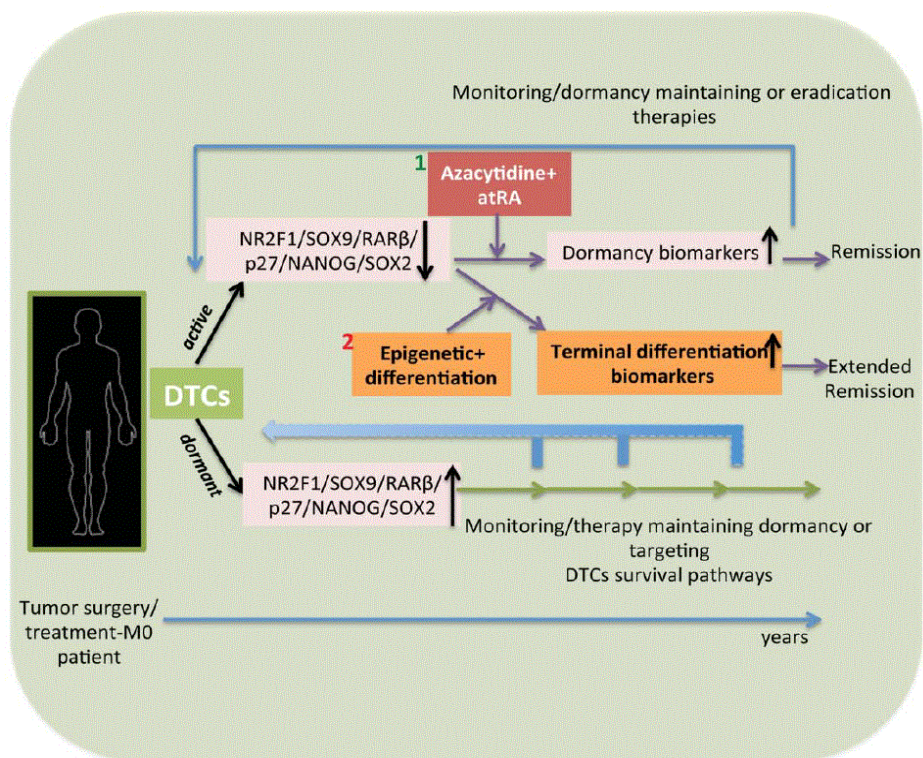
Κλινικές μελέτες αποδεικνύουν ότι το *NR2F1* συντονίζει τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων που έχουν υποστεί σίγαση και επίσης την εαυτό-ανανέωση των αρχέγονων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (ES, Embryonic stem cells). Επίσης το γονίδιο *NR2F1* έχει αποδειχτεί ότι ρυθμίζει την συμπεριφορά των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων σε μετεγχειρητικό στάδιο σε ποντίκια, δηλαδή όπως αυτά τα κύτταρα είναι ανενεργά, προκαλεί μία ραγδαία αλλαγή από την ηρεμία στη διάδοση καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη συστηματική επανεμφάνιση. Σε περιπτώσεις κλινικών δειγμάτων από το μυελό των οστών, το γονίδιο φαίνεται να ρυθμίζει την επιβίωση των DTCs. Είναι σημαντικό ότι η αποκατάσταση της έκφρασης *NR2F1* χρησιμοποιώντας παράγοντες απομεθυλίωσης του DNA και ενεργοποίηση της σηματοδότησης του RA (Retinoic Acid), που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των ιστών [213], επαρκεί για να ανακεφαλαιώσει το πρόγραμμα ηρεμίας και να προκαλέσει αλλαγές χρωματίνης συνδεδεμένες με μια ανθεκτική ληθαργική κατάσταση [214]. Αυτά τα ευρήματα διαπερνούν το νέο υπόβαθρο στην κατανόηση των μηχανισμών του λήθαργου και ταυτοποιούν δείκτες που θα μπορούσαν να εντοπίσουν τον υπολειμματικό καρκίνο με την ικανότητα διαφυγής από τη ληθαργική κατάσταση.

Έρευνα έδειξε ότι η υπερέκφραση του *NR2F1* (*NR2F1*-high) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα αντανάκλα κατάσταση λήθαργου. Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά

καρκινώματος πλακώδους κυττάρου HER3, ενός μοντέλου πολλαπλασιασμού έναντι λήθαργου, με σκοπό την ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που μετατρέπουν τα κακοήθη κύτταρα σε αδρανή και χαρακτηρίζονται από τον λήθαργο των κυττάρων του όγκου [208],[175],[215-217].

Ένα σημαντικό εύρημα έδειξε ότι ο συνδυασμός αζακυτιδίνης και ρετινοειδών επάγει την ηρεμία των κακοήθων καρκινικών κυττάρων επαναφέροντας το πρόγραμμα γονιδίων που ρυθμίζεται από *NR2F1*. Αυτά τα ευρήματα ανοίγουν την πόρτα για την ανάπτυξη στρατηγικών που μπορούν να σταματήσουν την ελάχιστη υπολειμματική νόσο από την εμφάνιση απειλητικών για τη ζωή μεταστάσεων [218]. Το *NR2F1* είναι ένας βασικός κόμβος στο δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων και αποτελεί την υπογραφή της ληθαργικής κατάστασης του καρκίνου. Όταν εφαρμόζεται σε προφίλ έκφρασης γονιδίωντων ασθενών με καρκίνο του μαστού που είναι θετικοί στον υποδοχέα οιστρογόνων (ER+), αυτή η υπογραφή του γονιδίου προέβλεψε μεγαλύτερες χρονικές περιόδους χωρίς μεταστάσεις [211]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η υπογραφή του λήθαργου, βρέθηκε επίσης, σε αδρανή DTCs, σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που είχαν ασυμπτωματική νόσο για 7-18 έτη [219], υπογραμμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη σημασία αυτών των κυττάρων για την ανθρώπινη ασθένεια. Στο μοντέλο HNSCC, το γονίδιο *NR2F1* μειώθηκε σε πρωτοπαθείς όγκους, αλλά αυξήθηκε όταν τα κακοήθη κύτταρα του όγκου εισήλθαν στο στάδιο του λήθαργου και αποσιωπήθηκαν και πάλι μετά τη διακοπή αυτού του σταδίου. Η πλαστικότητα της έκφρασης του *NR2F1*, δηλαδή η ικανότητά του να υφίσταται τροποποιήσεις χωρίς να αποδιοργανώνεται, πρότεινε ότι οι αλλαγές στο επιγονιδίωμα των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων θα μπορούσαν να ελεγχθούν με εξωτερικά και εσωτερικά σήματα και να κατευθύνουν τη μοίρα των DTCs. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου προκλήθηκε σε όγκους προστάτη μετά από θεραπεία στέρησης ανδρογόνου [220]. Επιπλέον, το *NR2F1* αποδείχθηκε ότι περιορίζει τον επαναπρογραμματισμό των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (IPS, induced pluripotent stem cells), πιθανώς με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, κύτταρα που φτιάχνονται από ενήλικα κύτταρα του ίδιου του ασθενή και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και να χορηγηθούν σαν θεραπεία. Σε αυτές τις γραμμές, διαπιστώσαμε ότι το γονίδιο αποτελεί το κλειδί στη διατήρηση μιας συνολικά περιοριστικής χρωματίνης σε κύτταρα όγκου που είναι σε κατάσταση λήθαργου ενώ ταυτόχρονα επέτρεψε μια ενεργή κατάσταση χρωματίνης στους

υποκινητές ειδικών γονιδίων που ανήκουν στην κατηγορία αυτών που σχετίζονται με το λήθαργο, συμπεριλαμβανομένου του δικού του φυσικά, υποκινητή. Αυτό υπογραμμίζει την ύπαρξη ενός ενορχηστρωμένου επιγενετικού προγράμματος το οποίο ρυθμίζεται από το *NR2F1* και μικροπεριβαλλοντικά σημεία και οδηγεί σε λήθαργο τα κύτταρα του όγκου. Καθορίζοντας τα σημεία που ενεργοποιούν το πρόγραμμα της ληθαργικής κατάστασης και βρίσκοντας τρόπους αποκατάστασης μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για την έρευνα και τις κλινικές εφαρμογές.



Σχήμα 4.6 Πιθανά θεραπευτικά σενάρια για ασθενείς με μακροχρόνια MRD. Τα διάσπαρτα κύτταρα όγκου (DTCs) που συλλέγονται από μυελό των οστών (BM) ασθενών σταδίου M0, δεν ανιχνεύονται απομακρυσμένες μεταστάσεις, θα μπορούσαν να αναλυθούν για να προσδιοριστεί η ληθαργική ή ενεργή τους κατάσταση και να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπευτική δράση. Για παράδειγμα, αν τα DTCs φέρουν υπογραφή αδράνειας (υψηλή έκφραση *NR2F1*, *NR2F1* high / *NR2F1* targethigh), θα μπορούσαν να εφαρμοστούν είτε θεραπευτικές αγωγές που διατηρούν την ληθαργική κατάσταση, είτε θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπείες που εξαλείφουν αυτά τα κύτταρα. Εάν τα DTCs φέρουν υπογραφή οριστικής επανενεργοποίησης (*NR2F1*low / *NR2F1* targetlow), τότε η θεραπεία με αζακυτιδίνη + ATRA (alltransretinoicacids) που προτείνεται εδώ, μπορεί να χρησιμεύσει για

να μετατρέψει αυτά τα υπολειμματικά καρκινικά κύτταρα σε κύτταρα πίσω στη ληθαργική κατάσταση.[Maria Soledad Sosa, Dormancy programs as emerging antimetastasis therapeutic alternatives, Molecular & Cellular Oncology 3:1, e1029062; January 2016; © 2016 Taylor & Francis Group, LLC]

Η κατανόηση των μηχανισμών επιβίωσης των ληθαργικών καρκινικών κυττάρων μπορεί να αποκαλύψει τρόπους για να στοχευτούν εξειδικευμένα αυτά τα κύτταρα, δεδομένου του ανθεκτικού χαρακτήρα τους. Ωστόσο, η πρόκληση με αυτή την προσέγγιση, έγκειται στην εκλεκτικότητα της εξάλειψης των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο ενώ δεν θα επηρεάζονται τα μη καρκινικά κύτταρα (όπως τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα) [221]. Αυτό μπορεί να είναι εφικτό, αν εστιάσουμε στην αναγνώριση εξαρτώμενων μονοπατιών που βοηθούν στη διατήρηση της ληθαργικής κατάστασης. Θα χρειαστεί περαιτέρω χαρακτηρισμός των κυττάρων που σχετίζονται με τη κατάσταση του λήθαργου για να αποκτήσουμε γνώσεις σχετικές με τους τρόπους στόχευσης αυτού του πληθυσμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του γονιδίου NR2F1 στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Η μελέτη για τον καρκίνο του μαστού έγινε σε δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με πρωτοπαθή και μεταστατικό όγκο, από τα οποία απομονώθηκε ctDNA και CTCs. Για τον καρκίνο των ωοθηκών η μελέτη έγινε σε δείγματα καρκινικού ιστού από ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, έχει ξαναγίνει έλεγχος για το συγκεκριμένο γονίδιο στον καρκίνο του μαστού σε δείγματα μυελού των οστών, από τα οποία απομονώθηκαν διασκορπισμένα καρκινικά κύτταρα, Disseminated Tumor Cells (DTCs). Έχει ξαναγίνει έλεγχος σε δείγματα περιφερικού αίματος και καρκινικού ιστού στο εργαστήριό μας. Είναι η πρώτη φορά που γίνεται έλεγχος του γονιδίου σε δείγματα από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Κλινικά δείγματα και καρκινικές κυτταρικές σειρές

6.1.1 Κλινικά δείγματα και κυτταρικές σειρές στον καρκίνο του μαστού

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στην παρούσα εργασία είναι οι SKBR3 και MCF7. Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της κ. Τσιτσιλώνη, στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας. Η κυτταρική σειρά MCF7, χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς *ACTB* και η ενίσχυσή της έγινε σε μεγάλο κύκλο. Αυτό αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα στην περαιτέρω χρήση της σαν θετικός μάρτυρας. Επίσης, στον έλεγχο των κυτταρικών σειρών με την *ACTB*, χρησιμοποιήθηκε 0% μεθυλιωμένο δείγμα από πλακουντιακό DNA, Placental DNA Sigma καθώς και 100% μεθυλιωμένο, (Methylated Human DNA, Standard, Zymo Research Corp. USA) και 100% αραιωμένο μεθυλιωμένο δείγμα από DNA. Αυτά τα 3 δείγματα αποτελούν, μαζί με τις κυτταρικές σειρές, τους θετικούς μάρτυρες στην παρούσα εργασία, Positive Controls (PC).

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* ήταν φιαλίδια από περιφερικό αίμα ασθενών με πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό το διαχωρισμό του πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Στη συνέχεια απομονώθηκε ctDNA από το πλάσμα, ενώ από τα έμμορφα συστατικά απομονώθηκαν τα CTCs. Οι ομάδες που προέκυψαν, από τα κλινικά δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο μαστού και μελετήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου, ήταν συνολικά 25 φιαλίδια ctDNA και 53 φιαλίδια CTCs. Στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, η ομάδα που προέκυψε από τα κλινικά δείγματα ήταν 44 φιαλίδια CTCs. Επιπλέον εξετάστηκε μία ομάδα 26 φιαλιδίων από το πλάσμα υγιών ατόμων.

Όλα τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη προέρχονται από την Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΙΑΣΩ και από την Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του νοσοκομείου ΕΛΕΝΑ.

6.1.2 Κλινικά δείγματα και κυτταρικές σειρές στον καρκίνο των ωοθηκών

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στην παρούσα μελέτη είναι η IGROV-1 και η OVCAR-29. Η καλλιέργειά τους, καθώς και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου του Essen και ήταν ευγενική χορηγία της Καθ. Sabine Kasimir Bauer, στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε δείγμα 100% μεθυλιωμένο από DNA και 100% μεθυλιωμένο DNA αραιωμένο 1:20 σαν θετικοί μάρτυρες.

Τα κλινικά δείγματα όπου μελετήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1* αποτελούν μία ομάδα 61 FFPEs από πρωτοπαθή όγκο ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Τα ιστοτεμάχια ήταν μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη και ανήκουν στον ορώδη ιστολογικό υπότυπο, υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade serous ovarian cancer, HGSC). Επιπλέον, εξετάστηκε μία ομάδα 8 FFPEs, από ωαγωγούς υγιών ατόμων. Τα δείγματα αυτά ήταν ευγενική χορηγία της ενδοκρινολόγου, Καθήγητριας Αικ. Παυλάκη.

6.2 Απομόνωση γενωμικούDNA από ορό ή πλάσμα

6.2.1 Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του ελεύθερου DNA από το πλάσμα πραγματοποιήθηκε με το High Pure Viral Nucleic Acid kit, Version 16 (Roche), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για απομόνωση DNA από ορό, καθώς και από ολικό αίμα. Η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικό χώρο που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση DNA, προς αποφυγή επιμόλυνσης.

Αρχικά πραγματοποιείται λύση των εξωσωμάτων που περικλείουν το DNA, με την επώαση του πλάσματος με διάλυμα σύνδεσης και πρωτεΐνωση K. Στη συνέχεια, τα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται στις ίνες υάλου που βρίσκονται στις ειδικές στήλες. Τα

συνδεδεμένα νουκλεϊκά οξέα εκπλένονται με ένα ειδικό διάλυμα που απομακρύνει τους αναστολείς της αντίδρασης PCR που θα ακολουθήσει, δηλαδή τις πρωτεΐνες, τα άλατα και άλλα κυτταρικά συστατικά που δεν είναι καθαρά. Τελευταίο στάδιο αποτελεί η ανάκτηση του καθαρού DNA με το κατάλληλο διάλυμα έκλυσης.

6.2.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, από 15°C ως 25°C, εκτός από την πρωτεΐνάση K και την poly(A) που απαιτούν θερμοκρασία -15°C ως -25°C για τη διατήρησή τους, με την πρωτεΐνάση K να παραμένει σταθερή μέχρι και 12 μήνες. Η συσκευασία του kit περιλαμβάνει και κάποια απαραίτητα αναλώσιμα υλικά. Πρόκειται γενικά για τα εξής:

- Διάλυμα σύνδεσης
- Poly(A)
- Πρωτεΐνάση K
- Διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων
- Διάλυμα έκπλυσης
- Διάλυμα έκλυσης
- Στήλες με φίλτρο
- Σωληνάρια συλλογής

Ορισμένα αντιδραστήρια απαιτούν προετοιμασία πριν χρησιμοποιηθούν. Συγκεκριμένα, η poly(A) και η πρωτεΐνάση K χρειάζονται διαλυτοποίηση σε 5 mL και 50 μ L διαλύματος έκλυσης, αντίστοιχα. Επιπλέον, στο διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων και στο διάλυμα έκπλυσης προστίθενται 20 mL και 40 mL αντίστοιχα, απόλυτης αιθανόλης. Η προετοιμασία και για τα τέσσερα αντιδραστήρια πραγματοποιείται μία φορά, μόλις ανοιχτεί το kit.

6.2.3 Πειραματική πορεία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα εργασίας, κάθε φορά πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Σε σωληνάριο χωρητικότητας 1,5 mL προστίθενται 1250 μ L διαλύματος σύνδεσης και 50 μ L poly(A), με επακόλουθη πολύ καλή ανάδευση. Το

διάλυμα εργασίας αρκεί για 6 δείγματα. Το πειραματικό πρωτόκολλο ακολουθεί παρακάτω:

1. Σε σωληνάρια των 1,5 mL προστίθενται 200 μ L δείγματος πλάσματος, 200 μ L διαλύματος εργασίας και 50 μ L πρωτεΐνάση K. Αμέσως ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και επώαση στους 72°C για 10 min.
2. Προστίθενται 100 μ L διαλύματος σύνδεσης σε κάθε σωληνάριο και αμέσως ακολουθεί ανάδευση.
3. Μεταφέρεται με πιπέττα το περιεχόμενο των σωληναρίων στις στήλες, οι οποίες έχουν ενωθεί με ισάριθμα σωληνάρια συλλογής.
4. Φυγοκέντρηση στα 8000 g για 1 min. Απορρίπτεται το διήθημα και τα σωληνάρια συλλογής. Οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
5. Προστίθενται 500 μ L διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων στην κάθε στήλη.
6. Φυγοκέντρηση στα 8000 g για 1 min. Απορρίπτεται το διήθημα και τα σωληνάρια συλλογής. Οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
7. Προστίθενται 450 μ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
8. Φυγοκέντρηση στα 8000 g για 1 min. Απορρίπτεται το διήθημα και τα σωληνάρια συλλογής. Οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
9. Προστίθενται 450 μ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
10. Φυγοκέντρηση στα 8000 g για 1 min. Απορρίπτεται το διήθημα και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου 13000 g) για 10 s.
11. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής και οι στήλες ενώνονται με τα τελικά σωληνάρια των 1,5 mL.
12. Προστίθενται 50 μ L διαλύματος έκλυσης στην κάθε στήλη, πολύ κοντά στην επιφάνειά της.
13. Φυγοκέντρηση στα 8000 g για 1 min, οπότε εκλύεται το DNA.

Τελικά λαμβάνονται 10-20 μ L DNA κάθε φορά. Τα δείγματα φυλάσσονται σε καταψύκτη, σε θερμοκρασία -20°C.

6.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPEs

6.3.1 Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του DNA από ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, FFPEs) πραγματοποιήθηκε με το QIAamp® DNA FFPE TissueKit (QIAGEN®), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA από τομές ιστών FFPE. Η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικό χώρο που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση DNA, προς αποφυγή επιμόλυνσης.

Αρχικά η παραφίνη διαλυτοποιείται σε ξυλόλιο και απομακρύνεται από τους FFPEs. Ακολουθεί λύση του δείγματος με προσθήκη πρωτεΐνάσης K στις κατάλληλες συνθήκες αποδιάταξης και επώαση στους 90°C, ώστε να αντιστραφεί η σύνδεση της φορμαλίνης και να απομακρυνθεί η τελευταία. Στη συνέχεια το DNA προσδένεται σε μεμβράνη και διηθούνται τα συστατικά που αποτελούν επιμολυντές του. Το DNA εκπλύνεται προς απομάκρυνση όσων επιμολυντών έχουν παραμείνει και τελικά εκλούεται από τη μεμβράνη με το κατάλληλο διάλυμα έκλουσης. Το απομονωμένο DNA φυλάσσεται επίσης σε θερμοκρασία -20°C.

