



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *BRCA1*,
GSTP1 ΚΑΙ *CST6* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΑΪΛΑΝΤΑ ΓΚΙΟΡΝΤΟΥΜΙ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη μεθυσίωσης των γονιδίων *BRCA1*, *GSTP1* και *CST6* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

ΑΪΛΑΝΤΑ ΓΚΙΟΡΝΤΟΥΜΙ

A.M.: 71702

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας,
Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ**, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
- 2. ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΡΟΥΠΗΣ**, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- 3. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΩΜΑΪΔΗΣ**, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 11/07/2019

Στην οικογένειά μου...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί μια νόσο μάστιγα για την εποχή μας και η μετάσταση αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου σε ασθενείς με καρκίνο. Η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs) και κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) μέσω της υγρής βιοψίας (liquid biopsy) αποτελεί ένα σύγχρονο, αξιόπιστο και μη επεμβατικό εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Ο καρκίνος του μαστού έχει μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλη μορφή καρκίνου και αποτελεί τον κύριο τύπο καρκίνου που μαστίζει τον γυναικείο πληθυσμό. Η έγκαιρη διάγνωση είναι καθοριστικής σημασίας για την ίαση. Η ανακάλυψη βιοδεικτών στο πλάσμα ασθενών κρίνεται αναγκαία για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου την εκτίμηση του κινδύνου και για την χορήγηση εξατομικευμένης θεραπείας.

Η μεθυλίωση του DNA φυσιολογικά εξασφαλίζει την χρωμοσωμική σταθερότητα του γονιδιώματος. Ωστόσο η υπομεθυλίωση υποκινητών ογκογονιδίων και η υπερμεθυλίωση υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν συσχετιστεί με ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων αντίστοιχα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων *BRCA1*, *GSTP1* και *CST6* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Για τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν ανεπτυγμένες από το εργαστήριο μέθοδοι MSP σε πραγματικό χρόνο (real-time MSP). Για την μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *GSTP1* χρησιμοποιήθηκαν 82 δείγματα converted DNA εκ των οποίων 24 φυσιολογικά δείγματα, 24 δείγματα από τον πρωτοπαθή όγκο, 34 από CTCs από μεταστατικό καρκίνο και δεν βρέθηκε κανένα μεθυλιωμένο στα φυσιολογικά (0,0%), ένα θετικό στα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου (4,17%) και κανένα θετικό στα CTCs (0,0%). Για την μελέτη της μεθυλίωσης του *BRCA1* χρησιμοποιήθηκαν 53 δείγματα converted DNA εκ των οποίων 14 φυσιολογικά δείγματα, 24 δείγματα από CTCs από μεταστατικό καρκίνο, και 15 δείγματα ctDNA από μεταστατικό καρκίνο και δεν βρέθηκε κανένα θετικό στα φυσιολογικά (0,0%), ένα θετικό στα CTCs (4,17%) και κανένα στα ctDNA (0,0%). Τέλος για την μελέτη μεθυλίωσης του *CST6* χρησιμοποιήθηκαν 24 δείγματα converted DNA ctDNA και βρέθηκαν 5 θετικά (20,38%). Τα δείγματα έχουν

απομονωθεί, γίνει conversion και ελεγχθεί για έλεγχο ποιότητας παλαιότερα από άλλα μέλη του εργαστηρίου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: μεθυλίωση DNA, καρκίνος, υγρή βιοψία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μεθυλίωση DNA, *BRCA1*, *GSTP1*, *CST6*, MSP, real-time MSP, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA)

ABSTRACT

Cancer is a pathological disease of our time and metastasis is the leading cause of death in cancer patients. The detection of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA) through liquid biopsy is a modern, reliable and non-invasive tool for early diagnosis, prognosis and treatment of cancer.

Breast cancer has been studied more than any other form of cancer and is the main type of cancer that plagues the female population. Early diagnosis is critical to cure. The discovery of biomarkers in the plasma of patients is considered necessary for the timely diagnosis of the disease, the risk assessment and for the administration of individualized treatment.

Methylation of DNA naturally assures chromosomal stability of the genome. However, hypomethylation of oncogenic primers and hypermethylation of tumor suppressor primers have been associated with oncogene activation and silencing of tumor suppressor genes, respectively.

The purpose of this study is to study the methylation of *BRCA1*, *GSTP1* and *CST6* genes in samples of breast cancer patients. For this purpose, MSP developed real-time MSP methods. For the study of methylation of the *GSTP1* gene, 82 converted DNA samples were used, of which 24 normal samples, 24 samples from the primary tumor, 34 from CTCs from metastatic cancer and found no methylated to normal (0.0%), one positive for the samples primary volume (4.17%) and no CTCs positive (0.0%). For the study of *BRCA1* methylation, 53 samples of converted DNA were used, of which 14 normal samples, 24 samples of CTCs from metastatic cancer, and 15 samples of ctDNA from metastatic cancer and found no positive for normal (0.0%), a positive for CTCs (4.17%) and none in ctDNA (0.0%). Finally, 24 samples of converted cDNA DNA were used to study the methylation of *CST6* and 5 positive (20.38%) were found. The samples have been isolated, converted and checked for quality earlier from other lab members.

SUBJECT AREA: DNA methylation, cancer, wet biopsy

KEYWORDS: Methylation of DNA, *BRCA1*, *GSTP1*, *CST6*, MSP, real-time MSP, circulating cancer cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VII
ABSTRACT.....	IX
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	XI
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	XV
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XIX
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	XXI
<i>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	4
1.1. Γενικά.....	4
1.2. Πώς εμφανίζεται ο καρκίνος.....	5
1.3. "Οδηγοί" του καρκίνου	6
1.4. "The hallmarks of cancer".....	6
1.5. Καρκίνος και μετάσταση.....	8
1.5.1. Κύτταρα εκκίνησης μετάστασης.....	9
1.5.2. Επιθυλιακή προς Μεσεγγυματική μετάβαση.....	10
1.5.3. Διείσδυση, αλληλεπίδραση με το στρώμα και ενδοαγγείωση.....	13
1.5.4. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα	14
1.5.5. Εξωαγγείωση	16
1.5.6. Αποικισμός.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	19
2.1. Γενικά.....	19
2.2. Μια ευρεία εικόνα των επιγενετικών μηχανισμών.....	20
2.3. Η επιγενετική του καρκίνου και η σχέση της με τη γενετική.....	23
2.4. Μεθυλίωση του DNA	26

2.4.1	Εισαγωγή	26
2.4.2.	DNA μεθυλίωση σε φυσιολογικά κύτταρα.....	28
2.4.3.	Βασικός μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA	29
2.4.3.1.	DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs)	29
2.4.3.2.	Πρωτεΐνες δέσμησης μεθυλιωμένων CpG (Methyl-CpG Binding Proteins)	31
2.4.3.3.	Υδροξυλάσες μεθυλοκυτοσίνης.....	32
2.4.4.	Ανωμαλίες στην μεθυλίωση του DNA στον καρκίνο.....	34
2.4.4.1.	Υπομεθυλίωση: Υποκινητών ογκογονιδίων	35
2.4.4.2.	Υπερμεθυλίωση: Υποκινητή ογκοκατασταλτικών γονιδίων	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ		37
3.1.	Εισαγωγή	37
3.2.	Συστατικά της υγρής βιοψίας	41
3.2.1.	Κυκλοφορούντες πρωτεΐνες που παράγονται από τον όγκο.....	41
3.2.2.	Κυκλοφορούν καρκινικό DNA	42
3.2.3.	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα	43
3.2.4.	Εξωκυτταρικά σωματίδια	44
3.2.5.	Κυκλοφορούν καρκινικό RNA	47
3.2.6.	Εκπαιδευμένα από τον όγκο αιμοπετάλια	47
3.3.	Δείγματα υγρής βιοψίας.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ		49
4.1.	Ανατομία και φυσιολογία του μαστού.....	49
4.2.	Γενικά.....	50
4.3.	Ταξινομήσεις στον καρκίνο του μαστού	52
4.3.1.	Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού	52
4.3.2.	Σύστημα σταδιοποίησης TNM	53

4.4. Γενετική του καρκίνου του μαστού	54
4.5. Επιγενετική του καρκίνου του μαστού	56
4.5.1. DNA μεθυλίωση	57
4.5.2. Βιοδείκτες DNA μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού	59
4.5.3. Γονίδια υπερμεθυλωμένα στον καρκίνο του μαστού	64
4.5.3.1. <i>CST6</i>	64
4.5.3.2. <i>GSTP1</i>	65
4.5.3.3. <i>BRCA1</i>	66
<i>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	68
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	72
6.1 Κλινικά δείγματα	72
6.2 Απομόνωση γενωμικού DNA	72
6.2.1. Από CTCs	72
6.2.2. Από πλάσμα ασθενών	73
6.2.3. Από FFPE's.....	73
6.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA	74
6.4. Χημική τροποποίηση του μεθυλωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (sodium bisulfite DNA conversion).....	75
6.5. Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων με real time PCR.....	76
6.6. Real time Methylation Specific PCR.....	76
6.6.1. Πειραματική πορεία για το γονίδιο <i>CST6</i>	77
6.6.2. Πειραματική πορεία για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	80
6.6.3. Πειραματική πορεία για το γονίδιο <i>BRCA1</i>	82
6.7. Οργανολογία της MSP	85
6.8. Συστήματα ανίχνευσης	87

6.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
7.1. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>CST6</i>	90
7.2. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>GSTP1</i>	93
7.3. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>BRCA1</i>	104
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	111
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	113
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	120
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Ο καρκίνος προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια, τις βασικές μονάδες κληρονομικότητας ⁴	5
Σχήμα 1.2. Τα έξι χαρακτηριστικά του καρκίνου σύμφωνα με την επισκόπηση του 2000 ⁵	7
Σχήμα 1.3. Ενημερωμένη επισκόπηση για τα χαρακτηριστικά του καρκίνου του 2010 ⁶	7
Σχήμα 1.4. Διαδικασία μετάστασης ¹¹	8
Σχήμα 1.5. Κύτταρα εκκίνησης μετάστασης και καρκινικά βλαστικά κύτταρα και διαδικασία εκκίνησης της μετάστασης ¹⁴	10
Σχήμα 1.6. Διαδικασίες: επιθυλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και μεσεγχυματική προς επιθυλιακή μετάβαση (MET) ²⁴	12
Σχήμα 1.7. Διαδικασία διείσδυσης ⁷	13
Σχήμα 1.8. Διαδικασία ενδοαγγείωσης ⁷	16
Σχήμα 1.9. Διαδικασία εξωαγγείωσης ⁷	17
Σχήμα 2.1. Οι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί καθορίζουν τον φαινότυπο ⁵⁴ ...	19
Σχήμα 2.2. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν επιγενετικό μηχανισμό ⁵⁴	22
Σχήμα 2.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί ⁵⁹	23
Σχήμα 2.4. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ¹³⁴	24
Σχήμα 2.5. Πιθανά προϊόντα αντίδρασης της 5-μέθυλοκυτοσίνης με δραστικά είδη οξυγόνου ⁷¹	25
Σχήμα 2.6. Γενετική και επιγενετική αλληλεπίδραση και συμβολή στον καρκίνο και στην εξέλιξη του ³³³	26
Σχήμα 2.7. Διαδικασία μεθυλίωσης ⁷²	27
Σχήμα 2.8. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν, αναγνωρίζουν και απομακρύνουν τη μεθυλίωση του DNA ⁸⁰	29

Σχήμα 2.9. Οδοί μεθυλίωσης του DNA ⁸¹	31
Σχήμα 2.10. Μηχανισμοί απομεθυλίωσης ¹¹⁹	33
Σχήμα 2.11. Υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση στον καρκίνο ¹³³	34
Σχήμα 2.12. DNA υπερμεθυλίωση και DNA υπομεθυλίωση στον καρκίνο ³³³	35
Σχήμα 2.13. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων αυξάνεται παράλληλα με την εξέλιξη του όγκου ³³²	36
Σχήμα 3.1. Συστατικά της κυκλοφορίας του αίματος που μπορούν να απομονωθούν μέσω της υγρής βιοψίας ¹⁴²	39
Σχήμα 3.2. Εφαρμογές κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) και εξωσωμάτων συστατικών της υγρής βιοψίας για εξατομικευμένη ιατρική ¹³⁸	40
Σχήμα 3.3. Συστατικά υγρής βιοψίας που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, αναλύσεις που χρησιμοποιούνται ανά κατηγορία και χρησιμοποιούμενες τεχνικές ¹⁴³	41
Σχήμα 3.4. Απελευθέρωση και εξαγωγή του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA από το αίμα ¹³⁵	43
Σχήμα 3.5. Πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε από την ανάλυση των CTCs και του ctDNA ¹⁶²	44
Σχήμα 3.6. Βιογένεση και περιεχόμενο εξωσωμάτων ¹³⁸	46
Σχήμα 3.7. Σωματικά υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα στην υγρή βιοψία ¹⁸⁹	48
Σχήμα 4.1. Ανατομία γυναικείου μαστού ¹⁹²	50
Σχήμα 4.2. Τύποι καρκίνου του μαστού ¹⁹⁷	51
Σχήμα 4.3. Το σχήμα απεικονίζει τους βασικούς βιοδείκτες που σχετίζονται με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του καρκίνου όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού ²¹⁰	55
Σχήμα 4.4. Επιγενετικές τροποποιήσεις που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του μαστού ²²³	57
Σχήμα 4.5. Υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση στον καρκίνο ²¹⁶	58

Σχήμα 4.6. Αύξηση της μεθυλίωσης των υποκινητών κατά την εξέλιξη του όγκου ²¹⁶	59
Σχήμα 4.7. Θέση του γονιδίου <i>CST6</i> στο χρωμόσωμα 11 ²⁷⁵	65
Σχήμα 4.8. <i>GSTP1</i> γονίδιο, ενεργή μορφή και μη ενεργή μορφή λόγω μεθυλίωσης ³⁰⁰	66
Σχήμα 4.9. <i>BRCA1</i> γονίδιο και θέση του στο χρωμόσωμα 17 ³⁰¹	67
Σχήμα 6.1. Nanodrop-1000 Spectrophotometer.	74
Σχήμα 6.2. Διαδικασία μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη.	75
Σχήμα 6.3. Βασική αρχή της MSP ³³⁵	77
Σχήμα 6.4. LightCycler® 2.0 & 1.5.....	86
Σχήμα 6.5. Cobas® 4800.	87
Σχήμα 6.6. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος ανίχνευσης με ανιχνευτή υδρόλυσης τύπου TaqMan ³³³	88
Σχήμα 6.7. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος ανίχνευσης με χρήση χρωστικής φθορισμού ³³⁴	89
Σχήμα 7.1. Καμπύλη ενίσχυσης.....	90
Σχήμα 7.2. Καμπύλη ενίσχυσης των δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού για μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου <i>CST6</i>	91
Σχήμα 7.3. Καμπύλη Kaplan-Meier συνολική επιβίωση.....	92
Σχήμα 7.4. Καμπύλη Kaplan-Meier για το ελεύθερο νόσου διάστημα.	93
Σχήμα 7.5. Καμπύλη ενίσχυσης.....	94
Σχήμα 7.6. Καμπύλες τήξης.....	94
Σχήμα 7.7. Κορυφές τήξης.	95
Σχήμα 7.8. Καμπύλες ενίσχυσης των φυσιολογικών δειγμάτων.	96
Σχήμα 7.9. Καμπύλες τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων..	97
Σχήμα 7.10. Κορυφές τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων.	98
Σχήμα 7.11. Καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων πρωτοπαθούς όγκου..	99

Σχήμα 7.12. Καμπύλες και κορυφές τήξης των δειγμάτων πρωτοπαθούς όγκου.	100
Σχήμα 7.13. Καμπύλες ενίσχυσης δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.....	101
Σχήμα 7.14. Καμπύλες τήξης δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.....	102
Σχήμα 7.15. Κορυφές τήξης των δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.....	103
Σχήμα 7.16. Καμπύλη ενίσχυσης, καμπύλη τήξης και κορυφές τήξης.	105
Σχήμα 7.17. Καμπύλες ενίσχυσης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών.....	106
Σχήμα 7.18. Καμπύλες τήξης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών..	107
Σχήμα 7.19. Κορυφές τήξης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών.	108
Σχήμα 7.20. Καμπύλες ενίσχυσης, τήξης και κορυφές τήξης δειγμάτων ctDNA ασθενών..	110

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα χαρακτηριστικά της κλασικής βιοψίας και τα αντίστοιχα της υγρής βιοψίας.....	37
Πίνακας 4.1. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού.....	52
Πίνακας 4.2. Σύστημα σταδιοποίησης TNM.....	53
Πίνακας 4.3. Γονίδια, Λειτουργία και κατάσταση μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού ²³⁶	61
Πίνακας 6.1. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών και ανιχνευτή για το γονίδιο <i>ACTB</i> ...	76
Πίνακας 6.2. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών και ανιχνευτή για το γονίδιο <i>CST6</i>	78
Πίνακας 6.3. Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο <i>CST6</i>	79
Πίνακας 6.4. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο <i>CST6</i>	80
Πίνακας 6.5. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	80
Πίνακας 6.6 Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	81
Πίνακας 6.7. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο <i>GSTP1</i>	82
Πίνακας 6.8. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο <i>BRCA1</i>	83
Πίνακας 6.9. Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο <i>BRCA1</i>	84
Πίνακας 6.10. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο <i>BRCA1</i>	85
Πίνακας 7.1. Συμφωνία των δικών μου πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ ctDNA με τα αντίστοιχα CTCs.....	91
Πίνακας 7.2. Συμφωνία των πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ ctDNA με τα αντίστοιχα CTCs.....	92
Πίνακας 7.3. Συμφωνία αποτελεσμάτων των FFPEs και των CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	104
Πίνακας 7.4. Συμφωνία αποτελεσμάτων των CTCs και του ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	110

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης Κλινικής Χημείας, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Ε. Λιανίδου, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος, την εκπαίδευση στο πεδίο της υγρής βιοψίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις γνώσεις, τις παρατηρήσεις και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας αλλά και την δυνατότητα που μου έδωσε να εξασκηθώ στο βιοχημικό εργαστήριο σε ένα από τα μεγαλύτερα δημόσια νοσοκομεία της Ελλάδας το «Γενικό Νοσοκομείο Ευαγγελισμός».

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Λυδία Γιαννοπούλου για όλη την βοήθεια της, για τις γνώσεις της, για την επίβλεψη, για την υπομονή, τις παρατηρήσεις της και για τις συμβουλές κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ πολύ επίσης την διδάκτορα Σοφία Μαστοράκη για την παραχώρηση των δειγμάτων της. Ευχαριστώ πολύ την Δήμητρα Στεργιοπούλου, την διδάκτορα Αθηνά Μάρκου, την διδάκτορα Μάρθα Ζαβρίδου, την διδάκτορα Αρετή Στρατή καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για όλη την βοήθεια, τις συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριές μου για την άψογη συνεργασία μας, την υπομονή, την κατανόηση, τη φιλία και την υποστήριξη κάθε φορά που χρειαζόταν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τις φίλες και τους φίλους μου για την κατανόηση την αμέριστη υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί και ιδιαίτερα την φίλη και συμφοιτήτρια μου Σταυρούλα Σμίλκου για την υποστήριξη, την βοήθεια της κάθε φορά που την χρειάστηκα και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε τόσο στην σχολή όσο και κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Και τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην υπέροχη οικογένεια μου για την αγάπη, τη φροντίδα, την συνεχή υποστήριξη σε κάθε μου βήμα, την ενθάρρυνση, την εμπιστοσύνη και την ατελείωτη υπομονή και κατανόησή τους.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

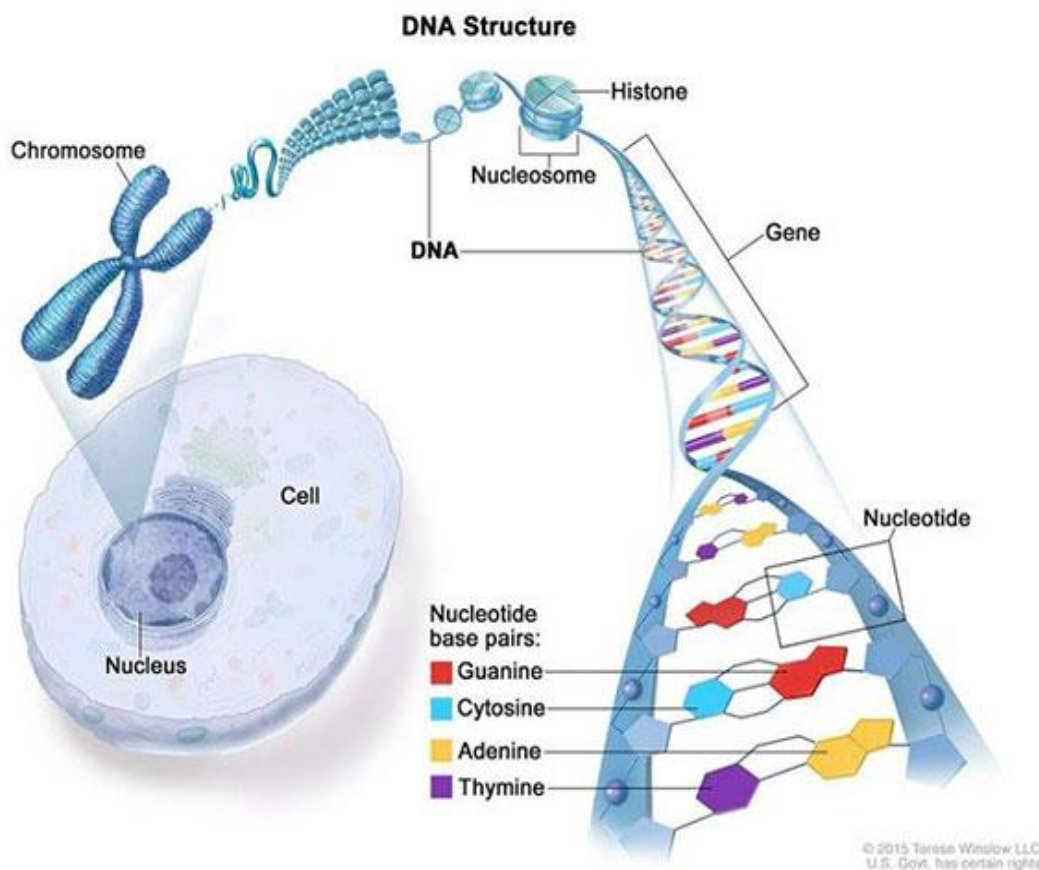
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1. Γενικά

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα υγείας σε όλο τον κόσμο¹. Ο καρκίνος είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο, με 9,6 εκατομμύρια θανάτους από καρκίνο να υπολογίζονται το 2018². Στις ΗΠΑ, περισσότερες από 1.735.350 διαγνώσεις καρκίνου εκτιμήθηκαν το 2018, προκαλώντας περισσότερους από 609.640 θανάτους³. Καρκίνος, σύμφωνα με τον ορισμό που δίνει το National Cancer Institute, είναι το όνομα που δίνεται σε μια ομάδα ασθενειών με σχετικά όμοια χαρακτηριστικά. Σε όλους τους τύπους καρκίνου, μερικά από τα κύτταρα του σώματος αρχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα και να εξαπλώνονται στους περιβάλλοντες ιστούς. Ο καρκίνος μπορεί να ξεκινήσει σχεδόν οπουδήποτε στο ανθρώπινο σώμα, το οποίο αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα. Κανονικά, τα ανθρώπινα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται για να σχηματίσουν νέα κύτταρα, όποτε το σώμα τα χρειάζεται. Όταν τα κύτταρα γερνούν ή καταστραφούν, πεθαίνουν και τα νέα κύτταρα παίρνουν τη θέση τους. Όταν όμως αναπτύσσεται ο καρκίνος, αυτή η συνήθης διαδικασία διασπάται. Καθώς τα κύτταρα γίνονται όλο και πιο ανώμαλα, τα παλιά ή τα κατεστραμμένα κύτταρα επιβιώνουν όταν πρέπει να πεθάνουν και σχηματίζονται νέα κύτταρα όταν δεν χρειάζονται. Αυτά τα επιπλέον κύτταρα μπορούν να διαιρεθούν χωρίς διακοπή και μπορεί να σχηματίσουν μάζες που ονομάζονται όγκοι. Πολλοί καρκίνοι σχηματίζουν συμπαγείς όγκους, οι οποίοι είναι μάζες ιστών. Οι καρκίνοι του αίματος, όπως οι λευχαιμίες, γενικά δεν σχηματίζουν συμπαγείς όγκους. Οι καρκίνοι είναι κακοήθεις, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να εξαπλωθούν ή να εισβάλουν στους κοντινούς ιστούς. Επιπλέον, καθώς αυτοί οι όγκοι αναπτύσσονται, ορισμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκολληθούν και να ταξιδέψουν σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος και να σχηματίσουν νέους όγκους μακριά από τον αρχικό όγκο. Σε αντίθεση με τους κακοήθεις όγκους, οι καλοήθεις όγκοι δεν εξαπλώνονται ή δεν εισβάλλουν στους κοντινούς ιστούς. Ωστόσο, οι καλοήθεις όγκοι μπορεί να είναι αρκετά μεγάλοι. Όταν αφαιρούνται, συνήθως δεν αυξάνονται, ενώ οι κακοήθεις όγκοι αρκετές φορές αυξάνονται. Σε αντίθεση με τους περισσότερους καλοήθεις όγκους σε άλλα σημεία του σώματος, οι καλοήθεις όγκοι του εγκεφάλου μπορεί να είναι απειλητικοί για τη ζωή⁴.

1.2. Πώς εμφανίζεται ο καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια - δηλαδή, προκαλείται από αλλαγές στα γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων μας, ειδικά πώς μεγαλώνουν και διαιρούνται. Οι γενετικές αλλαγές που προκαλούν καρκίνο μπορούν να κληρονομηθούν από τους γονείς μας. Μπορούν επίσης να προκύψουν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου ως αποτέλεσμα σφαλμάτων κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή λόγω βλάβης στο DNA που προκαλείται από ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο καρκίνος κάθε ατόμου αποτελεί έναν μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών. Καθώς ο καρκίνος συνεχίζει αυξάνονται και οι γενετικές αλλαγές. Ακόμη και εντός του ίδιου όγκου, διαφορετικά κύτταρα μπορεί να έχουν διαφορετικές γενετικές αλλαγές⁴.



Σχήμα 1.1. Ο καρκίνος προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια, τις βασικές μονάδες κληρονομικότητας⁴.

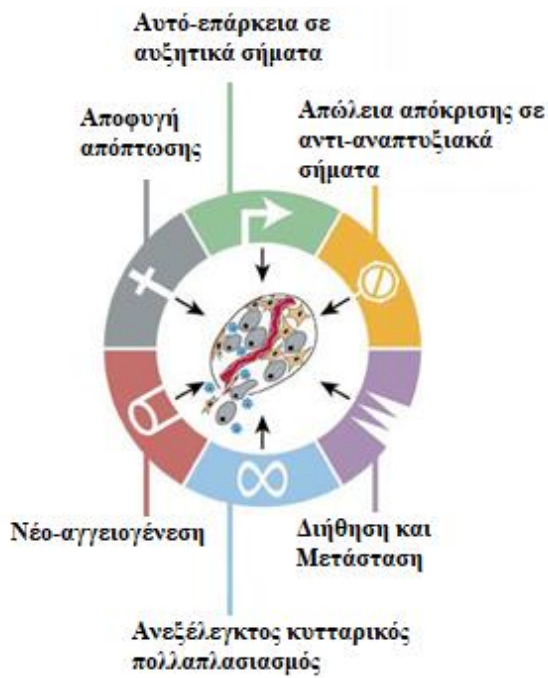
1.3. "Οδηγοί" του καρκίνου

Οι γενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στον καρκίνο τείνουν να επηρεάζουν τρεις κύριους τύπους γονιδίων: α) πρωτο-ογκογονιδίων, β) γονιδίων καταστολής όγκων και γ) γονιδίων επιδιόρθωσης DNA. Μεταλλάξεις σε αυτές τις κατηγορίες γονιδίων καλούνται μερικές φορές "οδηγοί" καρκίνου. Τα πρωτο-ογκογονίδια εμπλέκονται στην φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Ωστόσο, όταν αυτά τα γονίδια μεταλλάσσονται ή είναι πιο δραστικά από το φυσιολογικό, μπορεί να γίνουν γονίδια (ή ογκογονίδια) που προκαλούν καρκίνο, επιτρέποντας στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν όταν δεν πρέπει. Τα γονίδια καταστολής όγκων (όγκο-κατασταλτικά γονίδια) συμμετέχουν επίσης στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης. Τα κύτταρα με μεταλλάξεις στα όγκο-κατασταλτικά γονίδια μπορούν να διαιρεθούν με ανεξέλεγκτο τρόπο. Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA που έχει υποστεί βλάβη-ρήξη. Κύτταρα με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν την τάση να αναπτύξουν πρόσθετες μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια. Μαζί, αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να κάνουν το κύτταρο να γίνει καρκινικό.

1.4. "The hallmarks of cancer"

Το έτος 2000, οι Hanahan και Weinberg δημοσίευσαν την επισκόπησή τους: τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου (the hallmarks of cancer)⁵, όπου προσπάθησαν να οργανώσουν τις βασικές περιπλοκές της βιολογίας του καρκίνου σε έξι σημαντικά χαρακτηριστικά:

- i) Αυτοδυναμία σε αυξητικά σήματα,
- ii) Απώλεια απόκρισης σε αντι-αναπτυξιακά σήματα,
- iii) Διήθηση και Μετάσταση,
- iv) Ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός,
- v) Νέο-αγγειογένεση
- vi) Αποφυγή απόπτωσης.



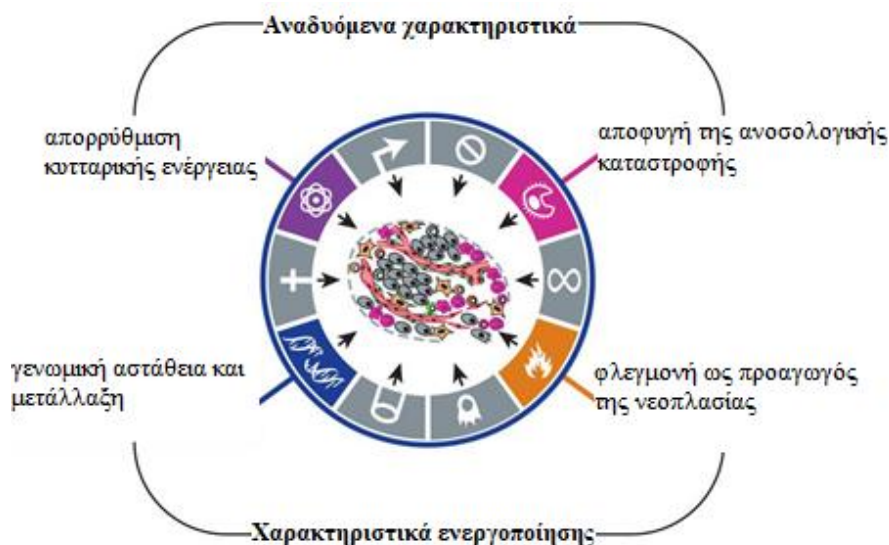
Σχήμα 1.2. Τα έξι χαρακτηριστικά του καρκίνου σύμφωνα με την επισκόπηση του 2000⁵.

Μια δεκαετία αργότερα, δημοσίευσαν μια ενημερωμένη επισκόπηση και πρόσθεσαν δύο αναδυόμενα χαρακτηριστικά⁶:

- vii) απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας και
- viii) αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής

και δύο χαρακτηριστικά ενεργοποίησης:

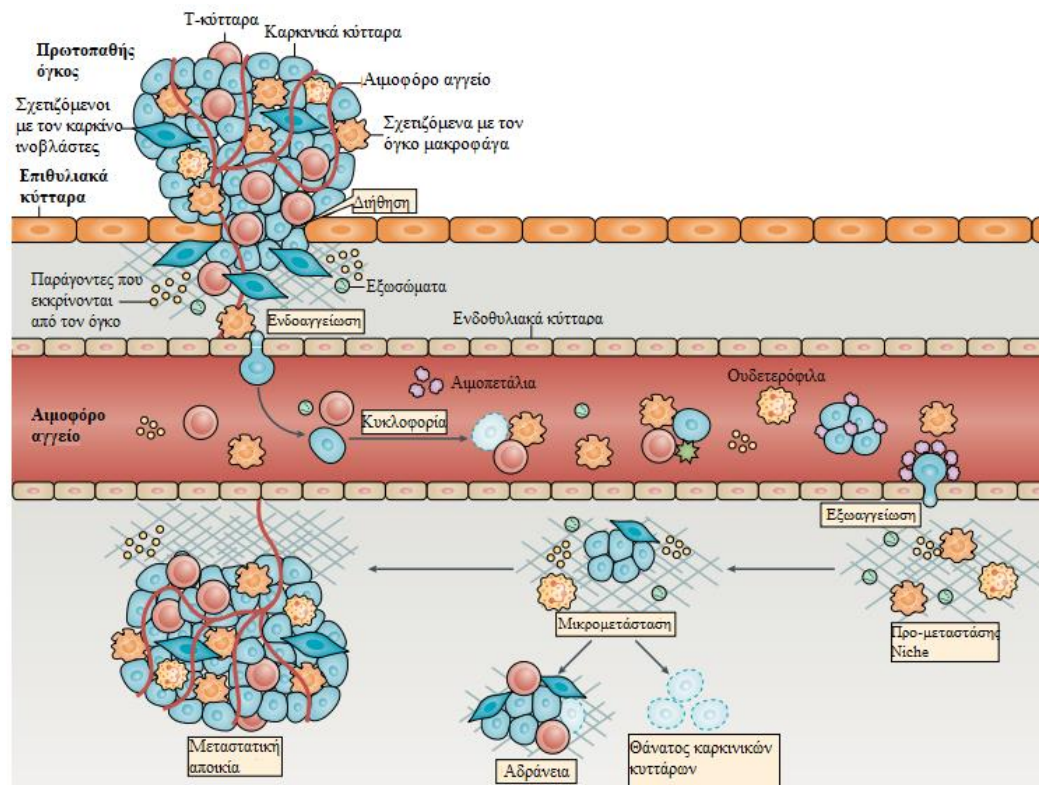
- ix) γενωμική αστάθεια και μετάλλαξη και
- x) φλεγμονή ως προαγωγός της νεοπλασίας.



Σχήμα 1.3. Ενημερωμένη επισκόπηση για τα χαρακτηριστικά του καρκίνου του 2010⁶.

1.5. Καρκίνος και μετάσταση

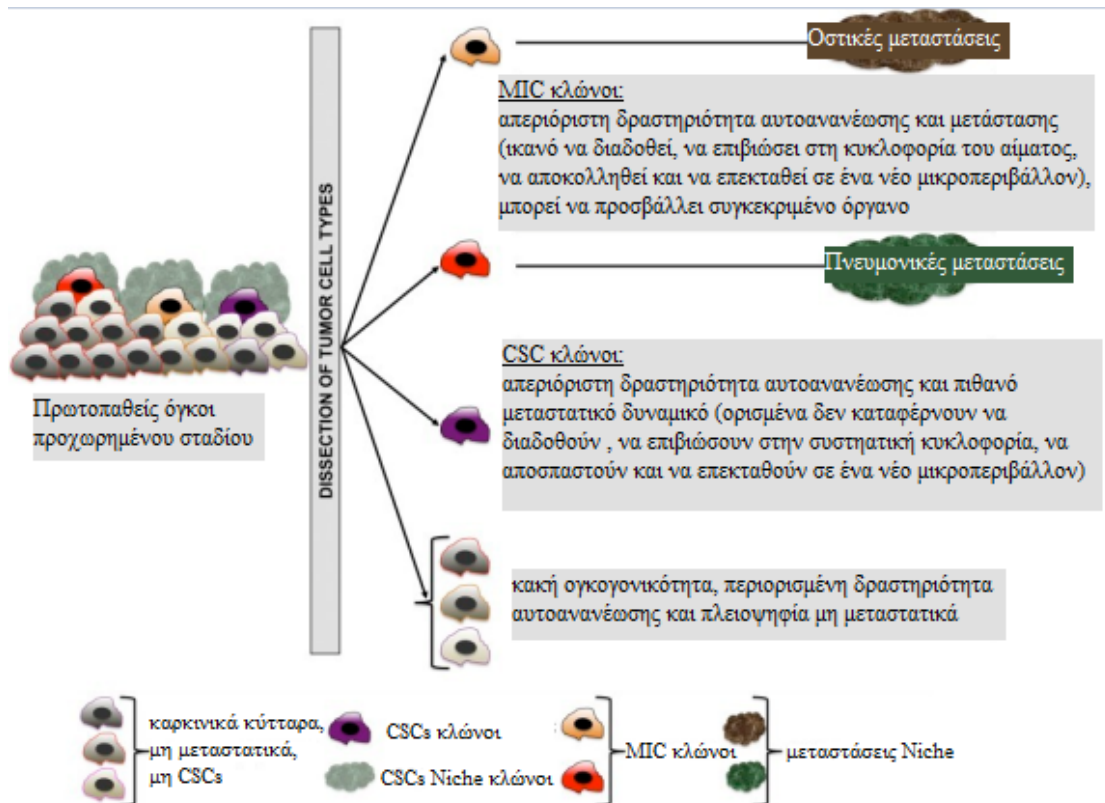
Η ικανότητα της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα όργανα ορίζει την κακοήθεια του όγκου και περίπου το 90% των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο οφείλεται σε μεταστατική νόσο και όχι στην πρωτογενή ανάπτυξη όγκου. Τα θεμέλια για την κατανόηση της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων τέθηκαν πριν από περίπου 130 χρόνια από τον Άγγλο χειρουργό Stephen Paget με βάση παρατηρήσεις σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Ο Paget ανέπτυξε την θεωρία του σπόρου και του εδάφους⁸, σύμφωνα με την οποία η επιλογή μιας θέσης για ανάπτυξη δευτερογενούς όγκου δεν γίνεται μόνο από το κύτταρο όγκου ή τον "σπόρο", αλλά επηρεάζεται επίσης από τις ιδιότητες του οργάνου στόχου, ή το "έδαφος". Τα τελευταία χρόνια έχει καταστεί σαφές ότι η σχέση μεταξύ των **δισεπαρμένων καρκινικών κυττάρων (Disseminating Tumor Cells - DTCs)** και του μικροπεριβάλλοντος των οργάνων που αποικίζουν είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της μετάστασης και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον προσδιορισμό του εάν τα DTCs θα αναπτυχθούν για να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους^{9,10}. Τα κύτταρα αυτά που κάνουν μετάσταση εκφράζουν ένα ή ένα σύνολο γονιδίων που τους παρέχουν την ικανότητα να διαχέονται και να αποικίζουν σε μακρινά όργανα.



Σχήμα 1.4. Διαδικασία μετάστασης¹¹.

1.5.1. Κύτταρα εκκίνησης μετάστασης

Οι συμπαγείς όγκοι είναι εξαιρετικά ετερογενείς. Πολλοί μηχανισμοί συμβάλλουν στην ετερογένεια, οι πιο σημαντικοί είναι η κλωνική εξέλιξη, τα **καρκινικά βλαστοκύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs)** και η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος¹². Η κλωνική εξέλιξη προβλέπει ότι τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν νέες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς αυξάνεται ο αριθμός τους, μερικές από τις οποίες τους παρέχουν πλεονέκτημα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Τα καρκινικά κύτταρα αυτά μεταλλάσσονται περαιτέρω και παράγουν νέους κλώνους κυττάρων που συμβάλλουν περισσότερο ή λιγότερο στην ετερογένεια του όγκου. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα σε ορισμένες κακοήθειες πιστεύεται ότι αποτελούν την κινητήρια δύναμη της ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου. Η αμφίδρομη πλαστικότητα τους προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας στον χαρακτηρισμό τους. Εκτός από την κλωνική εξέλιξη και τα CSCs το μικροπεριβάλλον συμβάλλει σημαντικά στην διαμόρφωση της ετερογένειας του όγκου. Ο όρος «**κύτταρα που εκκινούν μετάσταση**» (**Metastasis initiating cells, MICs**) χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα κύτταρα που πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη της μετάστασης¹³. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας γεγονός που εξηγεί την ικανότητά τους να ρυθμίζουν τα προγράμματα διαφοροποίησης, μεταβολισμού και πολλαπλασιασμού για να επιβιώσουν στην κυκλοφορία, να αποφύγουν την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος, και να προσαρμοστούν σε ένα νέο μικροπεριβάλλον εντελώς διαφορετικό από αυτό στο οποίο σχηματίστηκαν. Ωστόσο ο όρος MICs δεν δικαιολογείται απόλυτα λόγω του ότι τα MIC δεν φαίνεται να διαφέρουν από τα CSCs.

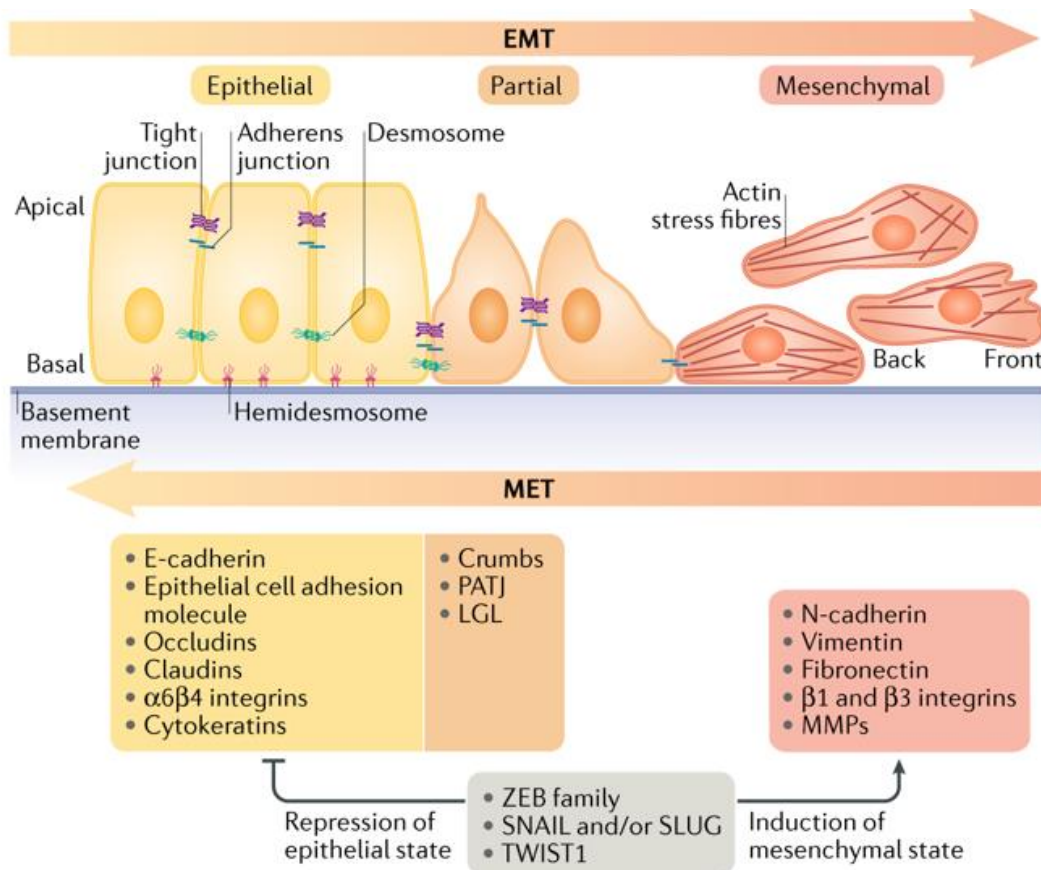


Σχήμα 1.5. Κύτταρα εκκίνησης μετάστασης και καρκινικά βλαστικά κύτταρα και διαδικασία εκκίνησης της μετάστασης¹⁴.

1.5.2. Επιθυλιακή προς Μεσεγγυματική μετάβαση

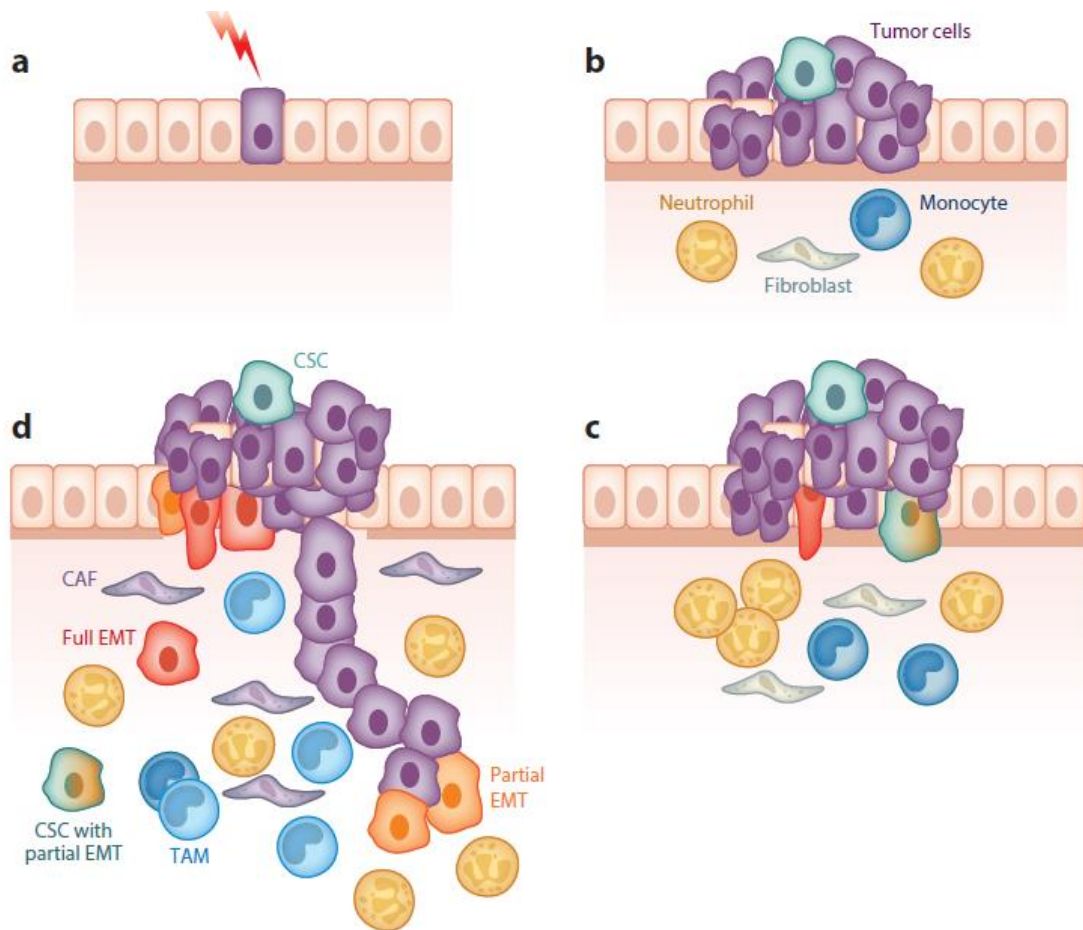
Μετά τον μετασχηματισμό, ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να παραμείνει αδρανές ή να διαιρεθεί και να σχηματίσει μια αποικία κυττάρων η ετερογένεια της οποίας είναι μεταβλητή. Εάν το μετασχηματισμένο κύτταρο παρουσιάζει χαρακτηριστικά CSC, η αποικία μπορεί να γίνει ετερογενής από νωρίς. Εάν το μετασχηματισμένο κύτταρο δεν εμφανίζει ιδιότητες CSC, η αρχική αποικία μπορεί να αποτελείται από πανομοιότυπα κύτταρα τα οποία σε κάποια μεταγενέστερη φάση αρχίζουν να αποκλίνουν το ένα από το άλλο με απόκτηση νέων γενετικών μεταλλάξεων ή επιγενετικών τροποποιήσεων. Και στις δύο περιπτώσεις, η αποικία αρχικά περιορίζεται στο επιθήλιο όπου είναι ένα καρκίνωμα *in situ*, διαχωρισμένο από το στρώμα από την επιθηλιακή βασική μεμβράνη. Σε κάποιο σημείο της εξέλιξής τους, μερικά από τα κύτταρα αποκτούν ιδιότητες που τους επιτρέπουν να διεισδύσουν στη βασική μεμβράνη και να δημιουργήσουν μια φυσική σχέση με το στρώμα. Η ικανότητα διάσπασης της βασικής μεμβράνης και εισβολής στους γειτονικούς ιστού δεν αποτελεί χαρακτηριστικό φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων, πράγμα που σημαίνει ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν αποκτήσει *de novo* ή έχουν επανενεργοποιήσει τα αναπτυξιακά προγράμματα

που τους προσδίδουν επεμβατικά χαρακτηριστικά. Η επανενεργοποίηση τέτοιων προγραμμάτων γίνεται κυρίως από το μικροπεριβάλλον. Παρά την ακεραιότητα της βασικής μεμβράνης, ένα *in situ* καρκινώμα μπορεί να ενεργοποιήσει τα κύτταρα του στρώματος και να στρατολογήσει αιμοποιητικά κύτταρα με την έκκριση μεσολαβητών που διαπερνούν την βασική μεμβράνη¹⁵. Τα αιμοποιητικά κύτταρα που έχουν προσβληθεί μπορούν στη συνέχεια να επιστρέψουν σήμα πίσω στα κύτταρα του όγκου με δικούς τους διαλυτούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν φαινοτυπικές αλλαγές που διευκολύνουν την εισβολή. Είτε προκύπτει από τον ογκογονικό επαναπρογραμματισμό είτε από τις αποκρίσεις σειράς γεγονότων του στρώματος, τα μετασχηματισμένα κύτταρα αποκτούν αυτές τις ιδιότητες από την αλληλεπίδραση με τον ιστό στον οποίο αναπτύσσονται. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα κύτταρα μπορούν να μεταβαίνουν μεταξύ επιθηλιακών και μεσεγχυματικών φαινοτύπων¹⁶. Η διαδικασία με την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν έναν μεσεγχυματικό χαρακτήρα είναι γνωστή ως **επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)** και περιλαμβάνει πλήθος φαινοτυπικών αλλαγών, μεταξύ των οποίων η απώλεια της πολικότητας της βασικής μεμβράνης και των συνδέσμων συγκόλλησης κυττάρου-κυττάρου, μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης E-cadherin, αύξηση της έκφρασης μορίων μεσεγχυματικού χαρακτήρα όπως η N-cadherin, μεταγραφικών παραγόντων NAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, και TWIST^{17,18} όπως και microRNAs (miRNAs) καθώς και επιγενετικών και μετά-μεταφραστικών ρυθμίσεων αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο^{17,19-22}. Η διαδικασία της μετάβασης των κυττάρων από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση είναι αναστρέψιμη, επιτρέποντας στα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε EMT να ανακτήσουν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους μέσω της **μεσεγχυματικής προς επιθηλιακή μετάβασης (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET)**²³.



Σχήμα 1.6. Διαδικασίες: επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση (EMT) και μεσεγγυματική προς επιθηλιακή μετάβαση (MET)²⁴.

Τα κύτταρα του καρκινώματος μπορούν να μεταναστεύσουν και να εισβάλουν στους ιστούς μεμονωμένα ή σε ομάδες²⁵⁻²⁷ που οδηγούνται από **σχετιζόμενους με τον καρκίνο ινοβλάστες (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)**²⁸ ή από κύτταρα όγκου που εμφανίζουν μερική EMT. Τα **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs)** είναι συνήθως μικτών φαινοτύπων: μερικά εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς της EMT, ενώ άλλα παρουσιάζουν κυρίως επιθηλιακά χαρακτηριστικά^{29,30}. Τα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν EMT και έχουν διεισδύσει σε μια δευτερεύουσα περιοχή πρέπει να υποβληθούν σε MET για να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν αποικίες³¹⁻³³.



Σχήμα 1.7. Διαδικασία διείσδυσης. a. Ένα μεταλλαγμένο κύτταρο, δηλαδή ένα κύτταρο το οποίο έχει υποστεί γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις, μπορεί να παραμείνει αδρανές ή να ξεκινήσει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. b. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα του στρώματος αλληλεπιδρούν με τα αιμοποιητικά κύτταρα μέσω της έκκρισης μεσολαβητών που διαπερνούν την βασική μεμβράνη. c. Καθώς αναπτύσσεται η αποικία, απελευθερώνονται διαλυτοί παράγοντες που προσλαμβάνονται από διάφορες υποομάδες λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, καθώς και μια ποικιλία στρωματικών κυττάρων. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα εκκρίνουν με την σειρά τους σήματα που ρυθμίζουν τον φαινότυπο τους και διεγείρουν την EMT των καρκινικών κυττάρων του στρώματος, συμπεριλαμβανομένων και των CSC, τα οποία αποκτούν χαρακτηριστικά διήθησης και παραβιάζουν την βασική μεμβράνη. d. Τα κύτταρα του όγκου που έχουν υποβληθεί σε πλήρη ή μερική EMT διαπερνούν το στρώμα είτε ως μεμονωμένα κύτταρα που αποσπώνται από τον όγκο ή σε ομάδες στις οποίες η πλειοψηφία των κυττάρων διατηρεί έναν κατά κύριο λόγο επιθηλιακό φαινότυπο. Τα κύτταρα όγκου ενεργοποιούν τα στρωματικά κύτταρα για να γίνουν CAF και μακροφάγα για να γίνουν TAM. Συντομογραφίες: CAF: σχετιζόμενος με τον καρκίνο ινοβλάστης, CSC: καρκινικό βλαστοκύτταρο, EMT: επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, TAM: σχετιζόμενο με τον όγκο μακροφάγο⁷.

1.5.3. Διείσδυση, αλληλεπίδραση με το στρώμα και ενδοαγγείωση

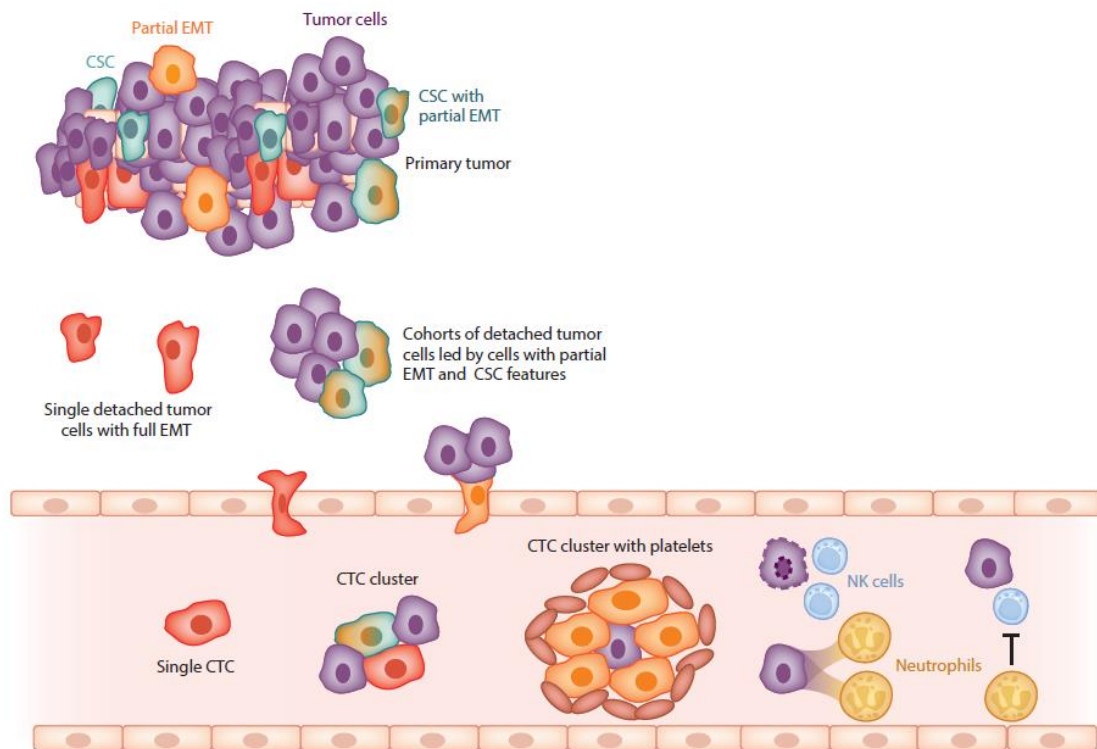
Η **διείσδυση** (διήθηση) των κυττάρων του όγκου στο στρώμα μετά την παραβίαση της βασικής μεμβράνης τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με διάφορα κύτταρα του στρώματος και την εξωκυτταρική μήτρα. Τα κύτταρα του όγκου μπορούν να αξιοποιήσουν τα CAFs και τα **σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα (Tumor Associated Macrophages, TAMs)** για να εκκρίνουν αγγειογόνους παράγοντες,

πρωτεολυτικά ένζυμα και πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας και να προκαλέσουν αγγειογένεση, λεμφαγγειογένεση και αναδιαμόρφωση ιστού, απελευθερώνοντας ένα πλήθος απομονωμένων αυξητικών παραγόντων και των προδρόμων μορίων τους³⁴. Η αναδιαμόρφωση του ιστού διευκολύνει τη διείσδυση των νεοσχηματισμένων πλασματικών κυττάρων, νεοσχηματιζόμενων αγγείων τα οποία είναι εξαιρετικά διαπερατά και στερούνται υπερκυττάρων, προκαλώντας την **ενδοαγγείωση**, τη διαδικασία με την οποία τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία για να γίνουν CTCs⁷.

1.5.4. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Λόγω της σπανιότητας των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs) και της δυσκολίας απομόνωσης τους – εκτιμάται ότι ένα κύτταρο του όγκου αναμειγνύεται με ένα δισεκατομμύριο κύτταρα αίματος³⁵ – η διέλευση τους μέσω της κυκλοφορίας ήταν ένα όχι και πολύ σαφές βήμα της διαδικασίας της μετάστασης. Ωστόσο, η ολοένα και πιο εξελιγμένη τεχνολογία διευκόλυνε την αναγνώριση και απομόνωση των CTC³⁶⁻³⁸, ανοίγοντας το δρόμο για την λεπτομερή αξιολόγηση των ιδιοτήτων τους. Τα CTCs στο αίμα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προγνωστική αξία και σημασία στη θεραπευτική ανταπόκριση³⁹, και ο ποσοτικός προσδιορισμός των CTCs χρησιμοποιήθηκε για να προβλέψει τη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression Free Survival, PFS)⁴⁰. Η εις βάθος ανάλυση των ιδιοτήτων των CTCs έδειξε ότι μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα ή συστάδες (ομάδες κυττάρων) ή να κυκλοφορήσουν ως μεμονωμένα κύτταρα. Παρόλο που τα συσσωματώματα είναι λιγότερο συνηθισμένα από τα μεμονωμένα CTCs, είναι 20-50 φορές πιο αποτελεσματικά στη διαμόρφωση μεταστάσεων⁴¹, υποδηλώνοντας την πιθανή ανάγκη συνεργασίας μεταξύ των καρκινικών κυττάρων για την έναρξη της μεταστατικής ανάπτυξης και την προστασία από τη μηχανική καταστροφή και τη μεσολάβηση των κυττάρων ανοσοποιητικού. Στον καρκίνο του μαστού, οι συστάδες CTCs βρέθηκαν να παρουσιάζουν ένα μικτό επιθηλιακό και μεσεγχυματικό φαινότυπο, με το μεσεγχυματικό φαινότυπο να είναι σημαντικά πιο έντονο από ότι σε μεμονωμένα CTCs⁴¹. Είναι ενδιαφέρον ότι CTCs από καρκίνο του μαστού εμφανίζουν δυναμικές μεταβολές στην επιθηλιακή και μεσεγχυματική κατάσταση ως απάντηση στη θεραπεία. Η αυξημένη μεσεγχυματική διαφοροποίηση συσχετίστηκε με την εξέλιξη της νόσου, υποδηλώνοντας ότι το EMT

μπορεί να παρέχει ένα βιοδείκτη αντίστασης στην θεραπεία²⁹. Σημαντικά ζητήματα που παραμένουν ανεπίλυτα είναι η αναλογία των CTCs που εμφανίζουν χαρακτηριστικά CSC σε διαφορετικούς τύπους όγκων. Με βάση την αναστρεψιμότητα του φαινοτύπου των CSCs, τα CTCs μπορούν να μεταβαίνουν μεταξύ πολυδύναμων και πιο διαφοροποιημένων καταστάσεων σύμφωνα με τους τύπους ερεθισμάτων που συναντούν. Κατά τη διάρκεια της εισόδου εντός της κυκλοφορίας, τα CTCs απαιτούν προστασία από την καταστροφή των λευκοκυττάρων, ιδιαίτερα των **φυσικών δολοφόνων (Natural Killers, NK)**, και τη μηχανική καταστροφή λόγω της διατμητικής πίεσης. Ο σχηματισμός συστάδων μπορεί να συμμετέχει στην παροχή τέτοιας προστασίας. Εκτός από το σχηματισμό συστάδων μεταξύ τους, τα CTCs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα. Τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν σε CTCs με μια ποικιλία μηχανισμών, το ένα από τα οποία είναι η αναγνώριση της έκφρασης του παράγοντα ιστών στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων^{42,43}. Τα αιμοπετάλια μπορούν να διευκολύνουν τη μετάσταση του όγκου απελευθερώνοντας μια ποικιλία βιοδραστικών παραγόντων⁴⁴ και προστατεύοντας τα CTCs από την καταστροφή από τα κύτταρα NK⁴⁵. Τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να βοηθήσουν στην ακινητοποίηση των CTCs σε τριχοειδή αγγεία, η προστασία έναντι των NK κυττάρων μπορεί να συνιστά τη βασική συνεισφορά τους στην διασπορά των CTCs σε δευτερογενείς θέσεις⁴⁵. Τα CTCs μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με τα ουδετερόφιλα, τα οποία εμφανίζουν κυρίως προμεταστατικές λειτουργίες, παρόλο που ενδέχεται να είναι αντιμεταστατικές σε κάποιες περιπτώσεις⁴⁶. Οι **εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων (Neutrophil Extracellular Traps, NETs)**, που σχηματίζονται από ελεύθερα μόρια DNA και συστατικά εξωκυτταρικής μήτρας και προορίζονται να παγιδεύουν παθογόνα ως αντίδραση σε μόλυνση, μπορούν να παγιδεύσουν τα κύτταρα του όγκου που βρίσκονται στην κυκλοφορία και έτσι να παρέχουν προστασία εκτός από την ενίσχυση της προσκόλλησης στο ενδοθήλιο. Τα ουδετερόφιλα μπορούν επίσης να διευκολύνουν την εξαγγείωση με έκκριση **μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (Matrix Metalloproteinases, MMPs)** που αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα⁴⁷.

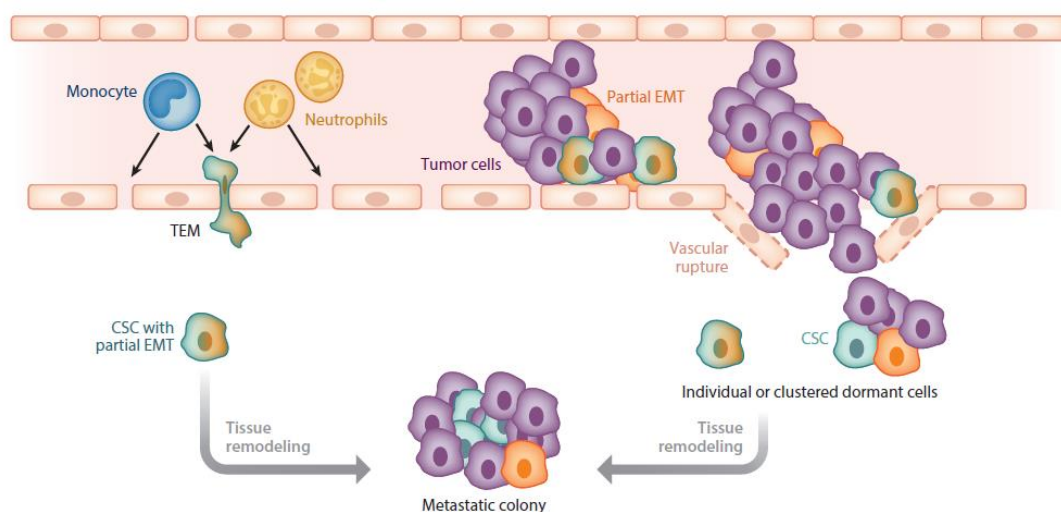


Σχήμα 1.8. Διαδικασία ενδοαγγείωσης. Ενδοαγγείωση και κυκλοφορία. Κύτταρα όγκου μεμονωμένα, καθώς και σε συστάδες, εισχωρούν στην κυκλοφορία διεισδύοντας στα υπάρχοντα και στα νεοσχηματισμένα λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία για να γίνουν CTC. Παρατηρούνται μεμονωμένα CTCs και συστάδες CTC, το τελευταίο αποτελείται από κύτταρα που εμφανίζουν μεταβλητούς βαθμούς EMT καθώς και κυρίως χαρακτηριστικά CSCs. Οι συστάδες μπορούν να καλυφθούν από αιμοπετάλια, τα οποία παρέχουν φυσική προστασία έναντι της μηχανικής καταστροφής και της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων NK. Τα ουδετερόφιλα μπορούν επίσης να σχηματίζουν συστάδες με τα CTCs μέσω των NET και παρέχουν προστασία εξουδετερώνοντας τη καταστροφή από τους NK. Σύντομογραφίες: CSC: καρκινικά βλαστοκύτταρα, CTC: κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, NET: εξωκυτταρική παγίδα ουδετερόφιλων, NK: φυσικός δολοφόνος⁷.

1.5.5. Εξωαγγείωση

Η εξωαγγείωση των καρκινικών κυττάρων αποτελεί προϋπόθεση για τον σχηματισμό δευτερογενούς αποικίας και μπορεί να συμβεί με δύο τουλάχιστον τρόπους. Ο ένας μοιάζει με την είσοδο των λευκοκυττάρων στους λεμφικούς ιστούς και τις περιοχές βλάβης, ενώ ο άλλος αφορά τη μηχανική διάσπαση των τριχοειδών αγγείων. Τα κύτταρα όγκου μπορούν να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο εκφράζοντας υποδοχείς προσκόλλησης που αναγνωρίζουν συγγενείς συνδέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα⁴⁷. Έχοντας προσκολληθεί στο ενδοθήλιο, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξωαγγειωθούν με **μεσοενδοθηλιακή μετανάστευση (Transendothelial Migration, TEM)**. Τα πειραματικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι τα καρκινικά κύτταρα προκαλούν ενδοθηλιακή συστολή και διεισδύουν στο ενδοθηλιακό φράγμα με συμπίεση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων η διαδικασία αυτή ονομάστηκε παρακυτταρικό

TEM^{47,48,49}. Εναλλακτικά, τα CTCs μπορούν να ακινητοποιηθούν, σε ομοτυπικά ή σε ετεροτυπικά συσσωματώματα που περιλαμβάνουν αιμοπετάλια και ουδετερόφιλα, εντός των τριχοειδών αγγείων του δευτερογενούς οργάνου. Η ενδοκυβική μικροσκοπία έδειξε ότι τα ακινητοποιημένα CTCs μπορούν να πολλαπλασιαστούν τοπικά, υποδηλώνοντας ότι διατηρούν τον επιθηλιακό φαινότυπο τους ή ότι έχουν υποβληθεί σε MET, προκαλώντας ρήξη των τριχοειδών αγγείων και προχωρώντας σε διείσδυση στο αντίστοιχο όργανο⁵⁰. Τα μεμονωμένα CTCs υφίσταται εξωαγγείωση με TEM ενώ τα CTCs προκαλώντας ρήξη του αγγείου.



Σχήμα 1.9. Διαδικασία εξωαγγείωσης. Εξωαγγείωση και σχηματισμός μετάστασης. Τα CTCs μπορούν να εξωαγγειωθούν με TEM, στο οποίο μπορούν να βοηθηθούν από μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα τα οποία αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα. Εντούτοις, μπορούν επίσης να ακινητοποιηθούν σε συστάδες CTCs και να πολλαπλασιαστούν τοπικά προκαλώντας την ρήξη του τριχοειδούς τοιχώματος και να διεισδύσουν στο δευτερεύον όργανο. Τα CTCs που πολλαπλασιάζονται εντός των τριχοειδών αγγείων κατά πάσα πιθανότητα διατηρούν τον επιθηλιακό φαινότυπο τους ή υποβάλλονται σε MET, ενώ οι CTC που εξωαγγειώνονται με TEM μπορεί να παρουσιάζουν μερική EMT. Τα κύτταρα όγκου που έχουν διεισδύσει στα δευτερεύοντα όργανα μπορεί να παραμείνουν αδρανή για παρατεταμένες περιόδους, μπορεί να βρίσκονται ως μεμονωμένα κύτταρα ή ως συστάδες και μπορεί να εμφανίζουν χαρακτηριστικά CSC. Τα καρκινικά αυτά κύτταρα μπορεί να παραμείνουν σε αδράνεια ή να ξεκινήσουν να διαιρούνται σχηματίζοντας έτσι μια νέα αποικία καρκινικών κυττάρων, η νέα αυτή αποικία αποτελεί μια μεταστατική εστία. Σντομογραφίες: CSC: καρκινικά βλαστοκύτταρα, CTC: κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, EMT: επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση, MET, μεσεγχυματικό-επιθηλιακή μετάβαση. TEM, μεσοενδοθλιακή μετανάστευση⁷.

1.5.6. Αποικισμός

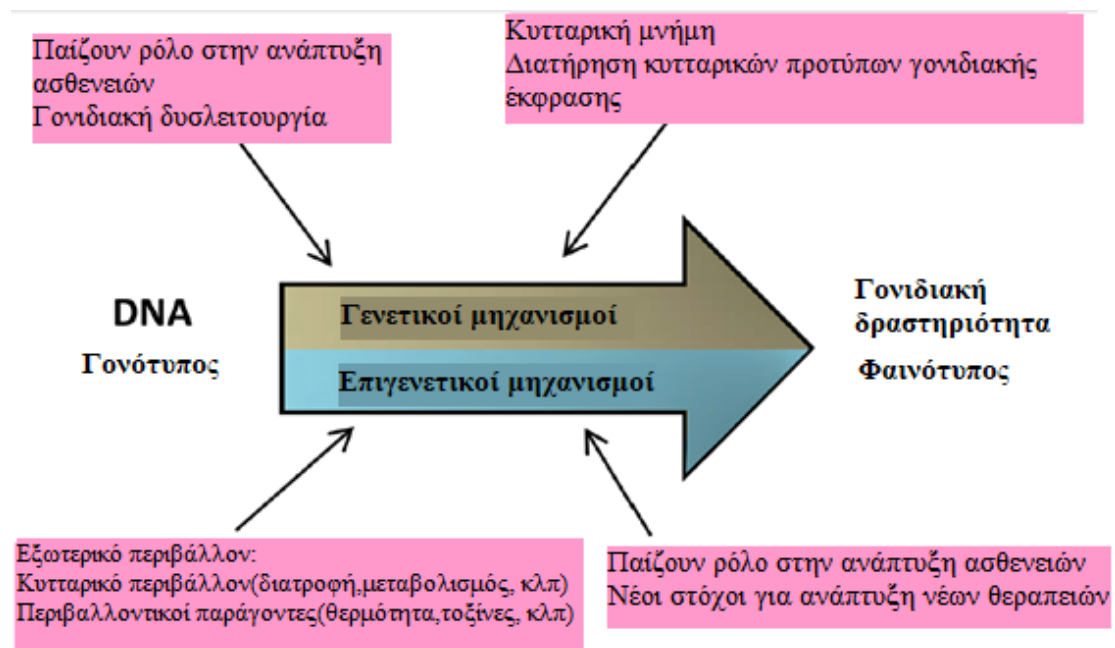
Ο σχηματισμός αποικιών είναι το τελικό βήμα στην πρόοδο των κακοήθων όγκων και εξαρτάται από την ικανότητα των κυττάρων όγκου να προσαρμοστούν στο νέο μικροπεριβάλλον τους. Ο σχηματισμός νέων αποικιών μπορεί να συμβεί μέσα σε λίγες ημέρες σε πειραματικά μοντέλα αλλά μπορεί να απαιτήσει μήνες έως χρόνια σε όγκους ανθρώπων. Τα μεταστατικά κύτταρα μπορεί να παραμείνουν αδρανή (dormancy) εντός

των δευτερευόντων ιστών ως διεσπαρμένα κύτταρα όγκου (Disseminated Tumor Cells, DTCs) για παρατεταμένες χρονικές περιόδους και να επανενεργοποιηθούν σε κάποιο μεταγενέστερο στάδιο, ενδεχομένως ως αποτέλεσμα αλλαγών στο τοπικό μικροπεριβάλλον⁵¹. Διαφορετικά οι όγκοι μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές συνθηκών και να δημιουργήσουν περιβάλλον κατάλληλο σε μακρινά όργανα που ευνοούν την επιβίωση των κυττάρων του όγκου και τον σχηματισμό αποικιών. Αυτές οι καταστάσεις έχουν ονομαστεί **προμεταστατικές κόγχες (premetastatic niches)**⁵² των οποίων ο σχηματισμός πιστεύεται ότι πραγματοποιείται από όγκους πριν από την άφιξη των δυνητικά μεταστατικών κυττάρων. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν έναν περιορισμένο πολλαπλασιασμό, οδηγώντας στον σχηματισμό της **μικρομετάστασης (micrometastasis)**. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των μικρομεταστατικών κυττάρων και η αγγειογένεση, οδηγούν στην δημιουργία **μακρομετάστασης** στα δευτερεύοντα όργανα που έχουν προσβληθεί⁵³.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

2.1. Γενικά

Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μια εκρηκτική ανάπτυξη στον ευρύ τομέα της επιγενετικής, με την εμφάνιση νέων παραδειγμάτων και την ανακάλυψη νέων ρυθμιστικών διεργασιών και μορίων. Αυτό προσφέρει νέες προσεγγίσεις για την κατανόηση της θεμελιώδους βιολογίας, αλλά επίσης υπόσχεται νέα γνώση των διεργασιών της νόσου, καθώς και τη δυνατότητα τροποποίησης των γονιδίων που εμπλέκονται. Τι είναι τότε τα επιγενετικά φαινόμενα; Με την ευρύτερη έννοια, ο όρος «**επιγενετική**» περιγράφει ένα πλήθος διεργασιών, τα οποία δρουν σε συνδυασμό με την αλληλουχία του DNA για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ενός οργανισμού (δηλ. του «φαινότυπου» - χρώμα μαλλιών, ύψος κλπ.)⁵⁴.



Σχήμα 2.1. Οι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί καθορίζουν τον φαινότυπο⁵⁴.

Η έννοια της επιγενετικής περιλαμβάνεται στην λέξη, το ελληνικό πρόθεμα «επί-» υποδηλώνει ότι πρόκειται για διαδικασίες που είναι «πάνω από» ή «εκτός από» την γενετική αλληλουχία. Ως εκ τούτου, οι γενετικές επιδράσεις περιγράφουν τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και τον φαινότυπο, λόγω αλλαγών στην αλληλουχία του DNA (δηλαδή όταν τα γονίδια αναδιατάσσονται ή υφίστανται μετάλλαξη). Αντίθετα, μια επιγενετική αλλαγή είναι όταν η γονιδιακή έκφραση και ο φαινότυπος μεταβάλλονται χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία του DNA - παρόλο που μπορεί να υπάρξει

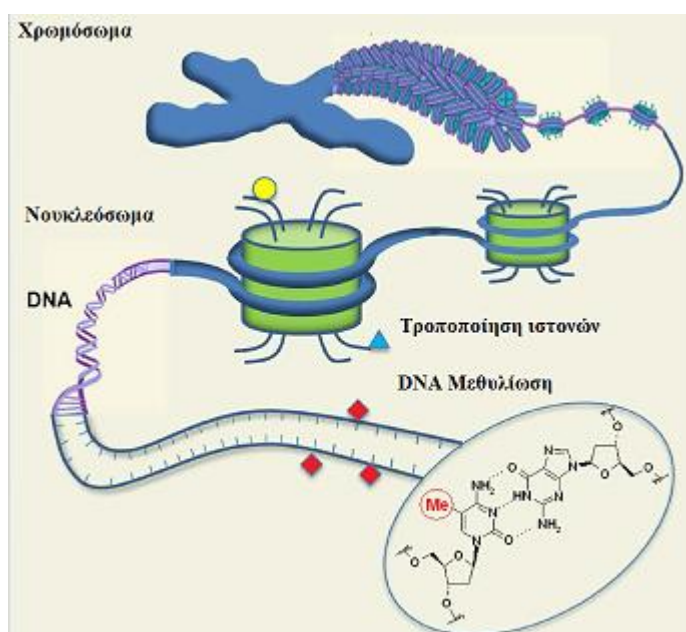
αλλαγή στη χημική τροποποίηση του DNA ή στο πακετάρισμά του εντός του πυρήνα. Επίσης η επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος (**επιγονιδίωμα**) μεταβάλλεται δυναμικά στα κύτταρα των διάφορων ιστών, σε αντίθεση με την ακολουθία του DNA, που παραμένει σταθερή, και χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων σε συντονισμό μεταξύ τους, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων και διαμορφώνει διαφορετικούς φαινοτύπους σε διαφορετικά κύτταρα. Υπάρχουν τρεις λόγοι για το έντονο ενδιαφέρον στον τομέα της επιγενετικής, αυτοί είναι: (i) οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται σε πολλούς θεμελιώδεις τομείς της βιολογίας, (ii) Η επιγενετική ρύθμιση παίζει κεντρικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση, έτσι εμπλέκεται (και περιστασιακά είναι υπεύθυνη) στην εκκίνηση των διεργασιών μιας νόσου, (iii) Ένας μεγάλος αριθμός νέων ενζύμων και πρωτεϊνικών συμπλοκών που εμπλέκονται σε επιγενετικές διεργασίες, είναι δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι. Μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί δύο κατηγορίες φαρμάκων με επιγενετικούς στόχους για τη χημειοθεραπεία του καρκίνου, αλλά παρόμοιες «επιγενετικές θεραπείες» είναι πιθανό να αναπτυχθούν για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών μεσοπρόθεσμα.

2.2. Μια ευρεία εικόνα των επιγενετικών μηχανισμών

Ο όρος «επιγενετική» αναπτύχθηκε αρχικά από τον Conrad Waddington τη δεκαετία του 1940 για να περιγράψει τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων ώστε να αναπτυχθούν λειτουργικά και μορφολογικά διακριτοί κυτταρικοί τύποι (π.χ. νευρώνες, ερυθρά αιμοσφαίρια). Σύμφωνα με αυτή την εκδοχή, το «επιγενετικό τοπίο» περιέγραψε το δίκτυο των ρυθμιστικών γονιδιακών αποφάσεων που λαμβάνει ένα κύτταρο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του από ένα πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο σε ένα τέρμα διαφοροποιημένο κύτταρο. Αυτή η εκδοχή αναπτύχθηκε πριν από την αναγνώριση ότι το DNA ήταν το γενετικό υλικό, αλλά η ερμηνεία της παραμένει έγκυρη, καθώς πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί που επιτρέπουν να εκφράζονται εκατοντάδες διαφορετικοί τύποι κυττάρων που υπάρχουν στους πολυκύτταρους οργανισμούς από έναν μόνο γονότυπο. Αυτό απαιτεί η κοινή αλληλουχία του DNA να ερμηνεύεται διαφορετικά σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων για να καθιερωθεί ένα συγκεκριμένο κυτταρικό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης και αυτό να διατηρηθεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου. Παρομοίως, διεργασίες όπως η συνεχιζόμενη ανακύκλωση των κυττάρων των ιστών απαιτούν την αντικατάσταση των διαφοροποιημένων κυττάρων, έτσι πρέπει στα συγκεκριμένα

κύτταρα τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης να αντιγραφούν και να περάσουν στα θυγατρικά κύτταρα. Είναι πλέον σαφές ότι οι επιγενετικές διεργασίες στηρίζουν την καθιέρωση και διατήρηση αυτών των προτύπων γονιδιακής έκφρασης και της «κυτταρικής μνήμης» που τους επιτρέπει να περάσουν από την μία κυτταρική διαίρεση στην άλλη. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν ρόλο στον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων που συνδέουν τον γονότυπο με τον φαινότυπο σε κυτταρικό επίπεδο. Το κληρονομικό από τους γονείς μας DNA αποτελεί τη βάση της γενετικής μας ταυτότητας και ορίζει πολλά από τα χαρακτηριστικά μας, αλλά είναι επίσης σαφές ότι δεν προκαθορίζει όλα τα στοιχεία του ποιοι είμαστε. Αυτό είναι πιο προφανές στα μονοζυγωτικά δίδυμα - άτομα που προέρχονται αρχικά από ένα μόνο γονιμοποιημένο ωάριο, αλλά από ένα «φυσικό ατύχημα» τελικά έγιναν δύο ξεχωριστά αλλά γενετικά ταυτόσημα άτομα. Εάν η ακολουθία του DNA είναι απόλυτα υπεύθυνη για τον προσδιορισμό της σωματικής μας εμφάνισης και των προσωπικοτήτων, τότε τα μονοζυγωτικά δίδυμα θα ήταν πράγματι πανομοιότυπα, αλλά στην πραγματικότητα πολύ σπάνια συμβαίνει αυτό. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει κάτι διαφορετικό πέρα του γονιδιώματος που συμμετέχει στον προσδιορισμό του φαινοτύπου. Αυτό συνήθως αποδίδεται στο περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται ένας οργανισμός και θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς παραγόντων του περιβάλλοντος. Αυτό, συν το εύρημα ότι κάποιες επιγενετικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με μεμονωμένα γονίδια μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων μεταβάλλονται καθώς μεγαλώνουν (π.χ. η μεθυλίωση του DNA⁵⁵), υποδηλώνουν ότι οι επιγενετικές διαδικασίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο πώς τα γονίδια ανταποκρίνονται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται το κάθε άτομο. Ως εκ τούτου, η επιγενετική πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση των επιδράσεων του περιβάλλοντος για να προσδιοριστούν οι πολλές διαφορετικές πτυχές του κυτταρικού και, τελικά, του συνολικού φαινοτύπου ενός οργανισμού. Αυτό υποδηλώνει ότι η επιγενετική παίζει ρόλο τόσο στην ρύθμιση της γονιδιακής δραστηριότητας ως απάντηση στις συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές επιδράσεις όσο και στη μακροπρόθεσμη διατήρηση των προτύπων έκφρασης των γονιδίων σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης προσδιορίζεται βάση της απόκρισης στις εξω-ή ενδοκυτταρικές συνθήκες. Ωστόσο, δεν είναι αυτός ο μόνος τρόπος με τον οποίο μπορούν να ρυθμιστούν τα γονίδια - οι αναπτυξιακές ή κυτταρικές διεργασίες που καθορίζονται από «τυχαίους διακόπτες» διατηρούνται επίσης με επιγενετικούς μηχανισμούς. Αυτό είναι πιο σαφές στην διαδικασία

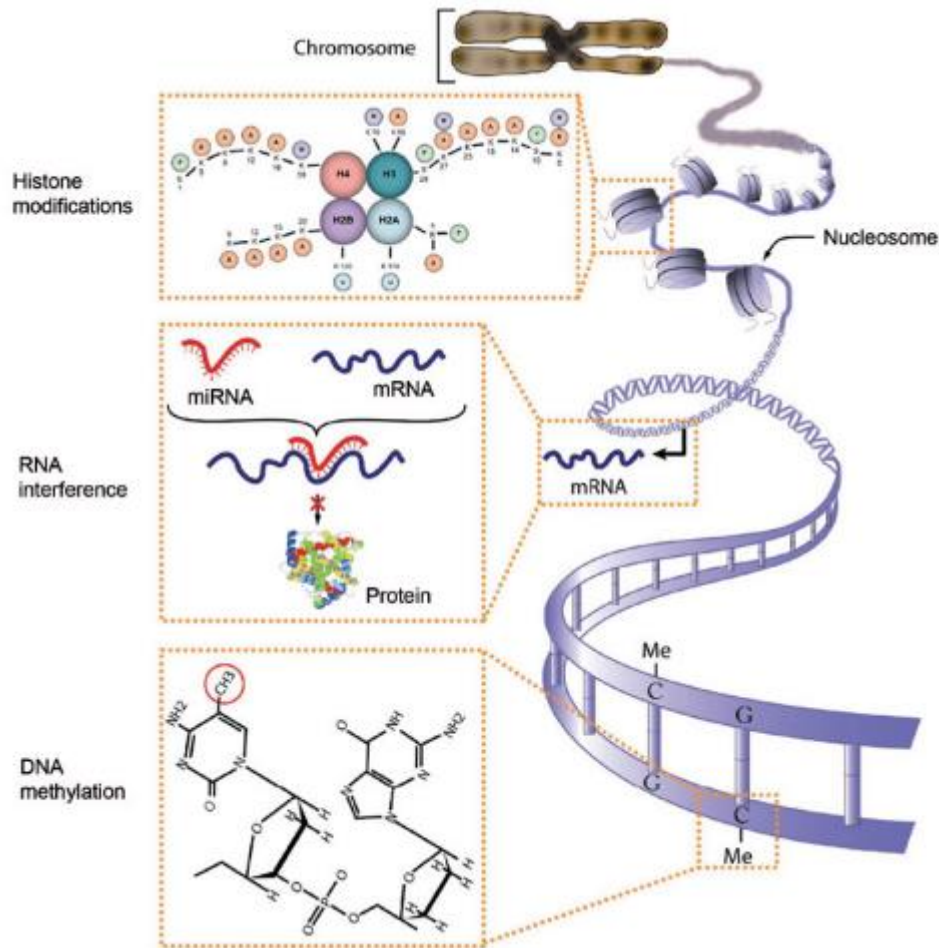
απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X, μια διαδικασία που πραγματοποιείται λόγω της ανάγκης εξισορρόπησης της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα X στα αρσενικά (XY, δηλ. 1X χρωμόσωμα) και στα θηλυκά (XX, δηλ. 2X χρωμοσώματα). Στα περισσότερα θηλαστικά αυτό επιτυγχάνεται με την τυχαία σίγαση όλων των γονιδίων σε ένα από τα χρωμοσώματα X στα θηλυκά, μια διαδικασία που εκτελείται από επιγενετικές μεταβολές στη χρωματίνη και το DNA⁵⁶. Παρομοίως, η μεταβολή της επίδρασης της θέσης, η εναλλαγή της δραστηριότητας ενός γονιδίου, που καθορίζεται από την εγγύτητά του με τις μεταγραφικά σιωπηλές περιοχές των χρωμοσωμάτων⁵⁷, είναι μια τυχαία διαδικασία "ενεργοποίησης" ή "απενεργοποίησης" η οποία αρχίζει και συντηρείται από επιγενετικές διεργασίες⁵⁴.



Σχήμα 2.2. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν επιγενετικό μηχανισμό⁵⁴.