6.3.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, από 15°C ως 25°C, εκτός από την πρωτεΐνάση K που απαιτεί θερμοκρασία 2°C ως 8°C σε περίπτωση που η θερμοκρασία περιβάλλοντος ξεπεράσει τους 25°C. Επιπλέον, στους 2-8°C διατηρούνται οι ειδικές στήλες έκλουσης και τα σωληνάρια συλλογής που περιλαμβάνονται στο kit. Στη συσκευασία περιέχονται τα εξής αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά:

- Πρωτεΐνάση K
- Διάλυμα ATL
- Διάλυμα AL
- Διάλυμα AW1
- Διάλυμα AW2
- Διάλυμα ATE
- Σωληνάρια έκλουσης

- ο Σωληνάρια συλλογής

Τα αντιδραστήρια που απαιτούν προετοιμασία, κάθε φορά μόλις ανοιχτεί η συσκευασία του kit, είναι τα διαλύματα έκπλυσης AW1 και AW2 όπου προστίθενται 25 mL και 30 mL αιθανόλη (96-100%), αντίστοιχα. Πριν την προσθήκη της αιθανόλης αναμειγνύεται καλά το κάθε διάλυμα.

6.3.3 Πειραματική πορεία

Πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη ιζημάτων στα διαλύματα AL και ATL. Σε περίπτωση που παρατηρηθούν, ακολουθεί διαλυτοποίησή τους με θέρμανση στους 70°C, με ήπια ανακίνηση. Τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου είναι τα παρακάτω:

1. Με τη χρήση νυστεριού, περικόπτεται η περίσσεια της παραφίνης από το συσσωμάτωμα δείγματος-παραφίνης.
2. Κόβονται ως και 8 τομές πάχους 5-10 μm, σε κάθε δείγμα. Αν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίπτονται οι 2-3 πρώτες τομές.
3. Οι τομές τοποθετούνται αμέσως σε σωληνάρια των 1,5 mL και προστίθεται 1 mL ξυλόλιο σε κάθε σωληνάριο. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10 s.
4. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 min.
5. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο με πιπέττα.
6. Προστίθεται 1 mL αιθανόλη (96-100%) σε κάθε σωληνάριο και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
7. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 min.
8. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο με πιπέττα.
9. Τα σωληνάρια επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, με ανοιχτά καπάκια, για 10 min ή όσο χρειαστεί για την πλήρη εξάτμιση της υπολειπόμενης αιθανόλης.
10. Επαναδιαλύεται το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου, με προσθήκη 180 μL διαλύματος ATL. Ακολουθεί προσθήκη 20 μL πρωτεΐνης K και ισχυρή ανάδευση.

11. Επώαση σε θερμοκρασία 56°C για 1 h.
12. Επώαση σε θερμοκρασία 90°C για 1 h.
13. Σύντομη φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείνασες σταγόνες στα καπάκια των σωληναρίων.
14. Προστίθενται 200 µL διαλύματος AL σε κάθε δείγμα και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται 200 µL αιθανόλης (96-100%) και ακολουθεί πάλι ισχυρή ανάδευση.
15. Σύντομη φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείνασες σταγόνες στα καπάκια των σωληναρίων.
16. Ενώνονται οι στήλες έκλουσης με τα σωληνάρια συλλογής. Μεταφέρεται προσεκτικά στις στήλες το κυτταρόλυμα που βρίσκεται στα σωληνάρια των 1,5 mL, τα οποία απορρίπτονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια. Αν το κυτταρόλυμα δεν πέρασε τελείως τη μεμβράνη, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση.
17. Προστίθενται 500 µL διαλύματος AW1 σε κάθε στήλη, χωρίς να διαβραχεί το χείλος του σωληναρίου συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
18. Προστίθενται 500 µL διαλύματος AW2 σε κάθε στήλη, χωρίς να διαβραχεί το χείλος του σωληναρίου συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
19. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 3 min, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της στήλης.
20. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια των 1,5 mL. Προστίθενται 20-100 µL διαλύματος ATE στο κέντρο της μεμβράνης κάθε στήλης.

21. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 min, οπότε εκλύεται το DNA.

6.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός DNA

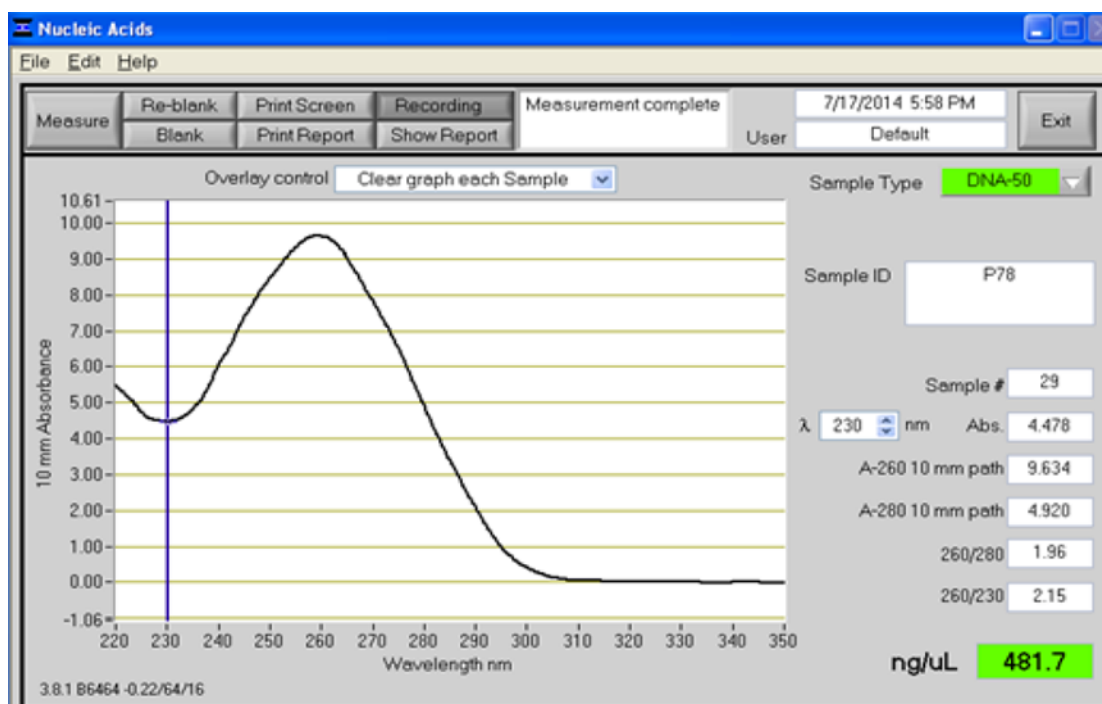
Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητάς του, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του οργάνου Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο με ευρύ φάσμα μέτρησης της απορρόφησης (220-750 nm), που απαιτεί 1 μ L δείγματος για να μετρήσει με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Είναι ειδικό για μέτρηση DNA και RNA χωρίς την ανάγκη αραιώσης των δειγμάτων, ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλές (50 X μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Δε χρειάζονται κυψελίδες, αφού το δείγμα συγκρατείται στη θέση μέτρησης μεταξύ των άκρων δύο οπτικών ινών μέσω επιφανειακής τάσης. Η μέτρηση διαρκεί 10 s, το δείγμα μπορεί να επανακτηθεί, ενώ είναι γρήγορος και εύκολος ο καθαρισμός του οργάνου μεταξύ των μετρήσεων.



Εικόνα 6.1 Φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000

Η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA γίνεται με τη μέτρηση του λόγου των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm (απορροφά το DNA) και στα 280 nm. Ο λόγος A_{260}/A_{280} θα πρέπει να έχει τιμή περίπου 1,8 οπότε το δείγμα γίνεται αποδεκτό. Αν η αναλογία είναι μικρότερη σε κάθε περίπτωση, υποδεικνύεται πιθανή παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280 nm. Για το RNA, είναι αποδεκτό η τιμή της αναλογίας να είναι περίπου 2. Το όριο ανίχνευσης του οργάνου, είναι 2 ng/ μ L.

Ακολουθεί ένα τυπικό καταγράφημα φάσματος DNA.

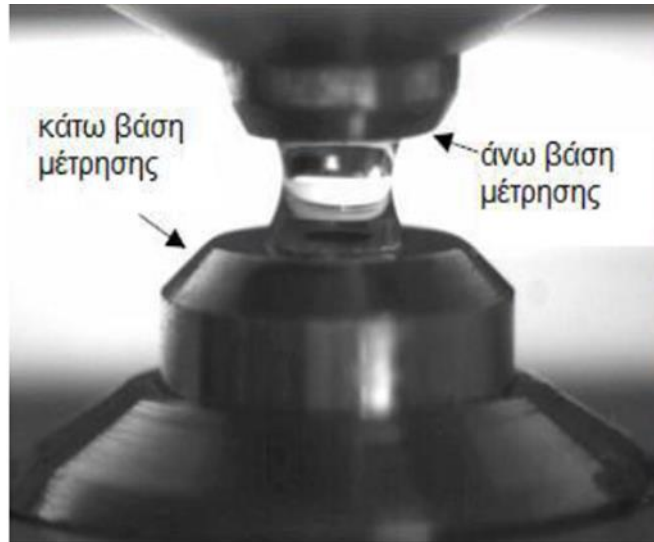


Σχήμα 6.1 Χαρακτηριστικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA

6.4.1 Πειραματική πορεία

Πριν από τη μέτρηση του DNA των δειγμάτων, χρησιμοποιείται το elution buffer από το kit της QIAGEN (το ίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA από τις παραφίνες). Το διάλυμα αυτό λειτουργεί σαν blank και τοποθετείται 1μl στην κατάλληλη θέση του μηχανήματος με σκοπό τον μηδενισμό των μετρήσεων για την εισαγωγή των νέων δειγμάτων.

Στη συνέχεια, αφού έχει γίνει ο μηδενισμός των μετρήσεων, τοποθετείται 1 μL δείγματος στην κατάλληλη θέση του οργάνου. Λόγω της επιφανειακής τάσης που αναπτύσσεται μεταξύ της ειδικής θέσης και του βραχίονα του οργάνου, το δείγμα παραμένει στη θέση.



Εικόνα 6.2 Θέση της κεφαλής και του βραχίονα του οργάνου

Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης και η ποσοτικοποίηση του δείγματος. Στη συνέχεια η θέση καθαρίζεται με απιονισμένο νερό και το όργανο είναι έτοιμο για την επόμενη μέτρηση. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων είναι απαραίτητη διαδικασία πριν τη χημική τροποποίηση του μεθυλιωμένου DNA, έτσι ώστε οι ποσότητες DNA να κυμαίνονται σε ένα κοινό επίπεδο και έχουμε μετά το τέλος της τροποποίησης, ισότιμη ποσότητα DNA στα προς μελέτη δείγματα.

6.5 Χημική τροποποίηση του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (sodium bisulfite DNA conversion)

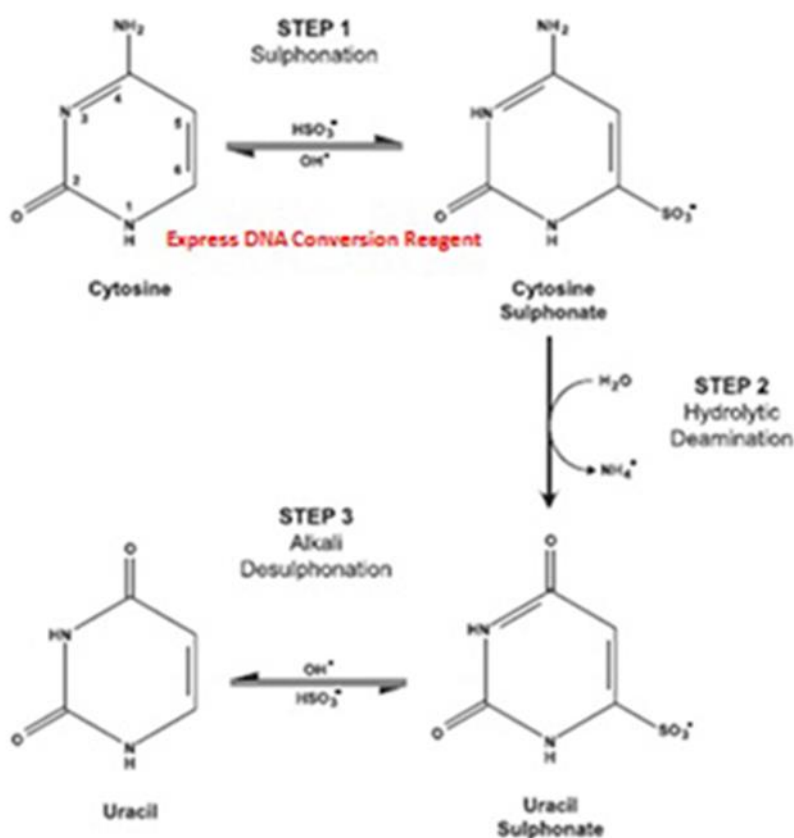
6.5.1 Αρχή μεθόδου

Η ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του μεθυλιωμένου DNA με αποτελεσματικότητα και ακρίβεια είναι πάρα πολύ σημαντική και σπουδαία στη μελέτη και στην έρευνα για τον καρκίνο, τη γονιδιακή έκφραση, τις γενετικές ασθένειες καθώς και σε πολλές ακόμα διαστάσεις της βιολογίας. Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του μεθυλιωμένου DNA, μεταξύ άλλων και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με ευαισθησία στη μεθυλίωση και τυχαία εκλεκτικότητα (methylation-sensitive

arbitrarily primed PCR). Παρόλα αυτά, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική, μέχρι και σήμερα, παραμένει η μέθοδος τροποποίησης με το όξινο θειώδες νάτριο.

Η κατεργασία του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion) συμπεριλαμβάνει τη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσίνων σε ουρακίλες μέσω υδρολυτικής απαμίνωσης. Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν κατά τη διάρκεια της κατεργασίας και δεν επηρεάζονται καθόλου. Στο τέλος της διαδικασίας, το DNA δεν είναι πλέον δίκλωνο και οι δύο κλώνοι του παύουν να είναι συμπληρωματικοί. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του conversion το μεθυλιωμένο προφίλ του DNA μπορεί να προσδιοριστεί με την μέθοδο ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μέσω της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing).

Όπως είναι λογικό, το τροποποιημένο DNA είναι πιο ευαίσθητο και ευπαθές από το μη τροποποιημένο, για αυτό παραμένει σε σημαντικά χαμηλή θερμοκρασία μετά τη χρήση του.



Σχήμα 6.2 Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στη διαδικασία του DNA conversion

Η τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο πραγματοποιήθηκε με το EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp., USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλη η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προετοιμασία της αντίδρασης και για τα ακόλουθα στάδια της μεθόδου, προς αποφυγή της επιμόλυνσης. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου κάθε φορά ήταν το καθαρό νερό (H₂O). Με τη χρήση του γίνεται ο έλεγχος της καθαρότητας των αντιδραστηρίων.

6.5.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στη συσκευασία του EZ DNA Methylation-Gold™ kit, μαζί με κάποια αναλώσιμα υλικά και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι τα εξής:

- Αντιδραστήριο μετατροπής CT (CT Conversion Reagent)
- Διάλυμα αραίωσης (M-Dilution Buffer)
- Διάλυμα διαλυτοποίησης (M-Dissolving Buffer)
- Διάλυμα σύνδεσης (M-Binding Buffer)
- Διάλυμα έκπλυσης (M-Wash Buffer)
- Διάλυμα desulphonation (M-Desulphonation Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης (M-Elution Buffer)
- Στήλες Zymo-Spin IC (Zymo-Spin IC Columns)
- Σωληνάρια συλλογής (Collection Tubes)

6.5.3 Πειραματική πορεία

Αμέσως πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι απαραίτητη η προετοιμασία του αντιδραστηρίου μετατροπής CT. Το αντιδραστήριο αυτό είναι φωτοευαίσθητο, οπότε λαμβάνονται οι απαιτούμενες προφυλάξεις. Στο σκουρόχρωμο σωληνάριο του αντιδραστηρίου προστίθενται 900 μL ύδατος, 300 μL διαλύματος αραίωσης και 50 μL διαλύματος διαλυτοποίησης. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το πειραματικό πρωτόκολλο είναι το παρακάτω:

1. Προστίθενται 130 μL αντιδραστηρίου μετατροπής CT και 20 μL δείγματος DNA σε κάθε σωληνάριο. Αν ο όγκος του δείγματος DNA είναι μικρότερος, η διαφορά

καλύπτεται με H₂O, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 150 μL. Αναμιγνύεται καλά το περιεχόμενο του σωληνάριου.

2. Όλα τα σωληνάρια τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή (Mastercycler® ergradient, Eppendorf, Germany). Το πρόγραμμα που ακολουθείται περιλαμβάνει τρία βήματα:

- 98°C για 10 min
- 64°C για 2,5 h
- 4°C για αποθήκευση, ως τις 20 h

3. Προστίθενται 600 μL διαλύματος σύνδεσης σε κάθε στήλη Zymo-Spin™ IC, που έχει τοποθετηθεί μέσα σε ένα σωληνάριο συλλογής.

4. Προστίθεται και το δείγμα στη στήλη. Με κλειστό καπάκι γίνεται περιστροφή του σωληναρίου αρκετές φορές, ώστε να αναμιχθεί καλά το περιεχόμενο.



Εικόνα 6.3 Ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler® ergradient

5. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s. Απορρίπτεται το διήθημα.

6. Προστίθενται 100 μL διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.

7. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.

8. Προστίθενται 200 μL διαλύματος desulphonation στην κάθε στήλη.

9. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (20-30°C) για 15-20 min. Μετά την επώαση, ακολουθεί Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
10. Προστίθενται 200 μL διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
11. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
12. Προστίθενται 200 μL διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
13. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
14. Η κάθε στήλη τοποθετείται μέσα σε νέο σωληνάριο των 1,5 mL. Προστίθενται 10 μL διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη, πολύ κοντά στην επιφάνειά της.
15. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s, οπότε εκλύεται το converted DNA.

Τα σωληνάρια περιέχουν το DNA που έχει μετατραπεί και φυλάσσονται σε θερμοκρασία -70°C, σε ειδικούς ψυκτικούς θαλάμους.



Σχήμα 6.4 χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (<https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>)

6.6 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων με real-timePCR

Με σκοπό της αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της χημικής μετατροπής του DNA, τα δείγματα από το DNA conversion, καθώς και ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας υπόκεινται σε διαδικασία ελέγχου ποιότητας με τη χρήση της μεθόδου Real-Time PCR. Αυτό συμβαίνει για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη, του χημικά τροποποιημένου DNA. Όπως είναι προφανές, στους θετικούς μάρτυρες τα αποτελέσματα αναμένονταν να είναι θετικά (ανίχνευση converted DNA και εν

δυνάμει ενίσχυσή του), ενώ στους αρνητικούς αναμένονταν αποτελέσματα χωρίς κανένα σήμα.

Ο έλεγχος πραγματοποιείται με εκκινητές που αναγνωρίζουν το μη μεθυλιωμένο γονίδιο αναφοράς *ACTB* και χρησιμοποιείται αποκλειστικά και μόνο σε χημικά τροποποιημένο DNA. Το γονίδιο αναφοράς ανιχνεύει το τροποποιημένο DNA είτε αυτό είναι μεθυλιωμένο είτε όχι. Ο σχεδιασμός των εκκινητών είχε επιτευχθεί από την ομάδα του εργαστηρίου μας στο λογισμικό Primer Premier 5.0 (Primer Biosoft International) . Απαραίτητες ιδιότητές τους είναι ο σχετικά μεγάλος αριθμός βάσεων θυμίνης που έχουν προέλθει από χημικά τροποποιημένες κυτοσίνες, καθώς και η απουσία CpG δινουκλεοτιδίων. Το μέγεθος του PCR προϊόντος είναι 135bp. Οι θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών είναι για τον πρόσθιο (Forward) 56.9 °C, ενώ για τον ανάστροφο (Reverse) είναι 56.6 °C.