Τρεις κυρίως μηχανισμοί εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση και τον έλεγχο της δομής της χρωματίνης: η μεθυλίωση του DNA (DNA methylation), οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της ιστόνης (histone modification) και τα μη κωδικά RNAs (δηλαδή, τα μικρά RNAs (microRNAs, miRNAs) και τα μακρά μη κωδικά RNAs (long non coding RNAs, lncRNAs). Η διαταραχή ενός ή περισσότερων από αυτούς τους επιγενετικούς μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη έκφραση των γονιδίων, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της κυτταρικής ομοιόστασης ή ασθένειας. Από αυτή την άποψη, οι βιοδείκτες βασισμένοι στην επιγενετική είναι ένας νέος σημαντικός ερευνητικός χώρος. Με τις ισχυρές τεχνολογίες που είναι τώρα

διαθέσιμες, μπορούν να δημιουργηθούν διαγνωστικά εργαλεία για την ανάλυση αυτών των βιοδεικτών και ως εκ τούτου να γίνει μελέτη της συμβολής τους στις ανθρώπινες ασθένειες⁵⁸.

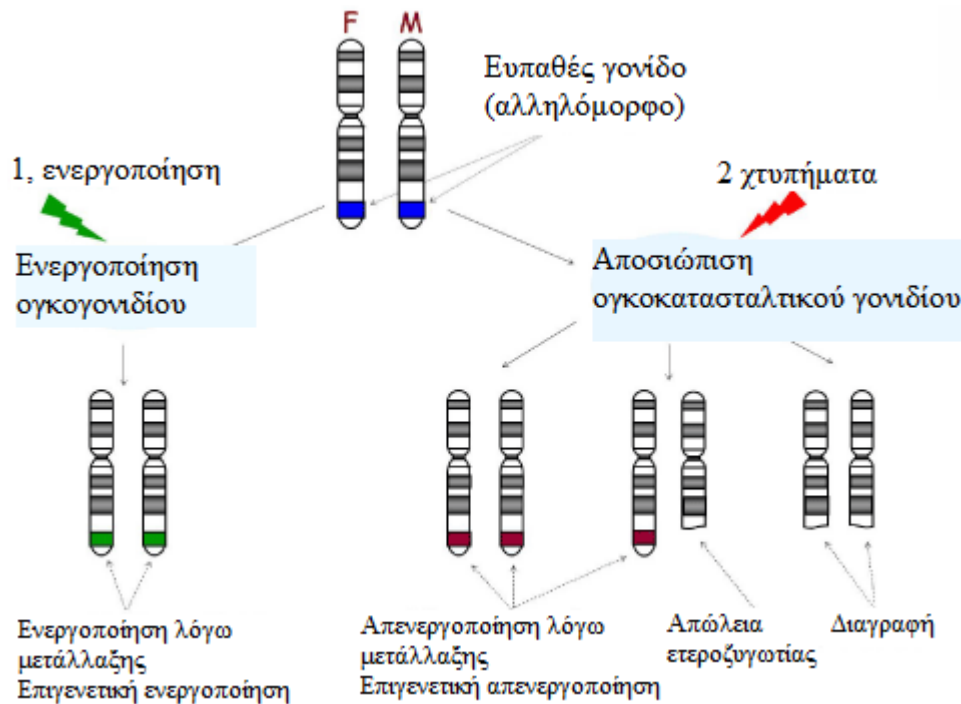


Σχήμα 2.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί⁵⁹.

2.3. Η επιγενετική του καρκίνου και η σχέση της με τη γενετική

Είναι προφανές ότι μόνο οι διακριτές γενετικές αλλοιώσεις στα νεοπλασματικά κύτταρα δεν μπορούν να εξηγήσουν τη πολύπλοκη διαδικασία των πολλαπλών σταδίων της καρκινογένεσης. Τα νεοπλασματικά κύτταρα υποβάλλονται σε μεγάλο αριθμό μετασχηματισμών κατά τη σύνθετη φάση της ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου γεγονός που αντανακλάται στον φαινότυπο τους. Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από το συνεχώς μεταβαλλόμενο επιγονιδίωμα και τους απορυθμισμένους επιγενετικούς μηχανισμούς που προκαλούν γενετική αστάθεια με αποτέλεσμα την απόκτηση

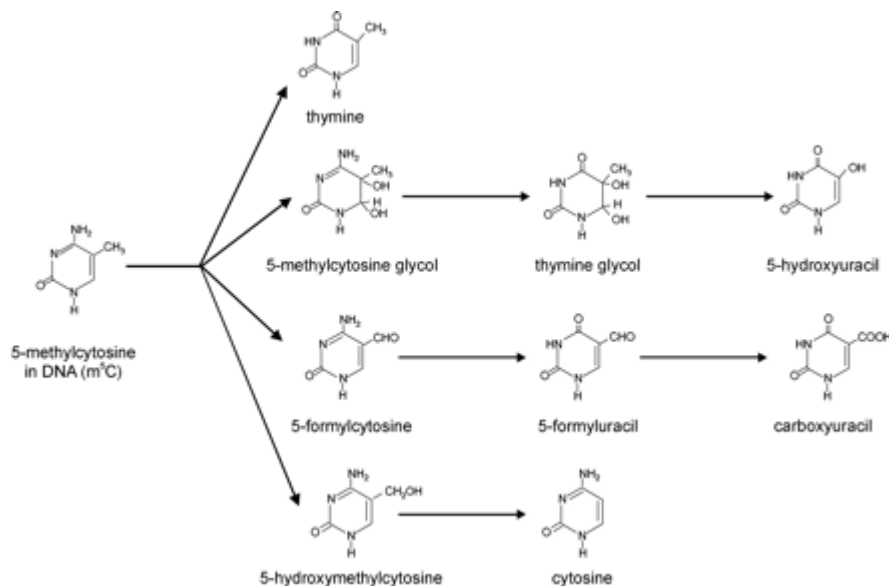
γενετικής μετάλλαξης σε όγκο-κατασταλτικά γονίδια και την ενεργοποίηση γενετικών μεταλλάξεων σε ογκογονίδια⁶⁰.



Σχήμα 2.4. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων¹³⁴.

Επιπλέον, οι επιγενετικές μεταβολές των κυττάρων του όγκου εμφανίζονται στην πρώιμη γενεά των καρκινικών κυττάρων⁶¹. Είναι καλά αποδεδειγμένο ότι τα υπολείμματα 5-μεθυλοκυτοσίνης (m5C) είναι "καυτά σημεία" για μεταλλάξεις, τα οποία μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τη δομή και τη λειτουργία των γονιδίων. Το ένα τρίτο των σημειακών μεταλλάξεων στα γαμετικά κύτταρα που προκαλούν γενετικές ασθένειες εμφανίζονται σε CpGs και οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις είναι μετατροπές $C \rightarrow T$ ⁶². Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι m5C είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στην απαμίνωση, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις μετάβασης (δηλ. $C \rightarrow T$) στα CpGs. Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετρία των μοτίβων CpG, η μεθυλοκυτοσίνη στον αντίθετο κλώνο μπορεί επίσης να επηρεαστεί, οδηγώντας σε αλλαγές ($G \rightarrow A$). Ως συνέπεια, τα CpGs είναι καυτά σημεία για μεταλλάξεις, σε μια ποικιλία γονιδίων^{63,64}. Τις μετατροπές $G \rightarrow A$ βρίσκουμε στο 44,8% των περιπτώσεων σε ασθενείς με λευχαιμία και μυελοδυσπλασίας και στο 60% των περιπτώσεων των ασθενών με καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι μετατροπές $C \rightarrow T$ και οι διαδοχικές μεταλλάξεις CC-TT βρίσκονται σε καρκινώματα βασικών κυττάρων και πλακωδών κυττάρων⁶⁵. Η μεθυλίωση αυξάνει τον ρυθμό της υδρολυτικής απαμίνωσης και επίσης αυξάνει την αντιδραστικότητα των γειτονικών γουανινών στα ηλεκτρονιόφιλα^{65,66}. Η

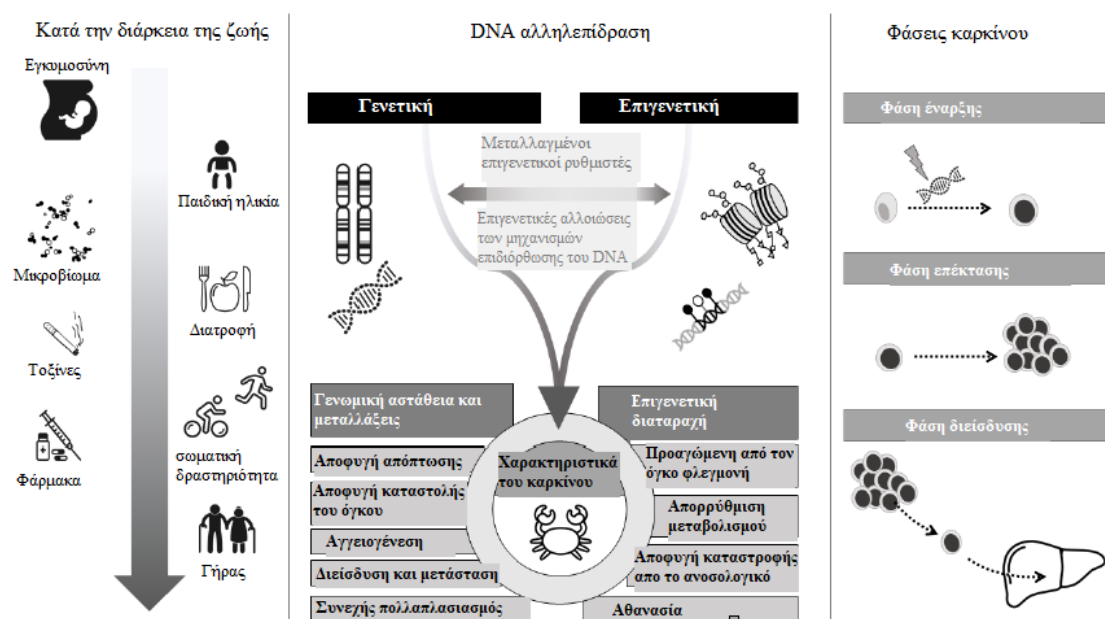
οξειδωση της m5C μπορεί να συνεισφέρει στην υψηλή συχνότητα των μετατροπών C→T στις CpG αλληλουχίες. Οι ρίζες οξυγόνου μπορούν να αντιδρασουν με την m5C για να οξειδώσουν τον 5, 6-διπλό δεσμό και το ενδιάμεσο προϊόν, m5C γλυκόλη, και στη συνέχεια να το απαμινώσουν για να σχηματίσουν την θυμίνη γλυκόλη⁶⁶. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη του όγκου όχι μόνο μέσω γενετικών μηχανισμών αλλά και μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, η παρουσία ριζών οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων του DNA που περιλαμβάνουν μεταβολές βάσεων, διαγραφές, θραύση κλώνου και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις. Τέτοιες αλλοιώσεις του DNA έχουν αποδειχθεί ότι παρεμβαίνουν στην ικανότητα του DNA να λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα DNMTs, (DNA methyltransferases) με αποτέλεσμα την ολική υπομεθυλίωση⁶⁷. Η παρουσία 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) σε CpG αλληλουχίες έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει έντονα τη μεθυλίωση των παρακείμενων κυτοσινών^{65,68}. Επιπλέον, η 8-OHdG δεν μπορεί να αναγνωριστεί από τα ένζυμα επιδιόρθωσης και συνεπώς μπορεί να παραμείνει ως μια μετάλλαξη τις οποίας το αποτέλεσμα είναι η μετατροπή G→T^{69,70}. Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι η οξειδωτική βλάβη του DNA μπορεί να επηρεάσει τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε «ανώμαλη» έκφραση γονιδίων και πιθανώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη κακοήθειας.



Σχήμα 2.5. Πιθανά προϊόντα αντίδρασης της 5-μέθυλοκυτοσίνης με δραστικά είδη οξυγόνου⁷¹.

Οι επιγενετικές αλλοιώσεις εμφανίζονται σε ολόκληρη την ανθρώπινη ζωή, από την αρχή στην μήτρα έως ότου ξεκινήσουν οι διαδικασίες της γήρανσης. Η γενετική και

επιγενετική αλληλεπίδραση του DNA που συμβαίνει είναι αμοιβαία, αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του καρκίνου, τον κίνδυνο και την εξέλιξη. Η τρέχουσα έρευνα αποσκοπεί να διερευνήσει τους ακριβείς μηχανισμούς και την γενετική και επιγενετική συμβολή σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης του καρκίνου. Μπορούν να παρουσιαστούν μοναδικά πρότυπα έκθεσης, κινδύνου και συμβολής για κάθε συγκεκριμένο τύπο καρκίνου³³³.

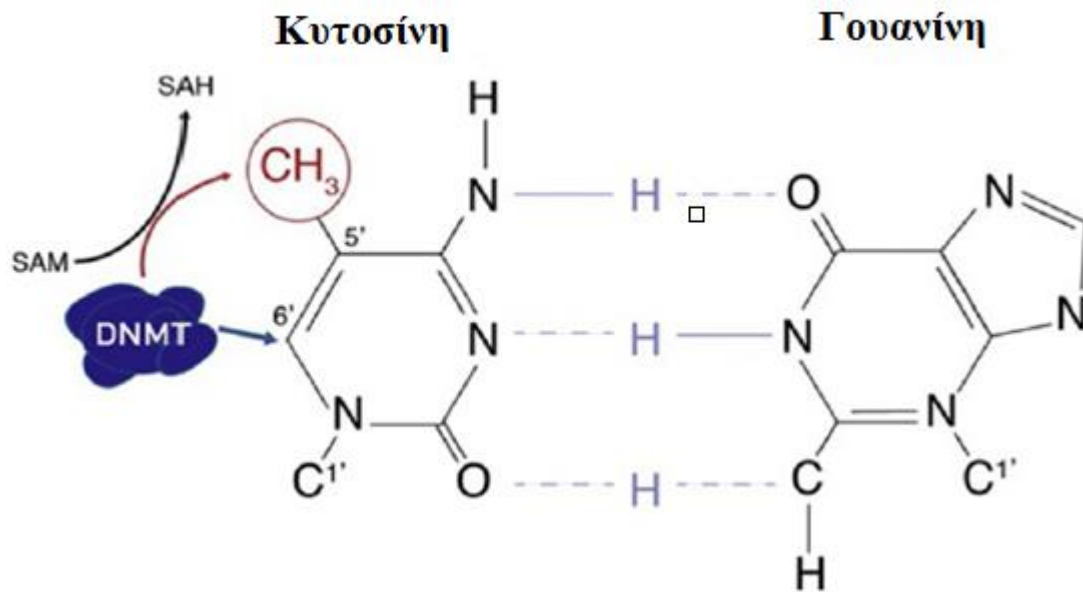


Σχήμα 2.6. Γενετική και επιγενετική αλληλεπίδραση και συμβολή στον καρκίνο και στην εξέλιξη του³³³.

2.4. Μεθυλίωση του DNA

2.4.1 Εισαγωγή

Η μεθυλίωση του DNA αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία μια μεθυλομάδα (CH_3) προστίθεται ομοιοπολικά στον 5^ο άνθρακα (θέση C5) της κυτοσίνης, δημιουργώντας την τροποποιημένη βάση **5-μεθυλοκυτοσίνη (5-methylcytosine, 5-mC)**. Η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα είτε σε περιοχές του γονιδιώματος που έχουν τις βάσεις κυτοσίνη-γουανίνη, γνωστές ως δινουκλεοτίδια CpG είτε σε περιοχές πλούσιες σε CpGs (νησίδες CpGs)⁷². Η συγκέντρωση δινουκλεοτιδίων CpG σε οποιαδήποτε γονιδιωματική περιοχή πάνω από 200 bp (συνήθως 500-1000 bp) σε μήκος με υψηλή περιεκτικότητα σε GC μεγαλύτερη από 55% και παρατηρούμενη αναλογία CpG μεγαλύτερη από 0,60 είναι γνωστή ως νησίδες CG, CGI (CG islands)^{73,74}.



Σχήμα 2.7. Διαδικασία μεθυλίωσης. Οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) είναι υπεύθυνες για την καταλυτική προσθήκη μίας ομάδας μεθυλίου στη θέση C5 της κυτοσίνης. Συγκεκριμένα, οι DNMTs εκτελούν πυρηνόφιλη προσβολή στον C6 και, χρησιμοποιώντας τον συμπαράγοντα S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM) ως δότη μεθυλίου, προσθέτουν ομοιοπολικά μία μεθυλομάδα στη θέση C5 μέσω μιας δεύτερης πυρηνόφιλης προσβολής. Η μεθυλομάδα δεν επηρεάζει το δεσμό υδρογόνου της κυτοσίνης με την γουανίνη⁷².

Η 5-μεθυλοκυτοσίνη ανακαλύφθηκε αρχικά το 1925 όταν απομονώθηκε από το βακτήριο που προκαλεί την φυματίωση το *Mycobacterium tuberculosis* και πάλι, το 1948, όταν ταυτοποιήθηκε σε DNA που εξήχθη από θύμο μόσχου^{75,76}. Εκείνη την εποχή, η λειτουργία αυτής της μεθυλιωμένης κυτοσίνης παρέμεινε άγνωστη. Το 1975, δύο ανεξάρτητα εργαστήρια εξέφρασαν ότι η μεθυλίωση του DNA ήταν ένας σημαντικός μηχανισμός στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της κυτταρικής μνήμης^{77,78}. Αυτοί οι ερευνητές αναγνώρισαν ότι το δινουκλεοτίδιο CpG είναι παλίνδρομο και επαναλαμβάνεται κατά μήκος όλου του γονιδιώματος με αμφοτέρους και τους δύο κλώνους του DNA να διαβάζουν την ίδια αλληλουχία με κατεύθυνση 5' προς 3'. Ως εκ τούτου, εξέφρασαν ότι η μεθυλίωση των δινουκλεοτιδίων CpG θα μπορούσε να διατηρηθεί μετά την κυτταρική διαίρεση. Πιο συγκεκριμένα, ένα μεθυλιωμένο δίκλωνο DNA θα γίνει δύο ημιμεθυλιωμένοι κλώνοι κατά την μίτωση. Στην συνέχεια κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει τον μεθυλιωμένο κλώνο ως εκμαγείο για να αντιγράψει τα σημάδια της μεθυλίωσης (methylation marks) στον νεοσυντιθέμενο κλώνο^{77,78}. Αυτή η θεωρία απαιτούσε τα κύτταρα να έχουν "μεθυλοτρανσφεράσες" υπεύθυνες για τη δημιουργία σημείων μεθυλίωσης (μεθυλίωση de novo) και "μεθυλοτρανσφερασών" που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της μεθυλίωσης (μεθυλίωση συντήρησης). Καταλήγουν στο

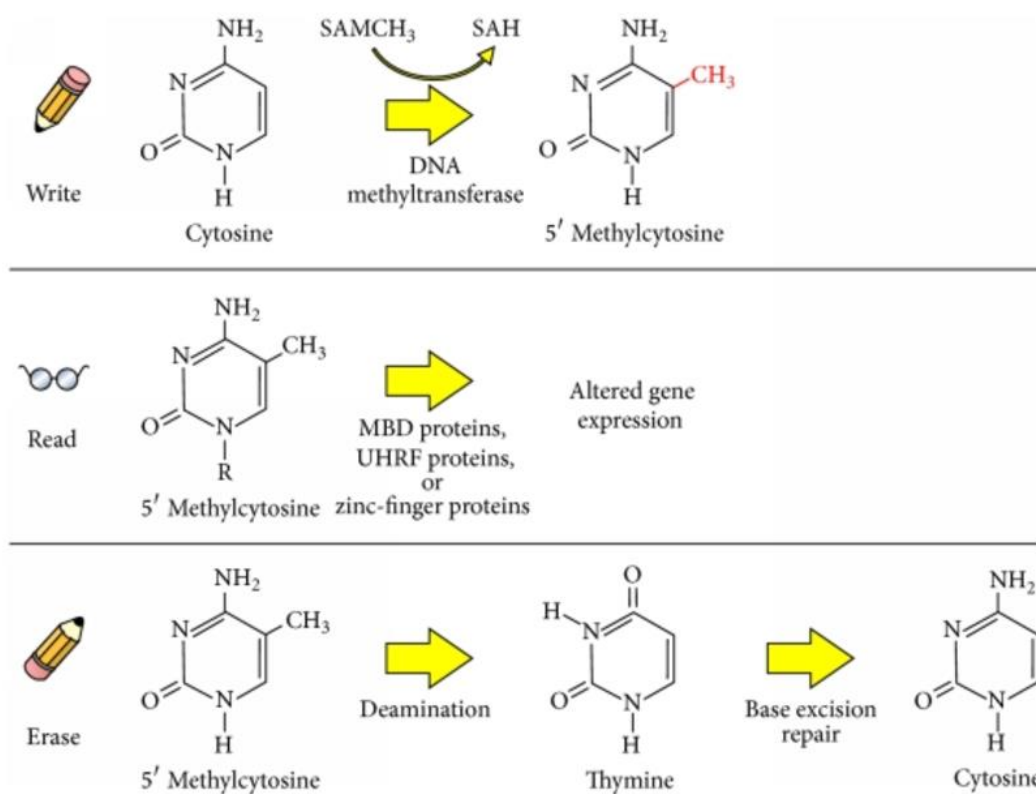
συμπέρασμα ότι μια ημι-συντηρητική μέθοδος αντιγραφής της μεθυλίωσης του DNA θα παρέχει επίσης ένα μηχανισμό για τα κύτταρα να φέρουν και να διατηρούν πληροφορίες που σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων. Επιπλέον, πρότειναν ότι η μεθυλίωση του DNA σε περιοχές του υποκινητή γονιδίων θα μπορούσε να διαταράξει την σύνδεση του DNA με τις πρωτεΐνες δεσμεύσεις του DNA που εμπλέκονται στη μεταγραφή και επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση^{77,78}. Συγκεκριμένα, αναγνώρισαν η μεθυλίωση του DNA μπορεί εν μέρει να ελέγξει στενά την γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης^{77,78}. Από τότε, οι υποθέσεις τους υποστηρίχθηκαν από ένα συνεχώς αυξανόμενο σύνολο στοιχείων που αποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ως μηχανισμό κυτταρικής μνήμης⁷².

2.4.2. DNA μεθυλίωση σε φυσιολογικά κύτταρα

Στα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CpG είναι σε μεγάλο βαθμό μεθυλιωμένες (περίπου το 80%), οι περισσότερες νησίδες CpG είναι μη μεθυλιωμένες, πράγμα που επιτρέπει την έκφραση γονιδίων παρουσία των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων⁷³. Εντούτοις, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, οι υποκινητές των γονιδίων είναι μεθυλιωμένοι στα φυσιολογικά κύτταρα ως μέρος των φυσιολογικών αναπτυξιακών διεργασιών: στα αποτυπωμένα γονίδια, στα γονίδια του χρωμοσώματος X στις γυναίκες και σε γαμετικά και ιστο-ειδικά γονίδια^{79,84}. Η γονιδιακή αποτύπωση είναι το φαινόμενο σύμφωνα με το οποίο η έκφραση των δύο αλληλόμορφων ενός γονιδίου καθορίζεται από το φύλο του γονέα από το οποίο προέρχεται. Ένα παρόμοιο φαινόμενο της μείωσης της γονιδιακής έκφρασης συμβαίνει και με την μεθυλίωση των CpG νησίδων σε ένα από τα δύο X χρωμοσώματα στις γυναίκες, όπου το ένα από τα δύο αντίγραφα είναι ενεργό⁷⁹. Η μεθυλίωση των ρυθμιστικών περιοχών εμπλέκεται στην καταστολή της έκφρασης των περιοχών που έχουν αποσιωπηθεί⁸⁰. Η μεθυλίωση του DNA διατηρείται κατά την κυτταρική διαίρεση κατά μήκος του γονιδιώματος εξασφαλίζει τη χρωμοσωμική σταθερότητα, την αποφυγή χρωμοσωμικών μεταθέσεων και τη καταστολή της κινητικότητας των μεταθετονίων (ακολουθίες DNA που μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο γονιδίωμα προκαλώντας μεταλλάξεις). Στους υποκινητές των γονιδίων (νησίδες CpGs) έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική τους σιγή και την αναστολή έκφρασης της γενετικής πληροφορίας, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη⁸¹.

2.4.3. Βασικός μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA

Τα ένζυμα που πραγματοποιούν, αναγνωρίζουν και απομακρύνουν τη μεθυλίωση του DNA χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: **writers, readers και erasers**. Οι writers είναι τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη της μεθυλομάδας στην κυτοσίνη. Οι erasers είναι τα ένζυμα που τροποποιούν και αφαιρούν την μεθυλομάδα. Οι readers αναγνωρίζουν και δεσμεύονται στις μεθυλομάδες για να επηρεάσουν τελικά την γονιδιακή έκφραση. Υπάρχουν δύο ειδών κατηγορίες μεθυλίωσης: η de novo μεθυλίωση κατά την οποία γίνεται η μεθυλίωση κυτοσινών που δεν έχουν υποστεί τροποποίηση και η μεθυλίωση συντήρησης (maintenance) κατά την οποία γίνεται η αναπαραγωγή μοτίβων μεθυλίωσης που ήδη υπάρχουν στους νεοσυντιθέμενους κλώνους DNA κατά την αντιγραφή⁸¹.

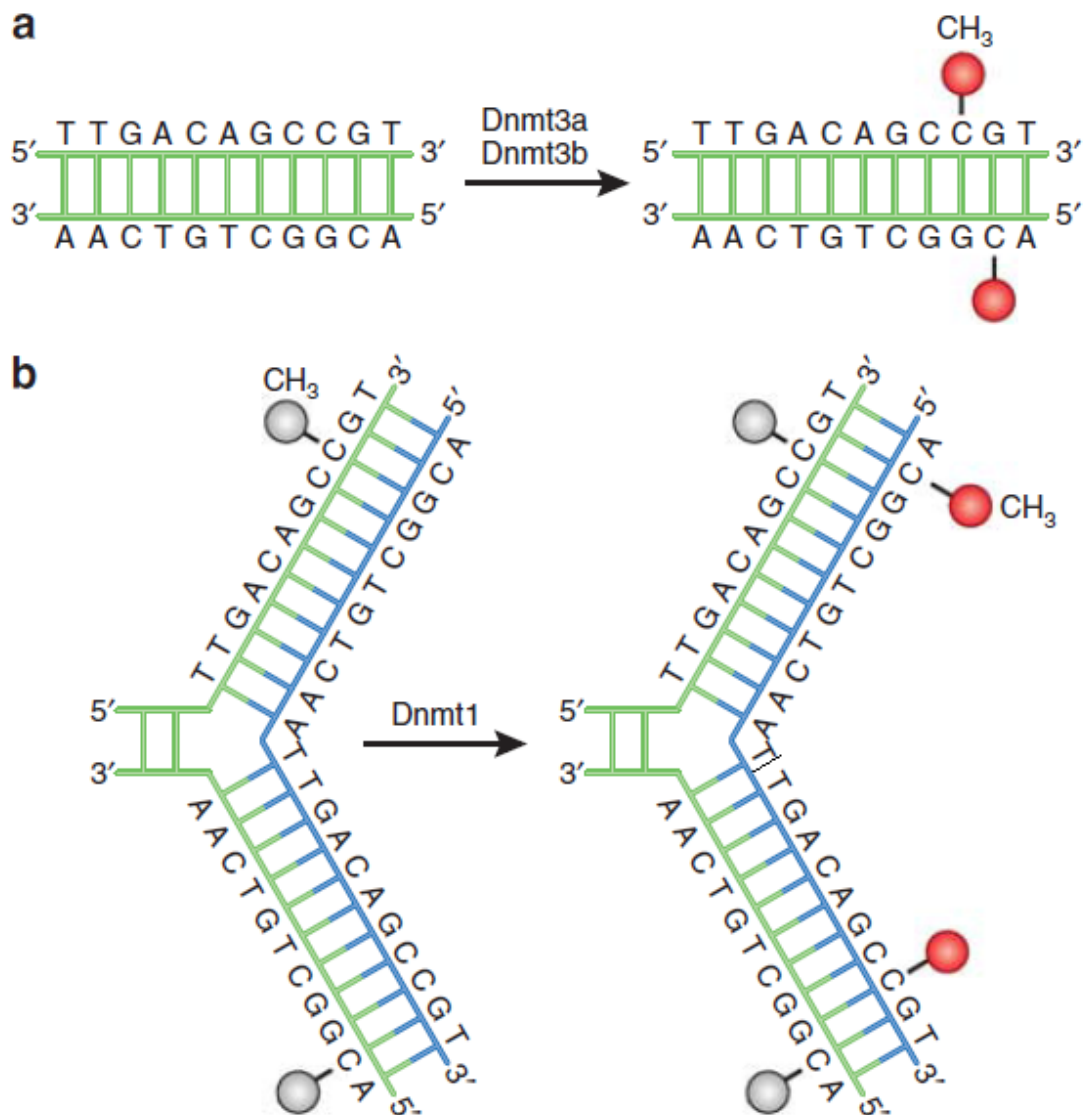


Σχήμα 2.8. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν, αναγνωρίζουν και απομακρύνουν τη μεθυλίωση του DNA⁸⁰.

2.4.3.1. Writers: DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs)

Τρία μέλη της οικογένειας των Dnmts καταλύουν την απευθείας προσθήκη ομάδων μεθυλίου στο DNA: η **Dnmt1**, η **Dnmt3a** και η **Dnmt3b**. Παρόλο που τα ένζυμα αυτά έχουν ομοιότητες στην δομή τους με μια μεγάλη N-τελική ρυθμιστική περιοχή και μια

Οι τελικές καταλυτικές περιοχές, έχουν μοναδικές λειτουργίες και πρότυπα έκφρασης^{82,83}. Η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 (Dnmt1) αναγνωρίζει το ημιμεθυλιωμένο DNA^{81,84-86} και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των υφιστάμενων μορφών μεθυλίωσης μετά την αντιγραφή του DNA. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, η Dnmt1 εντοπίζεται στην διχάλα αντιγραφής όπου σχηματίζεται το νεοσυντιθέμενο ημιμεθυλιωμένο DNA⁸⁷. Η Dnmt1 συνδέεται με το νεοσυντιθέμενο DNA και το μεθυλιώνει για να σχηματίσει επακριβώς το αρχικό πρότυπο μεθυλίωσης που υπήρχει πριν από την αντιγραφή του DNA⁸⁸. Επιπρόσθετα, η Dnmt1 έχει επίσης την ικανότητα να επιδιορθώνει τη μεθυλίωση του DNA⁸⁹. Για το λόγο αυτό, το Dnmt1 καλείται Dnmt συντήρησης επειδή διατηρεί το αρχικό πρότυπο μεθυλίωσης DNA σε μια γενιά κυττάρων. Η Dnmt1 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και κατά τη κυτταρική διαίρεση⁸¹. Αντίθετα, τα ένζυμα Dnmt3 είναι de novo Dnmts που εισάγουν μεθυλομάδες σε προηγουμένως μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες^{90,91}. Οι Dnmt3a και Dnmt3b έχουν εξαιρετικά παρόμοια δομή και λειτουργία. Σε αντίθεση με την Dnmt1, τόσο η Dnmt3a όσο και η Dnmt3b, όταν υπερεκφράζονται, είναι ικανές να μεθυλιώνουν τόσο το υπάρχον όσο και το νεοσυντιθέμενο DNA χωρίς προτίμηση για ημιμεθυλιωμένο DNA⁹². Αυτό που ξεχωρίζει κυρίως την Dnmt3a από την Dnmt3b είναι το πρότυπο γονιδιακής έκφρασής της. Αν και η Dnmt3a εκφράζεται και είναι σχεδόν πανταχού παρών, η Dnmt3b εκφράζεται ελάχιστα από την πλειοψηφία των διαφοροποιημένων ιστών, με εξαίρεση τον θυρεοειδή, τους όρχεις και των μυελό των οστών⁸³. Ένα τελικό μέλος της οικογένειας των Dnmt είναι η Dnmt3L, μια πρωτεΐνη που δεν διαθέτει την καταλυτική περιοχή που υπάρχει στα άλλα ένζυμα Dnmt^{93,94}. Η Dnmt3L εκφράζεται κυρίως κατά την πρόωμη ανάπτυξη και περιορίζεται στα γαμετικά κύτταρα και τον θύμο αδένα κατά την ενηλικίωση⁹⁵.



Σχήμα 2.9. Οδοί μεθυλίωσης του DNA. Μία οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών DNA (Dnmts) καταλάει τη μεταφορά μίας ομάδας μεθυλίου από την S-αδενυλμεθειονίνη (SAM) στον πέμπτο άνθρακα της κυτοσίνης για να σχηματίσει την 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC). (α)Οι Dnmt3a και Dnmt3b είναι οι de novo Dnmts και μεταφέρουν ομάδες μεθυλίου (κόκκινο) πάνω σε μη μεθυλιωμένο DNA. (β) Η Dnmt1 είναι Dnmt συντήρησης και διατηρεί το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Όταν το DNA υφίσταται ημι-συντηρητική αντιγραφή, ο κλώνος εκμαγείο διατηρεί το πρωτότυπο πρότυπο μεθυλίωσης DNA (γκρίζο). Η Dnmt1 εντοπίζεται στις εστίες που γίνεται η σύνθεση του νέου κλώνου DNA και αντιγράφει με ακρίβεια το αρχικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA με την προσθήκη ομάδων μεθυλίου (κόκκινο) πάνω στον νεοσυντιθέμενο κλώνο (μπλε)⁸¹.

2.4.3.2. Readers: Πρωτεΐνες δέσμωσης μεθυλιωμένων CpG (Methyl-CpG Binding Proteins)

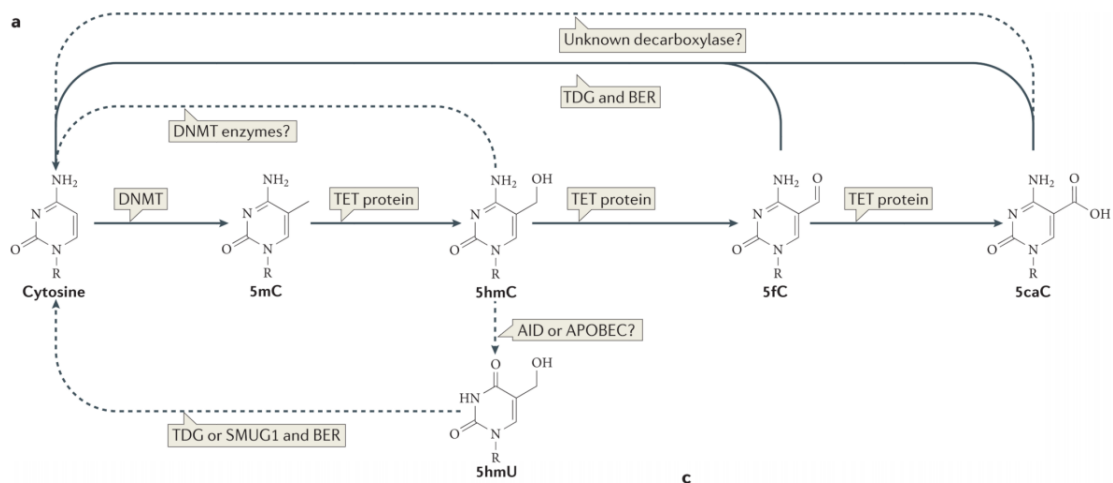
Η μεθυλίωση του DNA αναγνωρίζεται από τρεις ξεχωριστές οικογένειες πρωτεϊνών: τις πρωτεΐνες MBD, τις πρωτεΐνες UHRF και τις πρωτεΐνες με δακτύλιο ψευδαργύρου. Από αυτές η οικογένεια των MBD ήταν η πρώτη που προσδιορίστηκε. Οι MBD πρωτεΐνες δέσμωσης μεθυλιωμένων CpGs περιέχουν μια διατηρούμενη περιοχή

δέσμευσης μεθυλιωμένων-CpG (**Methyl-CpG-binding domain, MBD**) η οποία προσδίδει υψηλότερη συγγένεια για μεμονωμένες μεθυλιωμένες θέσεις CpG⁹⁶. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει την MeCP2, την πρώτη αναγνωρισμένη πρωτεΐνη δέσμευσης με μεθυλομάδα, και τις MBD1, MBD2, MBD3 και MBD4⁹⁷⁻⁹⁹. Οι MBDs εκφράζονται περισσότερο στον εγκέφαλο από ό, τι σε οποιονδήποτε άλλο ιστό και πολλές MBDs είναι σημαντικές για την φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των νευρώνων¹⁰⁰. Από την οικογένεια των MBD, οι MBD3 και MBD4 είναι πιο σπάνιες. Η MBD3 δεν είναι ικανή να δεσμεύεται άμεσα με το DNA⁹⁹. Η MBD4 παρόλο που δεσμεύεται στο DNA φυσιολογικά, αναγνωρίζει κατά προτίμηση όταν η γουανίνη είναι σε αναντιστοιχία (mismatched) με την θυμίνη, την ουρακίλη ή την 5-φθοροουρακίλη και συσχετίζεται με τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αποκατάσταση των αναντιστοιχιών του DNA¹⁰¹⁻¹⁰⁵. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των MBD έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται άμεσα με το μεθυλιωμένο DNA και περιέχουν μια περιοχή μεταγραφικής καταστολής (**Transcriptional Repression Domain, TRD**) η οποία επιτρέπει στις πρωτεΐνες MBD να δεσμευτούν σε μια ποικιλία συμπλοκών καταστολέα¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Εκτός από το ρόλο του ως μεταγραφικός καταστολέας, το MeCP2 φαίνεται να έχει ένα μοναδικό ρόλο στη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA. Η MeCP2 δεσμεύεται με την Dnmt1 μέσω της TRD περιοχής και μπορεί να στρατολογήσει την Dnmt1 στο ημιμεθυλιωμένο DNA για να πραγματοποιήσει τη μεθυλίωση συντήρησης¹⁰⁹. Οι MBDs εκτός από την λειτουργία τους ως μεταγραφικοί καταστολέας, αλληλεπιδρούν σε μεγάλη εμβέλεια με την χρωματίνη, παίζουν ρόλο στην γονιδιακή σταθερότητα, την νευρωνική σηματοδότηση και την μεταγραφική ενεργοποίηση¹¹⁰. Συγκεντρώνονται στο μεθυλιωμένο DNA και διευκολύνουν την πρόσληψη τροποποιητών ιστονών και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης^{111,112}.

2.4.3.3. Erasers: Υδροξυλάσες μεθυλοκτοσίνης

Η απομεθυλίωση του DNA χαρακτηρίζεται ως παθητική ή ενεργητική. Η παθητική απομεθυλίωση του DNA συμβαίνει σε κύτταρα που διαιρούνται. Καθώς η Dnmt1 διατηρεί ενεργά τη μεθυλίωση του DNA κατά την διάρκεια της αντιγραφής του κυττάρου, η αναστολή ή η δυσλειτουργία έχει ως αποτέλεσμα την μη μεθυλίωση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA και επομένως μειώνεται το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Η ενεργητική απομεθυλίωση μπορεί να συμβεί τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα, και η διαδικασία απαιτεί ενζυματικές αντιδράσεις για να επεξεργαστούν την 5mC με σκοπό να την

επαναφέρουν στην κυτοσίνη¹¹³⁻¹¹⁶. Ένας μηχανισμός ενεργητικής απομεθυλίωσης του DNA περιλαμβάνει την μεσολάβηση μιας οικογένειας ενζύμων μετατόπισης ten-eleven (**Ten-Eleven Translocation enzymes, TETs**) τα οποία είναι υδροξυλάσες 5-μέθυλοκυτοσίνης, στην οικογένεια αυτή ανήκουν τα ένζυμα TET1, TET2 και TET3. Τα ένζυμα TET οξειδώνουν διαδοχικά την 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC) σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)^{117,118}, σε 5-φόρμυλοκυτοσίνη (5-formilcytosine, 5fC) και σε 5-καρβοξυκυτοσίνη (5-carboxylcytosine, 5caC). Οι 5fC και 5caC μπορούν να απομακρυνθούν από την DNA γλυκοζυλάση της θυμίνης (**thymine DNA glycosylase, TDG**) και να αντικατασταθούν από την κυτοσίνη μέσω της επιδιόρθωσης εκτομής βάσης (**base excision repair, BER**). Άλλοι προτεινόμενοι μηχανισμοί απομεθυλίωσης είναι λιγότερο μελετημένοι, και περιλαμβάνουν την αποκαρβοξυλίωση της 5caC, την απομάκρυνση της υδροξυμεθυλομάδας της 5hmC από την DNA μεθυλοτρανσφεράσης (DNMT) και την αποαμίνωση της 5hmC (και 5mC) από το AID (activation-induced cytidine deaminase) και το APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide). Τα ένζυμα AID απαμινώνουν τις βάσεις κυτοσίνης στο DNA για να δώσουν ουρακίλη. Το AID και η μεγαλύτερη οικογένεια ενζύμων APOBEC έχουν προταθεί για την απομεθυλίωση του DNA με αποαμίνωση της 5mC και της 5hmC στο DNA για να δώσουν θυμίνη και 5hmU, αντίστοιχα. Λόγω του σχηματισμού κακοσυζευγμένων ζευγών βάσεων T: G και 5hmU: G, έχουν προταθεί μηχανισμοί αποκοπής και επιδιόρθωσης με SMUG1 (single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase) ή TDG⁷³.

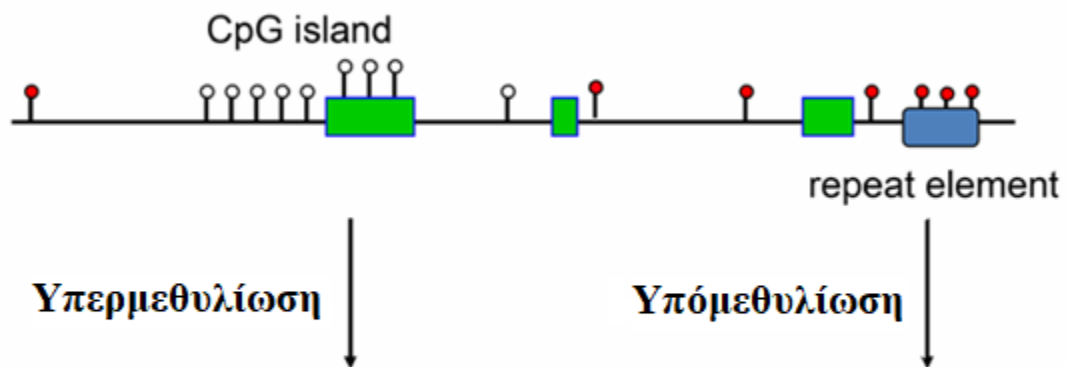


Σχήμα 2.10. Μηχανισμοί απομεθυλίωσης¹¹⁹.

2.4.4. Ανωμαλίες στην μεθυλίωση του DNA στον καρκίνο

Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA των καρκινικών κυττάρων έδειξε δυο σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα: 1) μείωση της συνολικής μεθυλίωσης του DNA, και 2) μία ανώμαλη υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων δινουκλεοτιδίων CpG και ιδιαίτερα κάποιον νησίδων CpG που φυσιολογικά είναι μη μεθυλιωμένες. Η εκτεταμένη απώλεια της μεθυλίωσης του DNA έρχεται σε αντίθεση με την υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων στον καρκίνο¹²⁰, συμπεριλαμβανομένων των CpG νησίδων του υποκινητή γονιδίων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση και κυρίως αυτών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και/ή στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – γνωστά και ως γονίδια καταστολής όγκων¹²¹. Η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων επηρεάζει άμεσα την διαδικασία της καρκινογένεσης^{122,123}.