Με σκοπό την ανίχνευση του PCR προϊόντος, έχει σχεδιαστεί από την ομάδα του εργαστηρίου μας ένας ειδικός τροποποιημένος ανιχνευτής υδρόλυσης τύπου TaqMan®, ο οποίος προσδέεται αποκλειστικά στο προϊόν και αναγνωρίζει τόσο τη μεθυλιωμένη όσο και τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία. Στον σχεδιασμό του ανιχνευτή (probe) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό με τους εκκινητές (primers). Η θερμοκρασία τήξης του ανιχνευτή είναι 65.7 °C. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης τύπου TaqMan® έχει συνδεδεμένη τη φθορίζουσα ουσία φλουορεσκεΐνη (F) στο 5' άκρο του, που εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος 530 nm. Στο 3' άκρο του έχει συνδεδεμένη μία ουσία αποσβέστη (Q), που δε φθορίζει καθόλου και εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού της φλουορεσκεΐνης, μέχρι να προσδεθεί ο ανιχνευτής στο PCR προϊόν. Ο αποσβέστης στον ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε είναι η τετραμεθυλοροδαμίνη (TMR) και είναι τύπου BBQ (Black Berry Quench). Για την παρασκευή του μείγματος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα αντιδραστήρια: άχρωμο ρυθμιστικό διάλυμα 5 X (Promega), διάλυμα MgCl₂ 25 mM (Promega), μείγμα των τεσσάρων dNTPs 10 mM (Invitrogen), διάλυμα BSA 10 μg/μL (Sigma), καθώς και η GoTaq® DNA πολυμεράση 5 U/μL (Promega).

Πίνακας 6.1 Οι αλληλουχίες των εκκινητών και ο ανιχνευτής για το γονίδιο *ACTB*

Γονίδιο	<i>ACTB</i>
Forward primer (5'-3')	GGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG
Reverse primer (5'-3')	CCAATAAAACCTACTCCTCCCT
TaqMan probe (5'-3')	F - TGTGTTTGTATTGTGTGTTGGGTGG- Q

Πίνακας 6.2 Τα συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *ACTB*

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά αντίδραση (μL)	Τελική συγκέντρωση
Απιονισμένο H ₂ O	2.94	-
Buffer (5X)	3.0	1.5X
MgCl ₂ (25mM)	1.2	3.0 mM
dNTPs (10mM)	0.2	200 μM
BSA (10 μg/μL)	0.3	0.3 μg/μL
Forward primer (10μM)	0.3	0.3 μM
Reverse primer (10μM)	0.3	0.3 μM
ProbeTaqMan (3μM)	0.66	0.2 μM
Taq DNA polymerase (5U/μL)	0.1	0.05 U/μL
DNA converted	1.0	-

*Η οργανολογία της αντίδρασης περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 6.7.1.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στη real-time PCR για το γονίδιο *ACTB* είναι το εξής:

- Ένας κύκλος στους 95°C για 2 min (denaturation)
- 45 κύκλοι στους :
 - 95 °C για 10s (Denaturation)
 - 55°Cγια 20 s (Hybridization)
 - 72°Cγια 20 s (Amplification)
- Ένας κύκλος στους 40°C για 30 s (Cooling)

6.7 Real-Time Methylation Specific PCR (MSP)

Η τεχνική MSP αποτελεί μία παραλλαγή της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και η κύρια διαφορά ανάμεσα στις δύο τεχνικές είναι ότι το δείγμα DNA που ενισχύεται στην MSP έχει, προηγουμένως, μετατραπεί χημικά με τη διαδικασία του bisulfite conversion DNA. Η διάκριση ανάμεσα στο μεθυλιωμένο και στο μη μεθυλιωμένο προϊόν βασίζεται στο σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών οι οποίοι προσδένονται στο χημικά τροποποιημένο DNA, με σκοπό να μην ενισχυθεί καθόλου γενωμικό DNA που δεν έχει μετατραπεί ή μη μεθυλιωμένο DNA προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Η προετοιμασία της αντίδρασης πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο και αποστειρωμένο χώρο με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Στο δωμάτιο αυτό βρίσκονται ειδικοί θάλαμοι (hood), οι οποίοι είναι εξοπλισμένοι με ειδικές λάμπες που εκπέμπουν UV ακτινοβολία και στόχο έχουν την αποστείρωση των πιπετών και όλων των αναλώσιμων υλικών που θα χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία της αντίδρασης της PCR. Ακόμα, στον έλεγχο για τυχόν επιμόλυνση χρησιμοποιείται και αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (negative control) που περιέχει μόνο ποσότητα από το μίγμα των αντιδραστηρίων και όχι ποσότητα δείγματος DNA. Η προσθήκη δείγματος με το DNA-στόχο, γίνεται σε διαφορετικό δωμάτιο, όπου και εκεί οι πιπέττες και τα αναλώσιμα υλικά ακτινοβολούνται με UV. Σε αυτό το χώρο προστίθεται το 1μL DNA-στόχου.



Εικόνα 6.4 Θάλαμος προετοιμασίας της αντίδρασης PCR (<https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/21291-PCR-Workstation-PCR-Hood/>)

Αυτή η τεχνική στοχ εύει στη διάκριση του μεθυλιωμένου από το μη μεθυλιωμένο προϊόν όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, καθώς επίσης αυτόεπιτυγχάνεται με το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών με στόχο την ενίσχυση του μεθυλιωμένου και χημικά τροποποιημένου DNA και μόνο. Συνεπώς, τα ζεύγη εκκινητών περιέχουν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια, καθώς και ένα μεγάλο σχετικά αριθμό βάσεων θυμίνης που έχουν προέλθει από χημικά τροποποιημένες κυτοσίνες. Οι εκκινητές που είναι κατάλληλοι για την MSP με σκοπό τη διερεύνηση του γονιδίου *NR2F1* είχαν σχεδιαστεί In Silico από την ομάδα του εργαστηρίου μας, στο λογισμικό PrimerPremier 5.0 και το μήκος του προϊόντος της PCR ήταν 146 βάσεις. Η θερμοκρασία τήξης για το πρόσθιο εκκινητή (forward) είναι 62.9°C και για τον ανάστροφο (reverse) 58.4°C.

Πίνακας 6.3 Οι εκκινητές για τη real-timeMSP για το γονίδιο *NR2F1*

Γονίδιο	<i>NR2F1</i>
Forward primer (5'-3')	CGGTGTTTTTTTCGTCGTCGTC
Reverse primer (5'-3')	CTACGAACGCCGTTTATAACG
TaqMan probe (5'-3')	6F-CCCCTAATATAACGCGATCGATAACTACC-Q

6.7.1 Οργανολογία της MSP για το γονίδιο *NR2F1*

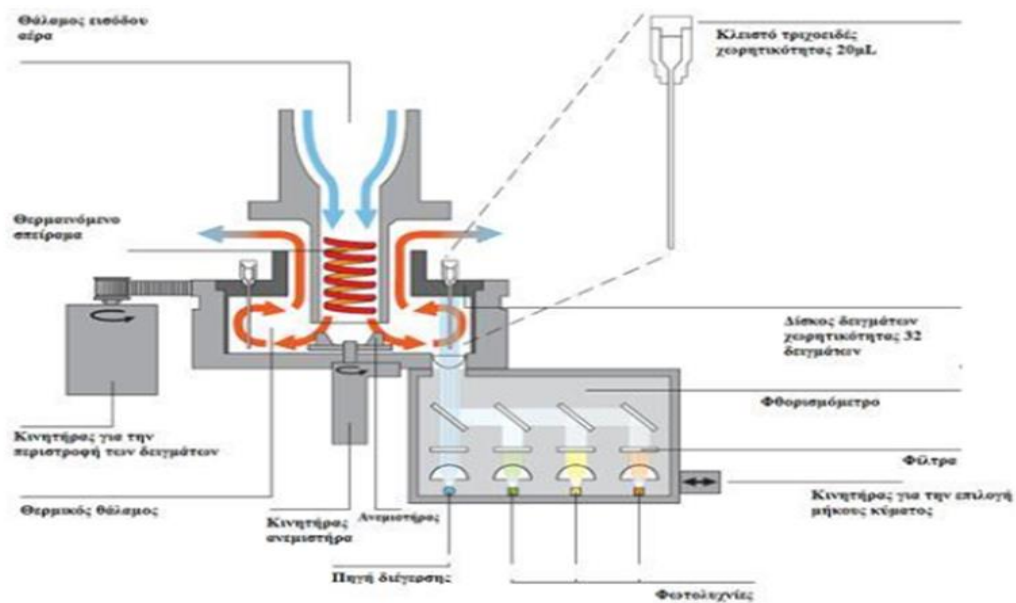
Όλες οι αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler® 2.0, της εταιρείας Roche. Η κάθε αντίδραση λαμβάνει χώρα σε γυάλινο τριχοειδές κλειστό με πλαστικό πώμα, που είναι τοποθετημένο σε σταθερή θέση στον περιστρεφόμενο δίσκο δειγμάτων. Ο μέγιστος όγκος που χωράει κάθε τριχοειδές είναι 20 µL, ωστόσο στην παρούσα εργασία ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι πάντα έως 10 µL. Πριν την τοποθέτηση των τριχοειδών στον περιστρεφόμενο δίσκο, προηγείται φυγοκέντρηση διάρκειας περίπου 3 δευτερολέπτων.

Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο και περιλαμβάνει το κατάλληλο λογισμικό (LightCycler Software, version 5.32).



Εικόνα 6.5 Όργανο Lightcycler® 2.0 (Roche)

Στο εσωτερικό του οργάνου υπάρχει η πηγή διέγερσης, μία μπλε δίοδος με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm. Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται με το φθορισμόμετρο που επίσης βρίσκεται μέσα στο όργανο, σε τρία μήκη κύματος: 530 nm (πράσινο), 645 nm (κίτρινο) και 710 nm (ερυθρό). Συνεπώς στο φθορισμόμετρο υπάρχουν τρία διαφορετικά φίλτρα και τρεις φωτολυχνίες. Η θέρμανση και η ψύξη στο θερμικό θάλαμο όπου βρίσκεται ο δίσκος με τα τριχοειδή, επιτυγχάνονται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα.



Εικόνα 6.6 Αναπαράσταση της οργανολογίας του Lightcycler

6.7.2 Συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο *NR2F1*

Με σκοπό την ανίχνευση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου έχουν σχεδιαστεί οι κατάλληλοι εκκινητές, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Για την ανίχνευση των προϊόντων σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής τύπου TaqMan® (TaqMan probe) που προσδένεται εκλεκτικά στο προϊόν και αναγνωρίζει μόνο την μεθυλιωμένη αλληλουχία.

Αυτός ο ανιχνευτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που έχει την παρακάτω αλληλουχία: 6F-CCCCTAATATAACGCGATCGATAACTACC-Q. Ο ανιχνευτής είναι τύπου TaqMan®, όπως αναφέρθηκε και έχει συνδεδεμένη τη φθορίζουσα ουσία φλουορεσκεΐνη (F) στο 5' άκρο του, που εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος 530 nm. Στο 3' άκρο του έχει συνδεδεμένη μία ουσία αποσβέστη (Q), που δε φθορίζει καθόλου και εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού της φλουορεσκεΐνης, μέχρι να προσδεθεί ο ανιχνευτής στο PCR προϊόν. Ο αποσβέστης στον ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε είναι η τετραμεθυλοροδαμίνη (TMR) και είναι τύπου BBQ (Black Berry Quench). Ο ρόλος του ανιχνευτή είναι να αναγνωρίζει και να προσδένεται στην αλληλουχία στόχο με σκοπό την αποφυγή ενίσχυσης μη ειδικού προϊόντος.

Η Taq πολυμεράση αναγνωρίζει και απομακρύνει την Φουσία από τον αποσβέστη με σκοπό την επίτευξη του φθορισμού. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου και μόνο.

Πίνακας 6.4 Τα συστατικά της αντίδρασης MSP για το γονίδιο *NR2F1*

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά αντίδραση (μL)	Τελική συγκέντρωση
Απιονισμένο H ₂ O	4.2	-
Buffer (5X)	2	1.5X
MgCl ₂ (25mM)	1	2.5 mM
dNTPs (10mM)	0.2	200 μM
BSA (10 μg/μL)	0.15	0.15 μg/μL
Forward primer (10μM)	0.18	0.18 μM
Reverse primer (10μM)	0.18	0.18 μM
Probe TaqMan (3μM)	1	0.3 μM
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	0.1	0.05 U/μL
DNA converted	1.0	-

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τη Real-TimePCR για το γονίδιο *NR2F1* έχει αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί από την διδάκτορα Μαρία Χειμωνίδου και είναι το εξής:

- 1 κύκλος στους 95 °C για 2.00 min (denaturation)
- 45 κύκλοι στους :
 - 95°C για 10 sec (denaturation)
 - 62°C για 45 sec (hybridization and amplification)
- 1 κύκλος στους 40°C για 30sec (cooling)

6.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

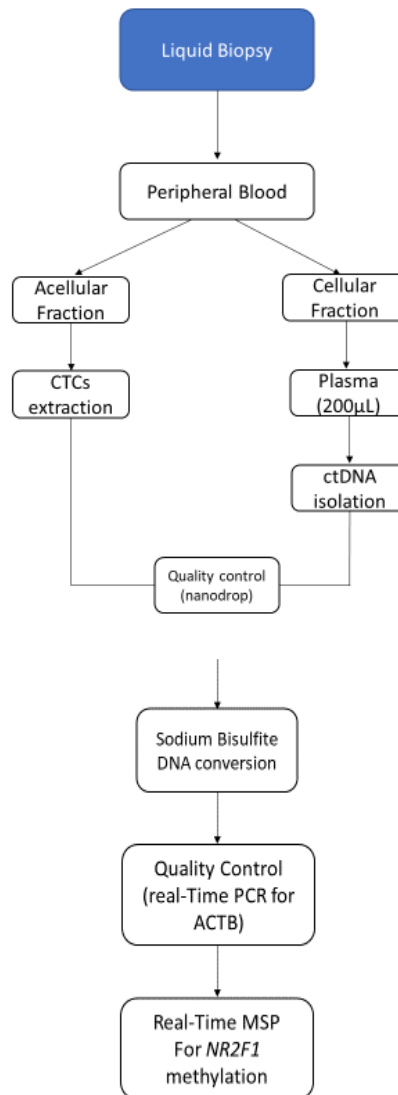
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 25.0 (IBM), ώστε να συσχετισθεί η μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η συσχέτιση έγινε με τη δοκιμασία χ^2 (pearson chisquare), όπου οι τιμές με P μικρότερο από 0,05 (P-value) αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές, για επίπεδο σημαντικότητας 95%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

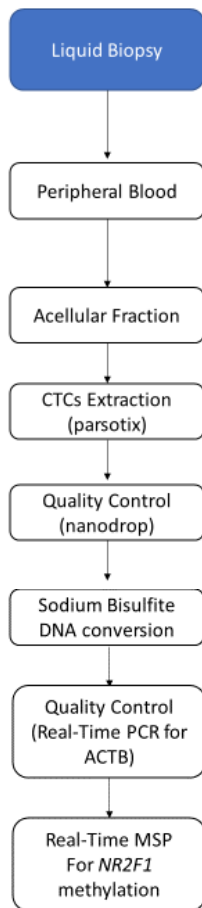
ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ *NR2F1* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

7.1 Πειραματική πορεία

Η γενική πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για τον καρκίνο του μαστού είναι η εξής:



Σχήμα 7.1 Πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή όγκο

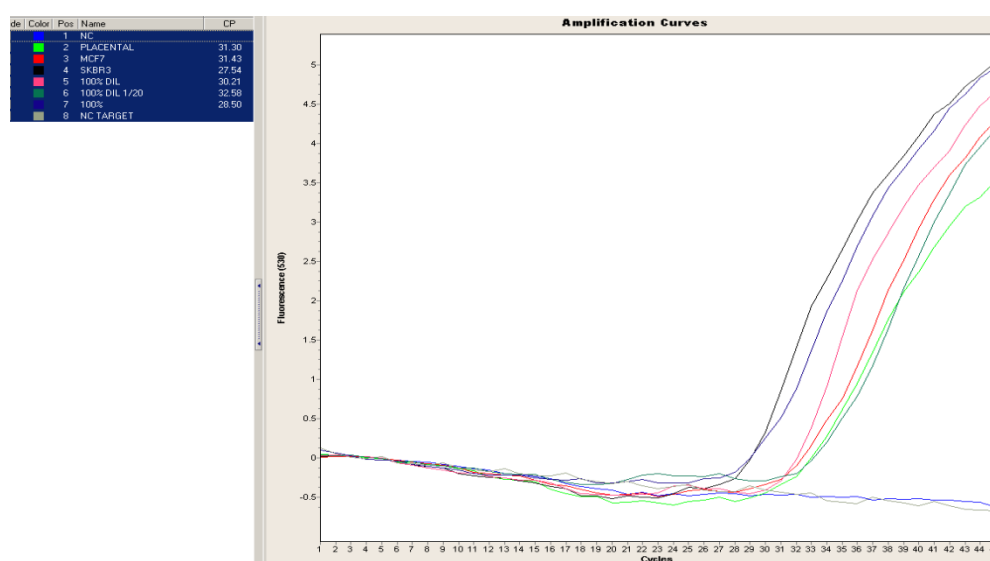


Σχήμα 7.2 Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα από ασθενείς με μεταστατικό όγκο

7.2 Μελέτη μεθυλίωσης για το γονίδιο *NR2F1*

Για να γίνει μελέτη της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου, είναι απαραίτητο πρώτα να γίνει έλεγχος ύπαρξης αυτής. Ο έλεγχος έγινε με τη χρήση κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στις real-time MSP που έγιναν. Αρχικά έγινε μελέτη της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* με τη χρήση των κυτταρικών σειρών SKBR3 και MCF7. Ως θετικοί μάρτυρες στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο DNA, το 100% αραιωμένο μεθυλιωμένο DNA (diluted), το 100% αραιωμένο μεθυλιωμένο DNA 1:20 (diluted 1:20), καθώς και το placental (0% μεθυλιωμένο). Το 100% μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκεκριμένα το Methylated Human DNA Standard (Zymo Research Corp., USA) και το placental (0% μεθυλιωμένο) ήταν δείγμα από πλακουντιακό DNA. Όπως ήταν αναμενόμενο υπήρξε ενίσχυση των 100% μεθυλιωμένων και καμία ενίσχυση του 0% (placental). Παρακάτω παρατίθεται το γράφημα του Lightcycler 2.0.

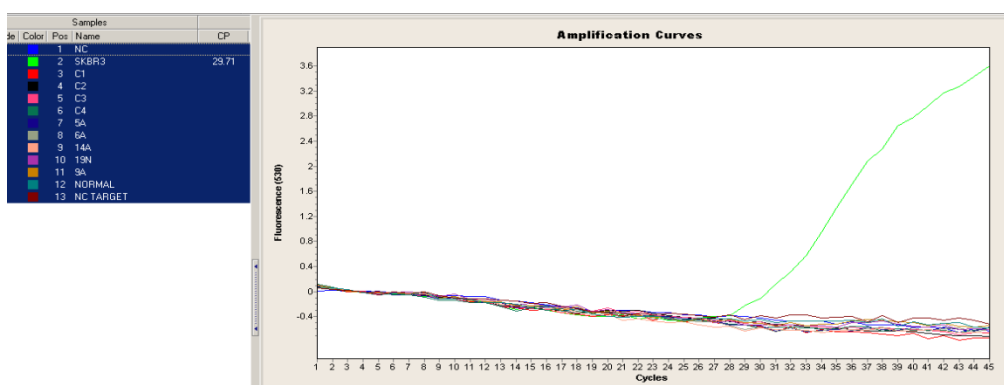
Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά στην κυτταρική σειρά MCF7 υπήρξε ενίσχυση της αλληλουχίας σε αρκετά μεγάλο κύκλο, εν αντιθέση με την SKBR3 όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα. Για τον λόγο αυτό στα επόμενα πειράματα που εφαρμόστηκε η μέθοδος σε κλινικά δείγματα, μόνο η κυτταρική σειρά SKBR3 χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας.