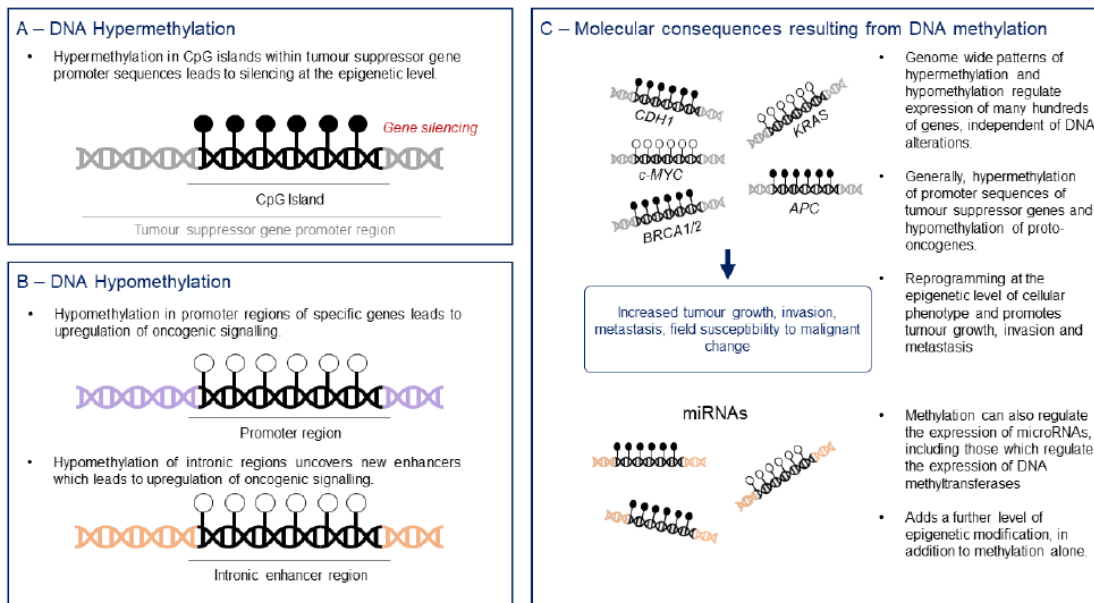
Φυσιολογικός ιστός



Καρκινικός ιστός



Σχήμα 2.11. Υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση στον καρκίνο¹³³.



Σχήμα 2.12. DNA υπερμεθυλίωση και DNA υπομεθυλίωση στον καρκίνο³³³.

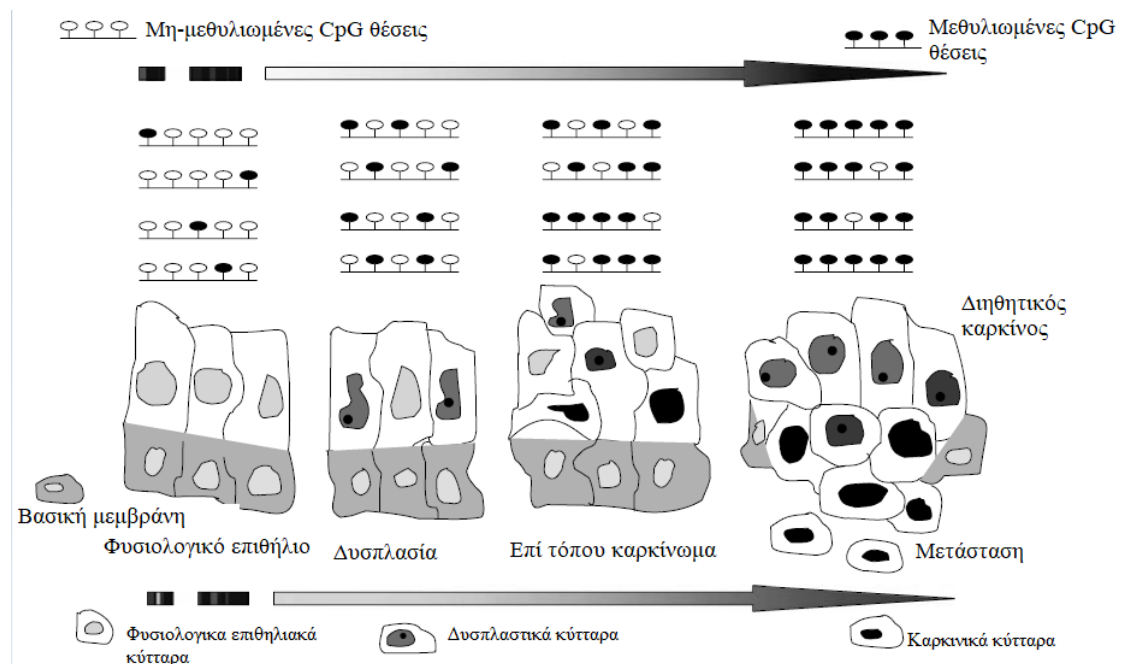
2.4.4.1. Υπομεθυλίωση: Υποκινητών ογκογονιδίων

Η απώλεια της 5-μεθυλοκυτοσίνης στα καρκινικά και η ολική υπομεθυλίωση DNA που έχει παρατηρηθεί σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές^{124,125}. Επίσης μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA βρέθηκαν σε επιλεγμένα γονίδια σε πρωτοπαθής όγκους σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς^{126,127}. Η απώλεια της μεθυλίωσης εντοπίζεται κυρίως σε συγκεκριμένους τύπους επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών¹²⁸ ή σε χρωμοσωμικές περιοχές¹²⁹ και έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα ανασυνδυασμών των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος και αυτό έχει σοβαρές επιπτώσεις στην γονιδιωματική σταθερότητα¹³⁰. Στον καρκίνο η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί την ανώμαλη ενεργοποίηση μίας περιορισμένης ομάδας γονιδίων. Η υπομεθυλίωση του υποκινητή των πρωτοογκογονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίησή τους και επομένως την έκφραση τους⁸⁴.

2.4.4.2. Υπερμεθυλίωση: Υποκινητή ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Ο όρος epimutation ορίζεται ως η μη φυσιολογική καταστολή ενεργών γονιδίων και/ή μη φυσιολογική ενεργοποίηση των συνήθως κατεσταλμένων γονιδίων που προκαλούνται από επιγενετικές αλλαγές στα γονίδια αυτά. Η υπερμεθυλίωση της κυτοσίνης των υποκινητών συνδέεται στενά με μεταγραφική καταστολή του γονιδίου και πολλοί υποκινητές που αρχικά αποδείχθηκαν ότι είναι υπερμεθυλιωμένοι στον καρκίνο αντιστοιχούσαν σε ογκοκατασταλτικά γονίδια¹³¹. Επομένως η υπερμεθυλίωση του υποκινητή έχει θεωρηθεί ως epimutation που προκαλεί τη σίγαση τέτοιων

γονιδίων¹³². Έτσι, η τρέχουσα άποψη είναι ότι η υπερμεθυλίωση υπολειμμάτων κυτοσίνης μπορεί να οδηγήσει την καρκινογένεση και την πρόοδο του καρκίνου, και ότι τα επιγενετικά συμβάντα μπορεί ακόμη και να ξεπεράσουν τις μεταλλάξεις στον καρκίνο. Η πλειοψηφία των γονιδίων που είναι υπερμεθυλιωμένα στον καρκίνο είναι στην πραγματικότητα ήδη κατεσταλμένα σε προκαρκινικά κύτταρα. Ακολούθως, συσσωρεύθηκε ένα σύνολο αποδεικτικών στοιχείων που δείχνουν ότι η πυκνότητα της μεθυλίωσης νησίδων CpG σταδιακά αυξάνεται παράλληλα με την εξέλιξη του όγκου. Συνολικά, το πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA αλλάζει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου³³².



Σχήμα 2.13. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων αυξάνεται παράλληλα με την εξέλιξη του όγκου³³².

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

3.1. Εισαγωγή

Οι βιοψίες έχουν χρησιμοποιηθεί από τους κλινικούς ιατρούς για τη διάγνωση και τη παρακολούθηση της νόσου για πάνω 1.000 χρόνια^{135,136}. Ως αποτέλεσμα των διαγνωστικών τους δυνατοτήτων που προσφέρονται πλέον, οι νέες βιοτεχνολογίες επισήμαναν τους περιορισμούς των παραδοσιακών μεθόδων δειγματοληψίας¹³⁷: οι παραδοσιακές βιοψίες είναι επεμβατικές (συχνά απαιτούν χειρουργικές επεμβάσεις), υψηλός κίνδυνος για πιθανές επιπλοκές, είναι ακριβές, ορισμένοι όγκοι είναι απρόσιτοι, αναλύεται μόνο μια μικρή περιοχή του όγκου με περιορισμένη ετερογένεια που δεν αντικατοπτρίζει την συνολική εικόνα του όγκου, το βιοπτικό υλικό είναι περιορισμένο, η διαδικασία επανάληψης λήψης βιοψίας είναι αδύνατη μετά την αφαίρεση του όγκου ή αν αυτός δεν είναι ορατός με την χρήση των απεικονιστικών μεθόδων και επομένως καθίσταται πολύ αδύνατη η παρακολούθηση της νόσου με αυτό τον τρόπο και τέλος οι επαναλαμβανόμενες βιοψίες δεν μπορούν να εκτελεστούν όταν οι κλινικές συνθήκες έχουν επιδεινωθεί και δεν συνίσταται για ασθενείς που λαμβάνουν συγκεκριμένες θεραπείες. Υπάρχουν πολλές δυσκολίες στην απόκτηση βιοψίας ιστών - συμπεριλαμβανομένης και της δυσφορίας στην οποία υποβάλλεται ο ασθενής^{135,138}.

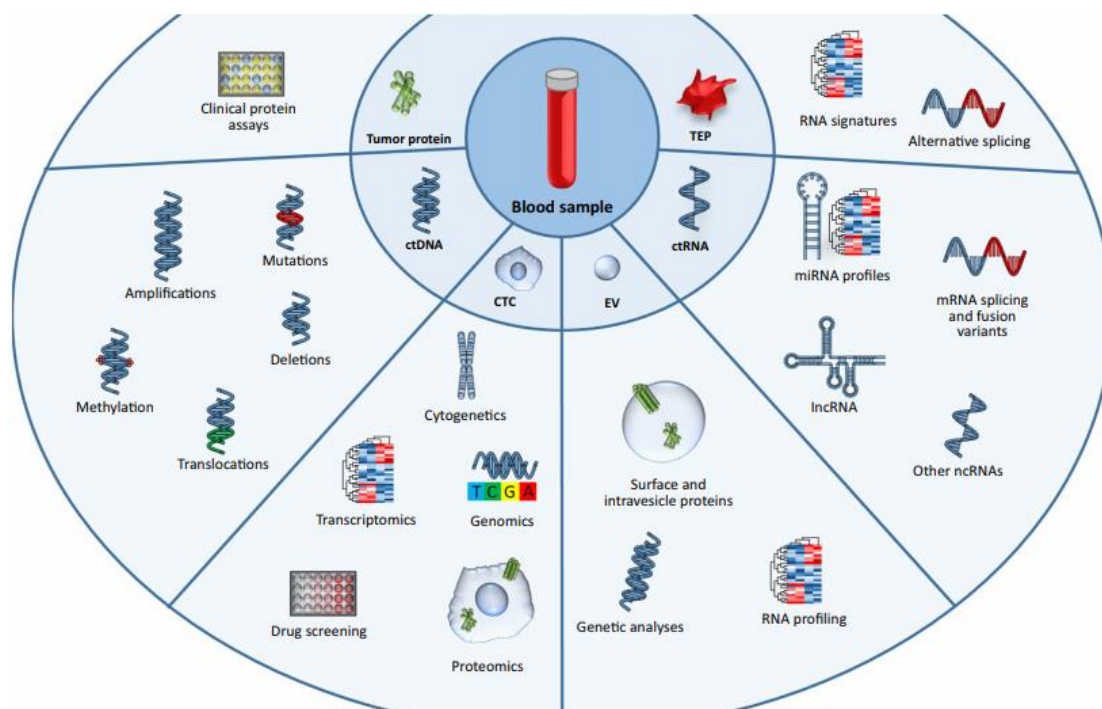
Πίνακας 3.1. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα χαρακτηριστικά της κλασικής βιοψίας και τα αντίστοιχα της υγρής βιοψίας.

Κλασική Βιοψία	Υγρή βιοψία
Επεμβατική και Ακριβή	Ελάχιστα επεμβατική και φθηνή
Ειδική για συγκεκριμένη περιοχή του όγκου	Ανεξάρτητη από την πρωτοπαθή εστία του όγκου
Αναλύεται μόνο μια μικρή περιοχή του όγκου με περιορισμένη ετερογένεια	Ορθότερη εκτίμηση της γενετικής ετερογένειας του συνόλου των καρκινικών κυττάρων

Περιορισμένο βιοπτικό υλικό για ανοσοϊστοχημική και γενετική ανάλυση	Ακόμα και μικρή ποσότητα ctDNA επαρκεί για γενετική ανάλυση
Ορισμένοι όγκοι δεν είναι χειρουργικά προσβάσιμοι για λήψη βιοπτικού υλικού	Πραγματοποίηση απλής αιμοληψίας
Αδύνατη επαναληπτική βιοψία μετά από αφαίρεση του όγκου ή αν αυτός δεν είναι ορατός με απεικονιστικές μεθόδους	Δυνατότητα διαδοχικών αναλύσεων απουσία ανιχνεύσιμου πρωτοπαθούς όγκου ή μεταστατικών εστιών
Οι διαδοχικές βιοψίες δεν είναι εύκολα ανεκτές από τον ασθενή	Εύκολη αιμοληψία λιγότερο επίπονη για τον ασθενή
Χρησιμοποιείται κυρίως για την επιβεβαίωση και σταδιοποίηση της νόσου	Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της απόκρισης στη θεραπεία και για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου
Αποτελεί εικόνα του όγκου μια δεδομένη χρονική στιγμή	Μπορεί να δώσει πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην θεραπεία, την δημιουργία νέων μεταλλάξεων και να συμβάλλει στην χορήγηση εξατομικευμένων θεραπειών
Χρησιμοποιείται όταν έχει δημιουργηθεί ο όγκος	Συμβάλλει στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου

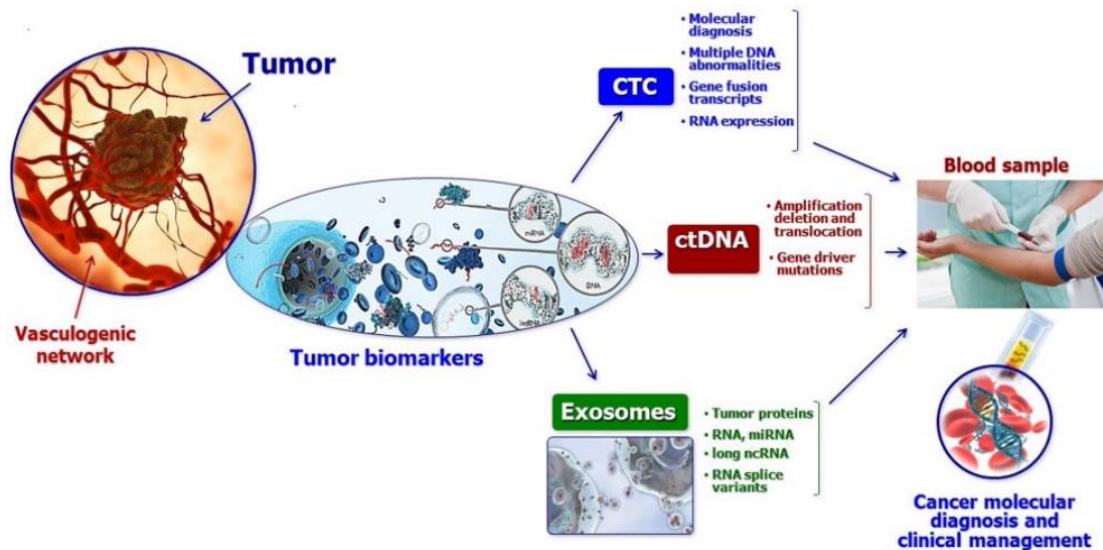
Επιπλέον, η κλασική βιοψία μας παρέχει μια εικόνα για το μοριακό προφίλ του όγκου που περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο^{139,140} και μια περιορισμένη εικόνα της συνολικής ετερογένειας του όγκου¹⁴¹. Στην πραγματικότητα, όμως το μοριακό προφίλ του όγκου και των μεταστάσεων του εξελίσσονται δυναμικά με την πάροδο του χρόνου και ύστερα από την χορήγηση θεραπείας και έτσι μπορεί να γίνει καταστολή ορισμένων κλώνων, ανάπτυξη κλώνων που εμφανίζουν αντίσταση στην θεραπεία και ενίσχυση άλλων κυτταρικών κλώνων¹³⁸. Αυτοί οι περιορισμοί της

κλασικής βιοψίας είναι ιδιαίτερα εμφανείς όταν ο ασθενής παρουσιάζει αντίσταση στην θεραπεία και όταν υπάρχει ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση της νόσου μετά την χειρουργική επέμβαση ή μετά από χορήγηση θεραπείας. Για αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε ένα νέο πεδίο έρευνας στον τομέα της ογκολογίας που εστιάζει στα συστατικά που προέρχονται από την καρκινική εστία και μπορούμε να τα εντοπίσουμε στην κυκλοφορία του αίματος¹⁴¹. Αυτά τα συστατικά περιλαμβάνουν κυκλοφορούντες πρωτεΐνες όγκου, κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα όγκου (ctDNA και ctRNA), κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells), εξωκυτταρικά σωματίδια (εξωσώματα) (extracellular vesicles, exosomes EVs) και εκπαιδευμένα από τον όγκο αιμοπετάλια (Tumor-Educated Platelets, TEP) που προέρχονται από τους όγκους και εκκρίνονται είτε από τους πρωτογενείς όγκους, είτε από τις μεταστατικές τους εστίες στο περιφερικό αίμα¹⁴².



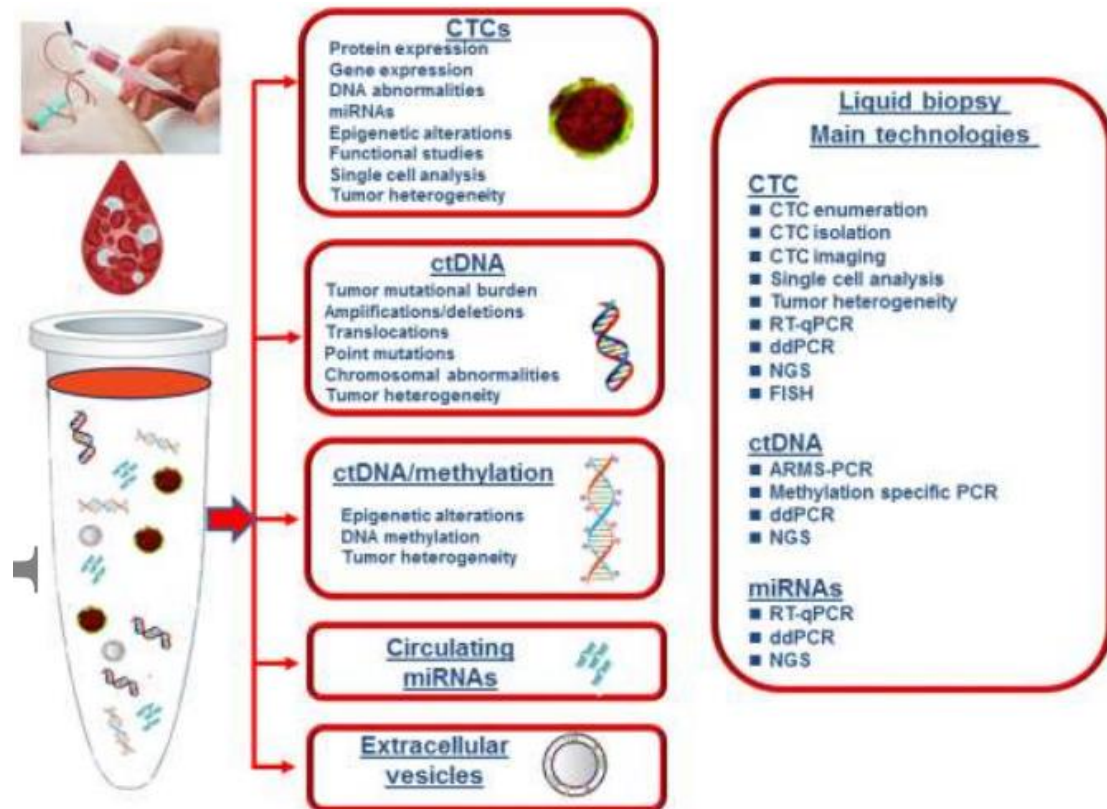
Σχήμα 3.1. Συστατικά της κυκλοφορίας του αίματος που μπορούν να απομονωθούν μέσω της υγρής βιοψίας¹⁴².

Η απομόνωση αυτών των συστατικών που προέρχονται από όγκο από το περιφερικό αίμα και η ανάλυση τους αντιπροσωπεύουν ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο που έχει ονομαστεί «υγρή βιοψία»¹³⁸.



Σχήμα 3.2. Εφαρμογές κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) και εξωσωμάτων συστατικών της υγρής βιοψίας για εξατομικευμένη ιατρική¹³⁸.

Η υγρή βιοψία βασίζεται σε ελάχιστα επεμβατικές εξετάσεις αίματος και επηρεάζει σημαντικά τη θεραπευτική στρατηγική σε ασθενείς με καρκίνο, παρέχοντας ένα εξαιρετικά ισχυρό και αξιόπιστο μη επεμβατικό κλινικό εργαλείο για τον μοριακό προσδιορισμό των ασθενών σε πραγματικό χρόνο. Το κύριο πλεονέκτημα της ανάλυσης υγρής βιοψίας είναι ότι είναι ελάχιστα επεμβατική και μπορεί να επαναληφθεί, επιτρέποντας έτσι την εξαγωγή πληροφοριών από τον όγκο σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, η ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών στο περιφερικό αίμα μας δίνει την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία σε πραγματικό χρόνο, και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για νέες προσεγγίσεις στη θεραπευτική αντιμετώπιση καρκινοπαθών¹⁴³. Το πρώτο σημαντικό ορόσημο στον τομέα αυτό επετεύχθη το 2016 με την έγκριση από τον FDA για την πρώτη συνοδευτική διαγνωστική εξέταση για καρκίνο του πνεύμονα με βάση το ctDNA το οποίο αποτελεί περιεχόμενο της υγρής βιοψίας¹⁴⁴.



Σχήμα 3.3. Συστατικά υγρής βιοψίας που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, αναλύσεις που χρησιμοποιούνται ανά κατηγορία και χρησιμοποιούμενες τεχνικές¹⁴³.

3.2. Συστατικά της υγρής βιοψίας

3.2.1. Κυκλοφορούντες πρωτεΐνες που παράγονται από τον όγκο

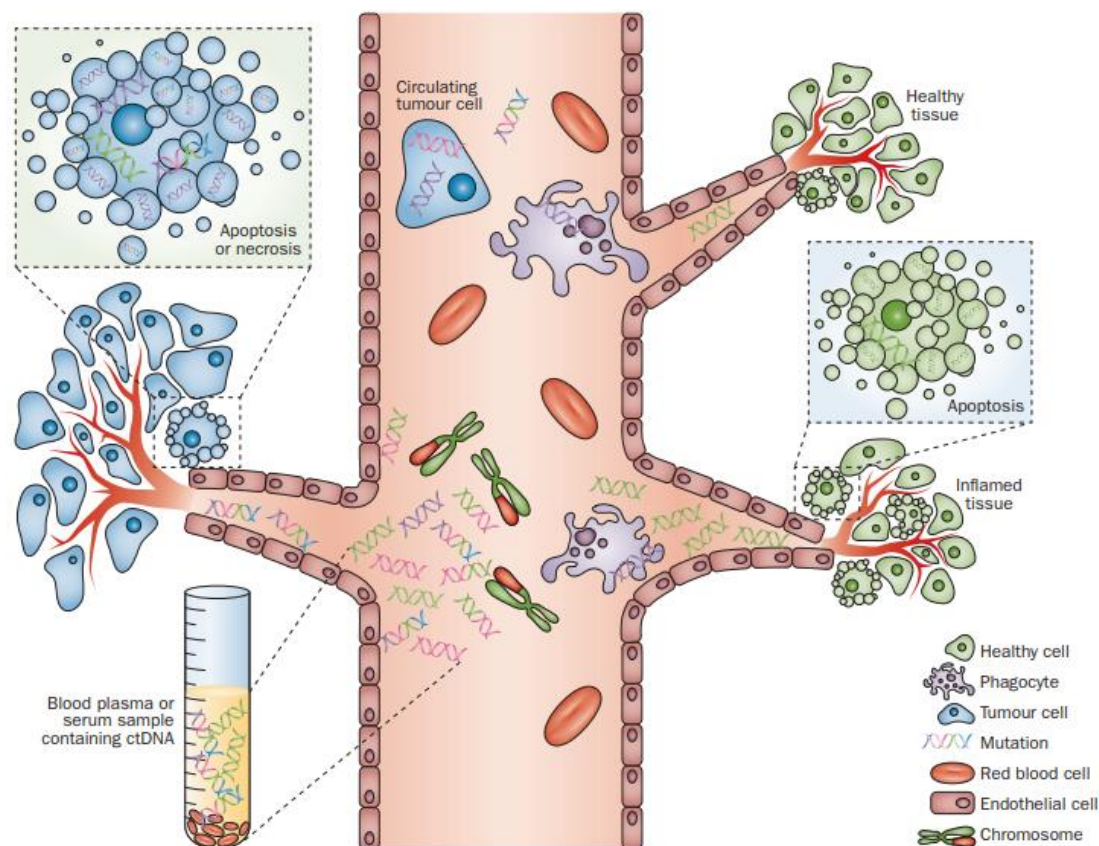
Η μέτρηση των **κυκλοφορούντων πρωτεϊνικών δεικτών** ιστορικά είναι η μέθοδος πρότυπο (gold standard) που χρησιμοποιείται για την μη επεμβατική διάγνωση, έλεγχο και την μετεγχειρητική παρακολούθηση για την διαχείριση του καρκίνου. Σημαντικά παραδείγματα κυκλοφορούντων προερχόμενων από όγκο πρωτεϊνικών δεικτών αποτελούν το ειδικό για τον προστάτη αντιγόνο (PSA) για τον έλεγχο του καρκίνου του προστάτη¹⁴⁵ και του καρκινικού αντιγόνου (CA) 15-3 για την μετεγχειρητική παρακολούθηση της υποτροπής του καρκίνου του μαστού¹⁴⁶. Σημαντικό μειονέκτημα αυτών των βιοδεικτών είναι τα υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί ο ασθενείς να υποβληθεί σε περιττές αντικαρκινικές θεραπείες¹⁴⁵. Η χρήση πάνελ βιοδεικτών ή βιουπογραφών που περιλαμβάνουν περισσότερες από μία πρωτεΐνες είναι μια πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση, επειδή ο συνδυασμός πολλαπλών

βιολογικών δεικτών αυξάνει τη διαγνωστική και/ή προγνωστική ικανότητα της ανάλυσης μειώνοντας τον αριθμό των ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών^{147,148}.

3.2.2. Κυκλοφορούν καρκινικό DNA

Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (**circulating tumor DNA, ctDNA**) περιλαμβάνεται στο κλάσμα του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (**circulating free DNA, cfDNA**) και προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό περιλαμβάνει μικρά θραύσματα συνδεδεμένα με νουκλεοσώματα (80-200 bp)¹⁴⁹ και μεγαλύτερα θραύσματα (> 10 kb) ενθυλακωμένα εντός εξωκυτταρικών σωματιδίων (EVs)¹⁵⁰. Οι μηχανισμοί απελευθέρωσης του ctDNA στην κυκλοφορία περιλαμβάνουν απόπτωση, νέκρωση, λύση των CTC και ενεργή έκκριση από τον όγκο¹⁵¹. Τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες μπορούν να ληφθούν από την ανάλυση του ctDNA¹⁴⁹. Ποσοτικές πληροφορίες μπορούν να ληφθούν από τη μέτρηση του κλάσματος του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (mutant allele fraction, MAF, το ποσοστό του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου σε ένα δεδομένο γενετικό τόπο) και είναι μια αντανάκλαση του φορτίου του όγκου¹⁴⁹. Βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease, MRD), ανίχνευση των απόκρυφων μεταστάσεων¹⁵², στην παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας¹⁵³. Τα επίπεδα ctDNA παρέχουν ένα στιγμιότυπο του συνολικού όγκου σε πραγματικό χρόνο λόγω της βραχείας ημιζωής του ctDNA (περίπου 2,5 ώρες)¹⁴⁹. Η ανίχνευση ctDNA μετά τη θεραπεία είναι ένας υψηλής ευαισθησίας και υψηλής εξειδίκευσης προγνωστικός δείκτης της υποτροπής¹⁵⁴. Ποιοτικές πληροφορίες μπορούμε να αντλήσουμε μέσα από το προφίλ των μεταλλάξεων, τις ενισχύσεις, τις διαγραφές, και τις μετατοπίσεις στο ctDNA, επιτρέποντας την ταυτοποίηση των γενετικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με την απόκριση συμβάλλοντας στην λήψη αποφάσεων για εξατομικευμένη διαχείριση του ασθενούς¹⁴⁹. Για παράδειγμα, η πρώτη διαγνωστική δοκιμή συνοδευτικού διαγνωστικού ελέγχου ctDNA (cobas1 EGFR Mutation Test v2, Roche Diagnostics), που εγκρίθηκε από τον FDA¹⁴⁴, χρησιμοποιείται για να καθοδηγήσει τη χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) με βάση την ανίχνευση ειδικών μεταλλάξεων του EGFR σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Άλλες ποιοτικές πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν μέσω της ανάλυσης ctDNA περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της μεθυσίας. Για παράδειγμα, μια δοκιμή ελέγχου για τον καρκίνο του παχέος εντέρου

(CRC), το Epi proColon1, που εγκρίθηκε πρόσφατα από τον FDA και αναλύει το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου SEPT9, μιας περιοχής που είναι γνωστό ότι υπερμεθυλιώνεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με μη κακοήγη δείγματα¹⁵⁵.

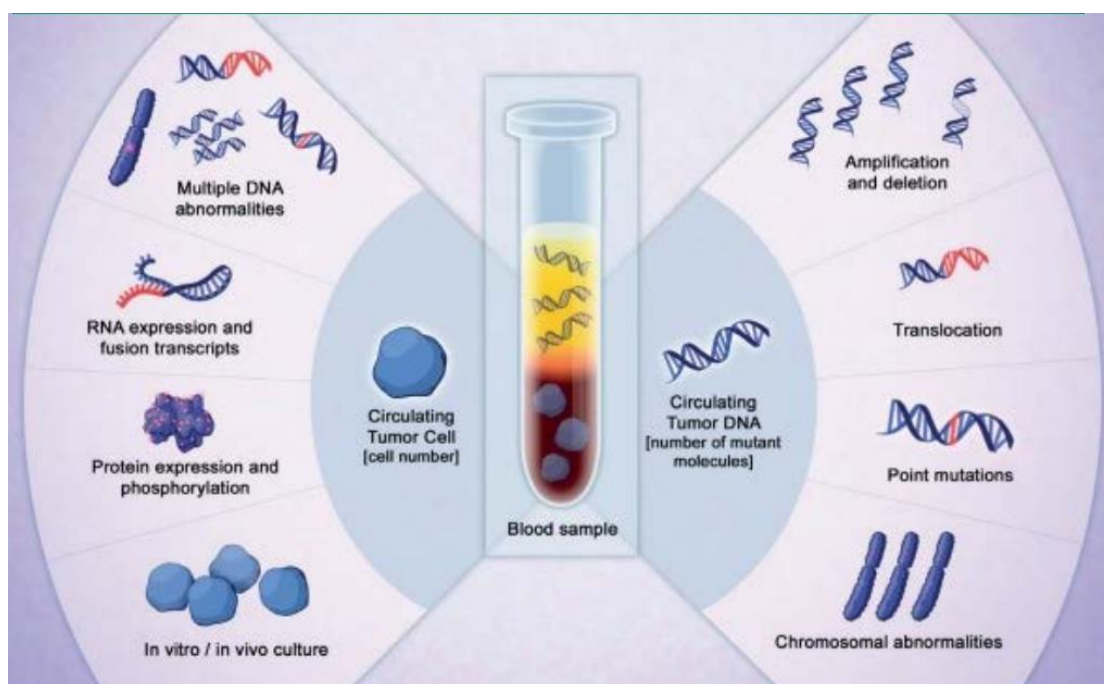


Σχήμα 3.4. Απελευθέρωση και εξαγωγή του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA από το αίμα. Το κυκλοφορούν DNA απελευθερώνεται από κύτταρα είτε από υγιή είτε από φλεγμονώδη ή νοσούντα (καρκινικό) ιστό που υποβάλλονται σε απόπτωση ή νέκρωση. Το καρκινικό κυκλοφορούν DNA μπορεί να εξαχθεί από δείγμα αίματος και να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι γενετικές ανωμαλίες στο DNA που απελευθερώνεται από τον καρκινικό ιστό. Οι γενετικές μεταβολές που προέρχονται από όγκους και που μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις (διαδοχικοί μοβ, κόκκινοι, πράσινοι και μπλε DNA κλώνοι), διακυμάνσεις του αριθμού των αντιγράφων (κόκκινο τμήμα χρωμοσωμάτων) και δομικές ανακατατάξεις (πράσινες και κόκκινες ίνες DNA)¹³⁵.

3.2.3. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) είναι ένας πληθυσμός κυττάρων του όγκου που έχουν αποκολληθεί από τον πρωτοπαθή όγκο και μπορούν να εντοπιστούν στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Η παρουσία τους θεωρείται θεμελιώδης για την ανάπτυξη της μετάστασης¹⁵⁶. Τα CTCs κάνουν την παρουσία στην κυκλοφορία του αίματος είτε μέσω ενεργού ενδοαγγείωσης, με την επιθηλίο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) ως θεμελιώδες βήμα¹⁵⁷, είτε μέσω παθητικής απόσπασης από τον πρωτοπαθή όγκο. Αυτός ο τελευταίος μηχανισμός έχει

ως αποτέλεσμα την **παρουσία συσσωματωμάτων CTCs ή κυκλοφορούντων μικροεμβολών όγκου (circulating tumor microemboli, CTMs)** στο αίμα¹⁵⁸. Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από την ανάλυση των CTCs είναι ποσοτικές καθώς και ποιοτικές (φαινοτυπικές) μέσω γονιδιοματικής, μεταγραφομικής και/ή πρωτεομική ανάλυσης μονήρους κυττάρου. Τα CTCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για τη διάγνωση, την παρακολούθηση, την πρόγνωση, την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία και επίσης για την ανακάλυψη νέων στόχων φαρμάκων¹⁵⁹. Επιπλέον, ο ex vivo χαρακτηρισμός των CTCs έχει σημαντική μεταφραστική αξία, διότι επιτρέπει τη διεξαγωγή εξατομικευμένων εξετάσεων ευαισθησίας σε φάρμακα με στόχο την λήψη θεραπευτικών αποφάσεων με βάση τα εξελισσόμενα προφίλ μεταλλάξεων του όγκου και τα πρότυπα ευαισθησίας του φαρμάκου που εντοπίζονται σε μεμονωμένους ασθενείς¹⁶⁰. Οι πιο απλές πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τα CTCs είναι ο αριθμός τους, ο οποίος είναι ένας προγνωστικός παράγοντας για πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των μεταστατικών καρκίνων του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη¹⁶¹.



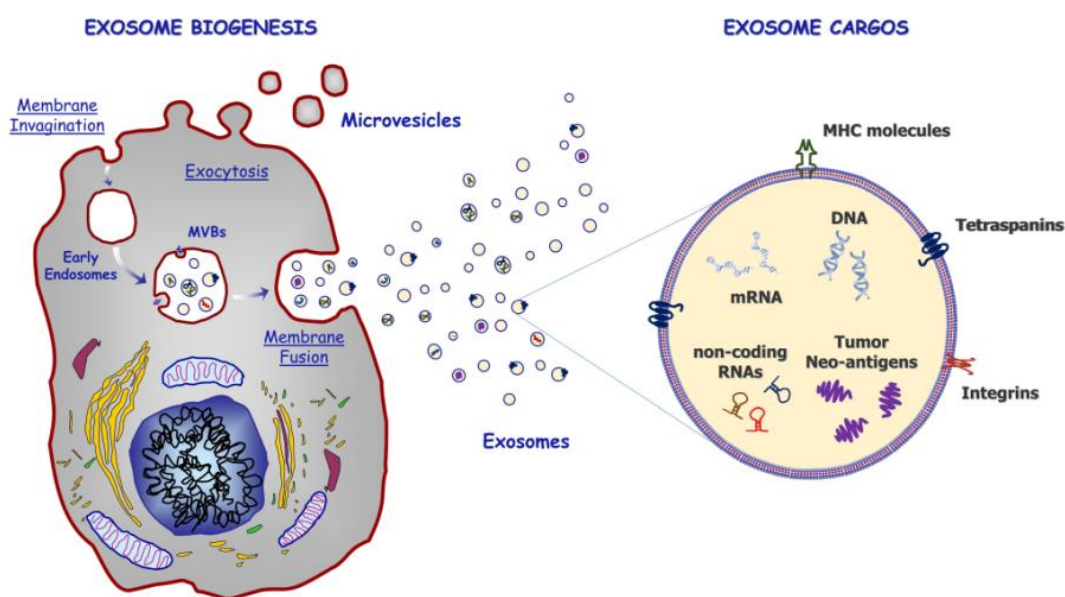
Σχήμα 3.5. Πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε από την ανάλυση των CTCs και του ctDNA¹⁶².

3.2.4. Εξωκυτταρικά σωματίδια

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (**Extracellular vesicles, EVs**) είναι σωματίδια (κυστίδια) μεμβρανών που απελευθερώνονται από όλους τους τύπους κυττάρων υπό φυσιολογικές

και παθολογικές συνθήκες, καθώς και μετά από διαφορετικούς τύπους ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών, της ADP, της θρομβίνης, των φλεγμονωδών κυτταροκινών, των αυξητικών παραγόντων, των στρεσογόνων και των αποπτωτικών σημάτων¹⁶³. Μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε όλα τα σωματικά υγρά και ειδικά στο αίμα¹⁶⁴. Αρχικά θεωρήθηκαν ως ένα απλό μέσο για την απομάκρυνση των μη απαραίτητων κυτταρικών συστατικών από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αλλά την τελευταία δεκαετία τα EVs αναγνωρίστηκαν ως θεμελιώδεις διαμεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας, ρυθμίζοντας και συμμετέχοντας σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου¹⁶⁴. Ανάλογα με τη βιογένεση, το περιεχόμενο και τα μονοπάτια έκκρισης τους, τα EVs μπορούν να χωριστούν σε δύο ευρείες κατηγορίες: τα εξωσώματα και τα μικροσωματίδια¹⁶⁴. Τα **εξωσώματα (Exosomes, EXOs)** είναι σωματίδια νανομεγέθους (40-100 nm) που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και είναι ανιχνεύσιμα στα περισσότερα υγρά του σώματος, όπως πλάσμα, ούρα, σάλιο¹⁶⁵. Διαφορετικά από άλλα EVs (50-1000 nm σε διάμετρο) ή τα αποπτωτικά σώματα, τα EXOs είναι προϊόντα της ενδοσκοπικής οδού ανακύκλωσης και προέρχονται από την εσωτερική εκκόλαψη της πλασματικής μεμβράνης¹⁶⁶. Παρόλο που παλαιότερα θεωρήθηκαν όπως και τα άλλα EVs και αυτά ως κυτταρικά απόβλητα¹⁶⁷, πλέον έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία, ανάλογα με το φορτίο των λειτουργικών μορίων που φέρουν από το δότη έως τα απομακρυσμένα κύτταρα¹⁶⁸. Τα EXOs συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες και έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην πρόοδο του καρκίνου και στη μετάσταση¹⁶⁸. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα EXOs που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα, συγκεκριμένα EXOs που προέρχονται από όγκους, προάγουν την EMT και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήσδηση των καρκινικών κυττάρων, επίσης συμβάλλουν στην αγγειογένεση και του τη δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος¹⁷⁰. Η καταλληλότητα των EVs ως καρκινικοί βιοδείκτες έγκειται στο γεγονός ότι τα μοριακά φορτία που μεταφέρουν μπορούν να θεωρηθούν ως ένα μοριακό αποτύπωμα του κυττάρου προέλευσης¹⁷¹. Σε σύγκριση με το ctDNA και τα CTCs, η εφαρμογή τους στην κλινική διάγνωση του καρκίνου παρεμποδίζεται από τις προκλήσεις στην απομόνωσή τους, την αναλυτική ευαισθησία και τις ανησυχίες σχετικά με τη σταθερότητα, τα πιθανά πλεονεκτήματα των EVs είναι πολλά. Τα EVs τυπικά παράγονται και απελευθερώνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα CTCs¹⁷². Η σταθερότητα του μοριακού φορτίου τους προφυλάσσεται μέσω μίας

προστατευτικής εξωτερικής λιπιδικής μεμβράνης¹⁷³. Παρόμοια με τα ctDNA και CTCs, τα EVs μπορούν να αποτελέσουν πηγή ποσοτικών και ποιοτικών πληροφοριών. Οι ποσοτικές πληροφορίες που περιλαμβάνουν τους αριθμούς EV μπορούν να ενημερώσουν την παρουσία κακοήθους νόσου και φορτίου όγκου. Για παράδειγμα, τα επίπεδα των εξωσωμάτων που κυκλοφορούν αυξάνονται στον καρκίνο του μαστού και του παγκρέατος¹⁷⁴ και ο αριθμός των κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων (MPs) είναι υψηλότερος σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα (MM) σε σύγκριση με υγιή άτομα¹⁷⁵. Επιπλέον, τα επίπεδα κυκλοφορούντων MPs έδειξαν δυνατότητα διάγνωσης και πρόγνωσης προχωρημένου μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα¹⁷⁶. Ποιοτικές πληροφορίες μπορούμε να αντλήσουμε μέσω του μοριακού χαρακτηρισμού των συστατικών των EVs, δηλαδή των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών¹⁷¹. Η περιεκτικότητα σε RNA των EVs, συμπεριλαμβανομένων και των κωδικών RNA και των μη κωδικών RNA (ncRNA), έχει μελετηθεί ευρέως¹⁷². Η περιεκτικότητα σε DNA των εξωσωμάτων προσέλκυσε πρόσφατα την προσοχή ως πηγή βιοδεικτών σε μια μελέτη στην οποία ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα KRAS και TP53 σε εξωσώματα από τον ορό σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος¹⁵⁰. Σε άλλη μελέτη, η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων KRAS στα εξωσώματα αποδείχθηκε καλύτερη από τα επίπεδα CA 19-9 για την προγνωστική στρωματοποίηση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος¹⁷⁷. Τα EVs φέρουν πρωτεΐνες στον αυλό τους και στη μεμβράνη τους και έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες αναφορές που καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών των EVs ως πιθανοί βιοδείκτες καρκίνου¹⁷¹.



Σχήμα 3.6. Βιογένεση και περιεχόμενο εξωσωμάτων¹³⁸.