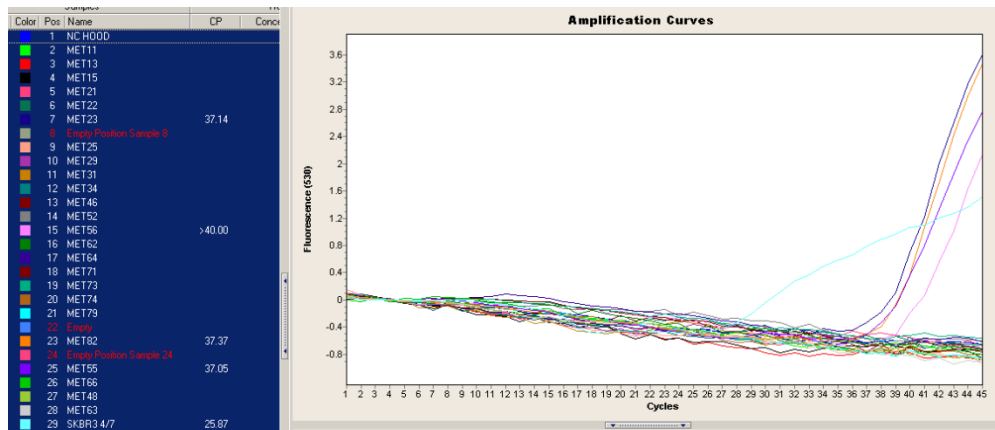
Σχήμα 7.3 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού

Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 6.7.2 για την ανάλυση των δειγμάτων από περιφερικό αίμα ασθενών με πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Η ανάλυση έγινε σε δείγματα ctDNA από πλάσμα (200μL) και σε δείγματα CTCs. Επίσης αναλύθηκε μία σειρά 26 δειγμάτων από πλάσμα περιφερικού αίματος φυσιολογικών ατόμων. Τα αποτελέσματα των κλινικών δειγμάτων δεν ήταν αρκετά σαφή από την άποψη ότι τα θετικά δείγματα δεν ήταν αρκετά ώστε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν στα δείγματα από περιφερικό αίμα ασθενών με πρωτοπαθή όγκο 5/53 CTCs, ποσοστό θετικών δειγμάτων περίπου στο 9% και στα δείγματα από περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό όγκο 7/44, ποσοστό θετικών δειγμάτων περίπου 15%. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπήρξε κανένα θετικό δείγμα ctDNA. Ίσως μία εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα να αποτελεί ο μικρός αριθμός δειγμάτων ctDNA που εξετάστηκαν.

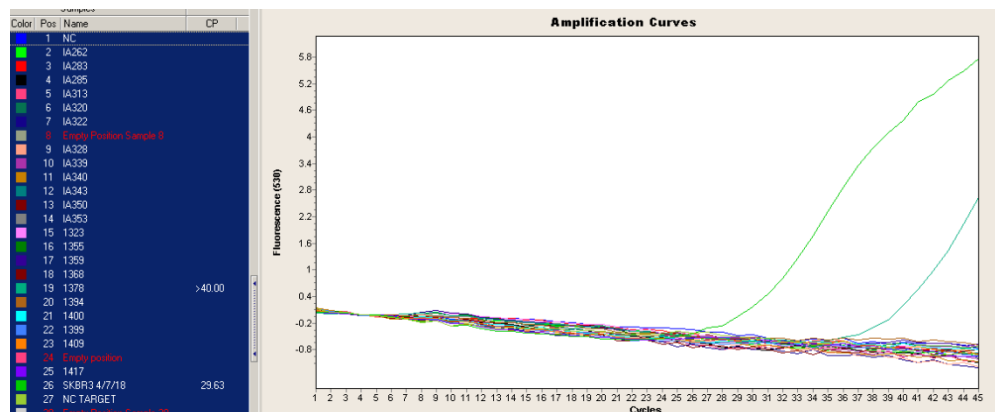
Παρακάτω παρατίθενται κάποιες καμπύλες πειραματικών αποτελεσμάτων.



Σχήμα 7.4 Καμπύλη διερεύνησης μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στα πρώτα 9 δείγματα από το πλάσμα φυσιολογικών ατόμων



Σχήμα 7.5 Καμπύλη διερεύνησης της μεθυσίας του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα από μεταστατικό καρκίνο του μαστού

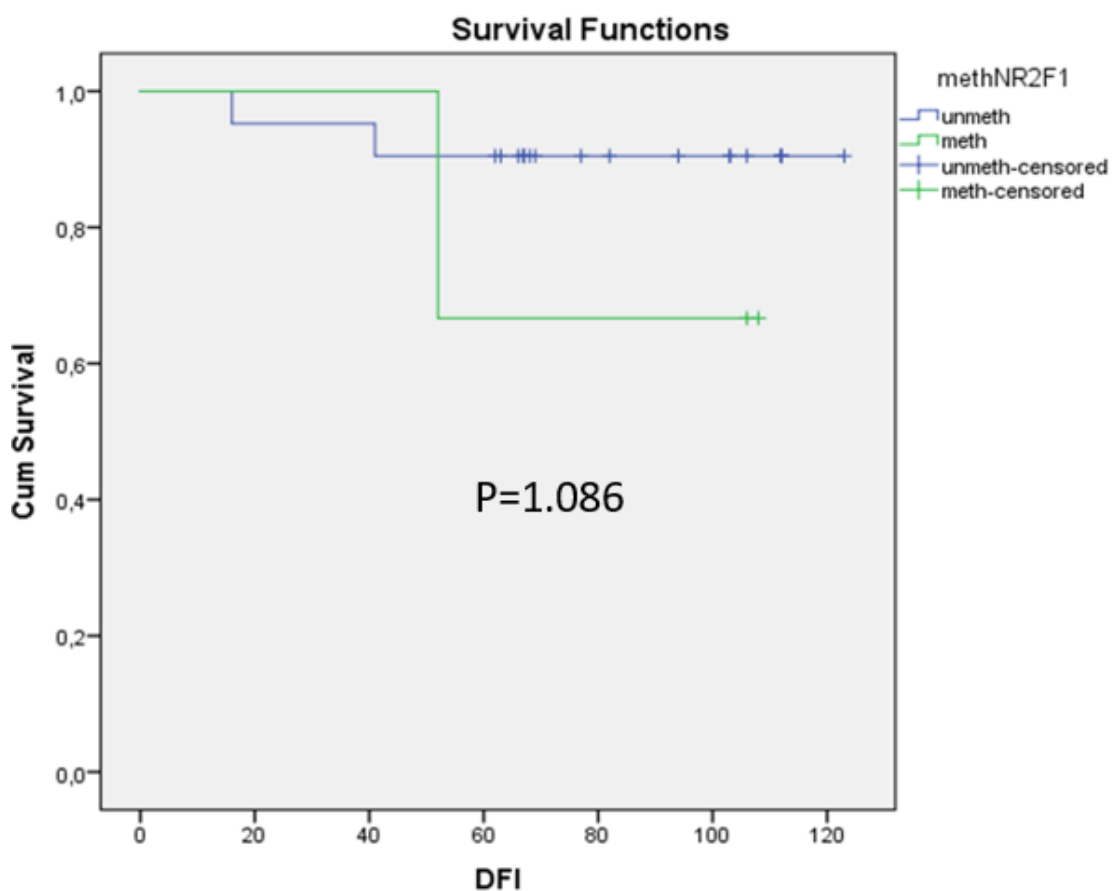


Σχήμα 7.6 Καμπύλη διερεύνησης της μεθυσίας για το γονίδιο *NR2F1* σε δείγματα από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού.

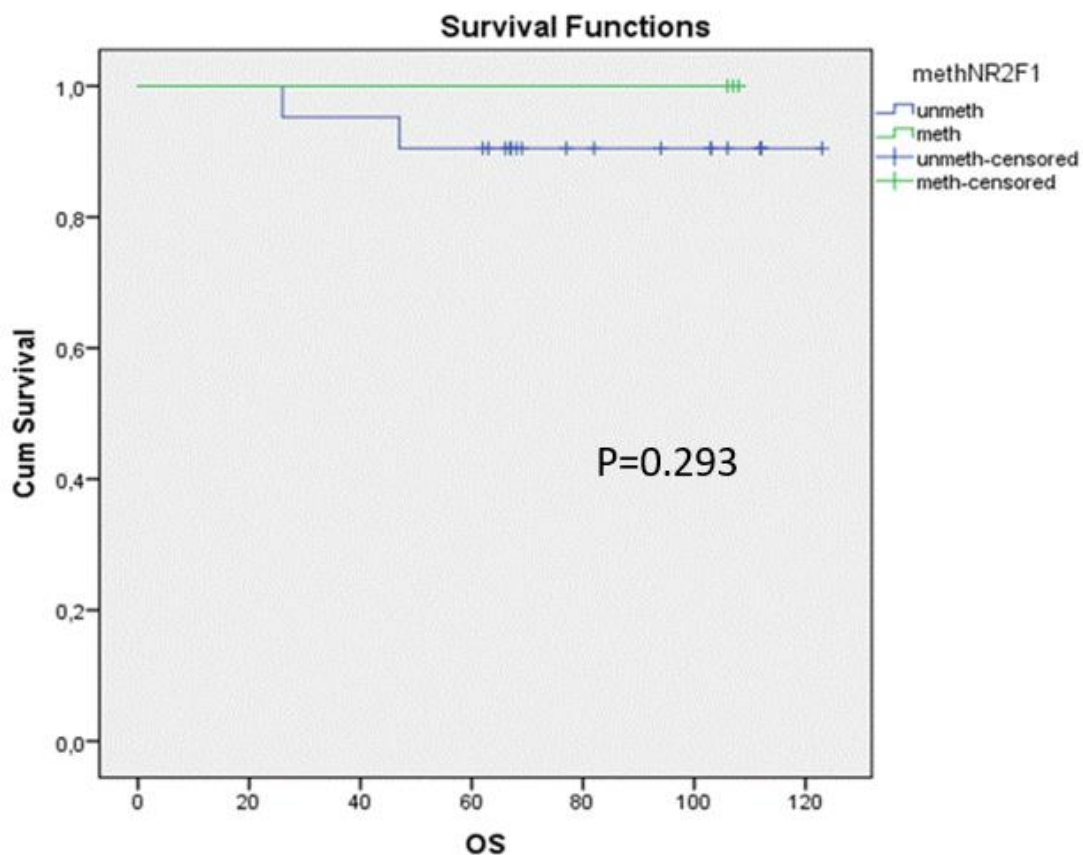
7.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 25.0 (IBM), ώστε να συσχετισθεί η μεθυσία του γονιδίου *NR2F1* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η συσχέτιση έγινε με τη δοκιμασία χ^2 (pearson chisquare), όπου οι τιμές με P μικρότερο από 0,05 (P-value) αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές, για επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Παρακάτω θα παρατεθούν οι καμπύλες συσχέτισης που όμως εμφανίζουν ένα μη ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Αυτό οφείλεται στα ελλιπή δεδομένα επιβίωσης των ασθενών. Η συσχέτιση είναι μη ικανοποιητική, αφού όπως προαναφέρθηκε πρέπει το P να είναι μικρότερο από 0,05 (P-value) και στην συγκεκριμένη περίπτωση των δειγμάτων των ασθενών με πρωτοπαθή όγκο μαστού, είναι κοντά στο 0,5. Συμπερασματικά προκύπτει ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών (P=0.5).



Σχήμα 7.7 Εκτίμηση του διαστήματος επιβίωσης χωρίς δραστηριότητα της νόσου (DFI) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων



Σχήμα 7.8 Εκτίμηση του διαστήματος ολικής επιβίωσης (OS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων

7.4 Αποτελέσματα των real-timeMSP στα φυσιολογικά δείγματα

Τα 26 δείγματα πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από πλάσμα φυσιολογικών ατόμων και εξετάστηκαν για τη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1*. Τα 25 παθολογικά δείγματα ctDNA προέρχονται όπως έχει ήδη αναφερθεί και αυτά από πλάσμα, τα 97 δείγματα CTCs από το μη κυτταρικό κλάσμα του αίματος. Επομένως ίσως το DNA από τα δύο είδη κυττάρων (CTCs και απομονώσιμων από το πλάσμα) να μην έχει συγκρίσιμο προφίλ μεθυλίωσης.

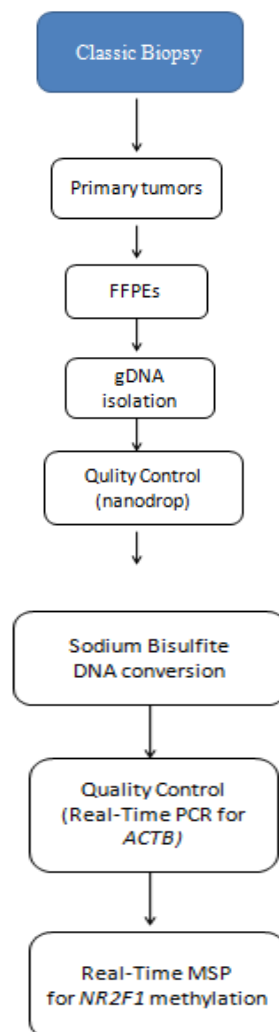
Η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* ανιχνεύτηκε σε 1/26 φυσιολογικά δείγματα. Επομένως ίσως να χρειάζεται η διερεύνηση της μεθυλίωσης σε ένα μεγαλύτερο αριθμό φυσιολογικών δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ *NR2F1* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

8.1 Πειραματική πορεία

Η γενική πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα:

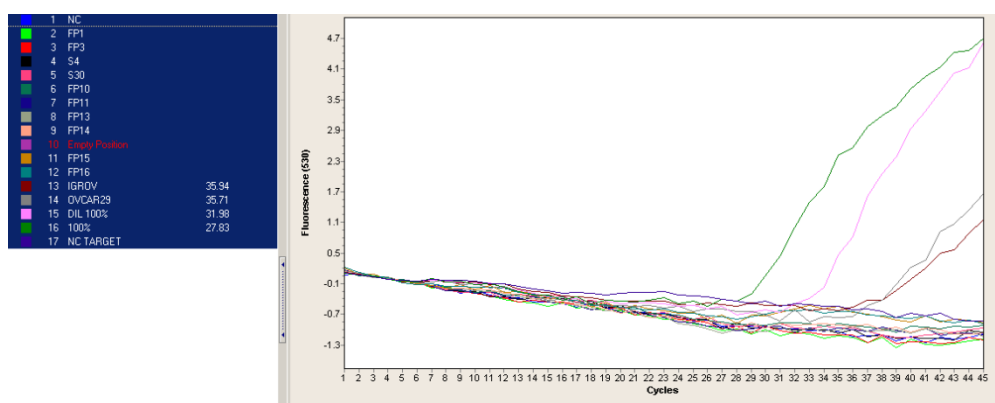


Σχήμα 8.1 Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα από ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο ωοθηκών

8.2 Μελέτη μεθυλίωσης για το γονίδιο *NR2F1*

Με σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου, όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 7.1, είναι απαραίτητο πρώτα να γίνει έλεγχος της παρουσίας της σε κυτταρικές σειρές. Ο έλεγχος έγινε με τη χρήση κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στις αντιδράσεις real-time MSP που έγιναν. Αρχικά έγινε μελέτη της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* με τη χρήση των κυτταρικών σειρών OVCAR-29 και IGROV-1. Ως θετικοί μάρτυρες στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο DNA και 100% αραιωμένο μεθυλιωμένο DNA (diluted). Το 100% μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε (Methylated Human DNA Standard, Zymo Research Corp., USA). Ενισχύθηκαν όλοι οι θετικοί μάρτυρες αλλά η κύρια διαφορά έγκειται στους διαφορετικούς κύκλους που ενισχύθηκε το κάθε ένα από τα δείγματα θετικών μαρτύρων. Το 100% μεθυλιωμένο DNA ήταν αυτό που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου μεθυλίωσης σε κλινικά δείγματα και αποτελεί τον θετικό μάρτυρα διότι ο κύκλος ενίσχυσης του ήταν στο 27 περίπου, σε αντίθεση με των υπολοίπων όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα του Lightcycler 2.0.

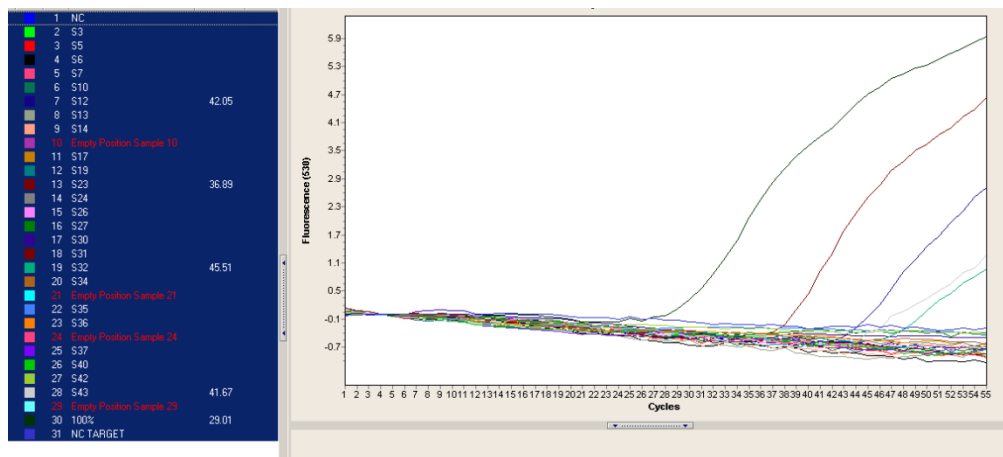
Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές με ελάχιστη διαφορά στο γράφημα. Όμως, όπως ήδη ανφέρθηκε, για λόγους αξιοπιστίας θετικού μάρτυρα, θα χρησιμοποιείται το 100% μεθυλιωμένο. Ο έλεγχος των κυτταρικών σειρών έγινε μαζί με τον έλεγχο κάποιων δειγμάτων προερχόμενων από ωαγωγούς υγιών ατόμων.



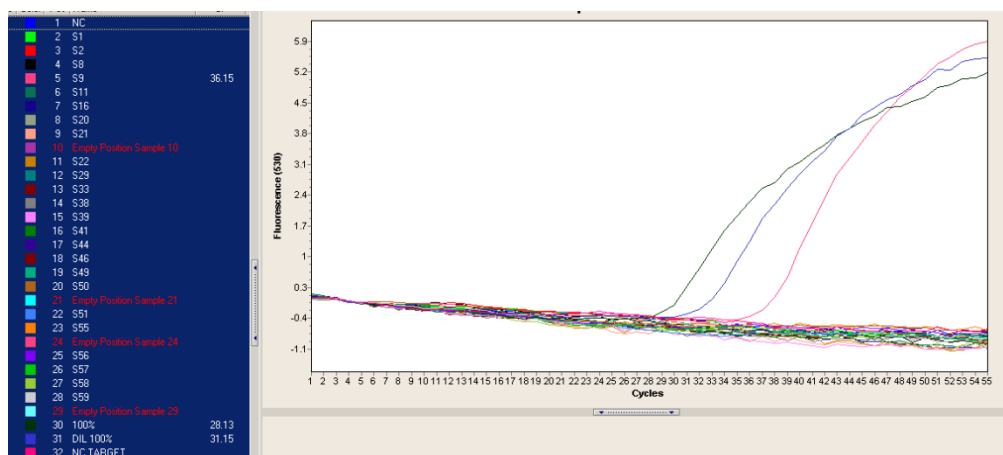
Σχήμα 8.2 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών και σε κλινικά δείγματα φυσιολογικών (* τα ενισχυόμενα δείγματα αντικατοπτρίζουν τις καμπύλες των θετικών μαρτύρων)

Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 6.7.2, για μία ομάδα δειγμάτων εγκιβωτισμένων σε κύβο παραφίνης (FFPEs) προερχόμενα από καρκινικό ιστό πρωτοπαθούς όγκου ωοθηκών. Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε ικανό αριθμό δειγμάτων FFPEs. Συγκεκριμένα 5/61 FFPEs, δηλαδή ποσοστό θετικών δειγμάτων περίπου 8%. Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, εξετάστηκε και μία ομάδα 8 δειγμάτων από ωαγωγούς υγιών ατόμων, όπου δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του γονιδίου.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες καμπύλες πειραματικών αποτελεσμάτων.



Σχήμα 8.3 Διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα από καρκινικό ιστό.



Σχήμα 8.4 Διερεύνηση μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* σε κλινικά δείγματα καρκινικού ιστού

8.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

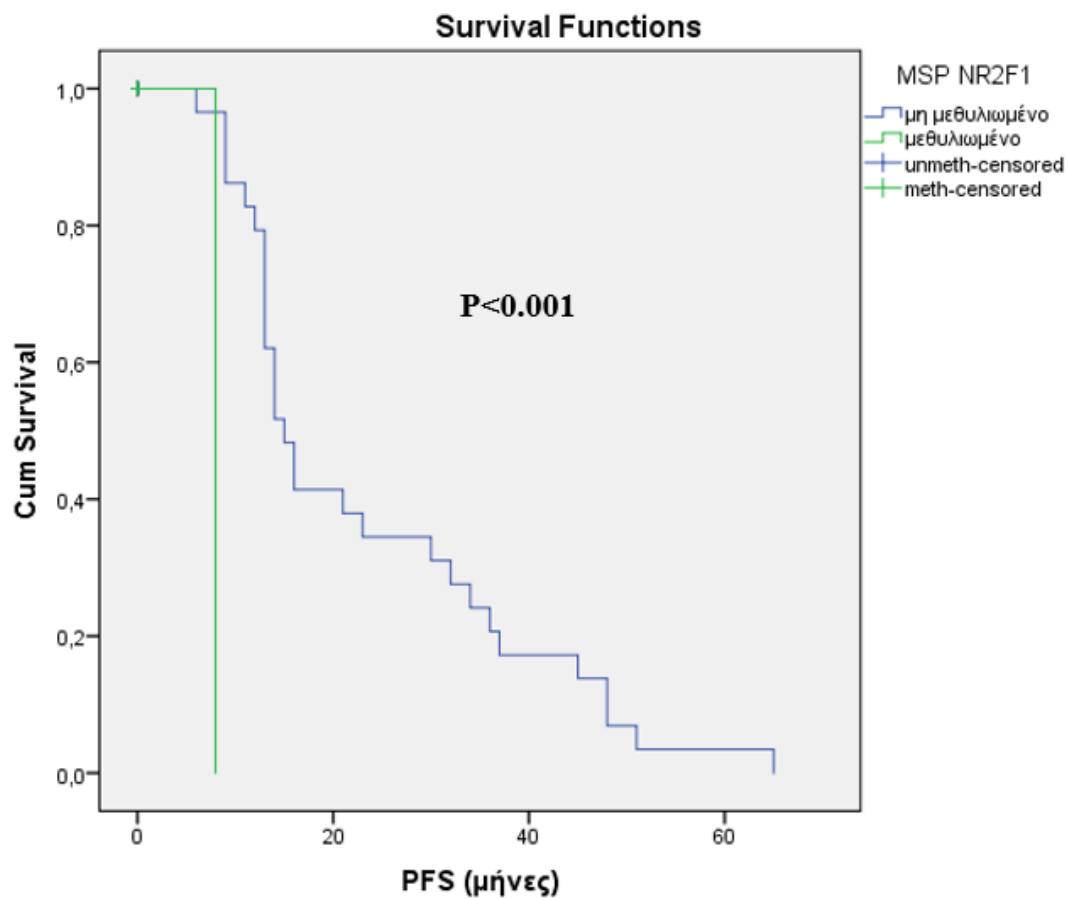
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 25.0 (IBM), ώστε να συσχετισθεί η μεθυλίωση Του γονιδίου *NR2F1* με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η συσχέτιση έγινε με τη δοκιμασία χ^2 (pearson chisquare), όπου οι τιμές με P μικρότερο από 0,05 (P-value) αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές, για επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Για τον καρκίνο των ωοθηκών τα στατιστικά αποτελέσματα είναι τα εξής:

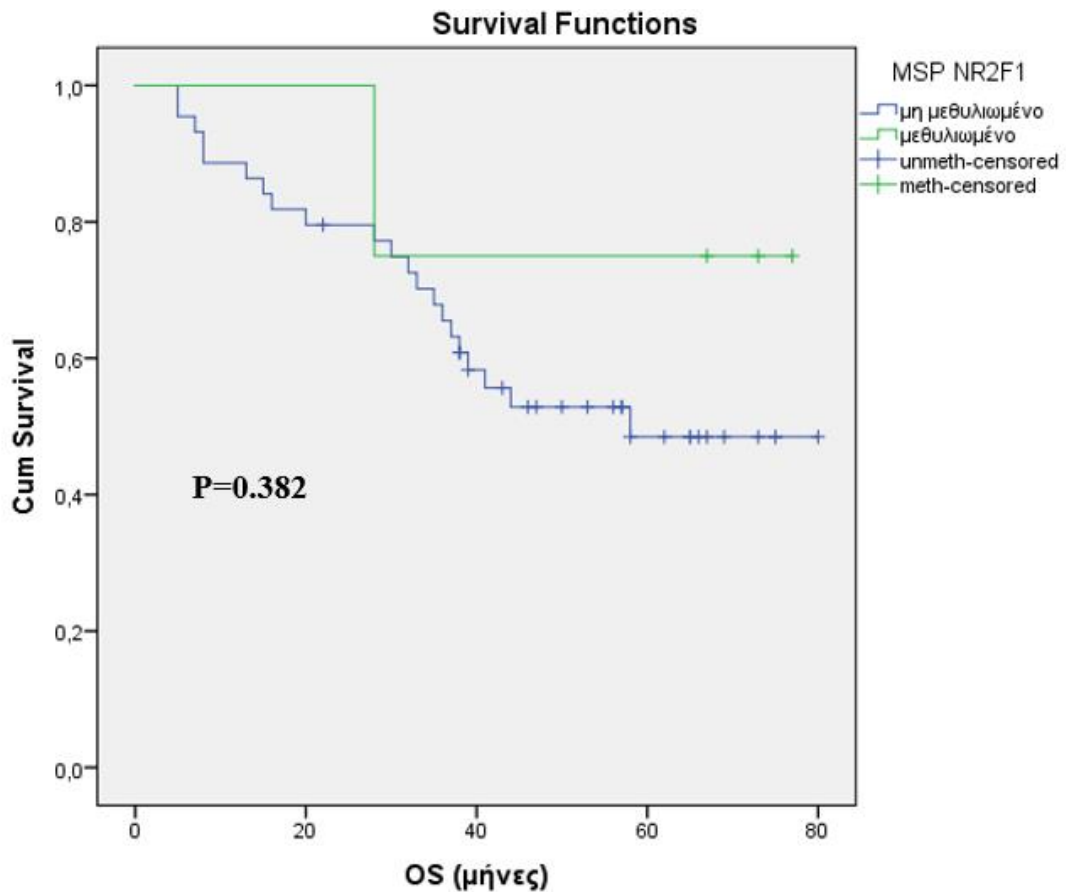
Δείγματα FFPEs πρωτοπαθών όγκων, N=61, ασθενών με HGSC καρκίνο ωοθηκών

Meth real-time MSP NR2F1: 5/61, 8.2%

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μελέτης μεθυλίωσης στην ομάδα των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα δεδομένα ολικής επιβίωσης, OS, καθώς και με τα δεδομένα του χρονικού διαστήματος επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου, PFS, με την εφαρμογή της ανάλυσης Kaplan-Meier (log-ranktest) και της παλινδρόμησης κατά Cox. Με την ανάλυση Kaplan-Meier η μεθυλίωση του γονιδίου συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένο PFS ($P < 0.001$, Σχήμα 1), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την OS ($P = 0.382$, Σχήμα 2). Με την εφαρμογή της μονοπαραμετρικής παλινδρόμησης κατά Cox, η μεθυλίωση συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένο PFS ($P = 0.018$).



Σχήμα 8.5 Εκτίμηση του διαστήματος επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (N=61)



Σχήμα 8.6 Εκτίμηση του διαστήματος ολικής επιβίωσης (OS) με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου NR2F1, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (N=61)

Ακολούθησε η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μελέτης μεθυλίωσης με real-time MSP των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων, με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (**Πίνακας 1**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών. Για την εκτίμηση του P-value εφαρμόστηκε το Fisher's Exact Test.

Πίνακας 8.1 Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Κλινικοπαθολογοανατομικά Χαρακτηριστικά	n	Μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i> (n=61)
Ηλικία		
≥64	31	2/31 (6.5%)
<64	30	3/30 (10.0%)
P-value		0.671
Βαθμός κακοήθειας (G)		
G2	26	2/26 (7.7%)
G3	35	3/35 (8.6%)
P-value		1.000
Στάδια FIGO		
I+II	7	0
III+IV	54	5/54 (9.3%)
P-value		1.000
Λεμφαδενική διήθηση (pN)		
N0	18	0
N1	27	3/27 (11.1%)
P-value		0.264
Μακρινές Μεταστάσεις (M)		
M0	53	4/53 (7.5%)
M1	8	1/8 (12.5%)
P-value		0.518
Αντίσταση στην πλατίνα		
Θετική	10	1/10 (10.0%)
Αρνητική	42	3/42 (7.1%)
P-value		1.000
Υπολειμματική νόσος (tumor rest)		
Θετική	26	3/26 (11.5%)
Αρνητική	35	2/35 (5.7%)
P-value		0.642

* σε περιπτώσεις όπου διαφέρει ο συνολικός αριθμός των ασθενών, λόγω μη διαθέσιμων πληροφοριών για τα κλινικά χαρακτηριστικά

8.4 Αποτελέσματα των real-timeMSP στα φυσιολογικά δείγματα

Τα 8 δείγματα FFPEs που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν κατά κύριο λόγο τομές στρωματικού ιστού από τους φυσιολογικούς ωαγωγούς, ωστόσο τα παθολογικά δείγματα ανήκουν στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Είναι πιθανό το DNA από τα κύτταρα των δύο ειδών ιστών να έχει διαφορετικό και μη συγκρίσιμο προφίλ μεθυλίωσης.

Δεν ανιχνεύτηκε καθόλου μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *NR2F1* σε φυσιολογικά δείγματα. Παρόλα αυτά καλό θα ήταν να εξεταστεί σε ένα μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για περισσότερα αξιόπιστα αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1* σε πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο μαστού και σε πρωτοπαθή καρκίνο ωοθηκών. Για τον καρκίνο του μαστού ελέγχθηκαν κλινικά δείγματα από το πλάσμα φυσιολογικών ατόμων και παθολογικά από το περιφερικό αίμα ασθενών. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κλάσματα από το περιφερικό αίμα τα οποία απομονώθηκαν από διαφορετικό πληθυσμό, δείγματα ctDNA, που απομονώθηκε από το πλάσμα και δείγματα CTCs που εξήχθησαν από το ακυτταρικό κλάσμα του περιφερικού αίματος. Δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση στο ctDNA και ίσως αυτό οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Στο μέλλον είναι σημαντικό να εξεταστούν δείγματα ctDNA προερχόμενα από μεγαλύτερο όγκο πλάσματος (2ml έναντι των 200 μl). Ωστόσο, υπάρχει ένα αξιόλογο ποσοστό θετικών δειγμάτων στα δείγματα CTCs τόσο σε ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο όσο και σε ασθενείς με μεταστατικό. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που μελετάται αυτό το γονίδιο σε περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού, καθώς έχει υπάρξει και στο παρελθόν μελέτη με διερεύνηση μεθυλίωσης του γονιδίου σε δείγματα μυελού των οστών (Julio et al). Όσον αφορά τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν από ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο ωοθηκών, αξίζει να αναφερθεί ότι ήταν η πρώτη φορά που έγινε διερεύνηση της μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Υπήρχε ένα ικανοποιητικό ποσοστό θετικών δειγμάτων και σημαντική συσχέτιση με το PFS .

Επίσης, θα διεξαχθεί μελλοντικά μελέτη μεθυλίωσης στα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος (N=58). Βρίσκεται σε εξέλιξη η μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων της δεύτερης ομάδας (N=66), που αποτελείται κυρίως από δείγματα ασθενών με πρόιμη νόσο (στάδια I,II). Η ομάδα που μελετήθηκε (N=61) απαρτίζεται κυρίως από δείγματα ασθενών με προχωρημένη νόσο (στάδια III,IV), όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 8-1**.

Τέλος, συμπερασματικά το μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης βρέθηκε στα κλινικά δείγματα μεταστατικού καρκίνου μαστού στα CTCs. Αυτό ίσως εξηγείται με το

γεγονός ότι το γονίδιο *NR2F1* είναι ένα γονίδιο που σχετίζεται με τον καρκινικό λήθαργο (tumor dormancy) και μπορεί να παραμείνει σε αυτή την κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί περαιτέρω η σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου αυτού, με τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερου αριθμού κλινικών δειγμάτων. Επιπρόσθετα, μπορεί να προσδιοριστεί η προγνωστική και η προβλεπτική σημασία της μεθυλίωσης, με τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με περισσότερα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως η ανταπόκριση στη θεραπεία, η συνολική επιβίωση (OS), το χρονικό διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS). Αυτό είναι και ο απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας. Να υπάρξει περαιτέρω διερεύνηση του γονιδίου τόσο σε δείγματα από καρκίνο μαστού όσο και σε δείγματα καρκίνου ωοθηκών.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ALDH1	Aldehydedehydrogenase 1
ALL	AcuteLymphocyticLeukemia
cfDNA	cellfree DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CGI	CpG Island
CHIP	Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential
CIMP	CpG Methylator Phenotype
CLL	ChronicLymphocyticLeukemia
CRC	Colorectal Cancer
CTC	Circulating Tumor Cell
ctDNA	Circulating Tumor DNA
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CUP	Cancer of UnknownPrimary
ddPCR	dropletdigital PCR
DFS	Disease Free Survival
DNMT	DNA Methyltransferase
dPCR	digital PCR
DTC	Disseminated Tumor Cell
EGFR	EpidermalGrowthFactorReceptor
EMT	EpithelialtoMesenchymaltransition
EpCAM	EpithelialCellAdhesionMolecule
ESR1	EstrogenReceptor 1
etc	et cetera
FDA	Food and Drug Administration
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Human PapillomaVirus
HR	HormoneReceptor
HR	HazardRatio
IDH	IsocitrateDehydrogenase
IHC	Immunohistochemistry

MBC	Metastatic Breast Cancer
MBD	Methylcytosine Binding Domain
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
MRD	Minimal Residual Disease
MSP	Methylation Specific PCR
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NIC	National Institute of Cancer
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
OS	Overall Survival
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PFS	Progression Free Survival
PSMA	Prostate Membrane Antigen
RFS	Relapse Free Survival
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SNV	Single Nucleotide Variant
TET	Ten-Eleven Translocation
UPR	Unfolded Protein Response
UV	UltraViolet
WHO	World Health Organization
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] National Cancer Institute, What is Cancer?, (2015).
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- [2] National Cancer Institute, Drivers of cancer, (2015).
- [3] G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber, Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape., *Nat. Immunol.* (2002). doi:10.1038/ni1102-991.
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation., *Cell.* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [5] K.G. Anderson, I.M. Stromnes, P.D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies, *Cancer Cell.* (2017). doi:10.1016/j.ccell.2017.02.008.
- [6] R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth, Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science* (80-.). (2011). doi:10.1126/science.1203486.
- [7] T. Okazaki, T. Honjo, PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application, *Int. Immunol.* (2007). doi:10.1093/intimm/dxm057.
- [8] N. L.B., The immune System, *Essays in biochemistry.*, 3 (2016) 275–301.
- [9] M. Yasunaga, Antibody Therapeutics and Immunoregulation in Cancer and Autoimmune Disease, *Semin. Cancer Biol.* (2019). doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.001.
- [10] R.R. Caspi, Immunotherapy of autoimmunity and cancer: The penalty for success, *Nat. Rev. Immunol.* (2008). doi:10.1038/nri2438.
- [11] S.M. Amos, C.P.M. Duong, J.A. Westwood, D.S. Ritchie, R.P. Junghans, P.K. Darcy, M.H. Kershaw, Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer, *Blood.* (2011). doi:10.1182/blood-2011-01-325266.
- [12] Cancer Research UK, Cancer of Unknown Primary, (2017).
- [13] T.R. Medler, D. Murugan, W. Horton, S. Kumar, T. Cotechini, A.M. Forsyth, P. Leyshock, J.J. Leitenberger, M. Kulesz-Martin, A.A. Margolin, Z. Werb, L.M. Coussens, Complement C5a Fosters Squamous Carcinogenesis and Limits T Cell Response to Chemotherapy, *Cancer Cell.* (2018). doi:10.1016/j.ccell.2018.09.003.
- [14] National Cancer Institute, Genetics of Breast and Gynecologic Cancers

- (PDQ®)—Health Professional Version, (2019).
- [15] E. Lianidou, K. Pantel, Liquid biopsies, *Genes Chromosom. Cancer.* (2019). doi:10.1002/gcc.22695.
- [16] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell.* (2000).
- [17] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries., *CA. Cancer J. Clin.* (2018). doi:10.3322/caac.21492.
- [18] L. Schwartzberg, E.S. Kim, D. Liu, D. Schrag, Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not?, (2019).
- [19] S.H. Shin, A.M. Bode, Z. Dong, Precision medicine: the foundation of future cancer therapeutics, *Npj Precis. Oncol.* (2017). doi:10.1038/s41698-017-0016-z.
- [20] F.S. Collins, H. Varmus, A new initiative on precision medicine., *N. Engl. J. Med.* (2015). doi:10.1056/NEJMp1500523.
- [21] A.M. Bailey, Y. Mao, J. Zeng, V. Holla, A. Johnson, L. Brusco, K. Chen, J. Mendelsohn, M.J. Routbort, G.B. Mills, F. Meric-Bernstam, Implementation of biomarker-driven cancer therapy: existing tools and remaining gaps., *Discov. Med.* (2014).
- [22] R. Palmirotta, D. Lovero, P. Cafforio, C. Felici, F. Mannavola, E. Pellè, D. Quaresmini, M. Tucci, F. Silvestris, Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology, *Ther. Adv. Med. Oncol.* (2018). doi:10.1177/1758835918794630.
- [23] I.G. Domínguez-Vigil, A.K. Moreno-Martínez, J.Y. Wang, M.H.A. Roehrl, H.A. Barrera-Saldaña, The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer., *Oncotarget.* (2018). doi:10.18632/oncotarget.23131.
- [24] L.M. Sholl, D.L. Aisner, T.C. Allen, M.B. Beasley, P.T. Cagle, V.L. Capelozzi, S. Dacic, L.P. Hariri, K.M. Kerr, S. Lantuejoul, M. Mino-Kenudson, K. Raparia, N. Rekhtman, S. Roy-Chowdhuri, E. Thunnissen, M. Tsao, M. Vivero, Y. Yatabe, Liquid biopsy in lung cancer: A perspective from members of the pulmonary pathology society, *Arch. Pathol. Lab. Med.* (2016). doi:10.5858/arpa.2016-0163-SA.
- [25] P.L. Bedard, A.R. Hansen, M.J. Ratain, L.L. Siu, Tumour heterogeneity in the clinic, *Nature.* (2013). doi:10.1038/nature12627.