3.2.5. Κυκλοφορούν καρκινικό RNA

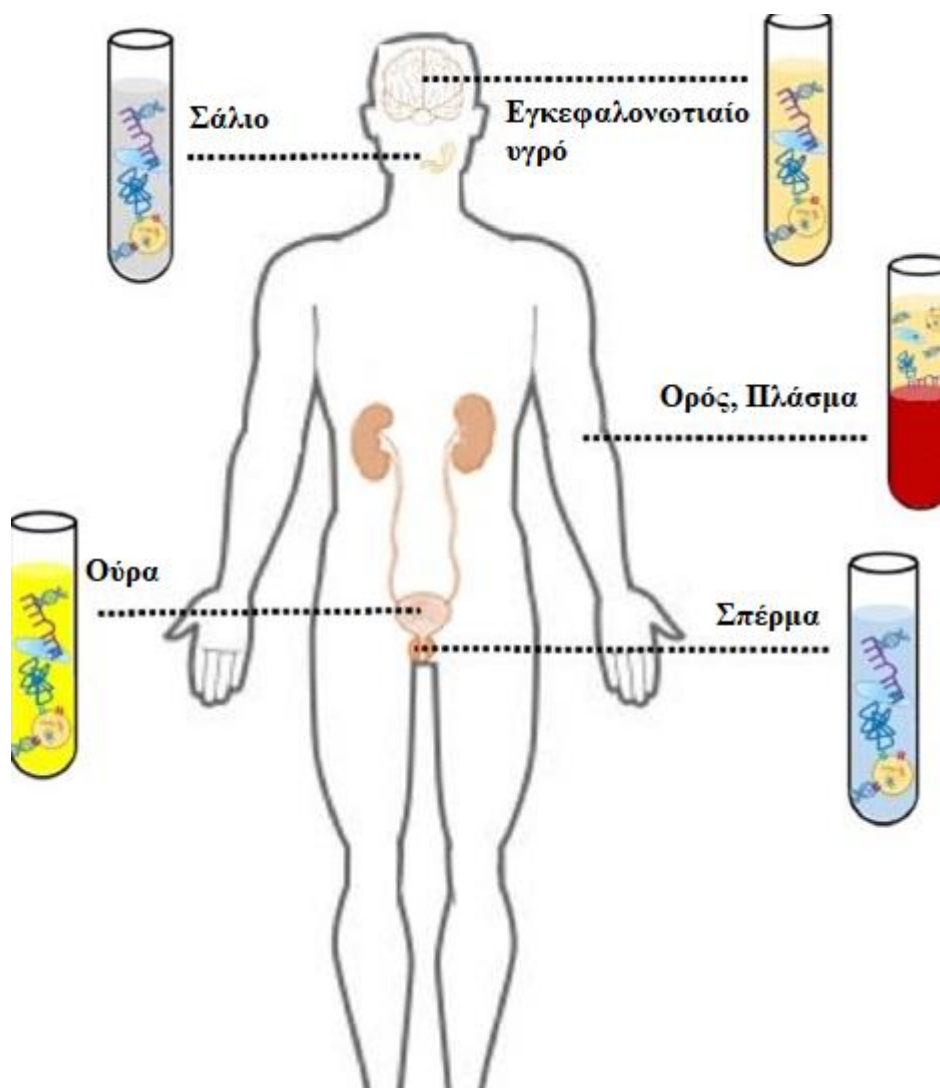
Το κλάσμα του ελεύθερου κυκλοφορούντος RNA που προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα αναφέρεται ως **κυκλοφορούν καρκινικό RNA (circulating tumor RNA, ctRNA)**. Η ύπαρξη εξωκυτταρικού RNA τεκμηριώθηκε για πρώτη φορά το 1978¹⁷⁸ και η πρώτη αναφορά του ως καρκινικού βιοδείκτη δημοσιεύθηκε αρκετά χρόνια αργότερα¹⁷⁹. Σε σύγκριση με το DNA, το RNA είναι ένα σχετικά ασταθές μόριο, ο χρόνος ημίσειας ζωής του στο πλάσμα είναι περίπου 15s¹⁸⁰. Η σταθερότητά του ενισχύεται από την ένωση του με τις πρωτεΐνες¹⁸¹, τα λιποπρωτεϊνικά σύμπλοκα¹⁷⁹ και τα EVs¹⁷³. Σχεδόν όλες οι γνωστές κατηγορίες RNA έχουν βρεθεί στη συστηματική κυκλοφορία και έχουν τη δυνατότητα να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες καρκίνου¹⁸². Παρόμοια με άλλα συστατικά του όγκου στην κυκλοφορία και το ctRNA αποτελεί πηγή ποσοτικών και ποιοτικών πληροφοριών¹⁸³. Οι σημαντικότερες κατηγορίες του ctRNA που είναι κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες είναι τα mRNAs, τα miRNAs και τα μακρά ncRNAs (lncRNAs).

3.2.6. Εκπαιδευμένα από τον όγκο αιμοπετάλια

Τα **εκπαιδευμένα από τον όγκο αιμοπετάλια (Tumor Educated Platelets, TEP)** είναι ίσως τα πιο πρόσφατα συστατικά του όγκου που εντοπίζουμε στην κυκλοφορία και που μπορούμε να τα αναλύσουμε ως πιθανούς βιοδείκτες καρκίνου. Η έννοια της «εκπαίδευσης των αιμοπεταλίων» από τον όγκο αναφέρεται στην παρουσία ειδικών υπογραφών RNA στα αιμοπετάλια από ασθενείς με καρκίνο. Αυτό αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2010 και το 2011 με τις παρατηρήσεις ότι: (i) σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, τα 197 γονίδια των αιμοπεταλίων απορυθμίστηκαν και αρκετά γονίδια διαμοιράστηκαν διαφορετικά σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς¹⁸⁴ και (ii) στο γλοίωμα, μικροσωματίδια που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα λαμβάνονται από τα αιμοπετάλια και μεταφέρουν το περιεχόμενο RNA τους, το οποίο φέρει μια χαρακτηριστική RNA υπογραφή την οποία ανιχνεύουμε με μικροσυστοιχίες (microarray) RNA¹⁸⁵. Το 2015, ο Best et al χαρακτήρισαν TEPs που εξήχθησαν από μια ομάδα ασθενών με έξι τύπους καρκίνου μέσω του RNA-Seq, διαχωρίζοντας τους ασθενείς με τοπικό ή μεταστατικό όγκο από τα υγιή άτομα με ακρίβεια 96% και εντόπισαν την θέση του όγκου με ακρίβεια 71%. Αυτό άνοιξε το δρόμο για ένα νέο τρόπο διάγνωσης του καρκίνου¹⁸⁶.

3.3. Δείγματα υγρής βιοψίας

Αν και η «τυπική» έννοια της υγρής βιοψίας περιλαμβάνει τη δειγματοληψία του αίματος, σχεδόν όλα τα σωματικά υγρά είναι κατάλληλα για υγρή βιοψία. Τα συνήθη σωματικά υγρά είναι: ούρα, σάλιο, πτύελα, κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) και υπεζωκοτικές εκκρίσεις. Πολλά από αυτά έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή βιοδεικτών καρκίνου^{187,188}.

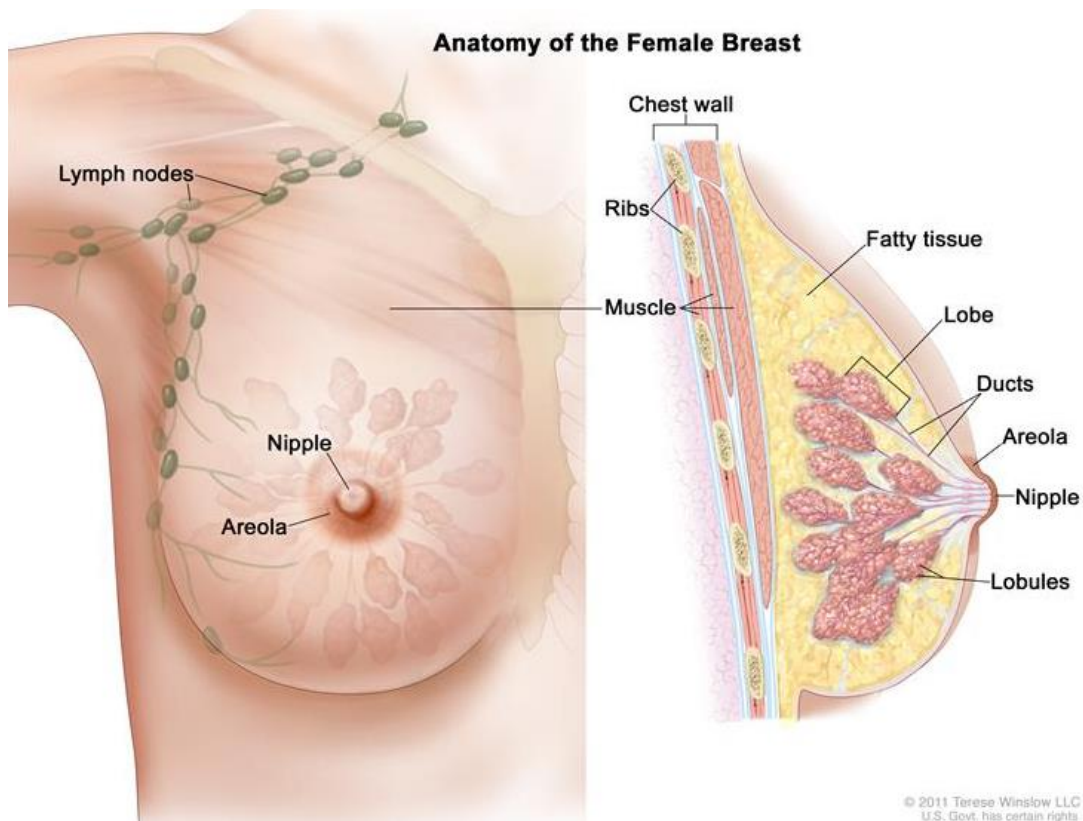


Σχήμα 3.7. Σωματικά υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα στην υγρή βιοψία¹⁸⁹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

4.1. Ανατομία και φυσιολογία του μαστού

Ανέκαθεν ο γυναικείος μαστός υπήρξε σύμβολο θηλυκότητας, μητρότητας αλλά και νόσου για τη γυναίκα. Το στήθος βρίσκεται στην κορυφή του μείζωνος θωρακικού μυ. Αποτελείται από παρέγχυμα, στρώμα και λιπώδη ιστό καθώς και από δέρμα και υποδόριο ιστό. Οι ζώνες του συνδετικού ιστού που ενώνουν το δέρμα με τον μείζων θωρακικό μυ ονομάζονται σύνδεσμοι του Cooper και είναι αυτοί οι οποίοι κρατούν τον μαστό στη θέση του. Καθώς οι γυναίκες γερνούν, αυτοί οι σύνδεσμοι χαλαρώνουν, οδηγώντας σε πτώση του μαστού¹⁹⁰. Το στήθος είναι εξαιρετικά περίπλοκο. Περνάει περισσότερες αλλαγές από οποιοδήποτε άλλο μέρος του ανθρώπινου σώματος - από τη γέννηση, την εφηβεία, την εγκυμοσύνη και το θηλασμό μέχρι την εμμηνόπαυση. Ο ιστός του μαστού εκτείνεται από την κλείδα, έως στις κάτω πλευρές, στο στέρνο και στη μασχάλη. Κάθε στήθος περιέχει 15-20 αδένες που ονομάζονται λοβοί, όπου το γάλα παράγεται σε γυναίκες που θηλάζουν. Αυτοί οι λοβοί συνδέονται με τη θηλή με 6-8 σωλήνες που ονομάζονται γαλακτοφόροι πόροι (αγωγοί) και μεταφέρουν το γάλα στη θηλή. Το στήθος και η μασχάλη περιέχουν λεμφαδένες και αγγεία που φέρουν λεμφικό υγρό και λευκά αιμοσφαίρια. Ένα μεγάλο μέρος του υπόλοιπου μαστού είναι ο λιπώδης ιστός¹⁹¹.

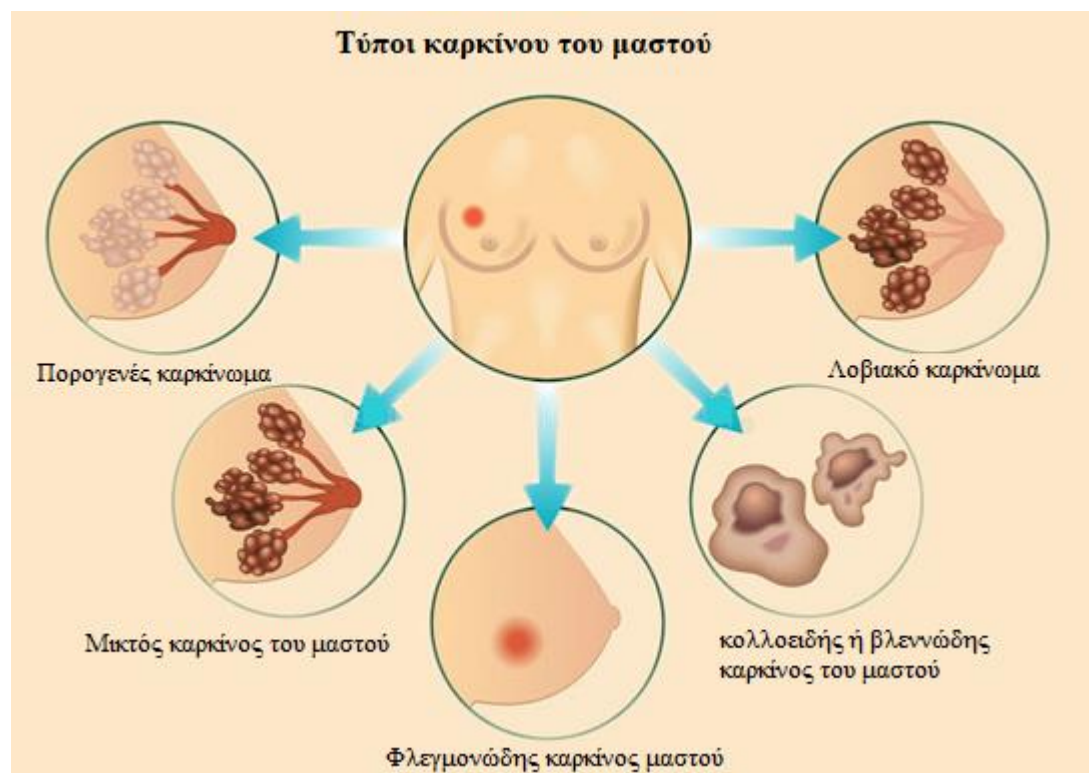


Σχήμα 4.1. Ανατομία γυναικείου μαστού¹⁹².

4.2. Γενικά

Ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη μορφή κακοήθειας των γυναικών. Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στον γυναικείο πληθυσμό, ο οποίος επηρεάζει κάθε χρόνο 2,1 εκατομμύρια γυναίκες και προκαλεί επίσης τον μεγαλύτερο αριθμό θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο στις γυναίκες. Το 2018, εκτιμάται ότι 627.000 γυναίκες πέθαναν από καρκίνο του μαστού - δηλαδή περίπου το 15% όλων των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες. Ενώ τα ποσοστά καρκίνου του μαστού είναι υψηλότερα στις γυναίκες στις πιο ανεπτυγμένες περιοχές, τα ποσοστά αυξάνονται σχεδόν σε όλες τις περιοχές παγκοσμίως¹⁹³. Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας κακοήθης όγκος που προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αγωγών του γάλακτος ή των λοβών του μαστού¹⁹⁵. Το καρκίνωμα του μαστού ταξινομείται είτε ως μη διηθητικό (καρκίνωμα επί τόπου, carcinoma in situ) είτε ως διηθητικό, ανάλογα με το αν ο όγκος έχει αρχίσει να αναπτύσσεται εκτός της βασικής μεμβράνης. Τα διηθητικά καρκινώματα είναι καρκίνοι στους οποίους τα καρκινικά κύτταρα διαχέονται στους περιβάλλοντες συνδετικούς ιστούς και κάνουν μεταστάσεις σε μακρινά όργανα του

σώματος. Περίπου τα δύο τρίτα των καρκινωμάτων του μαστού προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των γαλακτοφόρων πόρων, και ονομάζονται **πορογενές καρκίνωμα (ductal carcinoma)**, και το περίπου ένα τρίτο από τους λοβούς, και ονομάζεται **λοβιακό καρκίνωμα (lobular carcinoma)**¹⁹⁶. Άλλες λιγότερο συχνές μορφές καρκίνου του μαστού είναι ο φλεγμονώδης, κολλοειδής ή βλεννώδης, μυελοειδής, σωληνώδης, θηλώδης, μικροθηλώδης, εκκριτικός ή νεανικός, αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα και μεταπλαστικός καρκίνος του μαστού¹⁹⁶.



Σχήμα 4.2. Τύποι καρκίνου του μαστού¹⁹⁷.

Οι καρκίνοι, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, γενικά πιστεύεται ότι αναπτύσσονται από ένα μόνο κύτταρο στο οποίο μεταλλάξεις ή/και επιγενετικά γεγονότα έχουν τροποποιήσει τη λειτουργία των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Αυτά τα γεγονότα και τα επακόλουθα μοριακά συμβάντα μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση κακοήθων κλώνων με αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό^{194,198}.

4.3. Ταξινομήσεις στον καρκίνο του μαστού

4.3.1. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού

Οι καρκίνοι του μαστού μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις διακριτούς διαφορετικούς υποτύπους χρησιμοποιώντας τέσσερις γνωστούς βιοδείκτες, συμπεριλαμβανομένων των **ERa (Estrogen Receptor a**, υποδοχέας των οιστρογόνων), **PR (Progesterone receptor**, υποδοχέας προγεστερόνης), **HER2 (human epidermal growth factor receptor 2**, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας τύπου 2) και **Ki-67** (πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό)¹⁹⁹. Αυτή η ταξινόμηση με βάση τον μοριακό υπότυπο αποτελεί συχνά βασική αναφορά για την πρόγνωση και την επιλογή θεραπευτικής στρατηγικής²⁰⁰. Το Luminal A είναι ο πιο συνηθισμένος υποτύπος που είναι ERα-θετικός, PR-θετικός, HER2-αρνητικός και έχει χαμηλή έκφραση του Ki-67, και έχει επίσης την καλύτερη έκβαση με την ορμονική θεραπεία²⁰¹. Το Luminal B είναι παρόμοιο με το luminal A αλλά έχει υψηλή έκφραση του Ki-67 αυτός ο υποτύπος είναι πιο επιθετικός από τον Luminal A^{201,202}. Οι ασθενείς που έχουν luminal B υπότυπο μπορούν να ωφεληθούν από την ορμονική θεραπεία σε συνδυασμό με θεραπεία με αντισώματα αντι-HER2 Trastuzumab (Herceptin), ανάλογα με την έκφραση του HER2 ή όχι^{203,204}. Τέλος, ο τριπλός καρκίνος του μαστού (TNBC) είναι ένας υποτύπος με κακή πρόγνωση, λόγω της έλλειψης συγκεκριμένων στόχων φαρμάκων²⁰². Η χημειοθεραπεία είναι η κύρια θεραπεία για αυτόν τον υπότυπο²⁰⁵.

Πίνακας 4.1. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού.

Υπότυπος	Βιοδείκτης	Θεραπεία
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2- και Ki67 χαμηλό	Ορμονοθεραπεία
Luminal B	ER+, PR+/-, HER2+/- και Ki67 υψηλό	Ορμονοθεραπεία Trastuzumab
HER2 έκφραση	ER-, PR- και HER2+	Trastuzumab Χημειοθεραπεία
Τριπλά αρνητικός	ER-, PR- και HER2-	Χημειοθεραπεία

4.3.2. Σύστημα σταδιοποίησης TNM

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM που ανακηρύχθηκε από την Αμερικανική Κοινή Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) βασίζεται στις ανατομικές ιδιότητες του όγκου²⁰⁶. Η ταξινόμηση TNM χρησιμοποιεί συνδυασμό του μεγέθους του όγκου (T), της διήθησης σε γειτονικούς ιστούς, η διήθηση των λεμφαδένων (N), και την ύπαρξη μεταστάσεων ή την διασπορά της νόσου (M) σε άλλα όργανα²⁰⁷. Αυτό το σύστημα ταξινόμησης παρέχει μια βάση για πρόβλεψη της επιβίωσης, επιλογή θεραπευτικών προσεγγίσεων και αξιολόγηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων²⁰⁷.

Πίνακας 4.2. Σύστημα σταδιοποίησης TNM. Σημασία συμβόλων: T1 = Όγκος ≤2cm, T2 = Όγκος > 2cm αλλά ≤5cm, T3 = Όγκος > 5cm, N0 = Δεν υπάρχει εμπλοκή λεμφαδένων, N1mi = Μικρομεταστάσεις μικρότερες από 2 mm, N1 = Μεταστάσεις σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες, N2 = Μεταστάσεις σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες N3 = Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες, M0 = απουσία μακρινής μετάστασης, M1 = Απόμακρη μετάσταση.

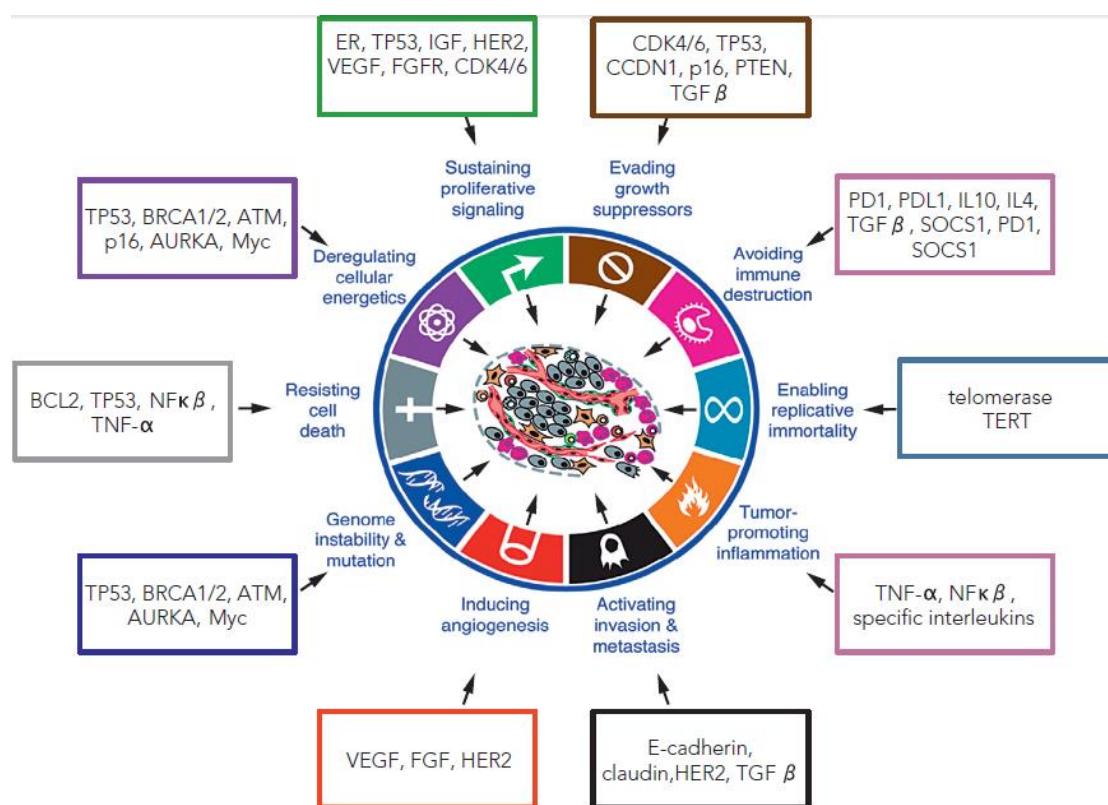
Σύστημα σταδιοποίησης TNM			
Στάδιο 0	T1	N0	M0
Στάδιο IA	T1	N0	M0
Στάδιο IB	T1	N1mi	M0
Στάδιο IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Στάδιο IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Στάδιο IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0

Στάδιο IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Στάδιο IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

4.4. Γενετική του καρκίνου του μαστού

Όπως και άλλες μορφές καρκίνου έτσι και ο καρκίνος του έχει γενετική βάση. Σήμερα, το θετικό οικογενειακό ιστορικό είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*). Εκτιμάται ότι περίπου το 5-10% όλων των καρκίνων του μαστού έχει κληρονομικό υπόβαθρο. Αυτές οι οικογένειες παρουσιάζουν ένα επικρατές μοτίβο κληρονομικότητας, εμφανίζουν καρκίνο σε μικρή ηλικία, συχνά εμφανίζουν καρκίνο των ωοθηκών, εμφανίζουν επίσης και πιο επιθετική μορφή καρκίνου και έχουμε εμφάνιση καρκίνου του μαστού και στους άνδρες^{208,209}. Οι γενετικές μεταβολές ταξινομούνται ως μεταλλάξεις στο επίπεδο αλληλουχίας ζευγών βάσεων, ενισχύσεις (πολλαπλές επαναλήψεις μεγάλων περιοχών ενός χρωμοσώματος), διαγραφές (απώλεια μιας μεγάλης περιοχής χρωμοσωμάτων), ανευπλοειδία (αλλοιώσεις στον αριθμό των χρωμοσωμάτων) και μετατοπίσεις (ένα χρωμόσωμα μεταφέρθηκε σε ένα μη ομόλογο χρωμόσωμα ή σε άλλη θέση στο ίδιο χρωμόσωμα). Η εμφάνιση σωματικών μεταλλάξεων μπορεί να περιγραφεί ως συνέπεια έκθεσης σε ενδογενή και/ή εξωγενή μεταλλαξιογόνα, σφαλμάτων κατά την αντιγραφή και ελαττωματικής συντήρησης του DNA²¹¹. Μελέτη του προτύπου εμφάνισης γονδιακών μεταλλάξεων και των συνδυασμών τους με κλινικές μεταβλητές μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της αιτιολογίας της νόσου καθώς μπορεί και να έχει και πιθανή κλινική χρησιμότητα. Οι μεταλλάξεις στα καρκινικά κύτταρα έχουν ως αποτέλεσμα: α) στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (**tumor suppressors**): απώλεια της ρύθμισης της ανάπτυξης και την κακή διαφοροποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ελέγχου του πολλαπλασιασμού (**gatekeepers**), απώλεια των σημείων ελέγχου και την ελλιπή επισκευή του DNA από τα γονίδια διατήρησης της ακεραιότητας και επιδιόρθωσης του

DNA (**caretakers**) και την τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος και την προώθηση της ανάπτυξης από τα γονίδια ελέγχου μικροπεριβάλλοντος του κυττάρου (landscapers), β) στα ογκογονίδια (**oncogenes**): ενεργοποίηση των ογκογονιδίων οδηγών (drivers) τα οποία είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό και την επιβίωση των όγκων και την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων επιβατών (passengers) των οποίων οι μεταλλάξεις δεν είναι απαραίτητα σχετιζόμενες με τον όγκο, γ) την απώλεια λειτουργίας (**loss of function**): μερική ή πλήρη απώλεια γονιδιακής λειτουργίας και δ) την αύξηση λειτουργίας (**gain of function**): απόκτηση νέας λειτουργίας και απόκτηση αντίστροφης από την κανονική λειτουργία των γονιδίων.

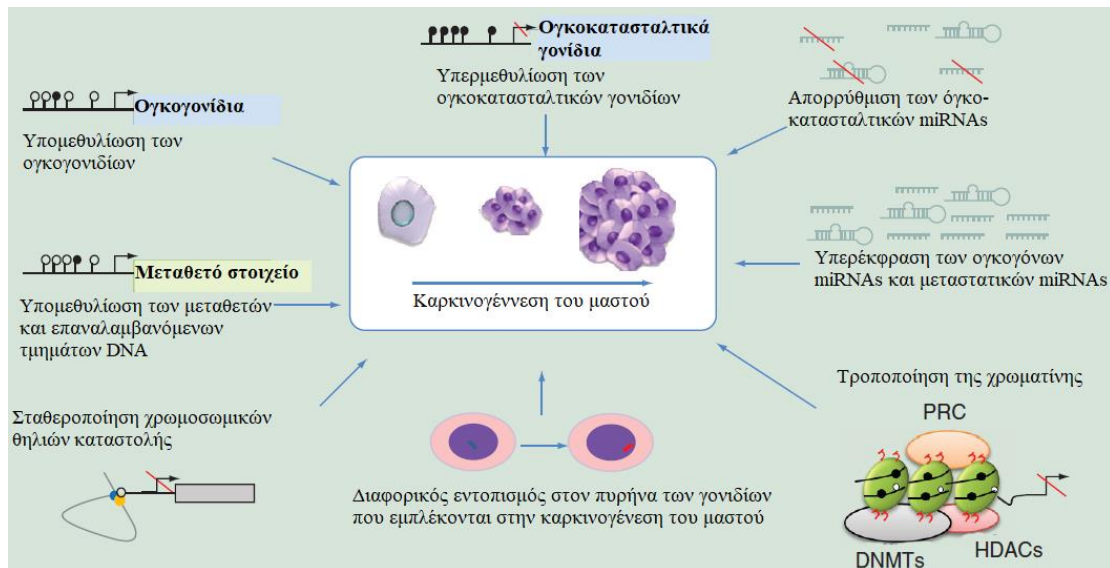


Σχήμα 4.3. Το σχήμα απεικονίζει τους βασικούς βιοδείκτες που σχετίζονται με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του καρκίνου όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού²¹⁰.

Επίσης οι ενδογενείς ορμόνες έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν βασικούς μη γενετικούς παράγοντες που αποτελούν τη βάση της καρκινογένεσης του μαστού. Το 2016 η Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (ASCO)^{212,213} εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαχείριση του καρκίνου του μαστού και αυτές περιλαμβάνουν την χρήση δυο ορμονικών υποδοχέων των ER και PR αλλά και του HER2 ως δείκτες για τη λήψη κλινικών αποφάσεων. Εκτός από τη χρήση τους ως προγνωστικών δεικτών για τη θεραπεία με αντιοιστρογόνα ή αντι-HER2, χρησιμοποιούνται επίσης ως προγνωστικοί δείκτες για νέους αναστολείς mTOR και αναστολείς CDK4/6^{210,214,215}.

4.5. Επιγενετική του καρκίνου του μαστού

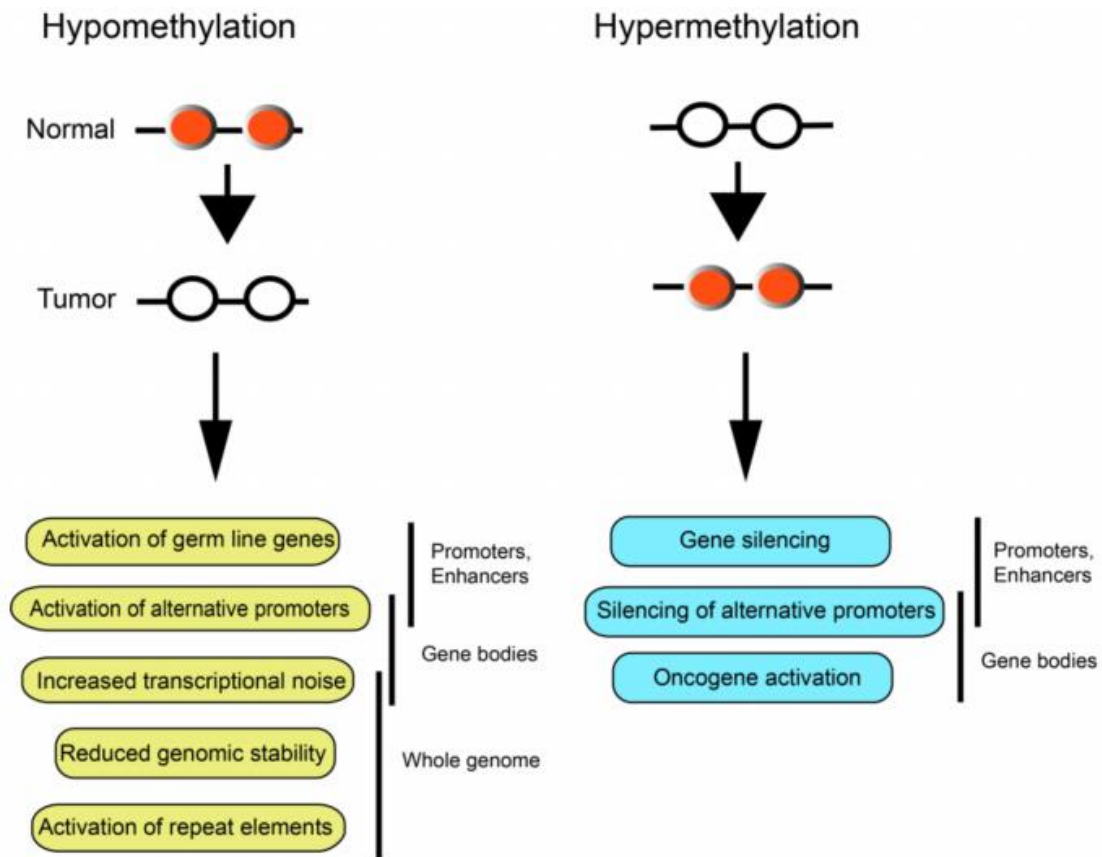
Οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν αναδειχθεί ως θεμελιώδεις παράγοντες στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού^{216,217}. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της καρκινογένεσης, οι μεταβολές στη δομή της χρωματίνης μέσω της χημικής τροποποίησης του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA, συμπεριλαμβανομένων των ιστονών, ως αποτέλεσμα των γενετικών αλλοιώσεων ή των περιβαλλοντικών επιδράσεων επηρεάζουν την κυτταρική πλαστικότητα και ευνοούν τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων με αποτέλεσμα την απόκτηση ανεξέλεγκτων ιδιοτήτων. Σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου, επιπρόσθετες επιγενετικές αλλαγές, μαζί με τις νέες μεταλλάξεις και τα σήματα από το μικροπεριβάλλον, ρυθμίζουν φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων και επηρεάζουν τη μεταστατική τάση του όγκου²¹⁸⁻²²¹. Πιο πρόσφατα, πέρα από τους κλασικούς επιγενετικούς μηχανισμούς, δίδεται όλο και περισσότερο έμφαση στον ρόλο τους ως επιγενετικοί τροποποιητές στα μη κωδικά RNAs (ncRNAs), ειδικά στα miRNAs και στα lncRNAs²²². Πράγματι, ενώ έχει αποδειχθεί ότι παρόμοια με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα ncRNAs είναι ευαίσθητα στην επιγενετική ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο, ρυθμίζουν με τη σειρά τους την γονιδιακή έκφραση μέσω της δράσης τους και/ή από τις αλληλεπιδράσεις τους με το DNA και/ή τις πρωτεΐνες. Αυτό επιτρέπει στα ncRNAs να επηρεάσουν αρκετά γονίδια ταυτόχρονα, επομένως δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η απορρύθμιση των ncRNAs στον καρκίνο επηρεάζει κάθε βήμα της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου μέχρι την μετάσταση σε μακρινά όργανα. Επομένως οι αναλύσεις σε επίπεδο επιγονιδιώματος μπορούν να προσφέρουν την ευκαιρία να εντοπιστούν νέα χαρακτηριστικά του καρκίνου και να συμβάλλουν στην βελτίωση της πρόγνωσης του καρκίνου και στην ανάπτυξη των εξατομικευμένων θεραπειών.



Σχήμα 4.4. Επιγενετικές τροποποιήσεις που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του μαστού²²³.

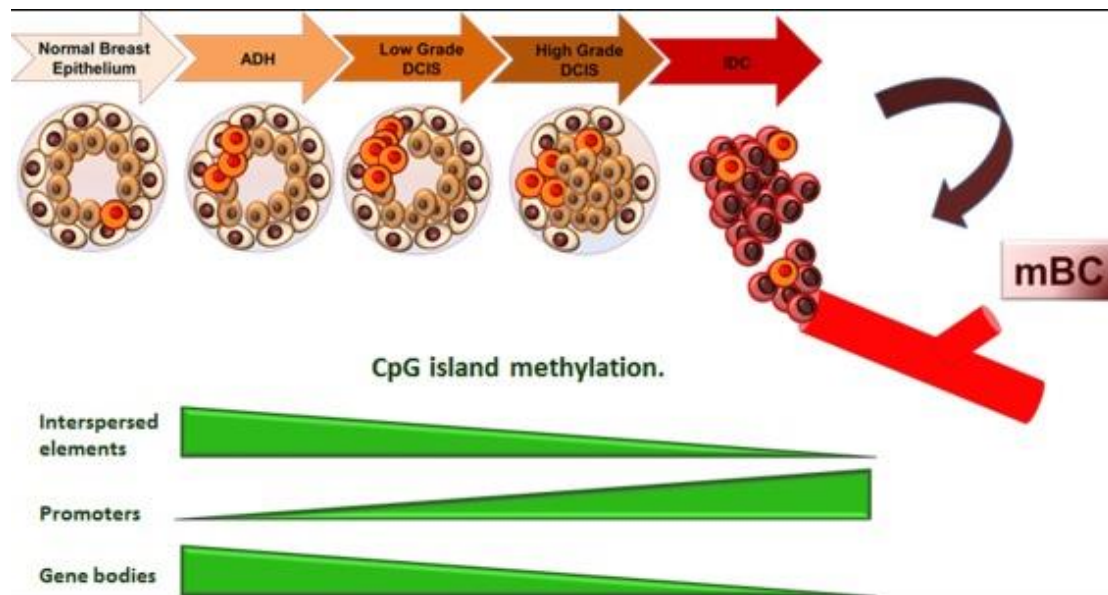
4.5.1. DNA μεθυλίωση

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων και ιδιαίτερα εκείνων που βρίσκονται στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων προκαλούν μεταγραφική σίγαση του γονιδίου. Σε πολλούς τύπους καρκίνου οι υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχουν βρεθεί να είναι υπερμεθυλιωμένοι. Αντίστοιχα η υπομεθυλίωση των φυσιολογικά μεθυλιωμένων υποκινητών των ογκογονιδίων οδηγεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου το οποίο στην συνέχεια μεταγράφεται. Επομένως η κατάσταση μεθυλίωσης των CpG νησίδων σχετίζεται με την μεταγραφική δραστηριότητα²²⁴.



Σχήμα 4.5. Υπερμεθυλίωση και υπομεθυλίωση στον καρκίνο²¹⁶.

Στον καρκίνο του μαστού, έχει αναφερθεί υπερμεθυλίωση του υποκινητή σε περισσότερα από 100 γονίδια²²⁵. Πολλά από αυτά τα γονίδια παίζουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (π.χ. *CCND2*, *CDKN2A*), στην επιδιόρθωση του DNA (π.χ. *BRCA1*, *GSTP1*), στην απόπτωση (π.χ. *BCL2*, *DAPK*), στην διήθηση και τη μετάσταση (*RASSF1A*, *RARβ*, *TWIST*, *HIN1*), ρύθμιση της μεταγραφής (π.χ. *HOXA5*), στην κυτταρική προσκόλληση (π.χ. *CDH1*) και στην κυτταρική σηματοδότηση με μεσολάβηση ορμονών (*ERα*, *ERβ* και *THRβ*).



Σχήμα 4.6. Αύξηση της μεθυλίωσης των υποκινητών κατά την εξέλιξη του όγκου²¹⁶.

Επιπλέον, η υπομεθυλίωση περιοχών του γονιδιώματος παρατηρείται επίσης συχνά σε όγκους του μαστού και συμβαίνει περισσότερο σε περιοχές του γονιδιώματος που έχουμε διπλασιασμούς τμημάτων²²⁶. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έδειξαν σε πρωτοπαθής όγκους συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού ότι και τα γονίδια *IL10*²²⁷, *MDR1*²²⁸, *FEN1*²²⁹, *NAT1*²³⁰, *CDH3*²³¹, ουροκινάση²³², συνουκλεΐνη²³³, *JAGGED1* και *NOTCH1*²³⁴ είναι επίσης υπομεθυλιωμένα. Ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών αποδεικνύουν ότι ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός των κυττάρων εκκίνησης του καρκίνου του μαστού αντιπροσωπεύει ένα βασικό βήμα στη καρκινογένεση του μαστού και στην κλωνική εξέλιξη που τελικά οδηγεί στην παθολογική και κλινική ετερογένεια των όγκων του μαστού^{217,235}.

4.5.2. Βιοδείκτες DNA μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένα συνεχώς εξελισσόμενο πεδίο έρευνας για την ανακάλυψη βιοδεικτών σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου και ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που έχουν βρεθεί αδρανοποιημένα στον καρκίνο του μαστού λόγω της μεθυλίωσης του υποκινητή. Αυτά τα γονίδια όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ρυθμίζουν και ελέγχουν πολλές διαφορετικές βιολογικές διεργασίες του κυττάρου²³⁶⁻²⁴⁰. Επιπλέον, πολλά από αυτά χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία προφίλ μεθυλίωσης όγκων του μαστού που σχετίζονται με την πρόγνωση και για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανταπόκριση στην θεραπεία^{241,242}. Λόγω της εκθετικής αύξησης των γονιδίων που

είναι μεθυλιωμένα στον καρκίνο του μαστού, ένας επιλεγμένος κατάλογος των πιο συχνά μεθυλιωμένων παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα. Αυτά τα γονίδια είναι κυρίως ογκοκατασταλτικά και άλλα ογκογονίδια. Έχουν βρεθεί ανεπιθύμητες υπερμεθυλώσεις σε πρωτογενείς όγκους ασθενών με κληρονομικούς καρκίνους (π.χ. CDH1, p16INK4A / CDKN2A, RB, BRCA1)²⁴³⁻²⁴⁶. Η χρήση εύκολα προσβάσιμων σωματικών υγρών όπως ο ορός ή το πλάσμα, και η ταχεία και συνεχής ανάπτυξη του τομέα της υγρής βιοψίας έχουν συμβάλει σημαντικά στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού²⁴⁷⁻²⁵⁰. Η βασική αρχή σε αυτό το διαγνωστικό σύστημα για την πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού βασίζεται στην απόδειξη ότι υπάρχει ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA) στην κυκλοφορία του αίματος το οποίο απελευθερώνεται από πρωτοπαθής και μεταστατικούς όγκους λόγω νέκρωσης ή απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων²⁵¹. Πράγματι, αρκετοί βιοδείκτες που έχουν ήδη περιγραφεί ως μεθυλιωμένοι σε όγκους του μαστού έχουν αξιολογηθεί μόνο ή σε συνδυασμό με τον ορό. Παρ' όλα αυτά, παρόλο που έχουν αναφερθεί αρκετοί δυνητικοί βιοδείκτες μεθυλίωσης του DNA και ο αριθμός των ερευνητικών ομάδων που εργάζονται σε αυτόν τον τομέα αναπτύσσεται εκθετικά, έως σήμερα κανένας από αυτούς τους βιοδείκτες δεν έχει φτάσει στην κλινική πράξη²⁵⁰. Η μεθυλίωση του DNA στον καρκίνο του μαστού επηρεάζει πολύπλοκα δίκτυα γονιδίων, αντί για μεμονωμένα γονίδια, επηρεάζοντας διαφορετικές βιολογικές διεργασίες²³⁷. Ένα παράδειγμα γονιδιακής απορρύθμισης είναι στην οδό φωσφατιδυλνινοσιτόλης3κινάσης (PI3K). Οι γονιδιακές μεταλλάξεις των συστατικών αυτής της οδού εμφανίζονται σε σχεδόν 70% των καρκίνων του μαστού²⁵². Η οδός PI3K είναι σημαντική για τον έλεγχο αρκετών φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών που είναι επίσης κρίσιμες για την ογκογένεση, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης, της επιβίωσης και της κινητικότητας. Μια από αυτές τις λειτουργίες είναι η αυτοφαγία, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στην απόπτωση και στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης²⁵³. Σε μερικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το PIK3C3 είναι υπερμεθυλιωμένο σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και η έκτοπη (aberrant) αναστολή του PIK3C3 καταστέλλει τη σωστή αυτοφαγία των ιστών του μαστού που προκαλούν την ογκογένεση²⁵⁴. Η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA μπορεί να επηρεάσει τις κανονικές κυτταρικές οδούς και τη ρύθμιση προκαλώντας διαφορετικούς μηχανισμούς ογκογένεσης. Επιπλέον, η μεθυλίωση εμπλέκεται στην επιθηλίο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Αυτή η μετάβαση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για τα κύτταρα

του όγκου του μαστού προκειμένου αυτά να καταφέρουν εισβάλλουν στους περιβάλλοντες ιστούς στο και να παράγουν δευτερογενείς όγκους και μεταστάσεις. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι και στον καρκίνο του μαστού το 90% των θανάτων από συμπαγείς όγκους είναι το αποτέλεσμα των μεταστάσεων και όχι των πρωτοπαθών όγκων²⁵⁵. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν ένα υψηλό επίπεδο πλαστικότητας, ένα σημαντικό παράγοντα στην μετάσταση του καρκίνου. Με την βοήθεια της EMT τα καρκινικά κύτταρα του μαστού καταφέρνουν να αποκολληθούν από τον όγκο και να αποκτήσουν μεσεγχυματικό φαινότυπο ο οποίος θα τα βοηθήσει να διαχυθούν στο αγγειακό σύστημα και να πάνε σε απομακρυσμένα όργανα στην συνέχεια η²⁵⁶ μεσεγχυματικό-επιθηλιακή μετάβαση (MET), θα τα βοηθήσει στο να αποικίσουν σε μακρινά όργανα και στην ανάπτυξη νέων απομακρυσμένων μεταστάσεων^{257,258}. Ένας συνδυασμός γενετικών και επιγενετικών απορρυθμίσεων οδηγεί στην ενεργοποίηση των διαδικασιών EMT και MET στα νεοπλασματικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην έναρξη των μεταστατικών διεργασιών. Η απορρύθμιση επιλεγμένων κληρονομικών επιγενετικών μοτίβων αναστέλλει και ενεργοποιεί διάφορους παράγοντες που τελικά θα εξελιχθούν σε όγκους²⁵⁹. Ένα άλλο πολύ μελετημένο παράδειγμα είναι η απώλεια της έκφρασης ER, ο οποίος είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού²⁶⁰. Η απώλεια της έκφρασης του ER σχετίζεται με κακή πρόγνωση των όγκων του μαστού και η κύρια αιτία της χαμηλής έκφρασης και της απορρύθμισης του ER, η αύξηση της επιθετικότητας και ο πολλαπλασιασμός του καρκίνου του μαστού, είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του ESR1^{236,239,261,262}.