- [26] W. S.Q., L. J., T. A.Y.-C., V. R., P. J.-M.B., D. H., E. J., D. K., B. A., M. G.A., F. S.B., T. D.M., F. A., P. J.P., Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing, *BMC Med. Genomics*. (2014). doi:<http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-7-23>.
- [27] M. Ilić, P. Hofman, Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy?, *Transl. Lung Cancer Res*. (2016). doi:10.21037/tlcr.2016.08.06.
- [28] A. Jung, T. Kirchner, Liquid biopsy in tumor genetic diagnosis, *Dtsch. Arztebl. Int*. (2018). doi:10.3238/arztebl.2018.0169.
- [29] C. Alix-Panabières, K. Pantel, Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy, *Cancer Discov*. (2016). doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483.
- [30] FDA, cobas EGFR Mutation Test v2, (2019).
- [31] D. Kwapisz, The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer?, *Ann. Transl. Med*. (2017). doi:10.21037/atm.2017.01.32.
- [32] E. Crowley, F. Di Nicolantonio, F. Loupakis, A. Bardelli, Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood., *Nat. Rev. Clin. Oncol*. (2013). doi:10.1038/nrclinonc.2013.110.
- [33] G.R. Oxnard, C.P. Paweletz, Y. Kuang, S.L. Mach, A. O'Connell, M.M. Messineo, J.J. Luke, M. Butaney, P. Kirschmeier, D.M. Jackman, P.A. Janne, Noninvasive detection of response and resistance in egfrmutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA, *Clin. Cancer Res*. (2014). doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2482.
- [34] C. Rolfo, M. Castiglia, D. Hong, R. Alessandro, I. Mertens, G. Baggerman, K. Zwaenepoel, I. Gil-Bazo, F. Passiglia, A.P. Carreca, S. Taverna, R. Vento, M. Peeters, A. Russo, P. Pauwels, Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. (2014). doi:10.1016/j.bbcan.2014.10.001.
- [35] D.J. Johann, M. Steliga, I.J. Shin, D. Yoon, K. Arnaoutakis, L. Hutchins, M. Liu, J. Liem, K. Walker, A. Pereira, M. Yang, S.K. Jeffus, E. Peterson, J. Xu, Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer, *Exp. Biol. Med*. (2018). doi:10.1177/1535370217750087.
- [36] A. Bardelli, K. Pantel, Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet), *Cancer*

- Cell. (2017). doi:10.1016/j.ccell.2017.01.002.
- [37] W. Schmiegel, R.J. Scott, S. Dooley, W. Lewis, C.J. Meldrum, P. Pockney, B. Draganic, S. Smith, C. Hewitt, H. Philimore, A. Lucas, E. Shi, K. Namdarian, T. Chan, D. Acosta, S. Ping-Chang, A. Tannapfel, A. Reinacher-Schick, W. Uhl, C. Teschendorf, H. Wolters, J. Stern, R. Viebahn, H. Friess, K.P. Janssen, U. Nitsche, J. Slotta-Huspenina, M. Pohl, D. Vangala, A. Baraniskin, B. Dockhorn-Dworniczak, S. Hegewisch-Becker, P. Ronga, D.L. Edelstein, F.S. Jones, S. Hahn, S.B. Fox, Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing, *Mol. Oncol.* (2017). doi:10.1002/1878-0261.12023.
- [38] F. Castro-Giner, S. Gkountela, C. Donato, I. Alborelli, L. Quagliata, C. Ng, S. Piscuoglio, N. Aceto, Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations, *Diagnostics.* (2018). doi:10.3390/diagnostics8020031.
- [39] B. Arneth, Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: A systematic review, *BMC Cancer.* (2018). doi:10.1186/s12885-018-4433-3.
- [40] M. Mino-Kenudson, Cons: Can liquid biopsy replace tissue biopsy?—the US experience, *Transl. Lung Cancer Res.* (2016). doi:10.21037/tlcr.2016.08.01.
- [41] C. De Morgan, Observations ON CANCER. ITS PATHOLOGY, AND ITS RELATIONS TO THE ORGANISM AND TO OTHER MORBID GROWTHS, *Lancet.* (1874). doi:10.1016/S0140-6736(02)48896-4.
- [42] R.R. Langley, I.J. Fidler, The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs, *Int. J. Cancer.* (2011). doi:10.1002/ijc.26031.
- [43] D.C. Voon, R.Y. Huang, R.A. Jackson, J.P. Thiery, The EMT spectrum and therapeutic opportunities, *Mol. Oncol.* (2017). doi:10.1002/1878-0261.12082.
- [44] C. Alix-Panabières, S. Mader, K. Pantel, Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells, *J. Mol. Med.* (2017). doi:10.1007/s00109-016-1500-6.
- [45] S. Kasimir-Bauer, O. Hoffmann, D. Wallwiener, R. Kimmig, T. Fehm, Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells, *Breast Cancer Res.* (2012). doi:10.1186/bcr3099.
- [46] C. Alix-Panabières, K. Pantel, Technologies for detection of circulating tumor

- cells: Facts and vision, *Lab Chip*. (2014). doi:10.1039/c3lc50644d.
- [47] S. Riethdorf, L. O’Flaherty, C. Hille, K. Pantel, Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). doi:10.1016/j.addr.2018.01.011.
- [48] S. Werner, A. Stenzl, K. Pantel, T. Todenh, Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells, 994 (2017) 205–228. doi:10.1007/978-3-319-55947-6.
- [49] N. Saucedo-Zeni, S. Mewes, R. Niestroj, L. Gasiorowski, D. Murawa, P. Nowaczyk, T. Tomasi, E. Weber, G. Dworacki, N.G. Morgenthaler, H. Jansen, C. Propping, K. Sterzynska, W. Dyszkiewicz, M. Zabel, M. Kiechle, U. Reuning, M. Schmitt, K. Lücke, 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). doi:10.3892/ijo.2012.1557.
- [50] G. Theil, K. Fischer, E. Weber, R. Medek, R. Hoda, K. Lücke, P. Fornara, The use of a new CellCollector to isolate circulating tumor cells from the blood of patients with different stages of prostate cancer and clinical outcomes - A proof-of-concept study, *PLoS One*. (2016). doi:10.1371/journal.pone.0158354.
- [51] T.M. Gorges, N. Penkalla, T. Schalk, S.A. Joosse, S. Riethdorf, J. Tucholski, K. Lücke, H. Wikman, S. Jackson, N. Brychta, O. Von Ahsen, C. Schumann, T. Krahn, K. Pantel, Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells, *Clin. Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1416.
- [52] A. Kuske, T.M. Gorges, P. Tennstedt, A.K. Tiebel, R. Pompe, F. Preißer, S. Prues, M. Mazel, A. Markou, E. Lianidou, S. Peine, C. Alix-Panabières, S. Riethdorf, B. Beyer, T. Schlomm, K. Pantel, Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients, *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep39736.
- [53] A. Markou, M. Lazaridou, P. Paraskevopoulos, S. Chen, M. Swierczewska, J. Budna, A. Kuske, T.M. Gorges, S.A. Joosse, T. Kroneis, M. Zabel, P. Sedlmayr, C. Alix-Panabières, K. Pantel, E.S. Lianidou, Multiplex gene expression profiling of in vivo isolated circulating tumor cells in high-risk prostate cancer patients, *Clin. Chem.* (2018).

- doi:10.1373/clinchem.2017.275503.
- [54] T.M. Gorges, A. Kuske, K. Röck, O. Mauermann, V. Müller, S. Peine, K. Verpoort, V. Novosadova, M. Kubista, S. Riethdorf, K. Pantel, Accession of tumor heterogeneity by multiplex transcriptome profiling of single circulating tumor cells, *Clin. Chem.* (2016). doi:10.1373/clinchem.2016.260299.
- [55] R. Lampignano, L. Yang, M.H.D. Neumann, A. Franken, T. Fehm, D. Niederacher, H. Neubauer, A novel workflow to enrich and isolate patient-matched EpCAMhigh and EpCAMlow/negative CTCs enables the comparative characterization of the PIK3CA status in metastatic breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* (2017). doi:10.3390/ijms18091885.
- [56] A. Strati, G. Koutsodontis, G. Papaxoinis, I. Angelidis, M. Zavridou, P. Economopoulou, I. Kotsantis, M. Avgeris, M. Mazel, C. Perisanidis, C. Sasaki, C. Alix-Panabières, E. Lianidou, A. Psyrri, Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma, *Ann. Oncol.* (2017). doi:10.1093/annonc/mdx206.
- [57] C. Keup, P. Mach, B. Aktas, M. Tewes, H.C. Kolberg, S. Hauch, M. Sprenger-Haussels, R. Kimmig, S. Kasimir-Bauer, RNA profiles of circulating tumor cells and extracellular vesicles for therapy stratification of metastatic breast cancer patients, *Clin. Chem.* (2018). doi:10.1373/clinchem.2017.283531.
- [58] L. König, S. Kasimir-Bauer, A.K. Bittner, O. Hoffmann, B. Wagner, L.F. Santos Manvailer, R. Kimmig, P.A. Horn, V. Rebmann, Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy, *Oncoimmunology.* (2017). doi:10.1080/2162402X.2017.1376153.
- [59] M. Bredemeier, P. Edimiris, P. Mach, M. Kubista, R. Sjöback, E. Rohlova, K. Kolostova, S. Hauch, B. Aktas, M. Tewes, R. Kimmig, S. Kasimir-Bauer, Gene expression signatures in circulating tumor cells correlate with response to therapy in metastatic breast cancer, *Clin. Chem.* (2017). doi:10.1373/clinchem.2016.269605.
- [60] I. Chebouti, S. Kasimir-Bauer, P. Buderath, P. Wimberger, S. Hauch, R. Kimmig, J.D. Kuhlmann, EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy, *Oncotarget.* (2017). doi:10.18632/oncotarget.16179.
- [61] A. Markou, M. Zavridou, I. Sourvinou, G. Yousef, S. Kounelis, N. Malamos,

- V. Georgoulas, E. Lianidou, Direct comparison of metastasis-related miRNAs expression levels in circulating tumor cells, corresponding plasma, and primary tumors of breast cancer patients, *Clin. Chem.* (2016). doi:10.1373/clinchem.2015.253716.
- [62] E. Trapp, W. Janni, C. Schindlbeck, J. Jückstock, U. Andergassen, A. de Gregorio, M. Alunni-Fabroni, M. Tzschaschel, A. Polasik, J.G. Koch, T.W.P. Friedl, P.A. Fasching, L. Haeberle, T. Fehm, A. Schneeweiss, M.W. Beckmann, K. Pantel, V. Mueller, B. Rack, C. Scholz, Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis, *J. Natl. Cancer Inst.* (2019). doi:10.1093/jnci/djy152.
- [63] J. Sparano, A. O'Neill, K. Alpaugh, A.C. Wolff, D.W. Northfelt, C.T. Dang, G.W. Sledge, K.D. Miller, Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial, *JAMA Oncol.* (2018). doi:10.1001/jamaoncol.2018.2574.
- [64] C.R. Goodman, B.L.L. Seagle, T.W.P. Friedl, B. Rack, K. Lato, V. Fink, M. Cristofanilli, E.D. Donnelly, W. Janni, S. Shahabi, J.B. Strauss, Association of circulating tumor cell status with benefit of radiotherapy and survival in early-stage breast cancer, in: *JAMA Oncol.*, 2018. doi:10.1001/jamaoncol.2018.0163.
- [65] K. Pantel, C. Alix-Panabières, Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2019). doi:10.1038/s41571-019-0187-3.
- [66] F.C. Bidard, D.J. Peeters, T. Fehm, F. Nolé, R. Gisbert-Criado, D. Mavroudis, S. Grisanti, D. Generali, J.A. Garcia-Saenz, J. Stebbing, C. Caldas, P. Gazzaniga, L. Manso, R. Zamarchi, A.F. de Lascoiti, L. De Mattos-Arruda, M. Ignatiadis, R. Lebofsky, S.J. van Laere, F. Meier-Stiegen, M.T. Sandri, J. Vidal-Martinez, E. Politaki, F. Consoli, A. Bottini, E. Diaz-Rubio, J. Krell, S.J. Dawson, C. Raimondi, A. Rutten, W. Janni, E. Munzone, V. Carañana, S. Agelaki, C. Almici, L. Dirix, E.F. Solomayer, L. Zorzino, H. Johannes, J.S. Reis-Filho, K. Pantel, J.Y. Pierga, S. Michiels, Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of individual patient data, *Lancet Oncol.* (2014). doi:10.1016/S1470-2045(14)70069-5.

- [67] G. Heller, R. McCormack, T. Kheoh, A. Molina, M.R. Smith, R. Dreicer, F. Saad, R. De Wit, D.T. Aftab, M. Hirmand, A. Limon, K. Fizazi, M. Fleisher, J.S. De Bono, H.I. Scher, Circulating tumor cell number as a response measure of prolonged survival for metastatic castration-resistant prostate cancer: A comparison with prostate-specific antigen across five randomized phase III clinical trials, in: *J. Clin. Oncol.*, 2018. doi:10.1200/JCO.2017.75.2998.
- [68] M. Ignatiadis, S. Litie`re, F. Rothe, S. Riethdorf, C. Proudhon, T. Fehm, K. Aalders, H. Forstbauer, P.A. Fasching, E. Brain, P. Vuylsteke, E. Guardiola, R. Lorenz, K. Pantel, K. Tryfonidis, W. Janni, M. Piccart, C. Sotiriou, B. Rack, J.Y. Pierga, Trastuzumab versus observation for HER2 nonamplified early breast cancer with circulating tumor cells (EORTC 90091-10093, BIG 1-12, Treat CTC): A randomized phase II trial, *Ann. Oncol.* (2018). doi:10.1093/annonc/mdy211.
- [69] V. Georgoulas, V. Bozionelou, S. Agelaki, M. Perraki, S. Apostolaki, G. Kallergi, K. Kalbakis, A. Xyrafas, D. Mavroudis, Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: Results of a randomized phase II study, *Ann. Oncol.* (2012). doi:10.1093/annonc/mds020.
- [70] G. Van Dalum, G.J. Stam, L.F.A. Scholten, W.J.B. Mastboom, I. Vermes, A.G.J. Tibbe, M.R. De Groot, L.W.M.M. Terstappen, Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer, *Int. J. Oncol.* (2015). doi:10.3892/ijo.2015.2824.
- [71] M.G. Krebs, R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J.M. Hou, A. Greystoke, T.H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, F.H. Blackhall, Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* (2011). doi:10.1200/JCO.2010.28.7045.
- [72] J.M. Hou, M.G. Krebs, L. Lancashire, R. Sloane, A. Backen, R.K. Swain, L.J.C. Priest, A. Greystoke, C. Zhou, K. Morris, T. Ward, F.H. Blackhall, C. Dive, Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* (2012). doi:10.1200/JCO.2010.33.3716.
- [73] C. Aggarwal, X. Wang, A. Ranganathan, D. Torigian, A. Troxel, T. Evans,

- R.B. Cohen, B. Vaidya, C. Rao, M. Connelly, A. Vachani, C. Langer, S. Albelda, Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with small cell lung cancer undergoing chemotherapy, *Lung Cancer*. 112 (2017) 118–125. doi:10.1016/j.lungcan.2017.08.008.
- [74] C.R. Lindsay, V. Faugeron, S. Michiels, E. Pailler, F. Facchinetti, D. Ou, M. V. Bluthgen, C. Pannet, M. Ngo-Camus, G. Bescher, C. Caramella, F. Billiot, J. Remon, D. Planchard, J.C. Soria, B. Besse, F. Farace, A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* (2017). doi:10.1093/annonc/mdx156.
- [75] H.I. Scher, R.P. Graf, N.A. Schreiber, B. McLaughlin, D. Lu, J. Louw, D.C. Danila, L. Dugan, A. Johnson, G. Heller, M. Fleisher, R. Dittamore, Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer, *Eur. Urol.* (2017). doi:10.1016/j.eururo.2016.11.024.
- [76] S. Meng, D. Tripathy, E.P. Frenkel, S. Shete, E.Z. Naftalis, J.F. Huth, P.D. Beitsch, M. Leitch, S. Hoover, D. Euhus, B. Haley, L. Morrison, T.P. Fleming, D. Herlyn, L.W.M.M. Terstappen, T. Fehm, T.F. Tucker, N. Lane, J. Wang, J.W. Uhr, Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy, *Clin. Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1110.
- [77] S.B. Ng, C. Chua, M. Ng, A. Gan, P.S. Poon, M. Teo, C. Fu, W.Q. Leow, K.H. Lim, A. Chung, S.L. Koo, S.P. Choo, D. Ho, S. Rozen, P. Tan, M. Wong, W.F. Burkholder, I.B. Tan, Individualised multiplexed circulating tumour DNA assays for monitoring of tumour presence in patients after colorectal cancer surgery, *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/srep40737.
- [78] H. Pan, R. Gray, J. Braybrooke, C. Davies, C. Taylor, P. McGale, R. Peto, K.I. Pritchard, J. Bergh, M. Dowsett, D.F. Hayes, 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years, *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1701830.
- [79] J.D. Merker, G.R. Oxnard, C. Compton, M. Diehn, P. Hurley, A.J. Lazar, N. Lindeman, C.M. Lockwood, A.J. Rai, R.L. Schilsky, A.M. Tsimberidou, P. Vasalos, B.L. Billman, T.K. Oliver, S.S. Bruinooge, D.F. Hayes, N.C. Turner, Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review, *Arch.*

- Pathol. Lab. Med. (2018). doi:10.5858/arpa.2018-0901-SA.
- [80] L. V. Schøler, T. Reinert, M.B.W. Ørntoft, C.G. Kassentoft, S.S. Arnadóttir, S. Vang, I. Nordentoft, M. Knudsen, P. Lamy, D. Andreasen, F. V. Mortensen, A.R. Knudsen, K. Stribolt, K. Sivesgaard, P. Mouritzen, H.J. Nielsen, S. Laurberg, T.F. Ørntoft, C.L. Andersen, Clinical implications of monitoring circulating Tumor DNA in patients with colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0510.
- [81] C. Abbosh, N.J. Birkbak, G.A. Wilson, M. Jamal-Hanjani, T. Constantin, R. Salari, J. Le Quesne, D.A. Moore, S. Veeriah, R. Rosenthal, T. Marafioti, E. Kirkizlar, T.B.K. Watkins, N. McGranahan, S. Ward, L. Martinson, J. Riley, F. Fraioli, M. Al Bakir, E. Grönroos, F. Zambrana, R. Endozo, W.L. Bi, F.M. Fennessy, N. Sponer, D. Johnson, J. Laycock, S. Shafi, J. Czyzewska-Khan, A. Rowan, T. Chambers, N. Matthews, S. Turajlic, C. Hiley, S.M. Lee, M.D. Forster, T. Ahmad, M. Falzon, E. Borg, D. Lawrence, M. Hayward, S. Kolvekar, N. Panagiotopoulos, S.M. Janes, R. Thakrar, A. Ahmed, F. Blackhall, Y. Summers, D. Hafez, A. Naik, A. Ganguly, S. Kareht, R. Shah, L. Joseph, A.M. Quinn, P.A. Crosbie, B. Naidu, G. Middleton, G. Langman, S. Trotter, M. Nicolson, H. Remmen, K. Kerr, M. Chetty, L. Gomersall, D.A. Fennell, A. Nakas, S. Rathinam, G. Anand, S. Khan, P. Russell, V. Ezhil, B. Ismail, M. Irvin-Sellers, V. Prakash, J.F. Lester, M. Kornaszewska, R. Attanoos, H. Adams, H. Davies, D. Oukrif, A.U. Akarca, J.A. Hartley, H.L. Lowe, S. Lock, N. Iles, H. Bell, Y. Ngai, G. Elgar, Z. Szallasi, R.F. Schwarz, J. Herrero, A. Stewart, S.A. Quezada, K.S. Peggs, P. Van Loo, C. Dive, C.J. Lin, M. Rabinowitz, H.J.W.L. Aerts, A. Hackshaw, J.A. Shaw, B.G. Zimmermann, C. Swanton, L. Bosshard-Carter, G. Goh, P. Gorman, N. Murugaesu, R.E. Hynds, S. Horswell, R. Mitter, M. Escudero, H. Xu, J. Goldman, R.K. Stone, T. Denner, J. Biggs, M. Costa, S. Begum, B. Phillimore, E. Nye, S. Graca, K. Joshi, A. Furness, A. Ben Aissa, Y.N.S. Wong, A. Georgiou, C. Simeon, G. Hector, A. Smith, M. Aranda, M. Novelli, D. Papadatos-Pastos, D. Carnell, R. Mendes, J. George, N. Navani, M. Taylor, J. Choudhary, R. Califano, P. Taylor, P. Krysiak, K. Rammohan, E. Fontaine, R. Booton, M. Evison, S. Moss, F. Idries, P. Bishop, A. Chaturvedi, H. Doran, A. Leek, P. Harrison, R. Waddington, J. Novasio, J. Rogan, E. Smith, J. Tugwood, G. Brady, D.G. Rothwell, F. Chemi, J. Pierce, S. Gulati, M. Bellamy, H. Bancroft, A. Kerr, S.