Πίνακας 4.3. Γονίδια, Λειτουργία και κατάσταση μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού²³⁶.

Γονίδιο	Περιγραφή	Λειτουργία	Κατάσταση μεθυλίωσης
<i>CDH13</i>	Cadherin 13	κυτταρική διήθηση/μετάσταση	Υπερμεθυλίωση
<i>CST6</i>	Cystatin E/M		Υπερμεθυλίωση
<i>SYK</i>	Spleen tyrosine kinase		Υπερμεθυλίωση

<i>BCSG1</i>	Breast cancer-specific gene 1 protein		Υπομεθυλίωση
<i>CAVI</i>	Caveolin 1		Υπομεθυλίωση
<i>CDHI</i>	Cadherin 1		Υπομεθυλίωση
<i>UPA</i>	Plasminogen activator, urokinase		Υπομεθυλίωση
<i>CDH3</i>	Cadherin 3		Υπομεθυλίωση
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1	Επιδιόρθωση του DNA	Υπερμεθυλίωση
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase		Υπερμεθυλίωση
<i>MLH1</i>	MutL Homolog1		Υπερμεθυλίωση
<i>RAD9</i>	RAD9 homolog A (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)		Υπερμεθυλίωση
<i>AK5</i>	Adenylate kinase 5	Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	Υπερμεθυλίωση
<i>SFN</i>	Stratifin		Υπερμεθυλίωση
<i>FOX2A</i>			Υπερμεθυλίωση
<i>RAR</i>	Retinoic acid receptor		Υπερμεθυλίωση
<i>CCND2</i>	Cyclin D2		Υπερμεθυλίωση
<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3		Υπερμεθυλίωση
<i>ER</i>	Estrogen receptor		Υπερμεθυλίωση

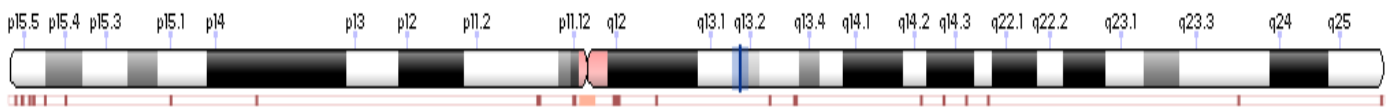
<i>SFRP1</i>	Secreted frizzles-related protein 1		Υπερμεθυλίωση
<i>RASSF1A</i>	RAS-association domain family member 1		Υπερμεθυλίωση
<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C		Υπερμεθυλίωση
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A		Υπερμεθυλίωση
<i>WIF1</i>	WNT inhibitor factor 1		Υπερμεθυλίωση
<i>PR</i>	Progesterone receptor		Υπερμεθυλίωση
<i>WRN</i>	Werner syndrome. RecQ helicase-like		Υπερμεθυλίωση
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	Απόπτωση	Υπερμεθυλίωση
<i>BCL2</i>	B cell CL/lymphoma 2		Υπερμεθυλίωση
<i>DAPK</i>	Death-associated protein kinase		Υπερμεθυλίωση
<i>DCC</i>	DCC netrin 1 receptor— Deleted in colorectal carcinoma		Υπερμεθυλίωση
<i>HIC1</i>	Υπερμεθυλίωση methylated in cancer 1		Υπερμεθυλίωση
<i>HOXA5</i>	Homeobox A5		Υπερμεθυλίωση
<i>TMS1</i>			Υπερμεθυλίωση

<i>TWIST</i>	Twist family bHLH transcription factor 1		Υπερμεθυλίωση
<i>LDLRAP1</i>	Low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1	Κυτταρική απόπτωση	Υπερμεθυλίωση
<i>GPC3</i>	Glypican 3		Υπερμεθυλίωση
<i>HOXD11</i>	Homeobox D11		Υπερμεθυλίωση
<i>LAMA3</i>	Laminin, alpha 3		Υπερμεθυλίωση
<i>LAMB3</i>	Laminin, beta 3		Υπερμεθυλίωση
<i>ROBO1</i>	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (<i>Drosophila</i>)		Υπερμεθυλίωση
<i>LAMC2</i>	Laminin, gamma 2		Υπερμεθυλίωση

4.5.3. Γονίδια υπερμεθυλωμένα στον καρκίνο του μαστού

4.5.3.1. *CST6*

Η κυστατίνη Μ ή η Ε/Μ (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CST6*), είναι ένας ενδογενής αναστολέας κυστεΐνοπρωτεασών^{248,263}. Η κυστατίνη Μ ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά και κλωνοποιήθηκε από τους Sotiropoulou et al. και από έρευνες επιβεβαιώθηκε η λειτουργία της ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο²⁶⁴. Αργότερα, η ίδια πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε ανεξάρτητα από εμβρυϊκούς πνευμονικούς ινοβλάστες και ονομάστηκε Cystatin E²⁶⁵. Η κυστατίνη Ε/Μ είναι μια χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη και παρουσιάζει ομολογία 27-32% με άλλες κυστατίνες. Η κυστατίνη Μ έχει προσδιοριστεί ότι βρίσκεται στην περιοχή 11q13.1 του χρωμοσώματος²⁶⁶, η οποία αποτελεί θέση απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH) σε διάφορους τύπους καρκίνου και πιστεύεται ότι φιλοξενεί ογκοκατασταλτικά γονίδια.



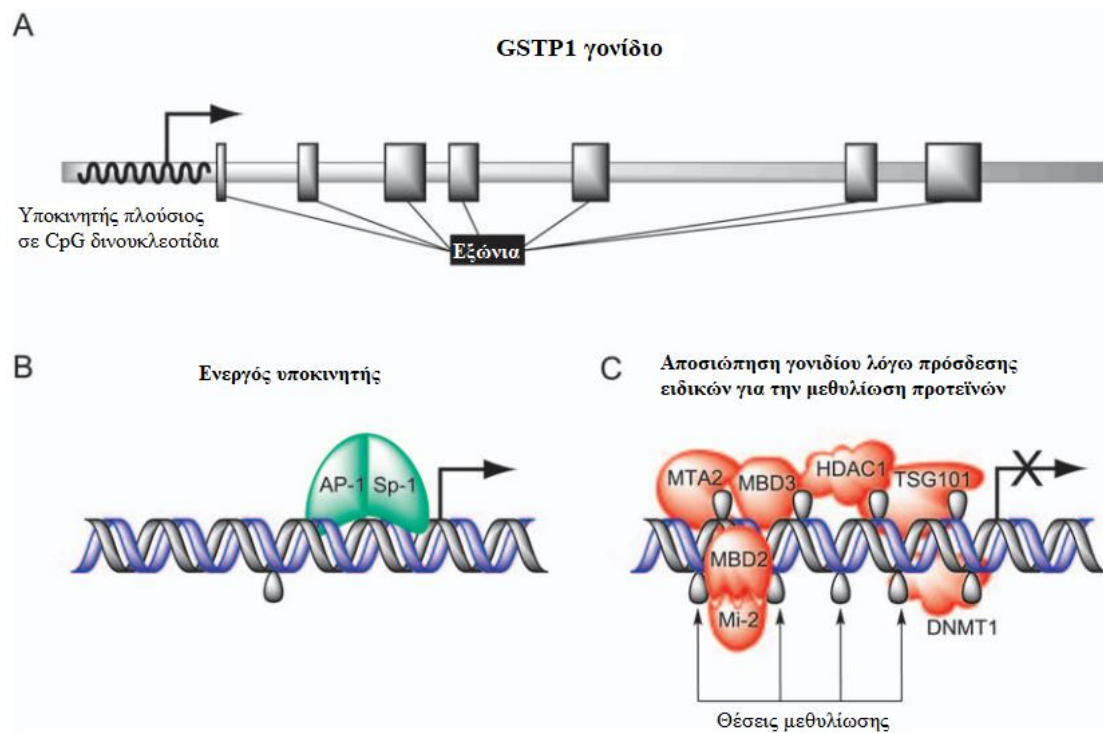
Σχήμα 4.7. Θέση του γονιδίου *CST6* στο χρωμόσωμα 11²⁷⁵.

Η κυστατίνη Μ έδειξε ότι αναστέλλει άμεσα τη δράση των καθεψινών Β, V και L^{267,268}. Επιπρόσθετα, η κυστατίνη Μ ελέγχει τη δράση του legumain, το οποίο είναι γνωστό ογκογονίδιο και δείκτης κακής πρόγνωσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού, αλλά βρέθηκε επίσης να είναι υπερεκφρασμένη στην πλειονότητα των ανθρώπινων συμπαγών όγκων^{269,270}. Έτσι, η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των πρωτεασών και των κυστατινών αναστολέων τους μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη όγκου, στην διήθηση και τη μετάσταση²⁷¹. Η ανάλυση του γονιδίου *CST6* παρουσιάζει μια ασυνήθιστη πυκνότητα CpG νησιών στον υποκινητή και το εξόνιο 1 του γονιδίου (περίπου 64 CpGs σε ένα τμήμα 507 bp)²⁷² και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αυτή η περιοχή είναι ένας στόχος για μεθυλίωση του DNA, η οποία καταλήγει σε απώλεια έκφρασης της κυστατίνης Μ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και σε καρκινώματα μαστού^{248,272-274}.

4.5.3.2. *GSTP1*

Οι γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες (GSTs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση καρκινογόνων και κυτταροτοξικών ουσιών καταλύοντας τη σύζευξη τους με γλουταθειόνη^{277,278}. Μεταξύ των ισοενζύμων, η π τάξη των GST (GSTπ) κωδικοποιείται από το γονίδιο *GSTP1* και εμπλέκεται σε μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων αποτοξίνωσης και μεταβολισμού, οι οποίες εμποδίζουν την βλάβη του γονιδιώματος στα κύτταρα και την έναρξη του καρκίνου^{279,280}. Το γονίδιο *GSTP1* είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και εντοπίζεται στην θέση 13 στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11q13)^{276,281}. Τα GSTs ένζυμα παρέχουν προστασία στα κύτταρα των θηλαστικών έναντι ηλεκτρονιόφιλων καρκινογόνων μεταβολιτών και δραστικών ειδών οξυγόνου²⁸³. Το *GSTP1* παίζει ρόλο στη ρύθμιση της οδού της πρωτεϊνικής κινάσης μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθώς είναι ένας αναστολέας της c-Jun NH2-τερματικής κινάσης 1 (cJun NH2-terminal kinase, JNK1), μιας κινάσης που εμπλέκεται στην απόκριση στο στρες, στην απόπτωση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^{284,285}. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή *GSTP1* συσχετίστηκε με την αποσιώπηση του γονιδίου στον καρκίνο του προστάτη²⁸⁶ και στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού²⁸⁷. Το *GSTP1* έχει βρεθεί

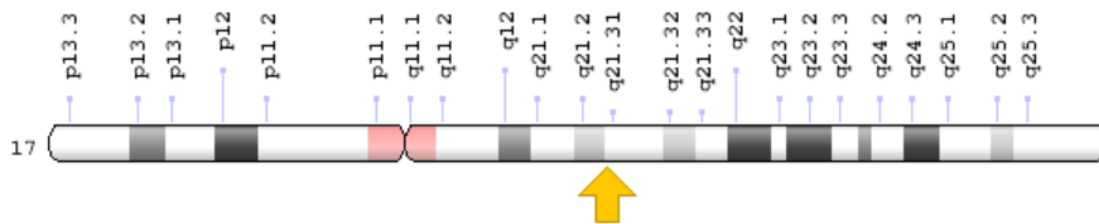
ότι συχνά μεθυλιώνεται στο καρκίνο του ήπατος, του μαστού, του νεφρού και του πνεύμονα^{282,288}. Η καταστολή της έκφρασης γονιδίου *GSTP1* που επάγεται από την υπερμεθυλίωση του υποκινητή έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού²⁸⁹ και αυξάνεται με την πρόοδο του όγκου^{290,291}. Πρόσφατα, η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων του *GSTP1* βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με το μέγεθος του όγκου, τη μετάσταση στους λεμφαδένες και στο ελεύθερο νόσου διάστημα στον καρκίνο του μαστού²⁹². Μελέτες έχουν διερευνήσει την κατάσταση μεθυλίωσης του *GSTP1* σε διηθητικό καρκίνο του μαστού²⁹⁴⁻²⁹⁸ και μια μελέτη αποκάλυψε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *GSTP1* είναι ένα πρώιμο συμβάν στον καρκίνο του μαστού²⁹⁹. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *GSTP1* έχει επίσης αναφερθεί ότι σχετίζεται με κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού^{293,295}.



Σχήμα 4.8. *GSTP1* γονίδιο, ενεργή μορφή και μη ενεργή μορφή λόγω μεθυλίωσης³⁰⁰.

4.5.3.3. *BRCA1*

Το ανθρώπινο γονίδιο *BRCA1* είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο βρίσκεται στον μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στην θέση 21.31 (17q21.31).



Σχήμα 4.9. *BRCA1* γονίδιο και θέση του στο χρωμόσωμα 17³⁰¹.

Το *BRCA1* εκφράζεται σε κύτταρα στο στήθος και σε άλλους ιστούς. Το *BRCA1* διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, στον έλεγχο των κρίσιμων σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της μεταγραφής. Η απώλεια της δραστηριότητας του *BRCA1* οδηγεί σε σχηματισμό όγκων σε συγκεκριμένους ιστούς-στόχους. Καθώς το *BRCA1* εμπλέκεται στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού³⁰⁵, το οποίο επιδιορθώνει τις ρογμές που δημιουργούνται στο δίκλωνο DNA, τα κύτταρα που στερούνται την πρωτεΐνη *BRCA1* τείνουν να επισκευάζουν την βλάβη του DNA με εναλλακτικούς μηχανισμούς επιρρεπείς σε σφάλματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων και μεγάλων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση³⁰⁵. Επομένως, τα θηλυκά που φέρουν γενετικές μεταλλάξεις του *BRCA1* διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης επιθετικών όγκων μαστού και ωοθηκών που χαρακτηρίζονται από κακή ιστολογική διαφοροποίηση, ανευπλοειδισμό και αρνητική έκφραση των ορμονικών υποδοχέων σε νεαρή ηλικία (<50)^{302,306}. Εκτιμάται ότι οι γυναίκες που φέρουν *BRCA1* μεταλλάξεις διατρέχουν 40-80% κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού και 30-40% κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών καθ' όλη την διάρκεια της ζωής^{303,307-313}. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένου και του μαστού, επειδή η υπερμεθυλίωση των CpG στην περιοχή του υποκινητή μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων³¹⁴⁻³²⁰. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *BRCA* γονιδίου λαμβάνει χώρα σχεδόν αποκλειστικά στο σποραδικό καρκίνο³⁰⁴ και μόνο σπάνια συμβαίνει σε ασθενείς με κληρονομική μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2*³²¹⁻³³¹. Αυτό θα μπορούσε να είναι πιθανώς κλινικά σημαντικό επειδή οι αναλύσεις μεθυλίωσης του υποκινητή θα μπορούσαν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως δοκιμασίες πρόβλεψης όταν υπάρχει υποψία κληρονομικό καρκίνο, αποκλείοντας την ανάγκη για γενετική ανάλυση μεταλλάξεων σε περιπτώσεις που υπάρχει υπερμεθυλίωση του υποκινητή³⁰³.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών των γονιδίων *GSTP1*, *BRCA1* και *CST6* στον καρκίνο του μαστού. Η μελέτη έγινε σε δείγματα καρκινικού ιστού από πρωτοπαθή όγκο, στο DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα καθώς και στο ελεύθερο καρκινικό DNA που έχει απομονωθεί από το πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* έχει πραγματοποιηθεί και παλαιότερα στο εργαστήριο μας σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του προστάτη και λόγω του ότι διαβάσαμε στην διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία ότι η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου σχετίζεται και με τον καρκίνο του μαστού, το μελετήσαμε σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Η γενετικές τροποποιήσεις του *BRCA1* γνωρίζουμε ότι παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού επομένως θελήσαμε να δούμε αν και οι επιγενετικές τροποποιήσεις (και συγκεκριμένα η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου) παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού. Για αυτό και μελετήσαμε την μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου, επίσης μελετήσαμε την κατάσταση μεθυλίωσης και σε δείγματα φυσιολογικών αιμοδοτών για να δούμε αν διαφοροποιείται η κατάσταση της μεθυλίωσης μεταξύ των υγιών και των ασθενών.

Όσον αφορά το γονίδιο *CST6* πραγματοποιήσαμε την συνέχιση μιας μελέτης η οποία είχε ξεκινήσει παλαιότερα στο εργαστήριο μας και για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας και τα προηγούμενα και τα τωρινά αποτελέσματα κατασκευάσαμε καμπύλες Kaplan-Meier για να μελετήσουμε την συμβολή της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή στην συνολική επιβίωση και στο ελεύθερο νόσου διάστημα σε δείγματα DNA που προέρχεται από ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Κλινικά δείγματα

Για την μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του γονιδίου *CST6* χρησιμοποιήθηκαν 24 δείγματα SB-converted DNA που προήλθαν από ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού οι οποίες δεν είχαν κάνει μετάσταση.

Για την μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* χρησιμοποιήθηκαν 82 δείγματα SB-converted DNA εκ των οποίων 24 ήταν δείγματα DNA που απομονώθηκαν από πλάσμα φυσιολογικών αιμοδοτών, 34 ήταν δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τα EpCAM⁺-CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και 24 ήταν δείγματα πρωτοπαθούς όγκου που ήταν μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPEs).

Για την μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* χρησιμοποιήθηκαν 53 δείγματα SB-converted DNA εκ των οποίων 14 ήταν δείγματα DNA που απομονώθηκαν από πλάσμα φυσιολογικών αιμοδοτών, 24 ήταν δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τα EpCAM⁺-CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και 15 ήταν δείγματα ctDNA ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα SB-converted DNA τα οποία είναι 100% μεθυλιωμένα.

Τα δείγματα παραλήφθηκαν από ασθενείς των ογκολογικών μονάδων των νοσοκομείων ΙΑΣΩ General-Metropolitan και Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο - Μαιευτήριο "Ελενα Βενιζέλου". Όλα τα δείγματα παραλήφθηκαν κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης των ασθενών.

6.2 Απομόνωση γενωμικού DNA

6.2.1. Από CTCs

Για την απομόνωση του DNA από CTCs που είναι θετικά στον επιθηλιακό δείκτη EpCAM (EpCAM⁺) χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Trizol-LS. Το αντιδραστήριο αυτό είναι μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη.

Κατά την διάρκεια της λύσης των κυττάρων του δείγματος το αντιδραστήριο Trizol διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ λύει τα κύτταρα και διαλύει τα κυτταρικά συστατικά. Η ισοθειοκυανική γουανιδίνη, η οποία είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας, συμβάλλει στη λύση των κυττάρων, βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA, αναστέλλοντας παράλληλα της ριβονουκλεάσες (RNάσες) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά την λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή επιτρέπει την απομόνωση μη κατακερματισμένου RNA. Η προσθήκη χλωροφορμίου ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση διαχωρίζει το διάλυμα σε μία υδατική φάση και σε μία οργανική φάση. Το RNA έχει την ιδιότητα να παραμένει αποκλειστικά στην υδατική φάση σε ένα διάλυμα που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη υπό την παρουσία μιας οργανικής φάσης από φαινόλη/χλωροφόρμιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA (50b-10Kb) βρίσκονται στην οργανική φάση, ενώ μεγαλύτερα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση. Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τα δείγματα ασθενών πραγματοποιήθηκε παλαιότερα από άλλα μέλη του εργαστηρίου.

6.2.2. Από πλάσμα ασθενών

Η απομόνωση του γενωμικού ctdNA από τα δείγματα πλάσματος των ασθενών έγινε με την χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ QIAamp DNA Micro (Qiagen, Germany) το οποίο έχει σχεδιαστεί για την απομόνωση και τον καθαρισμό gDNA από δείγματα μικρού όγκου, εκμεταλλευόμενο τις ιδιότητες πρόσδεσης σε μεμβράνη πυριτίου.

6.2.3. Από FFPE's

Η απομόνωση του DNA από ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, FFPE's) πραγματοποιήθηκε με το QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN®), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο κιτ χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA από τομές ιστών FFPE. Αρχικά η παραφίνη διαλυτοποιείται σε ξυλόλιο και απομακρύνεται από τους FFPE's. Ακολουθεί λύση του δείγματος με προσθήκη πρωτεϊνάσης 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 εκλύεται από τη μεμβράνη με το κατάλληλο διάλυμα έκλυσης.

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε από την διδάκτορα Σοφία Μαστοράκη παλαιότερα στο εργαστήριό μας.

6.3. Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητάς του, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του οργάνου Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Το όργανο αυτό είναι ένα φασματοφωτόμετρο με ευρύ φάσμα μέτρησης της απορρόφησης (220-750 nm), κατάλληλο για βιολογικά δείγματα καθώς 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). Έχει την δυνατότητα μέτρησης υψηλών τιμών απορρόφησης με αξιοπιστία. Δε χρειάζονται κυψελίδες, αφού το δείγμα συγκρατείται στη θέση μέτρησης μεταξύ των άκρων δύο οπτικών ινών μέσω επιφανειακής τάσης. Η μέτρηση διαρκεί 10s, το δείγμα μπορεί να επανακτηθεί, ενώ είναι γρήγορος και εύκολος ο καθαρισμός του οργάνου μεταξύ των μετρήσεων. Τέλος το όργανο έχει μικρό μέγεθος και μπορεί να εγκατασταθεί εύκολα σε οποιοδήποτε χώρο εργασίας.



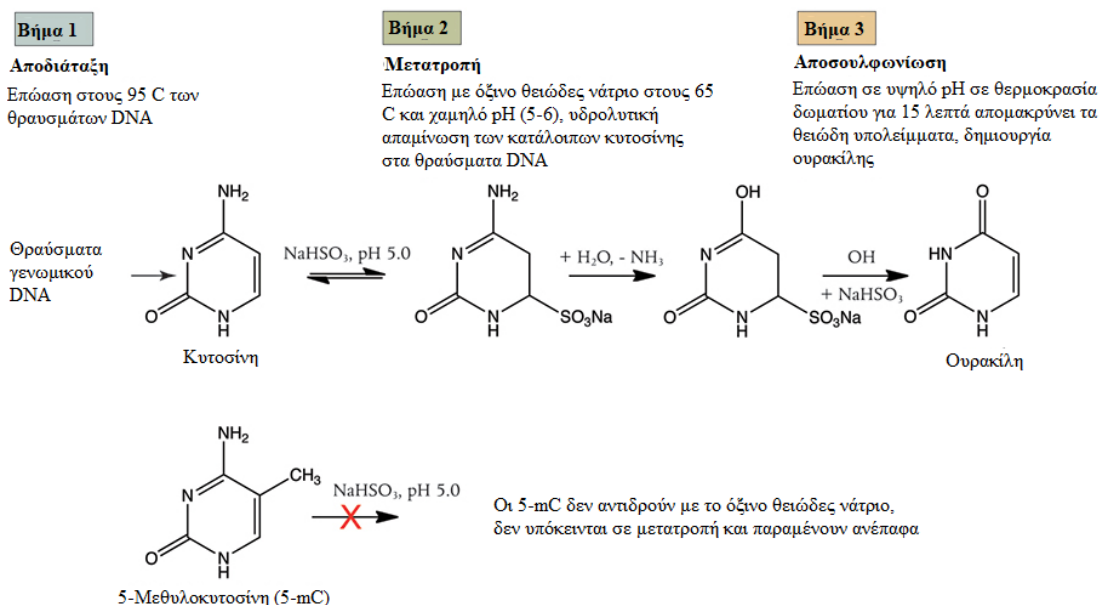
Σχήμα 6.1. Nanodrop-1000 Spectrophotometer.

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/μL.

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

Κατά την κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion) γίνεται μετατροπή όλων των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, με υδρολυτική απαμίνωση, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες δεν επηρεάζονται. Μετά τη χημική αυτή μετατροπή το DNA παύει να είναι δίκλωνο, γίνεται μονόκλωνο, καθώς οι δύο κλώνοι δεν είναι πλέον συμπληρωματικοί. Το τροποποιημένο DNA είναι πολύ πιο ευαίσθητο και ευπαθές σε σχέση με το μη τροποποιημένο, συνεπώς απαιτεί παραμονή σε εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία, μέχρι τη χρήση του. Η τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο πραγματοποιήθηκε με το EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp., USA).



Σχήμα 6.2. Διαδικασία μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη.

Στην συνέχεια με ενίσχυση μέσω ειδικής PCR για την ανίχνευση της μεθυλίωσης (Methylation specific PCR, MSP), οι ουρακίλες αντικαθίστανται από θυμίνες και οι μεθυλοκυτοσίνες από κυτοσίνες. Σε αυτή την διαδικασία είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι όλες οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες ακόμα και αυτές που δεν βρίσκονται σε CpG νησίδες μετατρέπονται σε ουρακίλες και εν συνέχεια σε θυμίνες.

6.5. Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων με real time PCR

Για την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, τα δείγματα, ο θετικός καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας του DNA SB-conversion υπόκεινται σε έλεγχο με real time PCR, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι, του χημικά τροποποιημένου DNA. Είναι προφανές ότι στα δείγματα και στους θετικούς μάρτυρες περιμένουμε την ανίχνευση τροποποιημένου DNA ικανού να ενισχυθεί, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν μηδενικό σήμα. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με εκκινητές που αναγνωρίζουν το μη μεθυλιωμένο γονίδιο ακτίνη (ACTB), αποκλειστικά σε χημικά τροποποιημένου DNA. Ο σχεδιασμός τους είχε επιτευχθεί από την ομάδα 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 130 bp.

Πίνακας 6.1. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών και ανιχνευτή για το γονίδιο ACTB.

	Αλληλουχία 5'-3'	Tm	PCR προϊόν
Πρόσθιος εκκινητής (F)	GGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG	56.9	130
Ανάστροφος εκκινητής (R)	CCAATAAAACCTACTCCTCCCT	56.6	
TaqMan ανιχνευτής	FAM - TGTGTTTGTATTGTGTGTTGGGTGG-BBQ	65.7	

Η χημική μετατροπή του DNA καθώς και ο έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την διδάκτορα Σοφία Μαστοράκη.

6.6. Real time Methylation Specific PCR

Η **Methylation Specific PCR (MSP)** αποτελεί μία παραλλαγή της PCR, όπου το δείγμα DNA που ενισχύεται έχει προηγουμένως μετατραπεί χημικά με τη διαδικασία του DNA

conversion. Η διάκριση μεταξύ μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου DNA βασίζεται στο σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών που προσδένονται ειδικά σε χημικά τροποποιημένο και μεθυλιωμένο DNA, έτσι ώστε να μην ενισχύεται καθόλου γενωμικό DNA που δεν έχει μετατραπεί ή DNA μη μεθυλιωμένο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει κάθε φορά. Συνεπώς, τα ζεύγη εκκινητών περιέχουν αρκετά CpG δινουκλεοτίδια, καθώς και ικανοποιητικό αριθμό βάσεων θυμίνης που έχουν προέλθει από χημικά τροποποιημένες κυτοσίνες.



Σχήμα 6.3. Βασική αρχή της MSP³³⁵.

Οι κατάλληλοι για MSP εκκινητές για τα γονίδια *CST6* και *GSTP1* είχαν ήδη σχεδιαστεί *in silico* από την ομάδα μας, στο λογισμικό Primer Premier 5.0 ενώ για το γονίδιο *BRCA1* χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές του Esteller et al 2000³³⁶. Η προετοιμασία της αντίδρασης πραγματοποιείται σε ξεχωριστό δωμάτιο όπου βρίσκονται ειδικοί θάλαμοι PCR, προς αποφυγή των επιμολύνσεων. Στους θαλάμους αυτούς ακτινοβολούνται με UV ακτινοβολία οι πιπέττες και όλα τα αναλώσιμα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία της αντίδρασης PCR. Επιπλέον για τον έλεγχο της επιμόλυνσης, σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, που περιλαμβάνει μόνο ποσότητα από το διάλυμα των αντιδραστηρίων, χωρίς DNA-στόχο. Η προσθήκη του DNA-στόχου δεν πραγματοποιείται στο δωμάτιο προετοιμασίας της PCR, αλλά σε ξεχωριστό χώρο όπου οι πιπέττες και τα αναλώσιμα επίσης ακτινοβολούνται με UV. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται 1 μ L DNA-στόχου.

6.6.1. Πειραματική πορεία για το γονίδιο *CST6*

Οι κατάλληλοι για την MSP εκκινητές για την μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *CST6* έχουν την ακόλουθη αλληλουχία. Το προϊόν της MSP αντίδρασης έχει μήκος 134bp.

Πίνακας 6.2. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών και ανιχνευτή για το γονίδιο *CST6*.

	Αλληλουχία 5'-3'	Tm	PCR προϊόν
Πρόσθιος εκκινητής (F)	TCGAGTTTCGTTTTAGTTTTAGGTC	59.1	134
Ανάστροφος εκκινητής (R)	CATAACCGTCAATACCGTCG	56.5	
TaqMan ανιχνευτής	FAM- TAGCGGGTAAAAGTTGCGCGGTCGTAAGTT- BBQ	75.5	

Για την ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *CST6* χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας. Ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία εργασίας:

1. Αφήνουμε να ξεπαγώσουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την MSP σε πραγματικό χρόνο (Promega, GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, Catalog number: M7405).
2. Στον ακόλουθο πίνακα έχουν υπολογιστεί οι όγκοι που χρειάζονται για την προετοιμασία του απαιτούμενου αριθμού αντιδράσεων και αναγράφονται και οι συγκεντρώσεις των συστατικών

Πίνακας 6.3. Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο *CST6*.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
DEPC-treated H ₂ O	3.95	
5X PCR buffer	2	1X
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0.2	200μM
BSA (bovine serum albumin) (10μg/μL)	0.15	0.15μg/μL
F (10μM)	0.3	0.3μM
R (10μM)	0.3	0.3μM
TaqMan probe (3μM)	1	0.3μM
Hot Start Polymerase	0.1	0.05U/μL
SB-converted DNA	1	
Τελικός όγκος	10.00	

3. Ήπια ανάδευση στο vortex και spin down.
4. Προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο (well) 9 μL από το μείγμα αντίδρασης ενίσχυσης.
5. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα SB-converted DNA και τα κάνουμε spin down.
6. Σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 1 μL από κάθε δείγμα converted DNA.
7. Σε κάθε αντίδραση MSP πραγματικού χρόνου προσθέτουμε ένα δείγμα θετικού ελέγχου το οποίο αποτελείται από αλληλουχία
8. Οι συνθήκες της ανάλυσης MSP πραγματικού χρόνου *CST6* είναι:

Πίνακας 6.4. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο *CST6*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2:00 min		
Αποδιάταξη	95°C	10s		45
Υβριδισμός	55°C	20s		
Ενίσχυση	72°C	20s	√	
Ψύξη	40°C	30s		

9. Όργανο: LightCycler 2.0 & 1.5

10. Ρυθμίσεις οργάνου: Fluorescence channel 530, Τύπος ανάλυσης: Απόλυτη ποσοτικοποίηση.

6.6.2. Πειραματική πορεία για το γονίδιο *GSTP1*

Οι κατάλληλοι για την MSP εκκινητές για την μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* έχουν την ακόλουθη αλληλουχία. Το προϊόν της MSP αντίδρασης έχει μήκος 189bp.

Πίνακας 6.5. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο *GSTP1*.

	Αλληλουχία 5'-3'	Tm	PCR προϊόν
Πρόσθιος εκκινητής (F)	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	65.3	189
Ανάστροφος εκκινητής (R)	AACCGCGCGTACTCACTAATAACG	64.9	

Για την ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας. Ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία εργασίας:

1. Αφήνουμε να ξεπαγώσουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την MSP σε πραγματικό χρόνο (Promega, GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, Catalog number: M7405).
2. Στον ακόλουθο πίνακα έχουν υπολογιστεί οι όγκοι που χρειάζονται για την προετοιμασία του απαιτούμενου αριθμού αντιδράσεων και αναγράφονται και οι συγκεντρώσεις των συστατικών.

Πίνακας 6.6 Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο *GSTP1*.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
DEPC-treated H ₂ O	3.55	
5X PCR buffer	2	1X
MgCl ₂ (25mM)	1.2	3mM
dNTPs (10mM)	0.2	200mM
BSA (bovine serum albumin) (10μg/μL)	0.15	0.15μg/μL
F (10μM)	0.4	0.4μM
R (10μM)	0.4	0.4μM
LC Green (10X)	1	1X
Hot Start Polymerase	0.1	0.05U/μL
SB-converted DNA	1	
Τελικός όγκος	10.00	

1. Ήπια ανάδευση στο vortex και spin down.

2. Προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο (well) 9 μL από το μείγμα αντίδρασης ενίσχυσης.
3. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα converted DNA και τα κάνουμε spin down.
4. Σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 1 μL από κάθε δείγμα converted DNA.
5. Σε κάθε αντίδραση MSP πραγματικού χρόνου προσθέτουμε ένα δείγμα θετικού ελέγχου το οποίο αποτελείται από αλληλουχία
6. Οι συνθήκες της ανάλυσης MSP πραγματικού χρόνου *GSTP1* είναι:

Πίνακας 6.7. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο *GSTP1*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3:00 min		
Αποδιάταξη	95°C	10s		45
Υβριδισμός	64°C	15s		
Ενίσχυση	72°C	20s	√	
Τήξη	55°C	20s		
	95°C	continuous		
	95°C	1:00 min		
Ψύξη	40°C	30s		

3. Όργανο: Cobas z480 (IVD Instrument. Roche Diagnostics)
4. Ρυθμίσεις οργάνου: Fluorescence channel 530, Τύπος ανάλυσης: Απόλυτη ποσοτικοποίηση και επακόλουθη ανάλυση καμπύλης τήξης.

6.6.3. Πειραματική πορεία για το γονίδιο *BRCA1*

Οι κατάλληλοι για την MSP εκκινητές για την μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* έχουν την ακόλουθη αλληλουχία. Το προϊόν της MSP αντίδρασης έχει μήκος 75bp.

Πίνακας 6.8. Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο *BRCA1*.

	Αλληλουχία 5'-3'	Tm	PCR προϊόν
Πρόσθιος εκκινητής (F)	5'- TCGTGGTAACGGAAAAGCGC -3'	63.5	75
Ανάστροφος εκκινητής (R)	5'- AAATCTCAACGAACTCACGCCG -3'	64.1	

Για την ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας. Ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία εργασίας:

1. Αφήνουμε να ξεπαγώσουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την MSP σε πραγματικό χρόνο (Promega, GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, Catalog number: M7405).
2. Στον ακόλουθο πίνακα έχουν υπολογιστεί οι όγκοι που χρειάζονται για την προετοιμασία του απαιτούμενου αριθμού αντιδράσεων και αναγράφονται και οι συγκεντρώσεις των συστατικών.

Πίνακας 6.9. Αντιδραστήρια, όγκοι και τελική συγκέντρωση των συστατικών της real time-MSP για το γονίδιο *BRCA1*.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
DEPC-treated H ₂ O	4	
5X PCR buffer	2	1X
MgCl ₂ (25mM)	1	2,5 mM
dNTPs (10mM)	0.25	200mM
BSA (bovine serum albumin) (10μg/μL)	0.15	0.15μg/μL
F (10μM)	0.25	0.4μM
R (10μM)	0.25	0.4μM
LC Green (10X)	1	1X
Hot Start Polymerase	0.1	0.05U/μL
SB-converted DNA	1	
Τελικός όγκος	10.00	

3. Ήπια ανάδευση στο vortex και spin down.
4. Προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο (well) 9 μL από το μείγμα αντίδρασης ενίσχυσης.
5. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα converted DNA και τα κάνουμε spin down.
6. Σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 1 μL από κάθε δείγμα converted DNA.
7. Σε κάθε αντίδραση MSP πραγματικού χρόνου προσθέτουμε ένα δείγμα θετικού ελέγχου το οποίο αποτελείται από αλληλουχία
8. Οι συνθήκες της ανάλυσης MSP πραγματικού χρόνου *BRCA1* είναι:

Πίνακας 6.10. Συνθήκες της real time-MSP για το γονίδιο *BRCA1*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2:00 min		
Αποδιάταξη	95°C	10s		45
Υβριδισμός	65°C	20s		
Ενίσχυση	72°C	20s	√	
Τήξη	55°C	20s		
	95°C	continuous		
	95°C	1:00 min		
Ψύξη	40°C	30s		

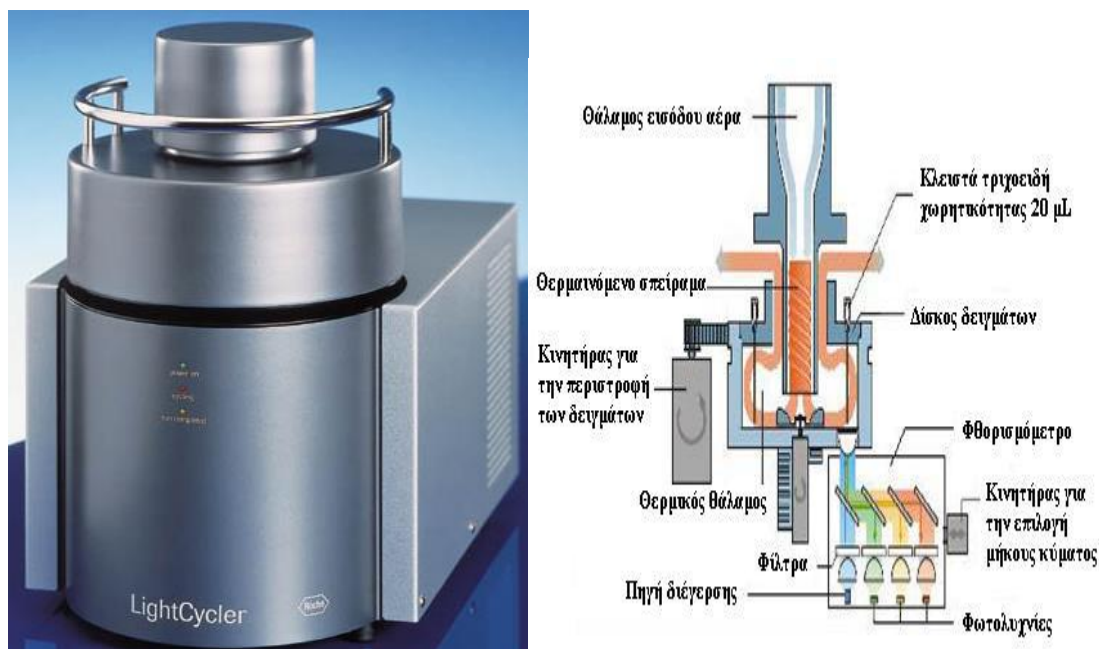
9. Όργανο: Cobas z480 (IVD Instrument. Roche Diagnostics)

10. Ρυθμίσεις οργάνου: Fluorescence channel 530, Τύπος ανάλυσης: Απόλυτη ποσοτικοποίηση και επακόλουθη ανάλυση καμπύλης τήξης.

6.7. Οργανολογία της MSP

Όλες οι αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο *CST6*, πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler® 2.0 & 1.5, 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 μ L, ωστόσο στην παρούσα εργασία ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι πάντα 10 μ L. Πριν την τοποθέτηση των τριχοειδών στο δίσκο, προηγείται φυγοκέντρηση διάρκειας λίγων 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). Στο εσωτερικό του οργάνου υπάρχει η πηγή διέγερσης, μία μπλε δίοδος με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm. Η ανίχνευση του

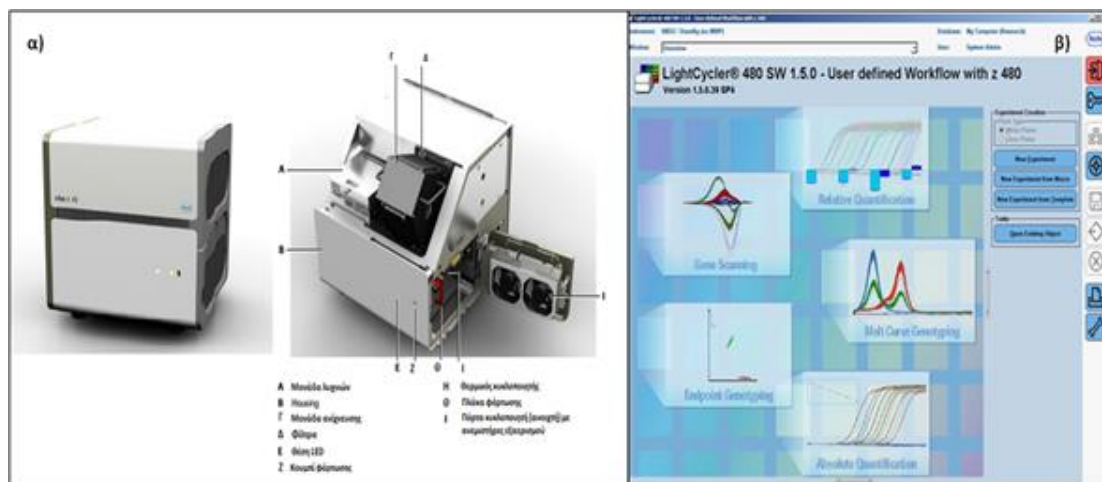
φθορισμού γίνεται με το φθορισμόμετρο που επίσης βρίσκεται μέσα στο όργανο, σε τρία μήκη κύματος: 530 nm (πράσινο), 645 nm (κίτρινο) και 710 nm (ερυθρό). Συνεπώς στο φθορισμόμετρο υπάρχουν τρία διαφορετικά φίλτρα και τρεις φωτολυχνίες. Η θέρμανση και η ψύξη στο θερμικό θάλαμο όπου βρίσκεται ο δίσκος με τα τριχοειδή, επιτυγχάνονται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα.



Σχήμα 6.4. LightCycler® 2.0 & 1.5.

Όλες οι αντιδράσεις PCR σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια *GSTP1* και *BRCA1*, πραγματοποιήθηκαν στο όργανο Cobas® 4800 της εταιρίας Roche. Το Cobas 4800 σύστημα αποτελείται από τον cobas z480 αναλυτή και το LightCycler 480 λογισμικό και επιτρέπει την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο έως και 96 δειγμάτων ταυτόχρονα. Το οπτικό σύστημα που διαθέτει, περιλαμβάνει μία υψηλής έντασης μπλε δίοδο (LED) με φάσμα εκπομπής από 390-710 nm και 5 φίλτρα εκπομπής (440, 465, 498, 533, 618nm), τα οποία σε συνδυασμό με τα 6 φίλτρα ανίχνευσης (488, 510, 580, 610, 640 και 660nm) διευκολύνουν την χρήση ποικίλων φθοριζουσών ουσιών και άλλων μορφών ανίχνευσης. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, η ταχεία και ακριβής αυξομείωση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται μέσω μπλοκ θερμικού κυκλοποιητή. Για την παρακολούθηση της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, οι πληροφορίες των σημάτων φθορισμού, θερμοκρασίας και κύκλου της αντίδρασης μεταφέρονται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Η τελική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με χρήση αυτόματων αλγορίθμων του λογισμικού,

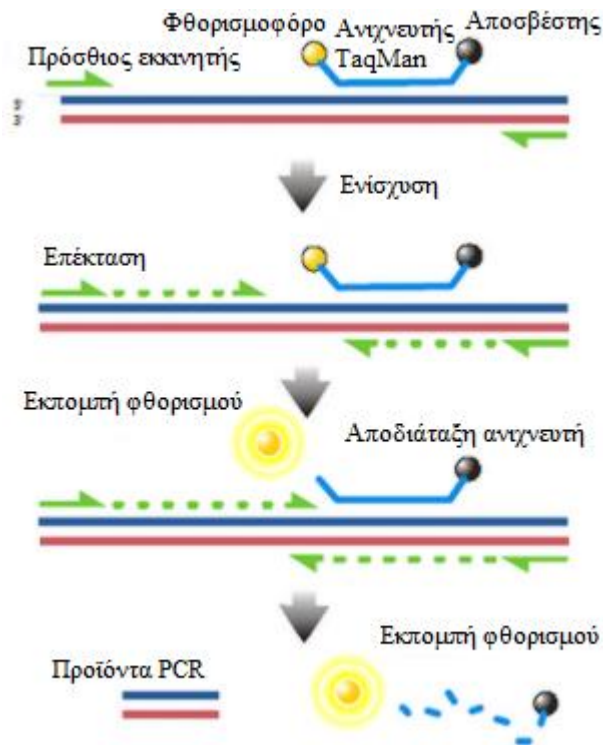
παρέχοντας την δυνατότητα για απόλυτη ποσοτικοποίηση της αντίδρασης και την ανάλυση καμπυλών τήξης.



Σχήμα 6.5. Cobas® 4800.

6.8. Συστήματα ανίχνευσης

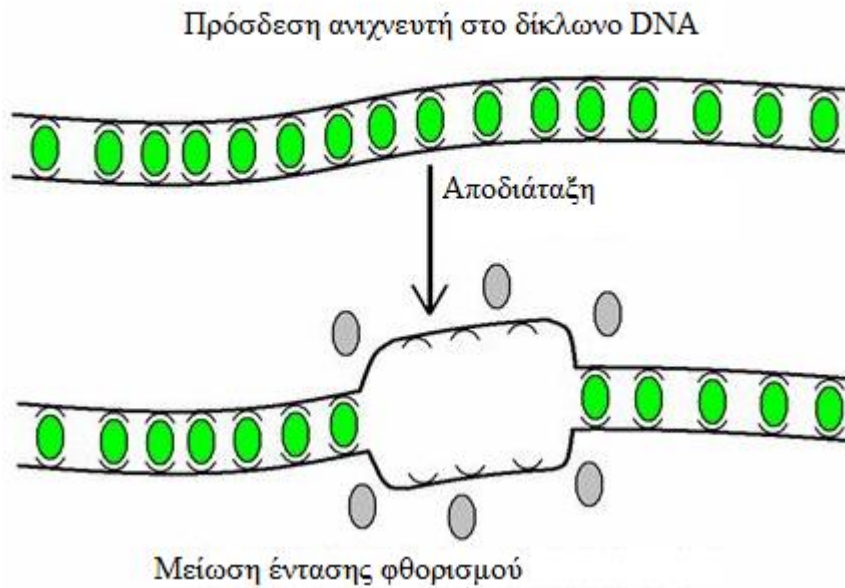
Για την ανίχνευση των PCR προϊόντων για το γονίδιο *CST6* έχει σχεδιασθεί από την ομάδα μας ένας ειδικός ανιχνευτής υδρόλυσης (probe) τύπου TaqMan®, που προσδένεται αποκλειστικά στο προϊόν και αναγνωρίζει τόσο τη μεθυλιωμένη όσο και τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία. Για το σχεδιασμό του χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό όπως και για τους εκκινητές. 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, η επέκταση του εκκινητή προκαλεί την υδρόλυση του ανιχνευτή και την απελευθέρωση του φθορισμοφόρου το οποίο δίνει σήμα.



Σχήμα 6.6. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος ανίχνευσης με ανιχνευτή υδρόλυσης τύπου TaqMan³³³.

Για την ανίχνευση των PCR προϊόντων για τα γονίδια *GSTP1* και *CST6* χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική LC-Green. Η χρωστική LC-Green παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 440-470 nm και μέγιστη εκπομπή στα 470-520 nm. Η χρωστική LC-Green έχει την ικανότητα να προσδένεται στην διπλή έλικα του DNA. Όταν εισέρχεται στο DNA και προσδένεται σε αυτό ο φθορισμός της αυξάνεται μέχρι 100 φορές. Η ποσότητα της χρωστικής που προσδένεται στο νεοσυντιθέμενο dsDNA, είναι ανάλογη του σήματος φθορισμού, δίνοντας έτσι την δυνατότητα όχι μόνο για ποιοτική αλλά και για ποσοτική ανάλυση. Την ένταση του φθορισμού την μετράμε στο τέλος της επέκτασης κάθε κύκλου καθώς τότε οι ανιχνευτές παρουσιάζουν την μέγιστη ένταση φθορισμού διότι ο taqman ανιχνευτής έχει υδρολυθεί και έχει απελευθερωθεί το φθορισμοφόρο και δίνει σήμα και το DNA βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή καθώς έχουν επιμηκυνθεί οι εκκινητές και έτσι μπορεί η LC-Green να προσδεθεί στο δίκλωνο DNA και να δώσει σήμα. Όταν το DNA είναι αποδιατάσσεται στην περίπτωση της LC-Green η ένταση του φθορισμού μειώνεται.

LC-Green



Σχήμα 6.7. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος ανίχνευσης με χρήση χρωστικής φθορισμού³³⁴.

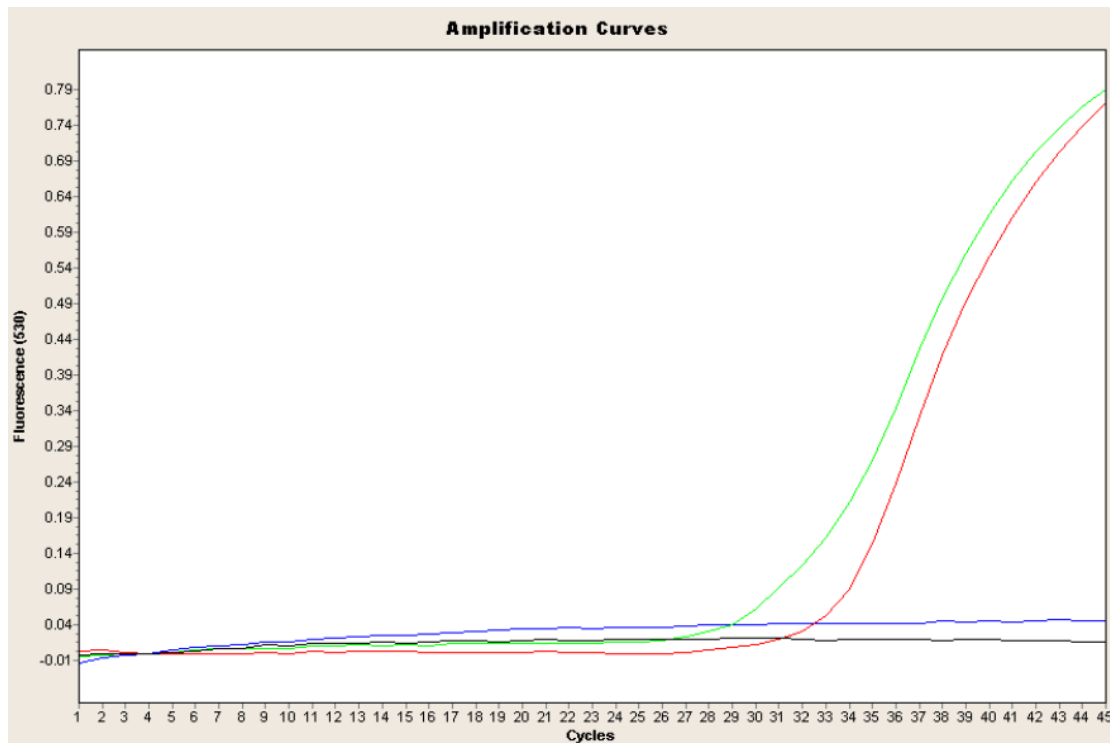
6.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής αλλά και αποτελέσματα από ανάλυση που έχουν πραγματοποιήσει παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου για την μελέτη της μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *CST6* με την ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού και την χρήση του SPSS 22.0 (IBM) κατασκευάσαμε καμπύλες Kaplan-Meyer ολικής επιβίωσης και για το ελεύθερο νόσου διάστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *CST6*

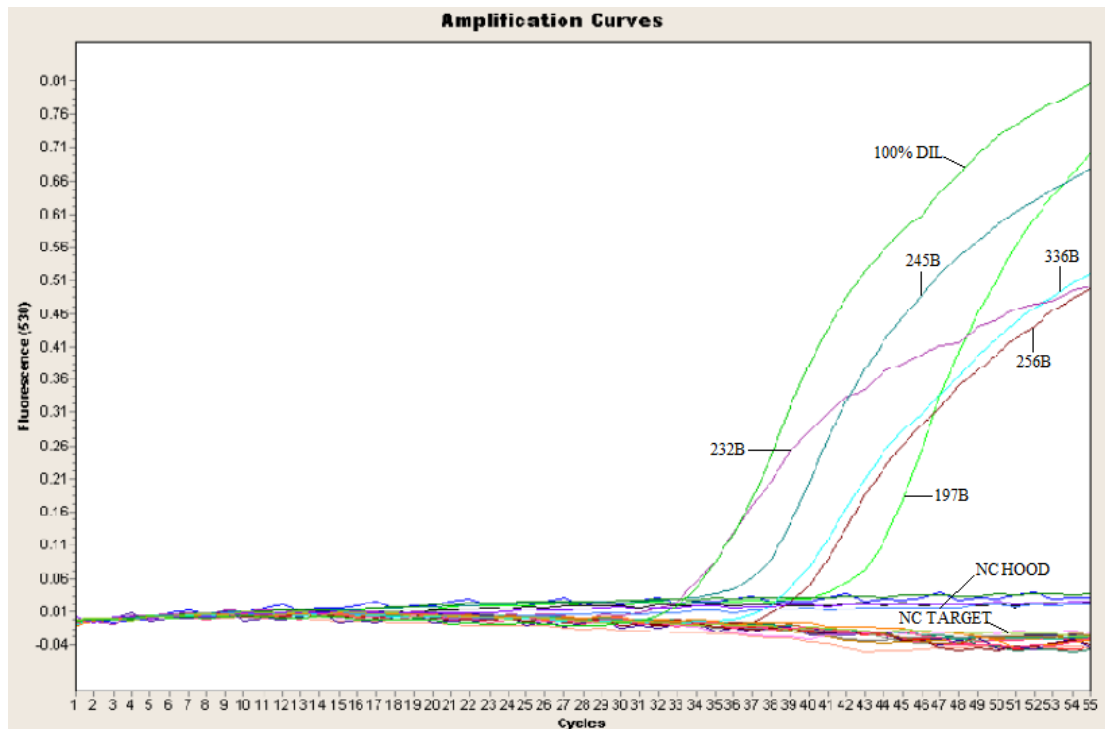
Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή των μεθόδων ανίχνευσης της μεθυλίωσης των γονιδίων στα κλινικά δείγματα αποτελεί η ενίσχυση του δείγματος 100% μεθυλιωμένου SB-converted DNA το οποίο χρησιμοποιούμε ως θετικό μάρτυρα.



Σχήμα 7.1. Καμπύλη ενίσχυσης. Παρατηρούμε ότι πραγματοποιείται ενίσχυση του 100% μεθυλιωμένου converted DNA και του 100% μεθυλιωμένου converted DNA αραιωμένο 1:20.

Πράγματι αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι πραγματοποιείται ενίσχυση του 100% μεθυλιωμένου converted DNA και του 100% μεθυλιωμένου converted DNA αραιωμένο 1:20 και επίσης δεν πραγματοποιείται ενίσχυση των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες. Από άλλα μέλη του εργαστηρίου έχει πραγματοποιηθεί παλαιότερα μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή σε δείγματα φυσιολογικών αιμοδοτών και βρέθηκε μεθυλίωση 2/49 (4,1%)³³⁷.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε την ανάλυση μεθυλίωσης των δειγμάτων και πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα.



Σχήμα 7.2. Καμπύλη ενίσχυσης των δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού για μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *CST6*. Ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιείται το 100% DIL και ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) το NC HOOD και NC TARGET.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης βλέπουμε ότι έχουμε ενίσχυση 5 δειγμάτων (6 δείγματα έχουν ενισχυθεί εκ των οποίων τα 5 είναι δείγματα ασθενών και το 1 ο θετικός μάρτυρας ο οποίος άρχισε να ενισχύεται στον 33,28 κύκλο). Επομένως παρατηρούμε ότι σε μερικές ασθενείς με καρκίνο του μαστού ο υποκινητής του γονιδίου *CST6* είναι μεθυλιωμένος. Το ποσοστό της μεθυλίωσης είναι 20,38% (5/24). Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας δεδομένα από ανάλυση των αντίστοιχων CTCs των ασθενών που πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου μας παλαιότερα με την ίδια μέθοδο υπολογίσαμε την συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7.1. Συμφωνία των δικών μου πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ ctDNA με τα αντίστοιχα CTCs.

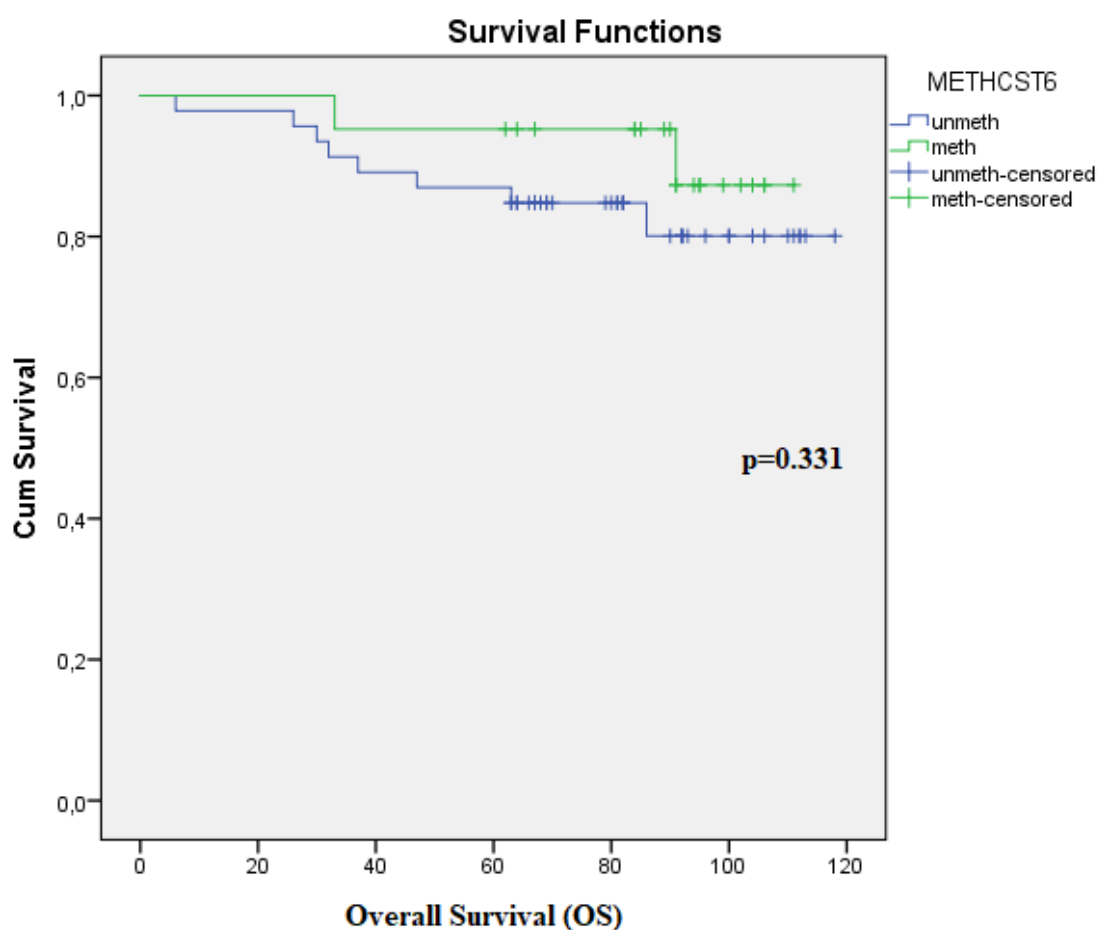
		ctDNA	
		+	-
CTCs	+	2	8
	-	2	10
Συμφωνία=12/22 (54,55%)			

Στην συνέχεια ενσωμάτωσα τα αποτελέσματα μου με τα υπόλοιπα πειραματικά αποτελέσματα που έχουν γίνει στο δικό μας εργαστήριο υπολόγισα την συμφωνία μεταξύ όλων των αποτελεσμάτων και κατασκευάσαμε τις καμπύλες Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση και το ελεύθερο νόσου διάστημα.

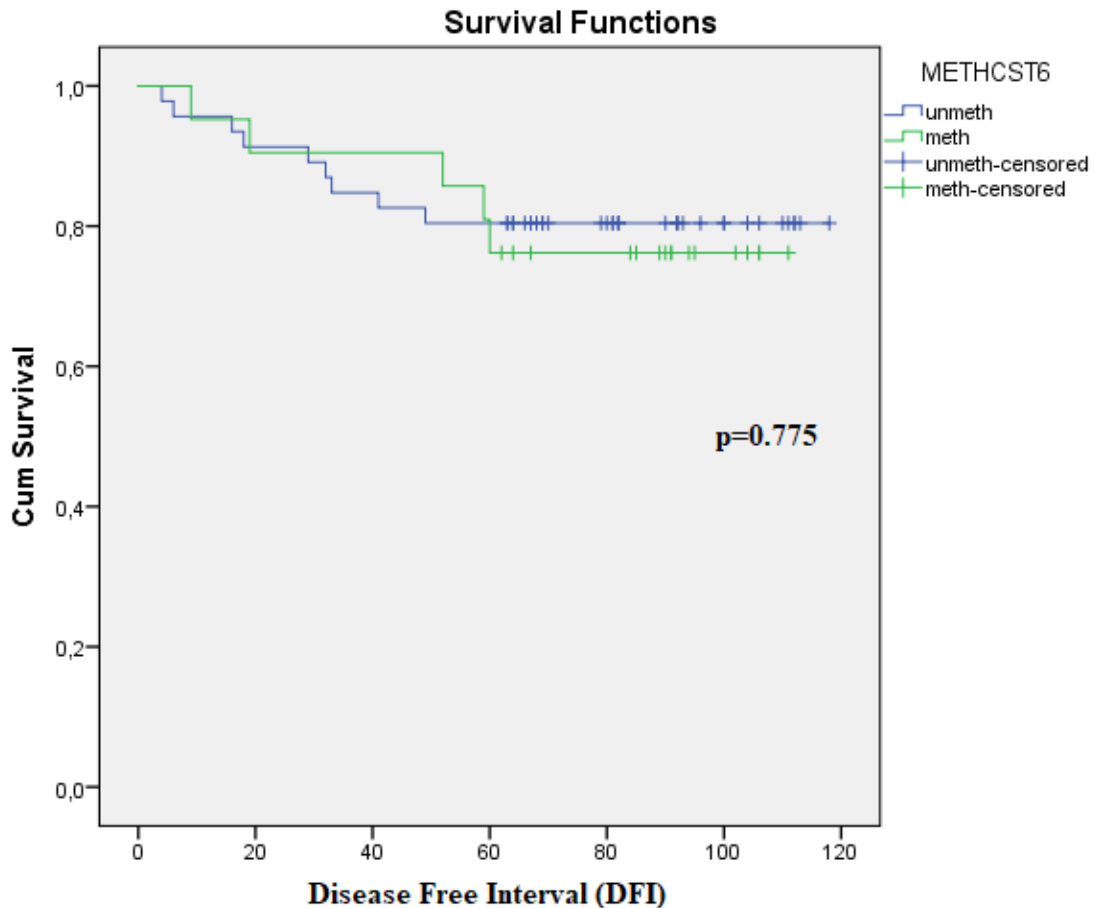
Πίνακας 7.21. Συμφωνία των πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ ctDNA με τα αντίστοιχα CTCs.

		ctDNA	
		+	-
CTCs	+	6	19
	-	24	47
Συμφωνία=53/96 (55,21%)			

Οι καμπύλες Kaplan-Meier φαίνονται παρακάτω:



Σχήμα 7.3. Καμπύλη Kaplan-Meier συνολική επιβίωση.

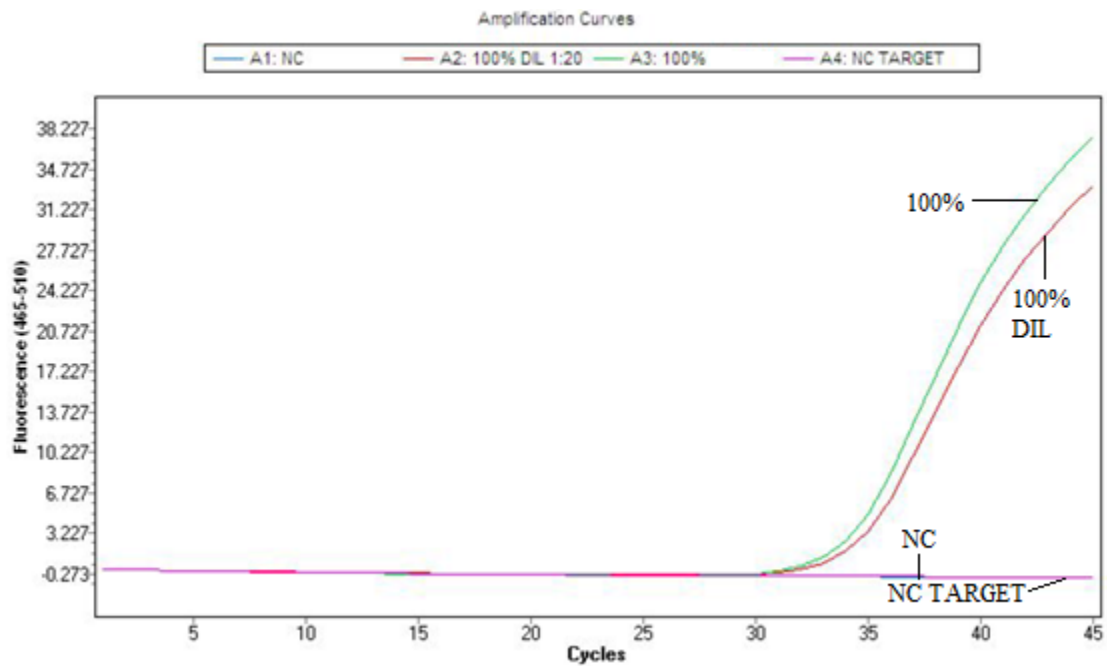


Σχήμα 7.4. Καμπύλη Kaplan-Meier για το ελεύθερο νόσου διάστημα.

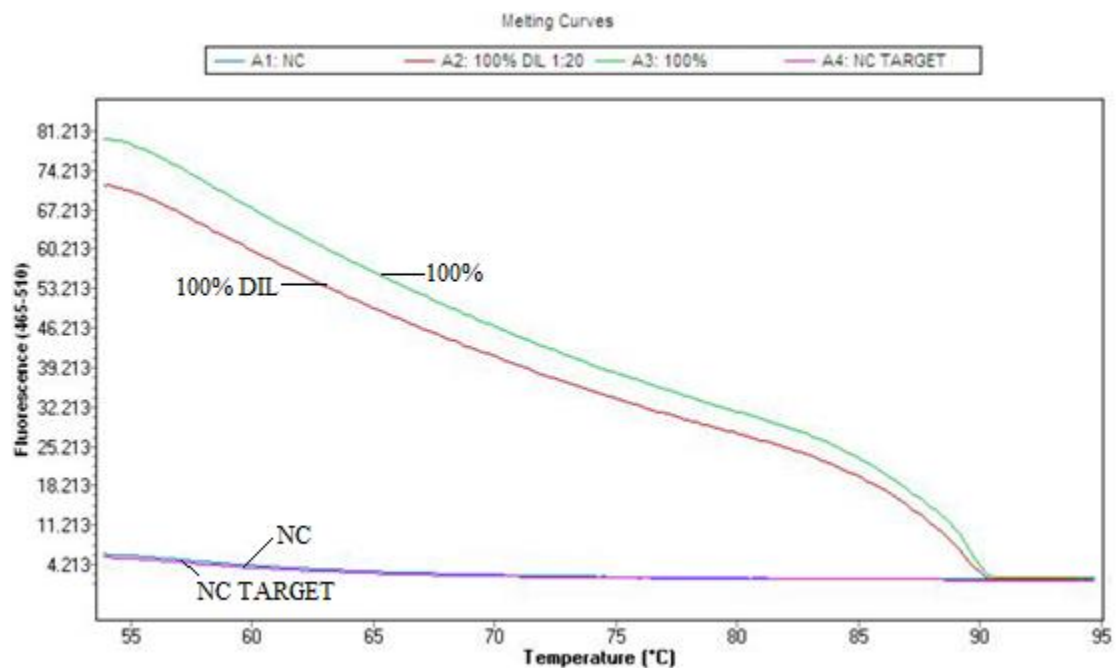
Για την κατασκευή των καμπυλών Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε ως τελικό σημείο η ημερομηνία 1/08/2017 διότι τότε έχουμε την τελευταία ενημέρωση της κατάστασης για την πλειοψηφία των ασθενών. Από τις καμπύλες Kaplan-Meier παρατηρούμε ότι υπάρχει μια στατιστικώς μη σημαντική διαφορά και ένας αρκετά καλός διαχωρισμός των καμπυλών μεταξύ των ασθενών ($p=0.331$) που έχουν μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου *CST6* στο ctDNA και των ασθενών που δεν έχουν μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου *CST6* στο ctDNA στην ολική επιβίωση. Και μία όχι και τόσο σημαντική διαφορά στην καμπύλη του ελεύθερου νόσου διάστημα ($p=0.775$).

7.2. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *GSTP1*

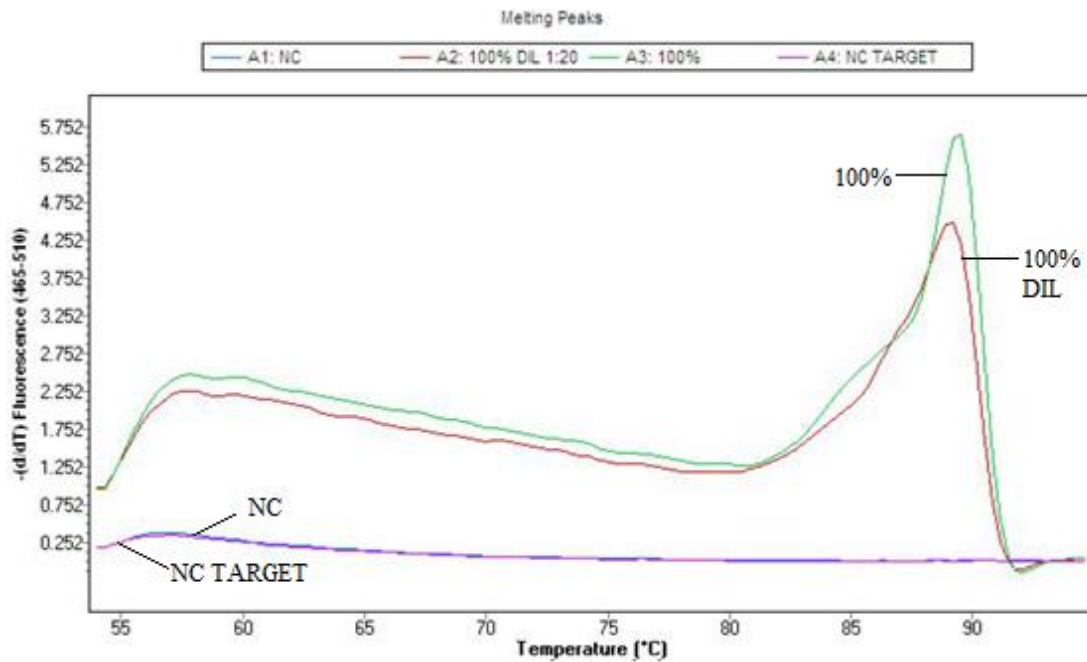
Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή των μεθόδων ανίχνευσης της μεθυλίωσης των γονιδίων στα κλινικά δείγματα αποτελεί η ενίσχυση του δείγματος 100% μεθυλιωμένο converted DNA το οποίο χρησιμοποιούμε ως θετικό μάρτυρα.



Σχήμα 7.5. Καμπύλη ενίσχυσης. Παρατηρούμε ότι πραγματοποιείται ενίσχυση του 100% μεθωλιωμένου converted DNA και του 100% μεθωλιωμένου converted DNA αραιωμένο 1:20 τα οποία αποτελούν τους θετικούς μάρτυρες και δεν παρατηρείται ενίσχυση των αρνητικών μαρτύρων.



Σχήμα 7.6. Καμπύλες τήξης.

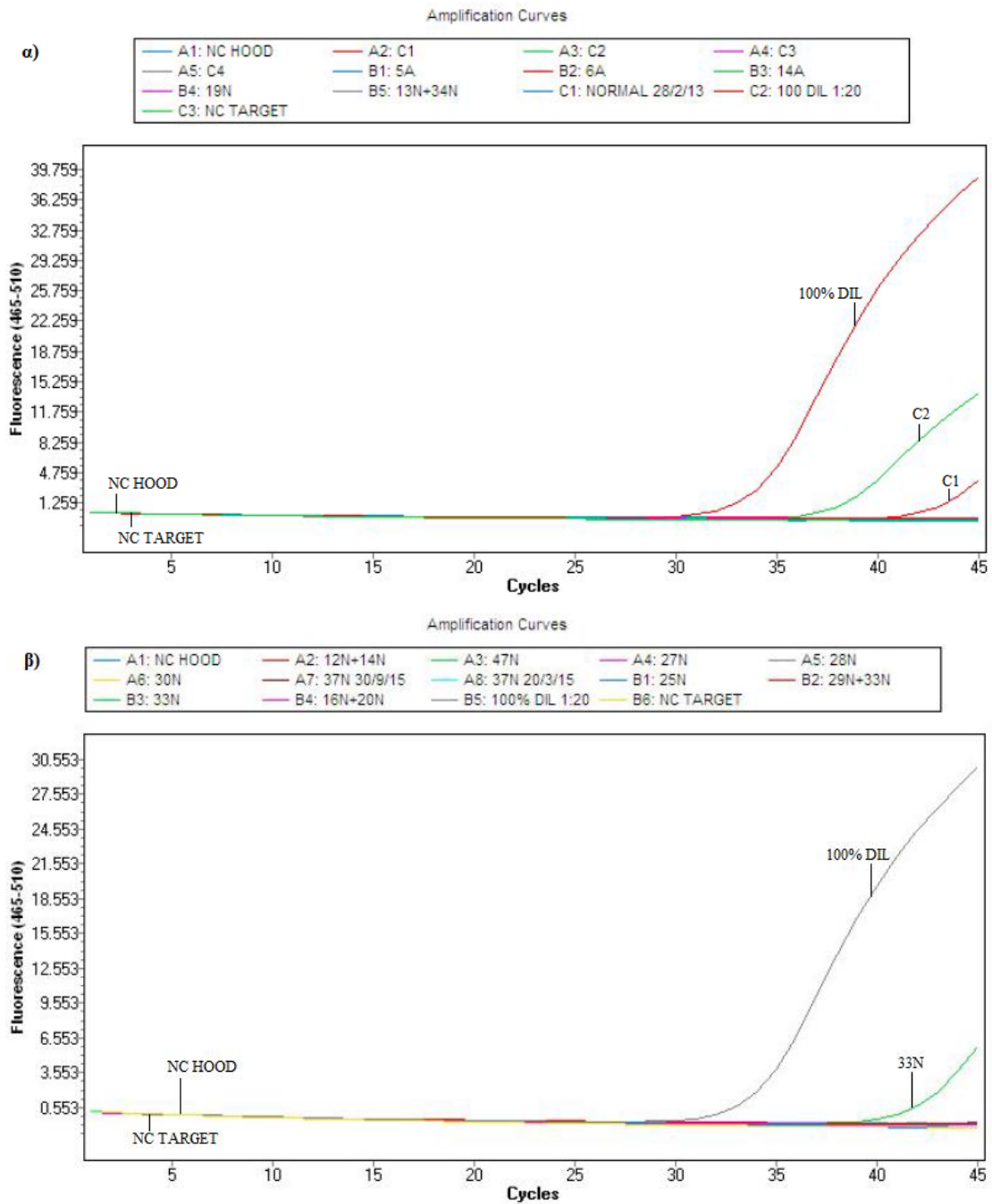


Σχήμα 7.7. Κορυφές τήξης.

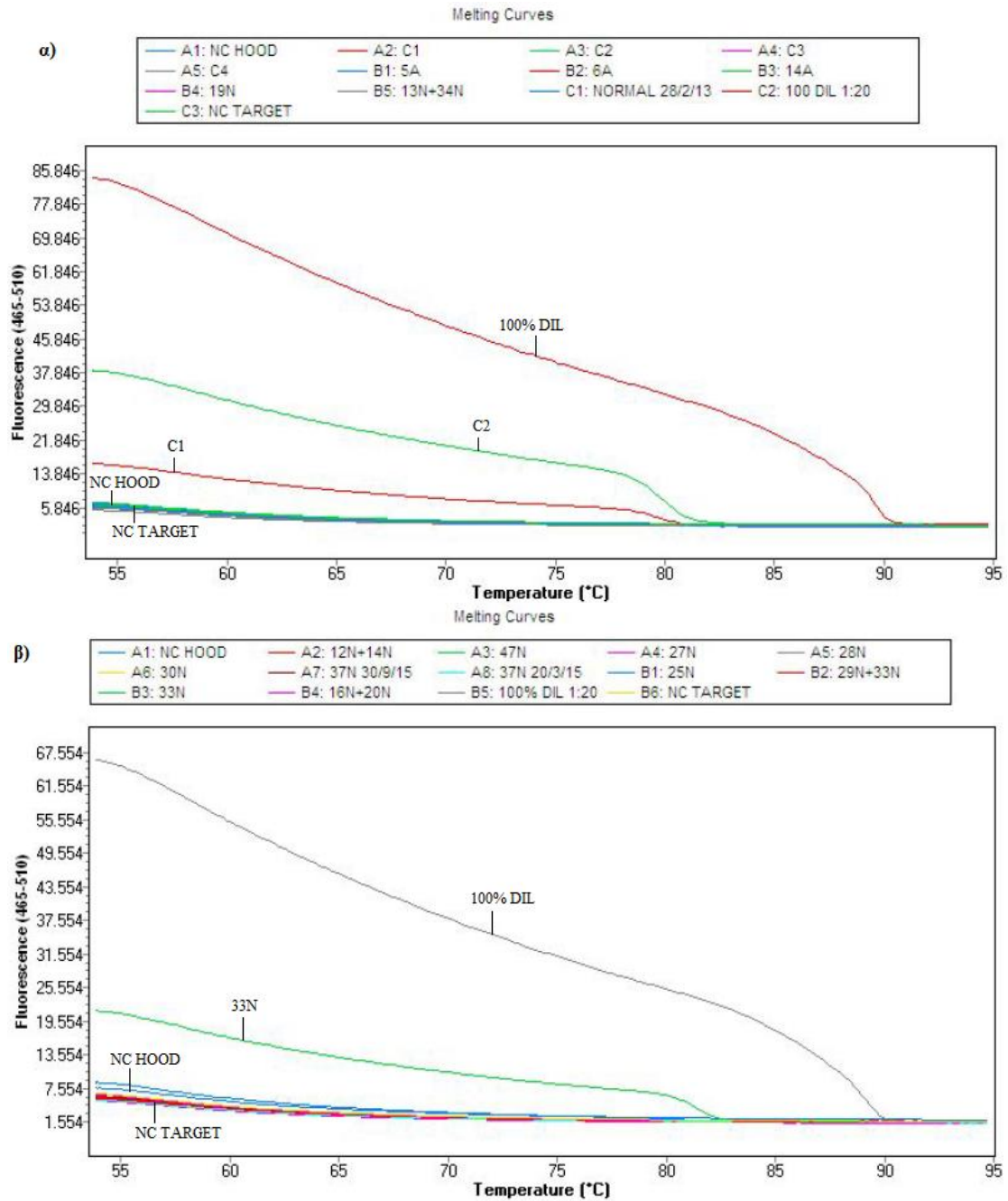
Παρατηρήσαμε ότι πραγματοποιείται ενίσχυση του 100% μεθυλιωμένου SB-converted DNA και του 100% μεθυλιωμένου SB-converted DNA αραιωμένο 1:20 τα οποία χρησιμοποιήσαμε ως θετικούς μάρτυρες και επίσης δεν πραγματοποιείται ενίσχυση των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες (NC και NC TARGET). Οπότε έχουμε 2/4 δείγματα μεθυλιωμένα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε την ανάλυση μεθυλίωσης των δειγμάτων και πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα.

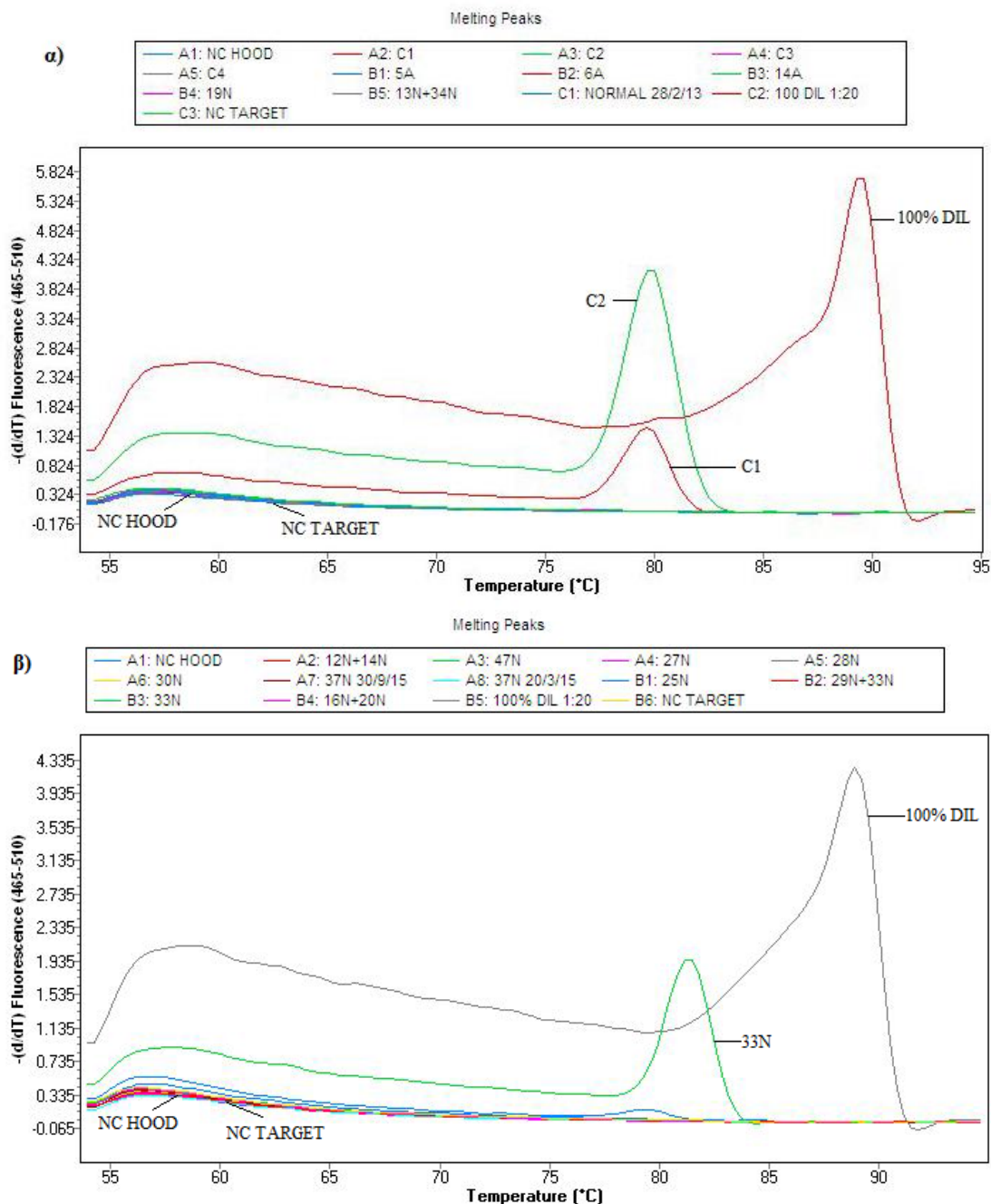
Από την ανάλυση των δειγμάτων των φυσιολογικών αιμοδοτών προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.



Σχήμα 7.8. Καμπύλες ενίσχυσης των φυσιολογικών δειγμάτων. **α)** Παρατηρούμε ότι ενισχύεται ο θετικός μάρτυρας, δεν ενισχύονται οι αρνητικοί μάρτυρες και αρχίζουν και ενισχύονται και δύο φυσιολογικά δείγματα. **β)** Παρατηρούμε ότι ενισχύεται ο θετικός μάρτυρας, δεν ενισχύονται οι αρνητικοί μάρτυρες και αρχίζει και ενισχύεται ένα φυσιολογικό δείγμα.



Σχήμα 7.9. Καμπύλες τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων. **α)** Παρατηρούμε μεγάλη διαφορά στις θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων των δύο φυσιολογικών δειγμάτων που φάνηκαν αρχικά να ενισχύονται και του προϊόντος του θετικού μάρτυρα. **β)** Επίσης παρατηρούμε μεγάλη διαφορά μεταξύ του προϊόντος του φυσιολογικού δείγματος που άρχισε να ενισχύεται και του θετικού μάρτυρα. Και στις δύο περιπτώσεις είναι προφανές ότι δεν έχω κάποιο θετικό δείγμα ως προς την μεθλίωση του υποκινητή και ότι αυτά που ενισχύονται είναι παραπροϊόντα. Δεν έχω προϊόν στους αρνητικούς μάρτυρες.