- Kadiri, J. Webb, M. Djearaman, A. Thomas, H. Walter, W. Monteiro, H. Marshall, L. Nelson, J. Bennett, L. Primrose, A. Amadi, S. Palmer, J. Miller, K. Buchan, A. Edwards, F. Morgan, A. Verjee, M. MacKenzie, M. Wilcox, S. Smith, N. Gower, C. Ottensmeier, S. Chee, B. Johnson, A. Alzetani, E. Shaw, E. Lim, P. De Sousa, M.T. Barbosa, A. Bowman, S. Jordan, A. Rice, H. Raubenheimer, C. Proli, M.E. Cufari, J.C. Ronquillo, A. Kwayie, H. Bhayani, M. Hamilton, Y. Bakar, N. Mensah, L. Ambrose, A. Devaraj, S. Buderer, J. Finch, L. Azcarate, H. Chavan, S. Green, H. Mashinga, A.G. Nicholson, K. Lau, M. Sheaff, P. Schmid, J. Conibear, T. Light, T. Horey, S. Danson, J. Bury, J. Edwards, J. Hill, S. Matthews, Y. Kitsanta, K. Suvarna, P. Fisher, A.D. Keerio, M. Shackcloth, J. Gosney, P. Postmus, S. Feeney, J. Asante-Siaw, S. Dentre, C. Dessimoz, Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution, *Nature*. (2017). doi:10.1038/nature22364.
- [82] E. Heitzer, P. Ulz, J.B. Geigl, Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer., *Clin. Chem.* (2015). doi:10.1373/clinchem.2014.222679.
- [83] A.A. Chaudhuri, J.J. Chabon, A.F. Lovejoy, A.M. Newman, H. Stehr, T.D. Azad, M.S. Khodadoust, M.S. Esfahani, C.L. Liu, L. Zhou, F. Scherer, D.M. Kurtz, C. Say, J.N. Carter, D.J. Merriott, J.C. Dudley, M.S. Binkley, L. Modlin, S.K. Padda, M.F. Gensheimer, R.B. West, J.B. Shrager, J.W. Neal, H.A. Wakelee, B.W. Loo, A.A. Alizadeh, M. Diehn, Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling, *Cancer Discov.* (2017). doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0716.
- [84] J.D. Cohen, L. Li, Y. Wang, C. Thoburn, B. Afsari, L. Danilova, C. Douville, A.A. Javed, F. Wong, A. Mattox, R.H. Hruban, C.L. Wolfgang, M.G. Goggins, M.D. Molin, T.L. Wang, R. Roden, A.P. Klein, J. Ptak, L. Dobbyn, J. Schaefer, N. Silliman, M. Popoli, J.T. Vogelstein, J.D. Browne, R.E. Schoen, R.E. Brand, J. Tie, P. Gibbs, H.L. Wong, A.S. Mansfield, J. Jen, S.M. Hanash, M. Falconi, P.J. Allen, S. Zhou, C. Bettegowda, L.A. Diaz, C. Tomasetti, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A.M. Lennon, N. Papadopoulos, Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test, *Science* (80-.). (2018). doi:10.1126/science.aar3247.
- [85] C. Abbosh, N.J. Birkbak, C. Swanton, Early stage NSCLC — challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2018). doi:10.1038/s41571-018-0058-3.

- [86] T. Mok, Y.L. Wu, J.S. Lee, C.J. Yu, V. Sriuranpong, J. Sandoval-Tan, G. Ladrera, S. Thongprasert, V. Srimuninnimit, M. Liao, Y. Zhu, C. Zhou, F. Fuerte, B. Margono, W. Wen, J. Tsai, M. Truman, B. Klughammer, D.S. Shames, L. Wu, Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC Patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy, *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2594.
- [87] I. Garcia-Murillas, G. Schiavon, B. Weigelt, C. Ng, S. Hrebien, R.J. Cutts, M. Cheang, P. Osin, A. Nerurkar, I. Kozarewa, J.A. Garrido, M. Dowsett, J.S. Reis-Filho, I.E. Smith, N.C. Turner, Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer, *Sci. Transl. Med.* (2015). doi:10.1126/scitranslmed.aab0021.
- [88] Y.-H. Chen, B.A. Hancock, J.P. Solzak, D. Brinza, C. Scafe, K.D. Miller, M. Radovich, Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy, *Npj Breast Cancer.* (2017). doi:10.1038/s41523-017-0028-4.
- [89] F. Riva, F.C. Bidard, A. Houy, A. Saliou, J. Madic, A. Rampanou, C. Hego, M. Milder, P. Cottu, M.P. Sablin, A. Vincent-Salomon, O. Lantz, M.H. Stern, C. Proudhon, J.Y. Pierga, Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer, *Clin. Chem.* (2017). doi:10.1373/clinchem.2016.262337.
- [90] M. Chimonidou, A. Strati, N. Malamos, V. Georgoulas, E.S. Lianidou, SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer, *Clin. Chem.* (2013). doi:10.1373/clinchem.2012.191551.
- [91] M. Chimonidou, A. Strati, A. Tzitzira, G. Sotiropoulou, N. Malamos, V. Georgoulas, E.S. Lianidou, DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells, *Clin. Chem.* (2011). doi:10.1373/clinchem.2011.165902.
- [92] M. Chimonidou, A. Strati, N. Malamos, S. Kouneli, V. Georgoulas, E. Lianidou, Direct comparison study of DNA methylation markers in EpCAM-positive circulating tumour cells, corresponding circulating tumour DNA, and paired primary tumours in breast cancer, *Oncotarget.* (2017).

- doi:10.18632/oncotarget.18679.
- [93] S. Mastoraki, A. Strati, E. Tzanikou, M. Chimonidou, E. Politaki, A. Voutsina, A. Psyrris, V. Georgoulas, E. Lianidou, ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy–Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment, *Clin. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-1181.
- [94] T. Benezeder, V. Tiran, A.A.N. Treitler, C. Suppan, C. Rossmann, H. Stoeger, R.J. Cote, R.H. Datar, M. Balic, N. Dandachi, Multigene methylation analysis of enriched circulating tumor cells associates with poor progression-free survival in metastatic breast cancer patients, *Oncotarget.* (2017). doi:10.18632/oncotarget.21426.
- [95] C.F. Pixberg, K. Raba, F. Müller, B. Behrens, E. Honisch, D. Niederacher, H. Neubauer, T. Fehm, W. Goering, W.A. Schulz, P. Flohr, G. Boysen, M. Lambros, J.S. De Bono, W.T. Knoefel, C. Sproll, N.H. Stoecklein, R.P.L. Neves, Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells, *Oncogene.* (2017). doi:10.1038/onc.2016.480.
- [96] P. Anand, A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, B. Sung, B.B. Aggarwal, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm. Res.* (2008). doi:10.1007/s11095-008-9661-9.
- [97] Corrigendum: Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma, *Nature.* (2014). doi:10.1038/nature13879.
- [98] B.R. Joubert, J.F. Felix, P. Yousefi, K.M. Bakulski, A.C. Just, C. Breton, S.E. Reese, C.A. Markunas, R.C. Richmond, C.J. Xu, L.K. Küpers, S.S. Oh, C. Hoyo, O. Gruziova, C. Söderhäll, L.A. Salas, N. Baiz, H. Zhang, J. Lepeule, C. Ruiz, S. Ligthart, T. Wang, J.A. Taylor, L. Duijts, G.C. Sharp, S.A. Jankipersadsing, R.M. Nilsen, A. Vaez, M.D. Fallin, D. Hu, A.A. Litonjua, B.F. Fuemmeler, K. Huen, J. Kere, I. Kull, M.C. Munthe-Kaas, U. Gehring, M. Bustamante, M.J. Saurel-Coubizolles, B.M. Quraishi, J. Ren, J. Tost, J.R. Gonzalez, M.J. Peters, S.E. Häberg, Z. Xu, J.B. Van Meurs, T.R. Gaunt, M. Kerkhof, E. Corpeleijn, A.P. Feinberg, C. Eng, A.A. Baccarelli, S.E. Benjamin Neelon, A. Bradman, S.K. Merid, A. Bergström, Z. Hereceg, H. Hernandez-Vargas, B. Brunekreef, M. Pinart, B. Heude, S. Ewart, J. Yao, N. Lemonnier, O.H. Franco, M.C. Wu, A. Hofman, W. McArdle, P. Van Der Vlies, F. Falahi, M.W. Gillman, L.F. Barcellos, A. Kumar, M. Wickman, S. Guerra, M.A.

- Charles, J. Holloway, C. Auffray, H.W. Tiemeier, G.D. Smith, D. Postma, M.F. Hivert, B. Eskenazi, M. Vrijheid, H. Arshad, J.M. Antó, A. Dehghan, W. Karmaus, I. Annesi-Maesano, J. Sunyer, A. Ghantous, G. Pershagen, N. Holland, S.K. Murphy, D.L. Demeo, E.G. Burchard, C. Ladd-Acosta, H. Snieder, W. Nystad, G.H. Koppelman, C.L. Relton, V.W.V. Jaddoe, A. Wilcox, E. Melén, S.J. London, DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis, *Am. J. Hum. Genet.* (2016). doi:10.1016/j.ajhg.2016.02.019.
- [99] S.E. Reese, S. Zhao, M.C. Wu, B.R. Joubert, C.L. Parr, S.E. Håberg, P.M. Ueland, R.M. Nilsen, Ø. Midttun, S.E. Vollset, S.D. Peddada, W. Nystad, S.J. London, DNA methylation score as a biomarker in newborns for sustained maternal smoking during pregnancy, *Environ. Health Perspect.* (2017). doi:10.1289/EHP333.
- [100] R. Joehanes, A.C. Just, R.E. Marioni, L.C. Pilling, L.M. Reynolds, P.R. Mandaviya, W. Guan, T. Xu, C.E. Elks, S. Aslibekyan, H. Moreno-Macias, J.A. Smith, J.A. Brody, R. Dhingra, P. Yousefi, J.S. Pankow, S. Kunze, S.H. Shah, A.F. McRae, K. Lohman, J. Sha, D.M. Absher, L. Ferrucci, W. Zhao, E.W. Demerath, J. Bressler, M.L. Grove, T. Huan, C. Liu, M.M. Mendelson, C. Yao, D.P. Kiel, A. Peters, R. Wang-Sattler, P.M. Visscher, N.R. Wray, J.M. Starr, J. Ding, C.J. Rodriguez, N.J. Wareham, M.R. Irvin, D. Zhi, M. Barrdahl, P. Vineis, S. Ambatipudi, A.G. Uitterlinden, A. Hofman, J. Schwartz, E. Colicino, L. Hou, P.S. Vokonas, D.G. Hernandez, A.B. Singleton, S. Bandinelli, S.T. Turner, E.B. Ware, A.K. Smith, T. Klengel, E.B. Binder, B.M. Psaty, K.D. Taylor, S.A. Gharib, B.R. Swenson, L. Liang, D.L. DeMeo, G.T. O'Connor, Z. Herceg, K.J. Ressler, K.N. Conneely, N. Sotoodehnia, S.L.R. Kardia, D. Melzer, A.A. Baccarelli, J.B.J. van Meurs, I. Romieu, D.K. Arnett, K.K. Ong, Y. Liu, M. Waldenberger, I.J. Deary, M. Fornage, D. Levy, S.J. London, Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking., *Circ. Cardiovasc. Genet.* (2016). doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001506.
- [101] N.S. Shenker, S. Polidoro, K. van Veldhoven, C. Sacerdote, F. Ricceri, M.A. Birrell, M.G. Belvisi, R. Brown, P. Vineis, J.M. Flanagan, Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking, *Hum. Mol. Genet.* (2013). doi:10.1093/hmg/dds488.

- [102] T.R. Stueve, W.Q. Li, J. Shi, C.N. Marconett, T. Zhang, C. Yang, D. Mullen, C. Yan, W. Wheeler, X. Hua, B. Zhou, Z. Borok, N.E. Caporaso, A.C. Pesatori, J. Duan, I.A. Laird-Offringa, M.T. Landi, Epigenome-wide analysis of DNA methylation in lung tissue shows concordance with blood studies and identifies tobacco smoke-inducible enhancers, *Hum. Mol. Genet.* (2017). doi:10.1093/hmg/ddx188.
- [103] T.B. Johnson, R.D. Coghill, Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus, *J. Am. Chem. Soc.* (1925). doi:10.1021/ja01688a030.
- [104] J.D. McGhee, G.D. Ginder, Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken β -globin genes [26], *Nature.* (1979). doi:10.1038/280419a0.
- [105] S. Charache, M.L. Terrin, R.D. Moore, G.J. Dover, F.B. Barton, S. V Eckert, R.P. McMahon, D.R. Bonds, Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia., *N. Engl. J. Med.* (1995). doi:10.1056/NEJM199505183322001.
- [106] R. Itzykson, P. Fenaux, Epigenetics of myelodysplastic syndromes, *Leukemia.* (2014). doi:10.1038/leu.2013.343.
- [107] B. Hendrich, U. Hardeland, H.H. Ng, J. Jiricny, A. Bird, The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites, *Nature.* (1999). doi:10.1038/45843.
- [108] G.D. Ginder, D.C. Williams, Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets, *Pharmacol. Ther.* (2018). doi:10.1016/j.pharmthera.2017.11.002.
- [109] M.J. Blow, T.A. Clark, C.G. Daum, A.M. Deutschbauer, A. Fomenkov, R. Fries, J. Froula, D.D. Kang, R.R. Malmstrom, R.D. Morgan, J. Posfai, K. Singh, A. Visel, K. Wetmore, Z. Zhao, E.M. Rubin, J. Korlach, L.A. Pennacchio, R.J. Roberts, The Epigenomic Landscape of Prokaryotes, *PLoS Genet.* (2016). doi:10.1371/journal.pgen.1005854.
- [110] D.N. Cooper, M. Mort, P.D. Stenson, E. V. Ball, N.A. Chuzhanova, Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides, *Hum. Genomics.* (2010). doi:10.1186/1479-7364-4-6-406.

- [111] K. Jabbari, G. Bernardi, Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies., *Gene*. (2004). doi:10.1016/j.gene.2004.02.043.
- [112] R.S. Illingworth, A.P. Bird, CpG islands - "A rough guide," *FEBS Lett.* (2009). doi:10.1016/j.febslet.2009.04.012.
- [113] R. Jaenisch, A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.* (2003). doi:10.1038/ng1089.
- [114] S. Charache, G. Dover, K. Smith, C.C. Talbot, M. Moyer, S. Boyer, Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal hemoglobin production and is associated with nonrandom hypomethylation of DNA around the gamma-delta-beta-globin gene complex., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.80.15.4842.
- [115] J.R. Edwards, O. Yarychivska, M. Boulard, T.H. Bestor, DNA methylation and DNA methyltransferases, *Epigenetics and Chromatin.* (2017). doi:10.1186/s13072-017-0130-8.
- [116] R. Tirado-Magallanes, K. Rebbani, R. Lim, S. Pradhan, T. Benoukraf, Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing, *Oncotarget.* (2017). doi:10.18632/oncotarget.13562.
- [117] R.Z. Jurkowska, A. Jeltsch, Enzymology of mammalian DNA methyltransferases, *Adv. Exp. Med. Biol.* (2016). doi:10.1007/978-3-319-43624-1_5.
- [118] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, Demethylation of the zygotic paternal genome, *Nature.* (2000). doi:10.1038/35000656.
- [119] S.M. et al. R. Lersback, J. Moore, TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;23) [3], *Leukemia.* (2003).
- [120] S. Ito, A.C.D. Alessio, O. V Taranova, K. Hong, C. Lawrence, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion , ES cell self- renewal , and ICM specification, *Nature.* (2010). doi:10.1038/nature09303.
- [121] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* (80-.). (2011). doi:10.1126/science.1210597.
- [122] S.B. Baylin, P.A. Jones, A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications., *Nat. Rev. Cancer.* (2011).

- doi:10.1038/nrc3130.
- [123] A.P. Feinberg, B. Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature*. (1983). doi:10.1038/301089a0.
- [124] M. Toyota, J.P.J. Issa, CpG island methylator phenotypes in aging and cancer, *Semin. Cancer Biol.* (1999). doi:10.1006/scbi.1999.0135.
- [125] S. Boettcher, B.L. Ebert, Clonal hematopoiesis of indeterminate potential, *J. Clin. Oncol.* (2019). doi:10.1200/JCO.2018.79.3588.
- [126] S. Ogino, T. Kawasaki, G.J. Kirkner, P. Kraft, M. Loda, C.S. Fuchs, Evaluation of markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample, *J. Mol. Diagnostics.* (2007). doi:10.2353/jmoldx.2007.060170.
- [127] M. Jia, X. Gao, Y. Zhang, M. Hoffmeister, H. Brenner, Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review, *Clin. Epigenetics.* (2016). doi:10.1186/s13148-016-0191-8.
- [128] L. Dang, D.W. White, S. Gross, B.D. Bennett, M.A. Bittinger, E.M. Driggers, V.R. Fantin, H.G. Jang, S. Jin, M.C. Keenan, K.M. Marks, R.M. Prins, P.S. Ward, K.E. Yen, L.M. Liao, J.D. Rabinowitz, L.C. Cantley, C.B. Thompson, M.G. Vander Heiden, S.M. Su, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*. (2009). doi:10.1038/nature08617.
- [129] S. Turcan, D. Rohle, A. Goenka, L.A. Walsh, F. Fang, E. Yilmaz, C. Campos, A.W.M. Fabius, C. Lu, P.S. Ward, C.B. Thompson, A. Kaufman, O. Guryanova, R. Levine, A. Heguy, A. Viale, L.G.T. Morris, J.T. Huse, I.K. Mellinghoff, T.A. Chan, IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype, *Nature*. (2012). doi:10.1038/nature10866.
- [130] H. Hashimoto, D. Wang, J.R. Horton, X. Zhang, V.G. Corces, X. Cheng, Structural Basis for the Versatile and Methylation-Dependent Binding of CTCF to DNA, *Mol. Cell.* (2017). doi:10.1016/j.molcel.2017.05.004.
- [131] X.S. Liu, H. Wu, X. Ji, Y. Stelzer, X. Wu, S. Czauderna, J. Shu, D. Dadon, R.A. Young, R. Jaenisch, Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome, *Cell.* (2016). doi:10.1016/j.cell.2016.08.056.
- [132] W.A. Flavahan, Y. Drier, B.B. Liao, S.M. Gillespie, A.S. Venteicher, A.O. Stemmer-Rachamimov, M.L. Suvà, B.E. Bernstein, Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas, *Nature*. (2016).

- doi:10.1038/nature16490.
- [133] R. Ghirlando, G. Felsenfeld, CTCF: Making the right connections, *Genes Dev.* (2016). doi:10.1101/gad.277863.116.
- [134] J.Y. Kang, S.H. Song, J. Yun, M.S. Jeon, H.P. Kim, S.W. Han, T.Y. Kim, Disruption of CTCF/cohesin-mediated high-order chromatin structures by DNA methylation downregulates PTGS2 expression, *Oncogene.* (2015). doi:10.1038/onc.2015.17.
- [135] V.B. Teif, D.A. Beshnova, Y. Vainshtein, C. Marth, J.P. Mallm, T.H. Rippe, Nucleosome repositioning links DNA (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development, *Genome Res.* (2014). doi:10.1101/gr.164418.113.
- [136] J.P. Issa, S.B. Baylin, J.G. Herman, DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications., *Leukemia.* (1997).
- [137] L. Yang, R. Rau, M.A. Goodell, DNMT3A in haematological malignancies, *Nat. Rev. Cancer.* (2015). doi:10.1038/nrc3895.
- [138] M. Guillaumot, L. Cimmino, I. Aifantis, The Impact of DNA Methylation in Hematopoietic Malignancies, *Trends in Cancer.* (2016). doi:10.1016/j.trecan.2015.12.006.
- [139] M. Buscarlet, S. Provost, Y.F. Zada, A. Barhdadi, V. Bourgoïn, G. Lépine, L. Mollica, N. Szuber, M.P. Dubé, L. Busque, DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions, *Blood.* (2017). doi:10.1182/blood-2017-04-777029.
- [140] F. Zink, S.N. Stacey, G.L. Norddahl, M.L. Frigge, O.T. Magnusson, I. Jonsdottir, T.E. Thorgeirsson, A. Sigurdsson, S.A. Gudjonsson, J. Gudmundsson, J.G. Jonasson, L. Tryggvadottir, T. Jonsson, A. Helgason, A. Gylfason, P. Sulem, T. Rafnar, U. Thorsteinsdottir, D.F. Gudbjartsson, G. Masson, A. Kong, K. Stefansson, Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly, *Blood.* (2017). doi:10.1182/blood-2017-02-769869.
- [141] L. Busque, J.P. Patel, M.E. Figueroa, A. Vasanthakumar, S. Provost, Z. Hamilou, L. Mollica, J. Li, A. Viale, A. Heguy, M. Hassimi, N. Socci, P.K. Bhatt, M. Gonen, C.E. Mason, A. Melnick, L.A. Godley, C.W. Brennan, O. Abdel-Wahab, R.L. Levine, Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis, *Nat. Genet.* (2012).

- doi:10.1038/ng.2413.
- [142] G. Genovese, A.K. Kähler, R.E. Handsaker, J. Lindberg, S.A. Rose, S.F. Bakhoun, K. Chambert, E. Mick, B.M. Neale, M. Fromer, S.M. Purcell, O. Svantesson, M. Landén, M. Höglund, S. Lehmann, S.B. Gabriel, J.L. Moran, E.S. Lander, P.F. Sullivan, P. Sklar, H. Grönberg, C.M. Hultman, S.A. McCarroll, Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence, *N. Engl. J. Med.* (2014). doi:10.1056/NEJMoa1409405.
- [143] B.B. Ganguly, D. Banerjee, M.B. Agarwal, Impact of chromosome alterations, genetic mutations and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) on the classification and risk stratification of MDS, *Blood Cells, Mol. Dis.* (2018). doi:10.1016/j.bcmed.2017.10.001.
- [144] D.H. Spencer, D.A. Russler-Germain, S. Ketkar, N.M. Helton, T.L. Lamprecht, R.S. Fulton, C.C. Fronick, M. O’Laughlin, S.E. Heath, M. Shinawi, P. Westervelt, J.E. Payton, L.D. Wartman, J.S. Welch, R.K. Wilson, M.J. Walter, D.C. Link, J.F. DiPersio, T.J. Ley, CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression, *Cell.* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.01.021.
- [145] M. Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps, *Nat. Rev. Genet.* (2007). doi:10.1038/nrg2005.
- [146] S.K. G. Gokul, DNA methylation and cancer, *Subcell. Biochem.* 61 (2013) 597–625.
- [147] P.A. Jones, S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer., *Nat. Rev. Genet.* (2002). doi:10.1038/nrg816.
- [148] R. Kanwal, K. Gupta, S. Gupta, Cancer epigenetics: An introduction, in: *Cancer Epigenetics Risk Assessment, Diagnosis, Treat. Progn.*, 2014. doi:10.1007/978-1-4939-1804-1_1.
- [149] M. Chimonidou, A. Tzitzira, A. Strati, G. Sotiropoulou, C. Sfikas, N. Malamos, V. Georgoulas, E. Lianidou, CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients, *Clin. Biochem.* (2013). doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.015.
- [150] A. Stone, E. Zotenko, W.J. Locke, D. Korbie, E.K.A. Millar, R. Pidsley, C. Stirzaker, P. Graham, M. Trau, E.A. Musgrove, R.I. Nicholson, J.M.W. Gee, S.J. Clark, DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer, *Nat. Commun.* (2015).

- doi:10.1038/ncomms8758.
- [151] K. Tsuboi, T. Nagatomo, T. Gohno, T. Higuchi, S. Sasaki, N. Fujiki, M. Kurosumi, H. Takei, Y. Yamaguchi, T. Niwa, S. ichi Hayashi, Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlates with hormone therapy resistance, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2017). doi:10.1016/j.jsbmb.2017.04.001.
- [152] D.M. Marzese, R.A. Scolyer, M. Roqué, L.M. Vargas-Roig, J.L. Huynh, J.S. Wilmott, R. Murali, M.E. Buckland, G. Barkhoudarian, J.F. Thompson, D.L. Morton, D.F. Kelly, D.S.B. Hoon, DNA methylation and gene deletion analysis of brain metastases in melanoma patients identifies mutually exclusive molecular alterations, *Neuro. Oncol.* (2014). doi:10.1093/neuonc/nou107.
- [153] N. Sahnane, F. Magnoli, B. Bernasconi, M.G. Tibiletti, C. Romualdi, M. Pedroni, M.P. De Leon, G. Magnani, L. Reggiani-Bonetti, L. Bertario, S. Signoroni, C. Capella, F. Sessa, D. Furlan, Aberrant DNA methylation profiles of inherited and sporadic colorectal cancer, *Clin. Epigenetics.* (2015). doi:10.1186/s13148-015-0165-2.
- [154] B. Dai, L. Geng, Y. Yu, C. Sui, F. Xie, W. Shen, T. Zheng, J. Yang, Methylation patterns of estrogen receptor α promoter correlate with estrogen receptor α expression and clinicopathological factors in hepatocellular carcinoma, *Exp. Biol. Med.* (2014). doi:10.1177/1535370214536651.
- [155] C.Y. Dou, Y.C. Fan, C.J. Cao, Y. Yang, K. Wang, Sera DNA Methylation of CDH1, DNMT3b and ESR1 Promoters as Biomarker for the Early Diagnosis of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma, *Dig. Dis. Sci.* (2016). doi:10.1007/s10620-015-3975-3.
- [156] V. Kirn, R. Shi, S. Heublein, J. Knabl, M. Guenther-Biller, U. Andergassen, C. Fridrich, W. Malter, J. Harder, K. Friese, D. Mayr, U. Jeschke, Estrogen receptor promoter methylation predicts survival in low-grade ovarian carcinoma patients., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2014). doi:10.1007/s00432-014-1729-9.
- [157] J. Martínez-Galán, B. Torres-Torres, M.I. Núñez, J. López-Peñalver, R. Del Moral, J.M. Ruiz De Almodóvar, S. Menjón, Á. Concha, C. Chamorro, S. Ríos, J.R. Delgado, ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients, *BMC Cancer.* (2014). doi:10.1186/1471-2407-14-59.

- [158] M. Chimonidou, G. Kallergi, V. Georgoulas, D.R. Welch, E.S. Lianidou, Breast Cancer Metastasis Suppressor-1 Promoter Methylation in Primary Breast Tumors and Corresponding Circulating Tumor Cells, *Mol. Cancer Res.* (2013). doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0096.
- [159] K. Pantel, R.H. Brakenhoff, Dissecting the metastatic cascade, *Nat. Rev. Cancer.* (2004). doi:10.1038/nrc1370.
- [160] O. Schmidt-Kittler, T. Ragg, A. Daskalakis, M. Granzow, A. Ahr, T.J.F. Blankenstein, M. Kaufmann, J. Diebold, H. Arnholdt, P. Muller, J. Bischoff, D. Harich, G. Schlimok, G. Riethmuller, R. Eils, C.A. Klein, From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003). doi:10.1073/pnas.1331931100.
- [161] T.G. Karrison, D.J. Ferguson, P. Meier, Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy, *J. Natl. Cancer Inst.* (1999). doi:10.1093/jnci/91.1.80.
- [162] D. Weckermann, P. Müller, F. Wawroschek, R. Harzmann, G. Riethmüller, G. Schlimok, Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: Detection and prognostic value, *J. Urol.* (2001). doi:10.1016/S0022-5347(05)66046-6.
- [163] J.A. Aguirre-Ghiso, Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, *Nat. Rev. Cancer.* (2007). doi:10.1038/nrc2256.
- [164] J.E. Talmadge, S.R. Wolman, I.J. Fidler, Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases, *Science* (80-.). (1982). doi:10.1126/science.6953592.
- [165] J.A. Schardt, M. Meyer, C.H. Hartmann, F. Schubert, O. Schmidt-Kittler, C. Fuhrmann, B. Polzer, M. Petronio, R. Eils, C.A. Klein, Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer, *Cancer Cell.* (2005). doi:10.1016/j.ccr.2005.08.003.
- [166] R. Demicheli, Tumour dormancy: Findings and hypotheses from clinical research on breast cancer, *Semin. Cancer Biol.* (2001). doi:10.1006/scbi.2001.0385.
- [167] A.F. Chambers, A.C. Groom, I.C. MacDonald, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites., *Nat. Rev. Cancer.* (2002). doi:10.1038/nrc865.
- [168] C. Heyn, J.A. Ronald, S.S. Ramadan, J.A. Snir, A.M. Barry, L.T. MacKenzie, D.J. Mikulis, D. Palmieri, J.L. Bronder, P.S. Steeg, T. Yoneda, I.C. MacDonald, A.F. Chambers, B.K. Rutt, P.J. Foster, In vivo MRI of cancer cell

- fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain, *Magn. Reson. Med.* (2006). doi:10.1002/mrm.21029.
- [169] C.A. Klein, D. Hölzel, Systemic cancer progression and tumor dormancy: Mathematical models meet single cell genomics, *Cell Cycle.* (2006). doi:10.4161/cc.5.16.3097.
- [170] M. Lacroix, Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells, *Endocr. Relat. Cancer.* (2006). doi:10.1677/erc-06-0001.
- [171] K. A.F., G. M.T., S. U., B. K., Postoperative Chemotherapy with Cisplatin and 5-Fluorouracil in Cancer of the Oral Cavity and the Oropharynx - Long-Term Results, *J. Chemother.* (2003).
- [172] N. Boudreau, M.J. Bissell, Extracellular matrix signaling: Integration of form and function in normal and malignant cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* (1998). doi:10.1016/S0955-0674(98)80040-9.
- [173] M.S. Wicha, Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds, *Clin. Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1537.
- [174] R.N. Kaplan, S. Rafii, D. Lyden, Preparing the “soil”: The premetastatic niche, *Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2407.
- [175] J.A. Aguirre-Ghiso, L. Ossowski, S.K. Rosenbaum, Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth, *Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0113.
- [176] J.A. Aguirre Ghiso, K. Kovalski, L. Ossowski, Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling, *J. Cell Biol.* (1999). doi:10.1083/jcb.147.1.89.
- [177] D.E. White, N.A. Kurpios, D. Zuo, J.A. Hassell, S. Blaess, U. Mueller, W.J. Muller, Targeted disruption of β 1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction, *Cancer Cell.* (2004). doi:10.1016/j.ccr.2004.06.025.
- [178] J.L. Townson, A.F. Chambers, Dormancy of solitary metastatic cells, *Cell Cycle.* (2006). doi:10.4161/cc.5.16.2864.
- [179] G.N. Naumov, I.C. MacDonald, P.M. Weinmeister, N. Kerkvliet, K. V. Nadkarni, S.M. Wilson, V.L. Morris, A.C. Groom, A.F. Chambers, Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: A possible contributor to dormancy, *Cancer Res.* (2002).

- [180] I. Dey-Guha, A. Wolfer, A.C. Yeh, J. G. Albeck, R. Darp, E. Leon, J. Wulfkühle, E.F. Petricoin, B.S. Wittner, S. Ramaswamy, Asymmetric cancer cell division regulated by AKT, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). doi:10.1073/pnas.1109632108.
- [181] V. Müller, N. Stahmann, S. Riethdorf, T. Rau, T. Zabel, A. Goetz, F. Jänicke, K. Pantel, Circulating tumor cells in breast cancer: Correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity, *Clin. Cancer Res.* (2005). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2469.
- [182] K. Pantel, R.H. Brakenhoff, B. Brandt, Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, *Nat. Rev. Cancer.* (2008). doi:10.1038/nrc2375.
- [183] J. Massagué, G1 cell-cycle control and cancer, *Nature.* (2004). doi:10.1038/nature03094.
- [184] C.J. Sherr, J.M. Roberts, CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.* (1999). doi:10.1101/gad.13.12.1501.
- [185] H. Endo, H. Okuyama, M. Ohue, M. Inoue, Dormancy of cancer cells with suppression of AKT activity contributes to survival in chronic hypoxia, *PLoS One.* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0098858.
- [186] G.L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* (2003). doi:10.1038/nrc1187.
- [187] J. Folkman, Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin. Oncol.* (2002). doi:10.1053/sonc.2002.37263.
- [188] L. Holmgren, M.S. O'reilly, J. Folkman, Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat. Med.* (1995). doi:10.1038/nm0295-149.
- [189] G.N. Naumov, E. Bender, D. Zurakowski, S.Y. Kang, D. Sampson, E. Flynn, R.S. Watnick, O. Straume, L.A. Akslen, J. Folkman, N. Almog, A model of human tumor dormancy: An angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype, *J. Natl. Cancer Inst.* (2006). doi:10.1093/jnci/djj068.
- [190] S. Giuriato, S. Ryeom, A.C. Fan, P. Bachireddy, R.C. Lynch, M.J. Rioth, J. van Riggelen, A.M. Kopelman, E. Passegue, F. Tang, J. Folkman, D.W. Felsher, Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- (2006). doi:10.1073/pnas.0608017103.
- [191] S. Indraccolo, L. Stievano, S. Minuzzo, V. Tosello, G. Esposito, E. Piovan, R. Zamarchi, L. Chieco-Bianchi, A. Amadori, Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0506200103.
- [192] A.B. Al-Mehdi, K. Tozawa, A.B. Fisher, L. Shientag, A. Lee, R.J. Muschel, Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: A new model for metastasis, *Nat. Med.* (2000). doi:10.1038/71429.
- [193] F.M. Burnet, The concept of immunological surveillance., *Prog. Exp. Tumor Res.* (1970).
- [194] G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting., *Immunity.* (2004). doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017.
- [195] C.M. Koebel, W. Vermi, J.B. Swann, N. Zerafa, S.J. Rodig, L.J. Old, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state, *Nature.* (2007). doi:10.1038/nature06309.
- [196] J.D. Farrar, K.H. Katz, J. Windsor, G. Thrush, R.H. Scheuermann, J.W. Uhr, N.E. Street, Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state., *J. Immunol.* (1999).
- [197] A. Matsuzawa, Y. Takeda, M. Narita, H. Ozawa, Survival of leukemic cells in a dormant state following cyclophosphamide-induced cure of strongly immunogenic mouse leukemia (DL811), *Int. J. Cancer.* (1991). doi:10.1002/ijc.2910490227.
- [198] R.M. MacKie, R. Reid, B. Junor, Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery, *N. Engl. J. Med.* (2003). doi:10.1056/NEJM200302063480620.
- [199] G.J. Elder, P. Hersey, P. Branley, Remission of transplanted melanoma--clinical course and tumour cell characterisation, *Clin Transpl.* (1997).
- [200] I. Penn, Malignant melanoma in organ allograft recipients, *Transplantation.* (1996). doi:10.1097/00007890-199601270-00019.
- [201] M.G. Suranyi, P.G. Hogan, M.C. Falkk, R.A. Axelsen, R. Rigby, C. Hawley, J. Petrie, Advanced donor origin melanoma in a renal transplant recipient:

- Immunotherapy, cure, and retransplantation, *Transplantation*. (1998). doi:10.1097/00007890-199809150-00020.
- [202] D. Montagna, R. Maccario, F. Locatelli, E. Montini, S. Pagani, F. Bonetti, L. Daudt, I. Turin, D. Lisini, C. Garavaglia, P. Dellabona, G. Casorati, Emergence of antitumor cytolytic T cells is associated with maintenance of hematologic remission in children with acute myeloid leukemia, *Blood*. (2006). doi:10.1182/blood-2006-05-021535.
- [203] I. Penn, J.W. Alexander, K. Blaine, Post-transplant malignancy. The role of immunosuppression, *Drug Saf.* (2000). doi:10.2165/00002018-200023020-00002.
- [204] C.M. Vajdic, S.P. McDonald, M.R.E. McCredie, M.T. Van Leeuwen, J.H. Stewart, M. Law, J.R. Chapman, A.C. Webster, J.M. Kaldor, A.E. Grulich, Cancer incidence before and after kidney transplantation, *J. Am. Med. Assoc.* (2006). doi:10.1001/jama.296.23.2823.
- [205] S.L. Shiao, A. Preethi Ganesan, H.S. Rugo, L.M. Coussens, Immune microenvironments in solid tumors: New targets for therapy, *Genes Dev.* (2011). doi:10.1101/gad.169029.111.
- [206] S. M.S., A.-V. A., B. P., W. H.-C., A.-G. J.A., ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: Opportunities to control dormant residual disease, *Clin. Cancer Res.* (2011). doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2574.
- [207] M.S. Sosa, P. Bragado, J.A. Aguirre-Ghiso, Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: An awakening field, *Nat. Rev. Cancer.* (2014). doi:10.1038/nrc3793.
- [208] A.P. Adam, A. George, D. Schewe, P. Bragado, B. V. Iglesias, A.C. Ranganathan, A. Kourtidis, D.S. Conklin, J.A. Aguirre-Ghiso, Computational identification of a p38 SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence, *Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3820.
- [209] T.T. Onder, N. Kara, A. Cherry, A.U. Sinha, N. Zhu, K.M. Bernt, P. Cahan, B.O. Marcarci, J. Unternaehrer, P.B. Gupta, E.S. Lander, S.A. Armstrong, G.Q. Daley, Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming., *Nature*. (2012). doi:10.1038/nature10953.
- [210] R.M. Marión, K. Strati, H. Li, M. Murga, R. Blanco, S. Ortega, O. Fernandez-Capetillo, M. Serrano, M.A. Blasco, A p53-mediated DNA damage response

- limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity, *Nature*. (2009). doi:10.1038/nature08287.
- [211] R.S. Kim, A. Avivar-Valderas, Y. Estrada, P. Bragado, M.S. Sosa, J.A. Aguirre-Ghiso, J.E. Segall, Dormancy signatures and metastasis in estrogen receptor positive and negative breast cancer, *PLoS One*. (2012). doi:10.1371/journal.pone.0035569.
- [212] Y. Qiu, A.J. Cooney, S. Kuratani, F.J. DeMayo, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.91.10.4451.
- [213] B.C. Das, P. Thapa, R. Karki, S. Das, S. Mahapatra, T.C. Liu, I. Torregroza, D.P. Wallace, S. Kambhampati, P. Van Veldhuizen, A. Verma, S.K. Ray, T. Evans, Retinoic acid signaling pathways in development and diseases, *Bioorganic Med. Chem.* (2014). doi:10.1016/j.bmc.2013.11.025.
- [214] M.S. Sosa, F. Parikh, A.G. Maia, Y. Estrada, A. Bosch, P. Bragado, E. Ekpin, A. George, Y. Zheng, H.M. Lam, C. Morrissey, C.Y. Chung, E.F. Farias, E. Bernstein, J.A. Aguirre-Ghiso, NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes, *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms7170.
- [215] J.A. Aguirre-Ghiso, Y. Estrada, D. Liu, L. Ossowski, ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK)., *Cancer Res.* (2003).
- [216] D. Liu, J.A. Aguirre Ghiso, Y. Estrada, L. Ossowski, EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma, *Cancer Cell*. (2002). doi:10.1016/S1535-6108(02)00072-7.
- [217] J.A. Aguirre Ghiso, Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo, *Oncogene*. (2002). doi:10.1038/sj.onc.1205342.
- [218] M.S. Sosa, Dormancy programs as emerging antimetastasis therapeutic alternatives, *Mol. Cell. Oncol.* (2016). doi:10.1080/23723556.2015.1029062.
- [219] L. Chéry, H.-M. Lam, I. Coleman, B. Lakely, R. Coleman, S. Larson, J.A. Aguirre-Ghiso, J. Xia, R. Gulati, P.S. Nelson, B. Montgomery, P. Lange, L.A. Snyder, R.L. Vessella, C. Morrissey, Characterization of single disseminated

- prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways, *Oncotarget*. (2014). doi:10.18632/oncotarget.2480.
- [220] V.C. Thompson, T.K. Day, T. Bianco-Miotto, L.A. Selth, G. Han, M. Thomas, G. Buchanan, H.I. Scher, C.C. Nelson, N.M. Greenberg, L.M. Butler, W.D. Tilley, A gene signature identified using a mouse model of androgen receptor-dependent prostate cancer predicts biochemical relapse in human disease, *Int. J. Cancer*. (2012). doi:10.1002/ijc.26414.
- [221] A.C. Yeh, S. Ramaswamy, Mechanisms of cancer cell dormancy-another hallmark of cancer?, *Cancer Res*. (2015). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1370.