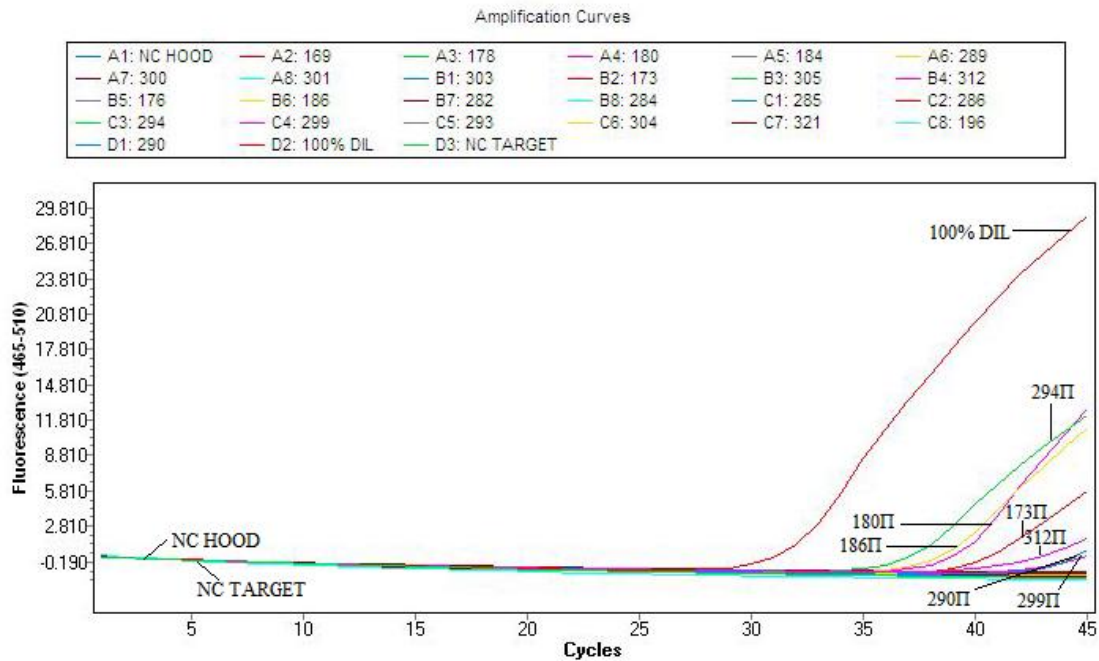


Σχήμα 7.10. Κορυφές τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων. α) Επιβεβαιώνουμε με τις καμπύλες τήξης ότι τα δείγματα που φάνηκαν να ενισχύονται είναι παραπροϊόντα. β) Επίσης επιβεβαιώνουμε ότι το δείγμα που φάνηκε να ενισχύεται είναι παραπροϊόν. Οι κορυφές τήξης των φυσιολογικών δειγμάτων και στις δύο περιπτώσεις διαφέρουν σημαντικά από αυτές των θετικών μαρτύρων.

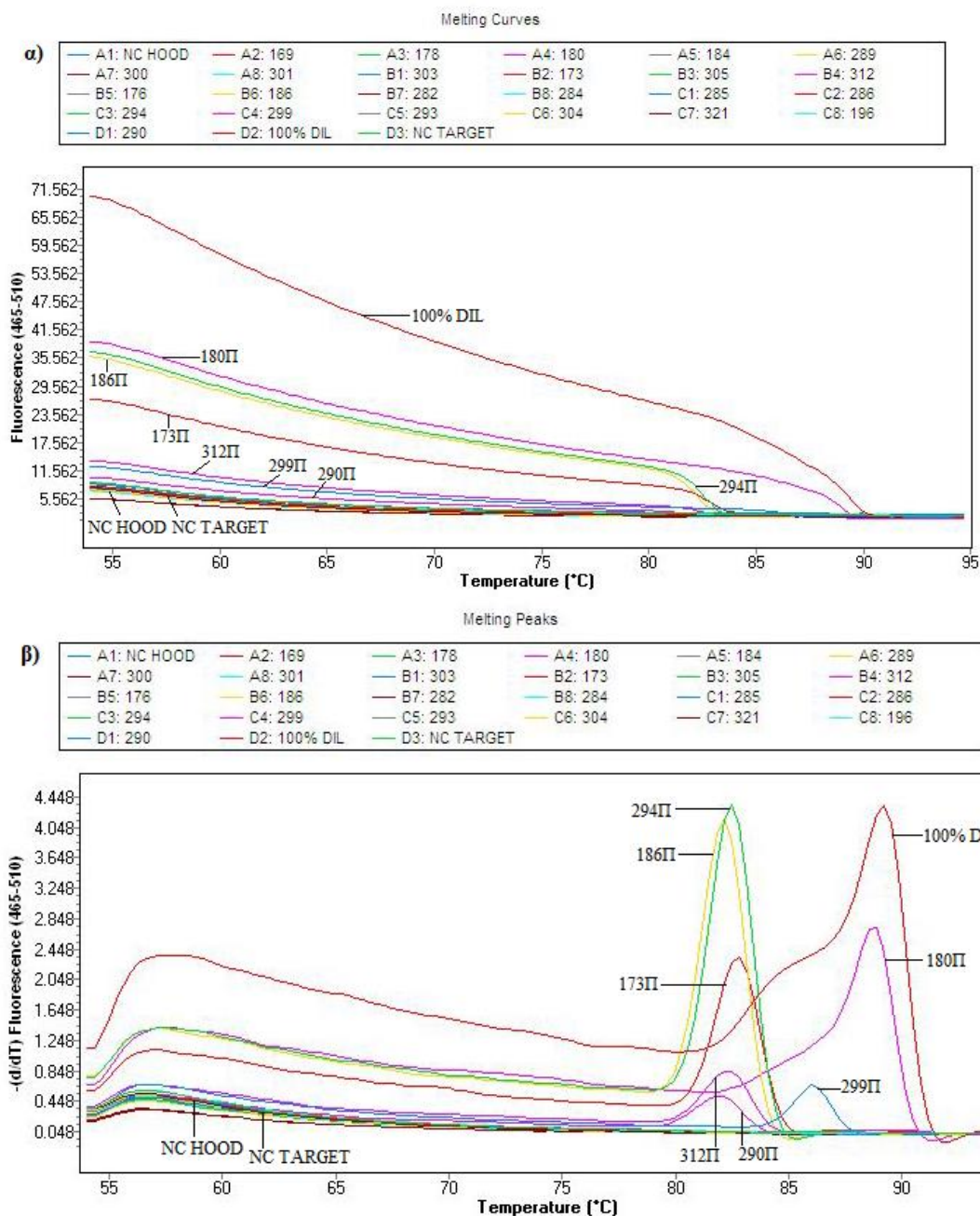
Από τις καμπύλες ενίσχυσης φαίνεται ότι τρία δείγματα αρχίζουν και ενισχύονται αλλά από τις καμπύλες τήξης βλέπουμε ότι αυτά αποτελούν παραπροϊόντα. Καθώς από τις καμπύλες τήξης τους βλέπουμε ότι οι θερμοκρασίες τήξης τους είναι αρκετά μικρότερες από αυτή του προϊόντος. Τα αποτελέσματα είναι αυτά που αναμέναμε καθώς περιμέναμε ότι ο υποκινητής του γονιδίου *GSTP1* δεν είναι μεθυλιωμένος στους

φυσιολογικούς αιμοδότες. Επομένως για τα δείγματα των φυσιολογικών αιμοδοτών έχουμε ποσοστό μεθυσίας 0,00% (0/24).

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε μελέτη της μεθυσίας 24 δειγμάτων από πρωτοπαθή όγκο. Και προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:



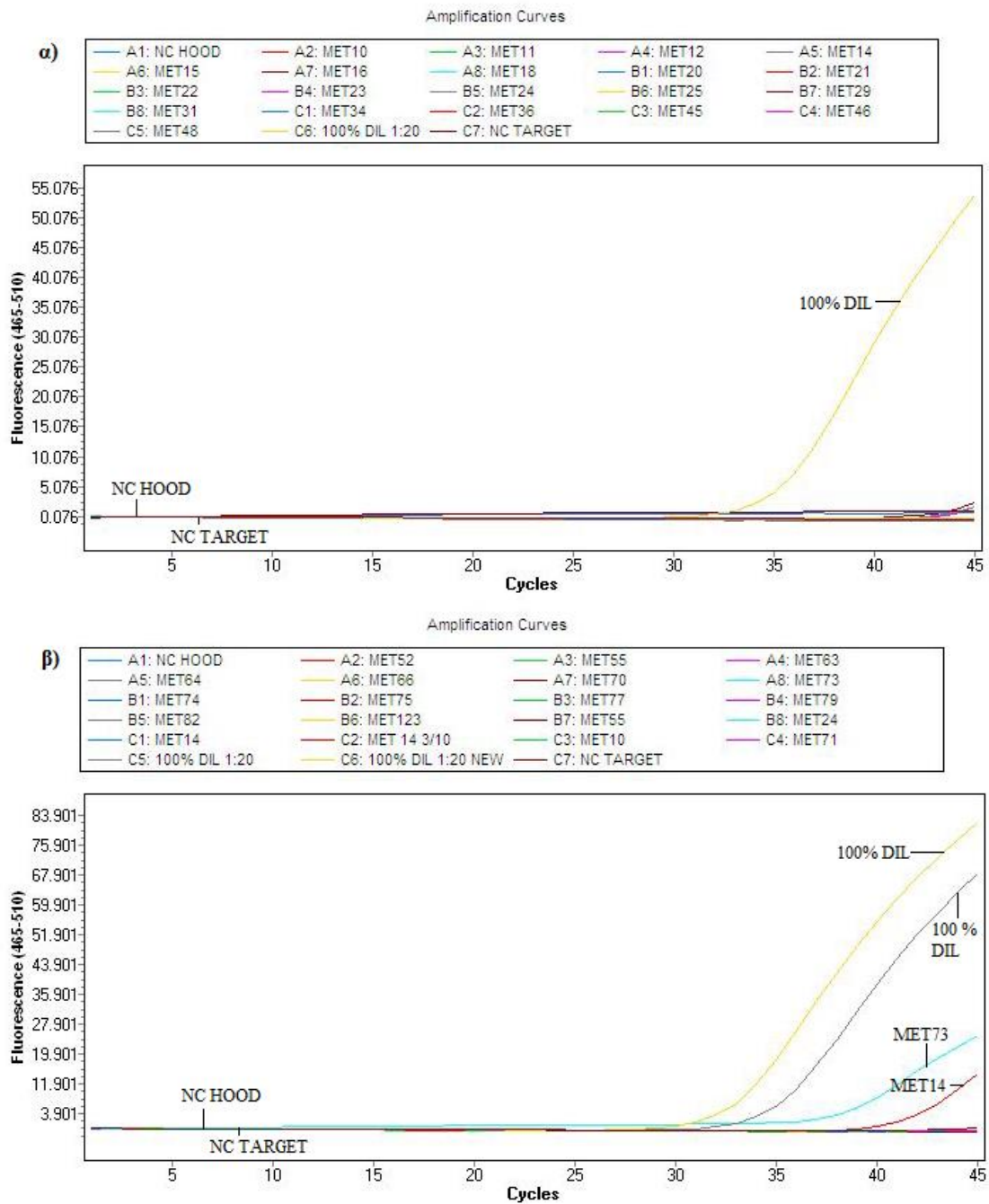
Σχήμα 7.11. Καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων πρωτοπαθούς όγκου. Παρατηρούμε ότι ενισχύεται ο θετικός μάρτυρας, δεν ενισχύονται οι αρνητικοί μάρτυρες και 7 δείγματα πρωτοπαθούς όγκου ενισχύονται. Από τα 7 δείγματα τα 4 ενισχύονται μετά τον 40 κύκλο οπότε πολύ πιθανόν αποτελούν παραπροϊόντα.



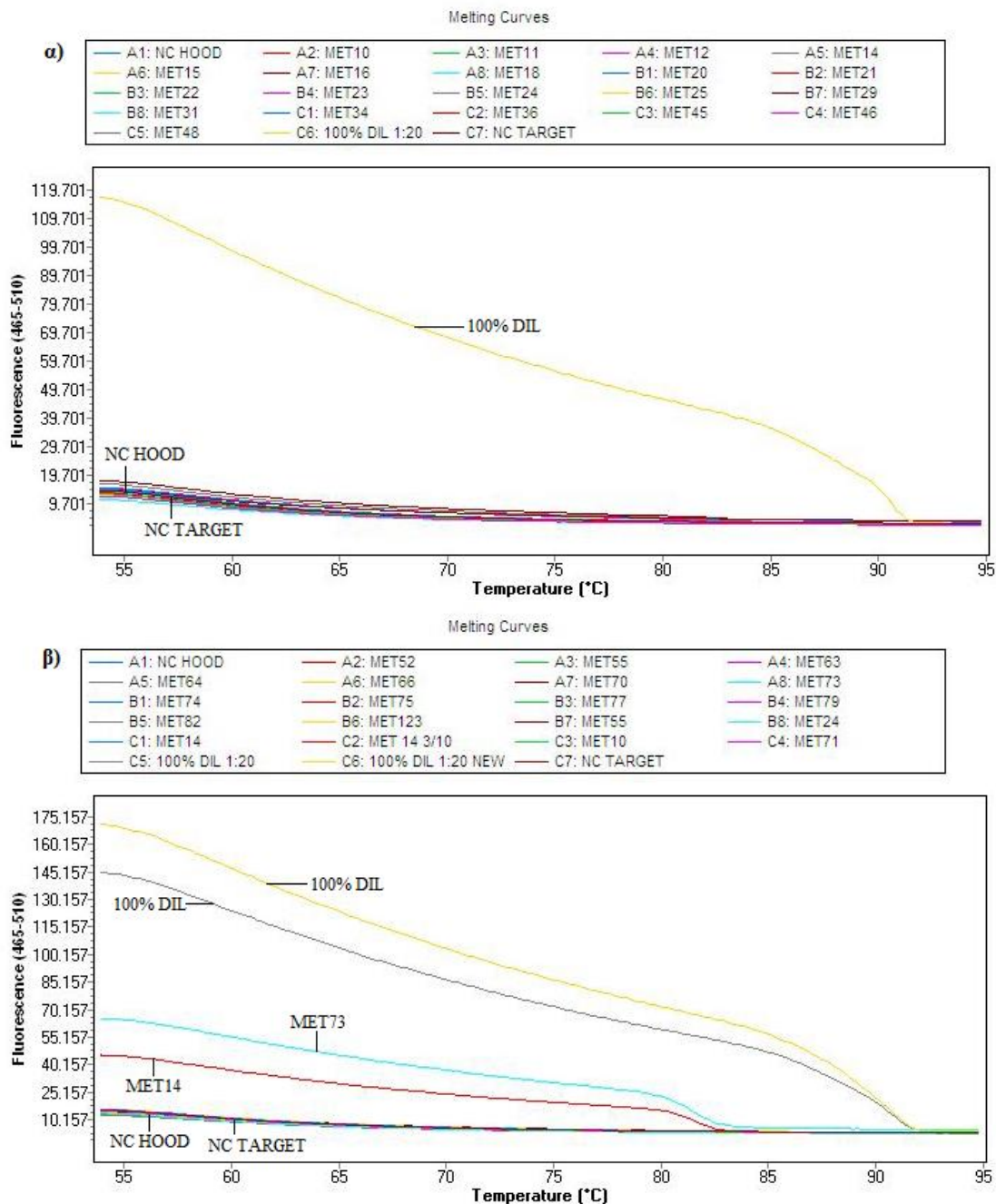
Σχήμα 7.12. Καμπύλες και κορυφές τήξης των δειγμάτων πρωτοπαθούς όγκου. **α)** Από τις καμπύλες τήξης παρατηρούμε ότι μόνο τα προϊόντα του δείγματος 180Π έχουν παρόμοια θερμοκρασία με τον θετικό μάρτυρα και ότι τα προϊόντα όλων των υπόλοιπων δειγμάτων έχουν πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες τήξης. **β)** Ομοίως και στις κορυφές τήξης παρατηρούμε ότι η κορυφή τήξης των προϊόντων του δείγματος 180Π είναι σε παρόμοια θερμοκρασία με αυτή του θετικού μάρτυρα.

Από τις καμπύλες ενίσχυσης παρατηρούμε ότι μια πληθώρα δειγμάτων αρχίζουν και ενισχύονται αλλά παρόλα αυτά όμως από τις καμπύλες τήξης παρατηρούμε ότι μόνο ένα δείγμα έχει παρόμοια θερμοκρασία τήξης με τον θετικό μάρτυρα. Άρα μόνο ένα δείγμα είναι θετικό. Επομένως έχουμε ποσοστό μεθυλίωσης 4,17% (1/24).

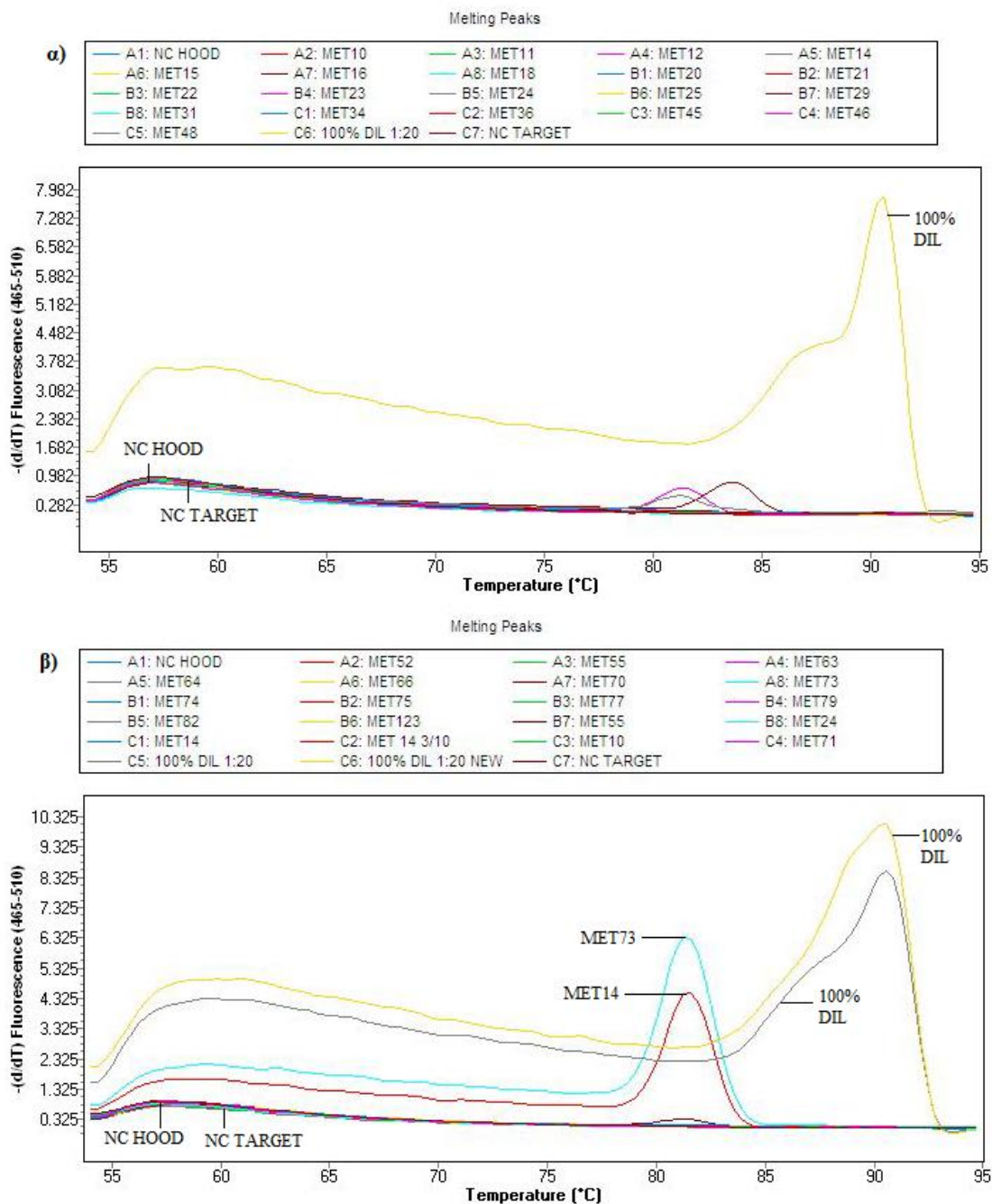
Στην συνέχεια μελετήσαμε την μεθυσίωση σε 34 δείγματα από CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.



Σχήμα 7.13. Καμπύλες ενίσχυσης δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. α) Παρατηρούμε ότι ενισχύεται μόνο ο θετικός μάρτυρας. β) Παρατηρούμε ότι ενισχύονται οι θετικοί μάρτυρες, σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήσαμε δύο θετικούς μάρτυρες διότι το δείγμα που είχε τον θετικό μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα τελείωσε και χρησιμοποιήσαμε ένα νέο δείγμα 100% DIL 1:20 ως θετικό μάρτυρα για να συγκρίνουμε τον κύκλο στον οποίο βγαίνουν προκειμένου να το χρησιμοποιήσουμε στα επόμενα πειράματα. Το 100% DIL με κίτρινο χρώμα είναι το καινούριο και το γκρι το παλιό. Επίσης παρατηρούμε ότι δύο δείγματα αρχίζουν να ενισχύονται. Σε κανένα από τα δύο πειράματα δεν παρατηρούμε ενίσχυση του αρνητικού μάρτυρα.



Σχήμα 7.14. Καμπύλες τήξης δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. α) Παρατηρούμε ότι έχουμε μία μόνο καμπύλη τήξης, αυτή του θετικού μάρτυρα. β) Παρατηρούμε ότι οι δύο θετικοί μάρτυρες έχουν την ίδια θερμοκρασία τήξης όπως αναμέναμε. Οι θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων των δύο δειγμάτων που φάνηκαν να ενισχύονται τελικά έχουν χαμηλότερες θερμοκρασίες από αυτή του θετικού μάρτυρα, άρα αποτελούν παραπροϊόντα και επομένως τα δείγματα αυτά δεν είναι θετικά.



Σχήμα 7.15. Κορυφές τήξης των δειγμάτων CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. **α)** Παρατηρούμε την κορυφή του θετικού μάρτυρα και σε μικρότερη θερμοκρασία και με αρκετά ασθενή ένταση φθορισμού κάποιες κορυφές παραπροϊόντων της MSP. **β)** Παρατηρούμε ότι οι κορυφές τήξης των θετικών μαρτύρων είναι σε σχεδόν ίδια θερμοκρασία. Οι θερμοκρασίες των κορυφών τήξης των δύο δειγμάτων που αρχικά ενισχύθηκαν είναι χαμηλότερες από αυτές των θετικών μαρτύρων. Επομένως όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αυτά που ενισχύονται είναι παραπροϊόντα και τα δείγματα αυτά δεν είναι θετικά.

Από την μελέτη της μεθυσίας των δειγμάτων των CTCs των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ενώ στις καμπύλες ενίσχυσης παρατηρούμε ότι μερικά δείγματα αρχίζουν και ενισχύονται παρόλα αυτά όμως από τις καμπύλες και κορυφές τήξης παρατηρούμε ότι οι θερμοκρασίες τήξης αυτών των δειγμάτων είναι

μικρότερες των θετικών μαρτύρων. Συνεπώς δεν έχω μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* σε κανένα δείγμα SB-converted DNA από EpCAM⁺-CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Άρα το ποσοστό μεθυλίωσης σε αυτή την ομάδα δειγμάτων είναι 0% (0/34).

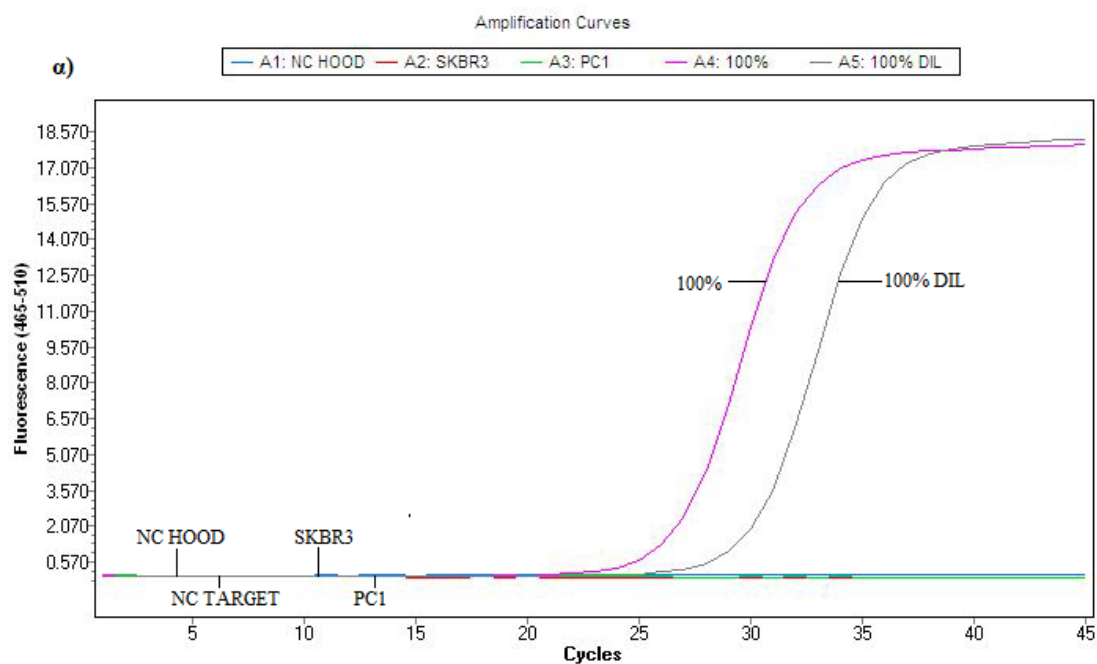
Από τα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου και τα αντίστοιχα CTCs υπολογίσαμε την συμφωνία των αποτελεσμάτων.

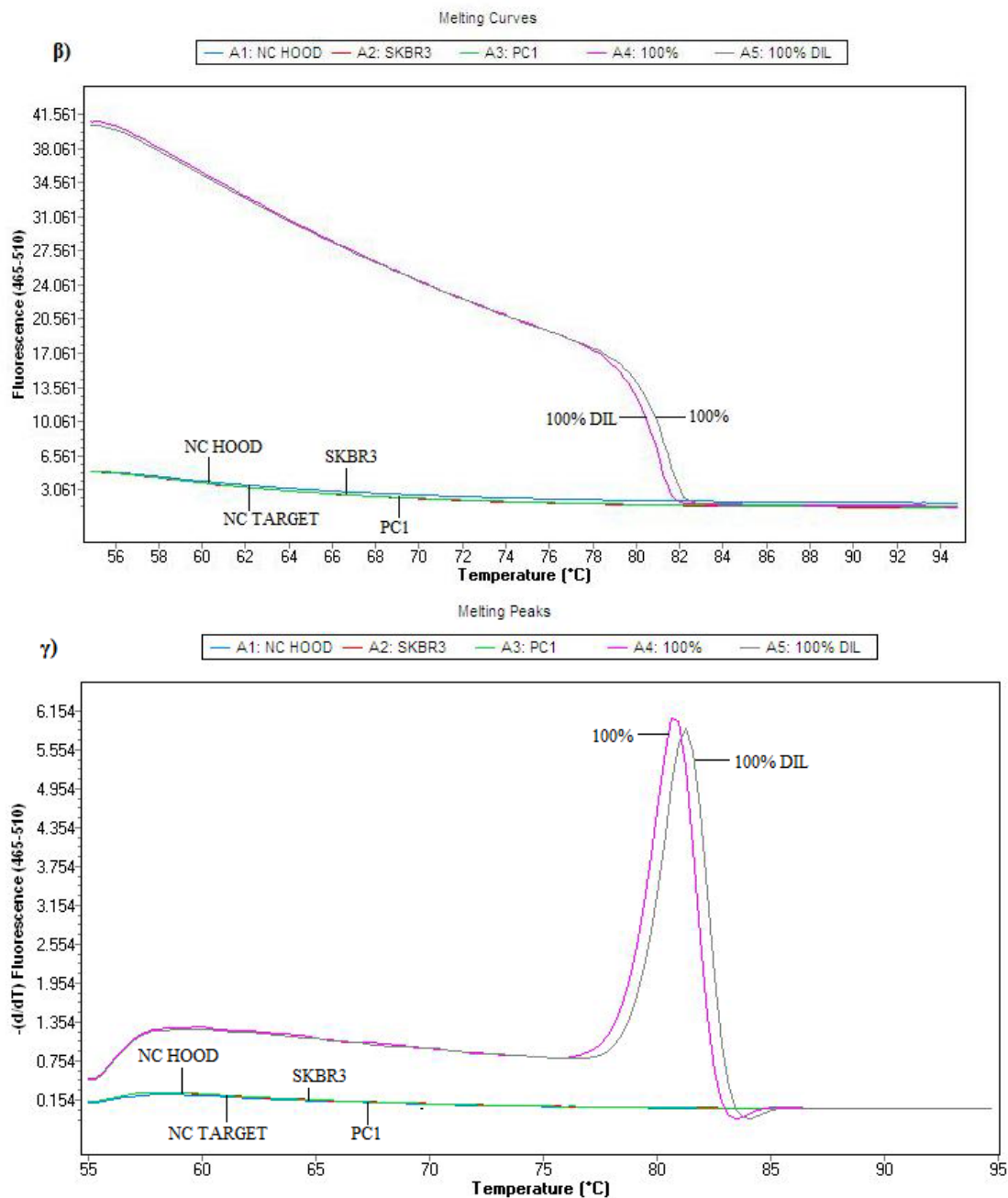
Πίνακας 7.3. Συμφωνία αποτελεσμάτων των FFPEs και των CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.

		FFPEs	
		+	-
CTCs	+	0	0
	-	1	11
Συμφωνία=11/12 (91,67%)			

7.3. Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *BRCA1*

Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή των μεθόδων ανίχνευσης της μεθυλίωσης των γονιδίων στα κλινικά δείγματα αποτελεί η ενίσχυση του δείγματος 100% μεθυλιωμένο SB-converted DNA το οποίο χρησιμοποιούμε ως θετικό μάρτυρα.



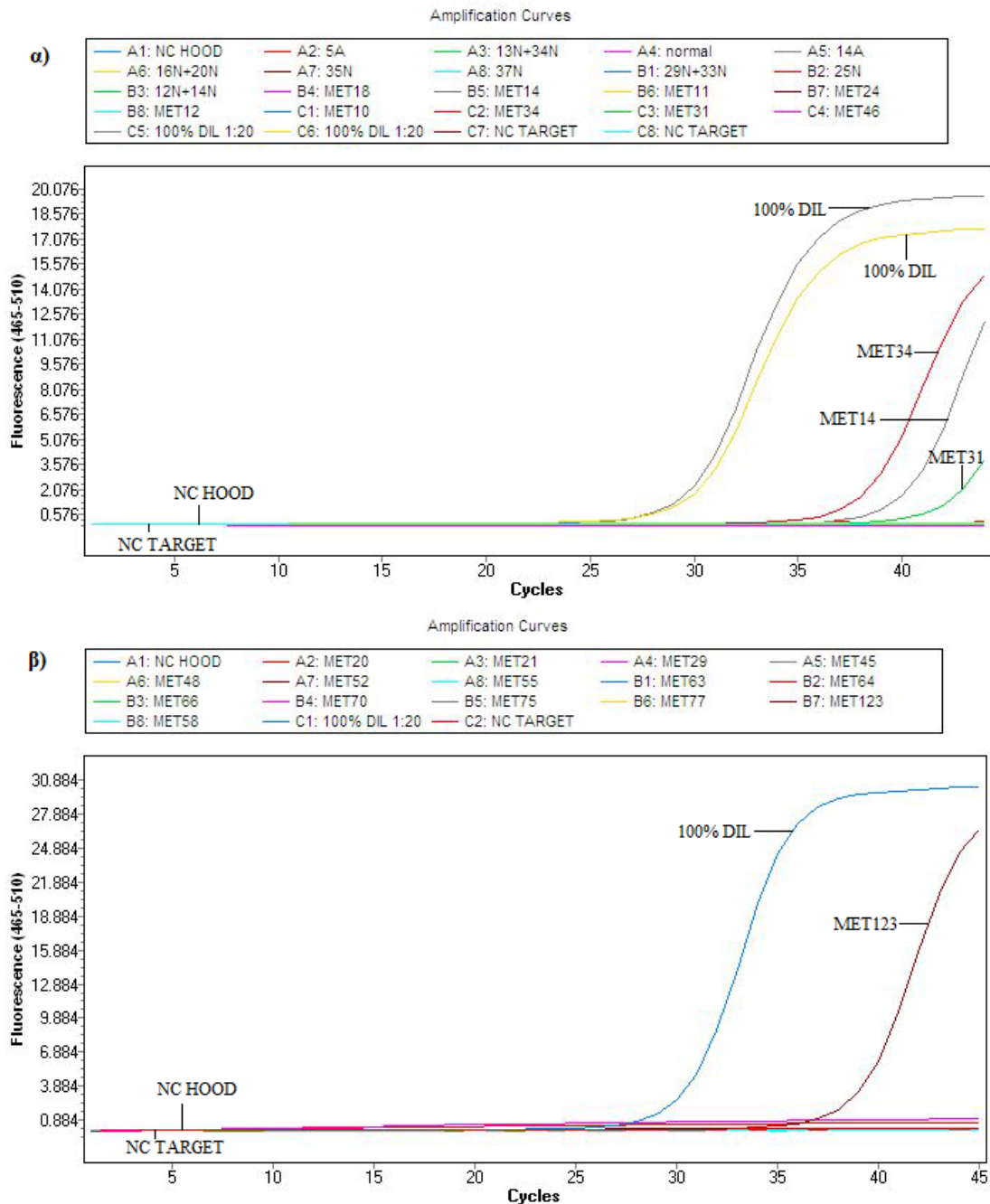


Σχήμα 7.16. Καμπύλη ενίσχυσης, καμπύλη τήξης και κορυφές τήξης. Πρώτη δοκιμή με χρήση μόνο του θετικού μάρτυρα και των κυτταρικών σειρών SKBR3 (SKBR3 και PC1). α) Από την καμπύλη ενίσχυσης παρατηρώ ότι μόνο το 100% και 100% DIL ενισχύονται οι κυτταρικές σειρές δεν ενισχύονται. β) Καμπύλη τήξης παρατηρούμε ότι τα προϊόντα των θετικών μαρτύρων έχουν παρόμοια θερμοκρασία τήξης. γ) Κορυφές τήξης, παρατηρούμε ότι υπάρχουν δύο μόνο κορυφές αυτές των θετικών μαρτύρων. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήσαμε ως δείγματα και δυο κυτταρικές σειρές με σκοπό να δούμε αν είναι κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες και τελικά δεν είναι κατάλληλες διότι δεν ενισχύονται.

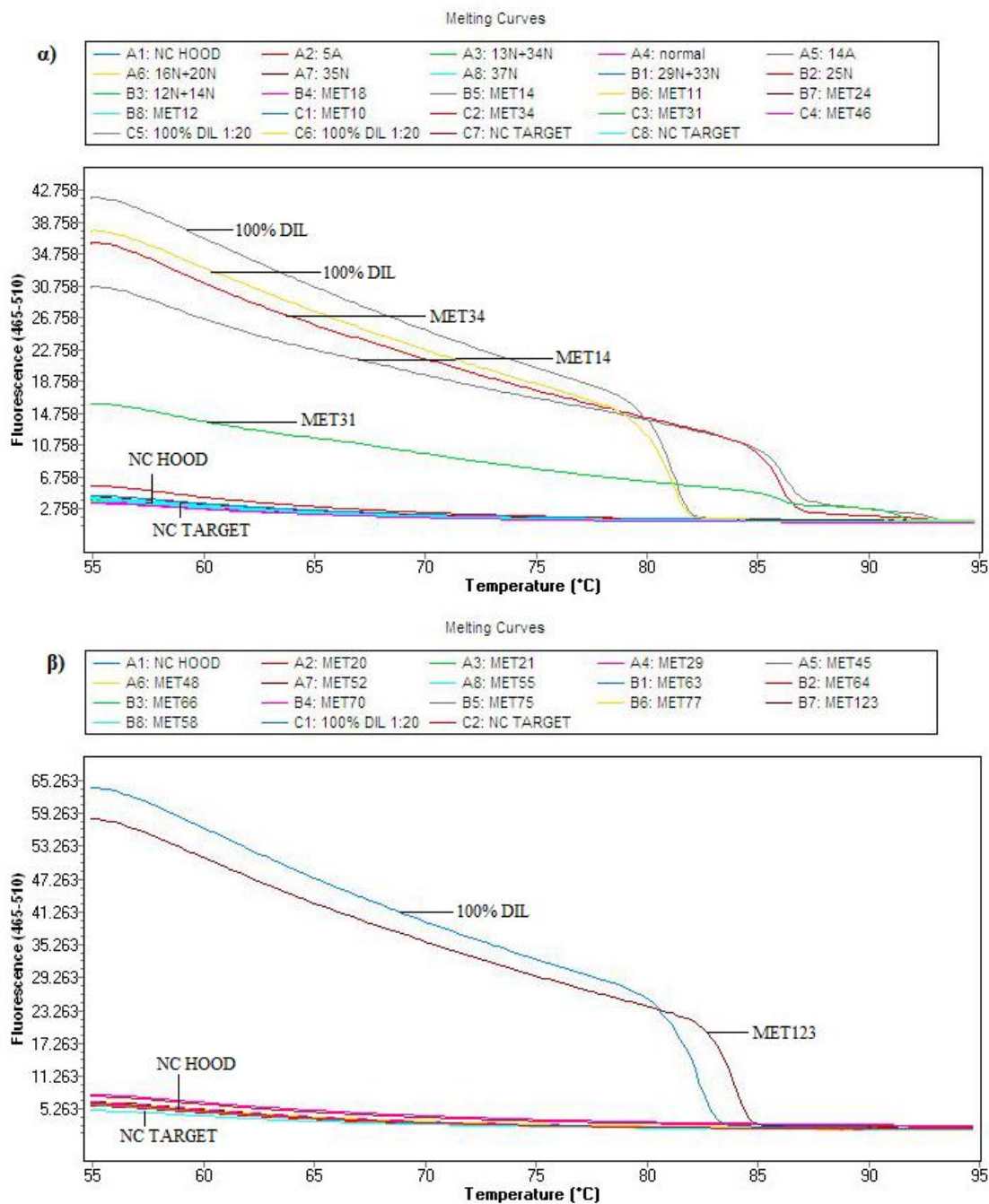
Πράγματι αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι πραγματοποιείται ενίσχυση του 100% μεθυλιωμένου SB-converted DNA και του 100% μεθυλιωμένου SB-converted DNA αραιωμένο 1:20 και επίσης δεν πραγματοποιείται ενίσχυση των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε την ανάλυση μεθυσίωσης των δειγμάτων και πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα.

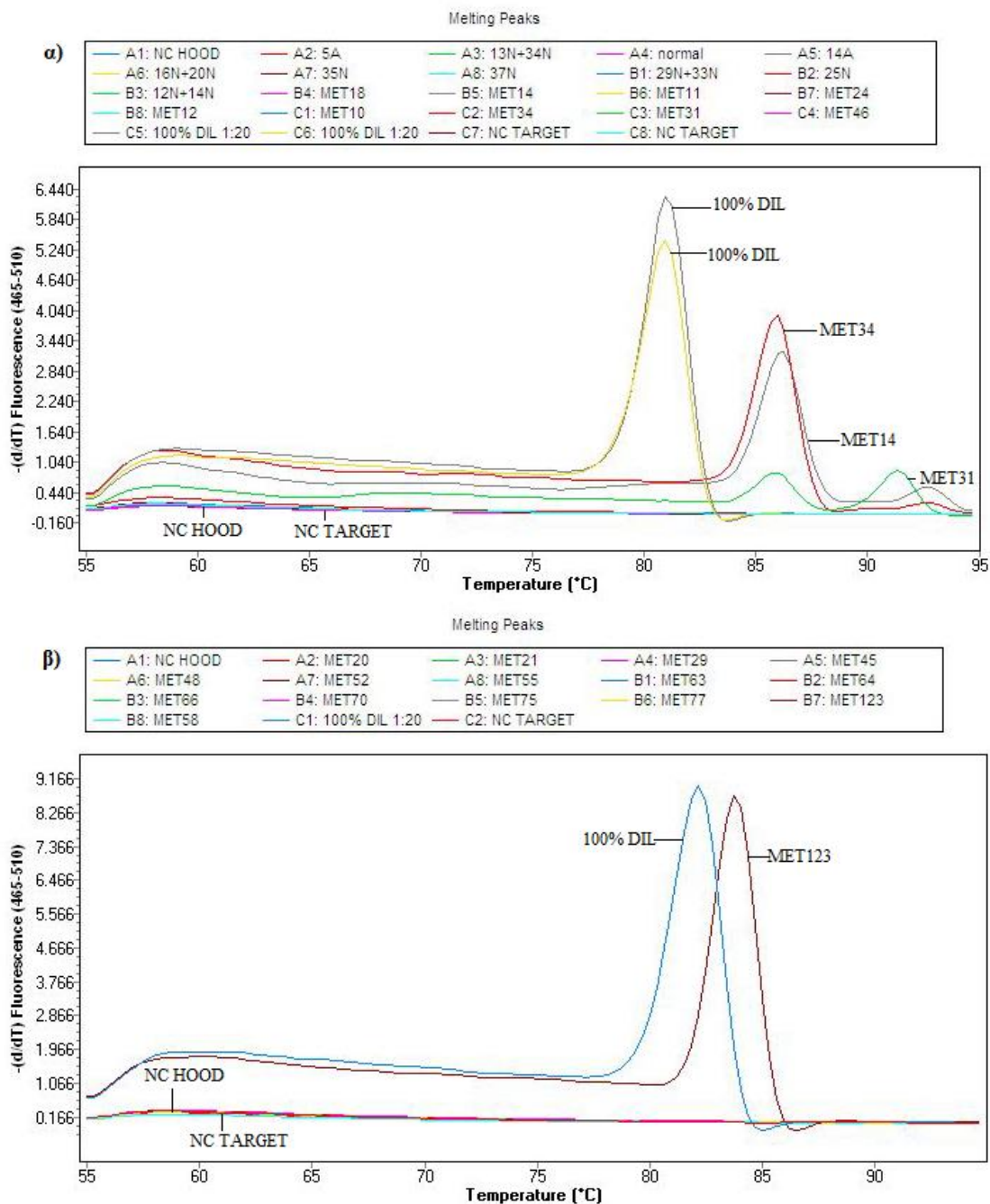
Από την ανάλυση των δειγμάτων των φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.



Σχήμα 7.17. Καμπύλες ενίσχυσης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών. α) Σε αυτό το πείραμα βάλουμε δείγματα ασθενών και φυσιολογικών αιμοδοτών στο διάγραμμα των αποτελεσμάτων παρατηρούμε ότι από τα δείγματα των φυσιολογικών δεν βρέθηκε να ενισχύεται κάποιο δείγμα αλλά από των ασθενών φαίνεται να ενισχύονται 3 δείγματα. β) Σε αυτό το πείραμα βάλουμε δείγματα CTCs ασθενών και από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι ένα δείγμα ενισχύεται.



Σχήμα 7.18. Καμπύλες τήξης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών. **α)** Από τις καμπύλες τήξης παρατηρούμε ότι οι θερμοκρασίες τήξης των δειγμάτων που φάνηκαν να ενισχύονται είναι αρκετά διαφορετικές από αυτές των θετικών μαρτύρων άρα τα προϊόντα αυτών των δειγμάτων αποτελούν παραπροϊόντα, επομένως τα δείγματα αυτά δεν είναι θετικά. **β)** Από τις καμπύλες τήξης παρατηρούμε ότι τα προϊόντα του δείγματος που ενισχύθηκε έχουν παρόμοια θερμοκρασία τήξης με αυτά του θετικού μάρτυρα, επομένως το δείγμα αυτό είναι θετικό. Κανένα από τα δείγματα αρνητικών μαρτύρων δεν ενισχύθηκε.

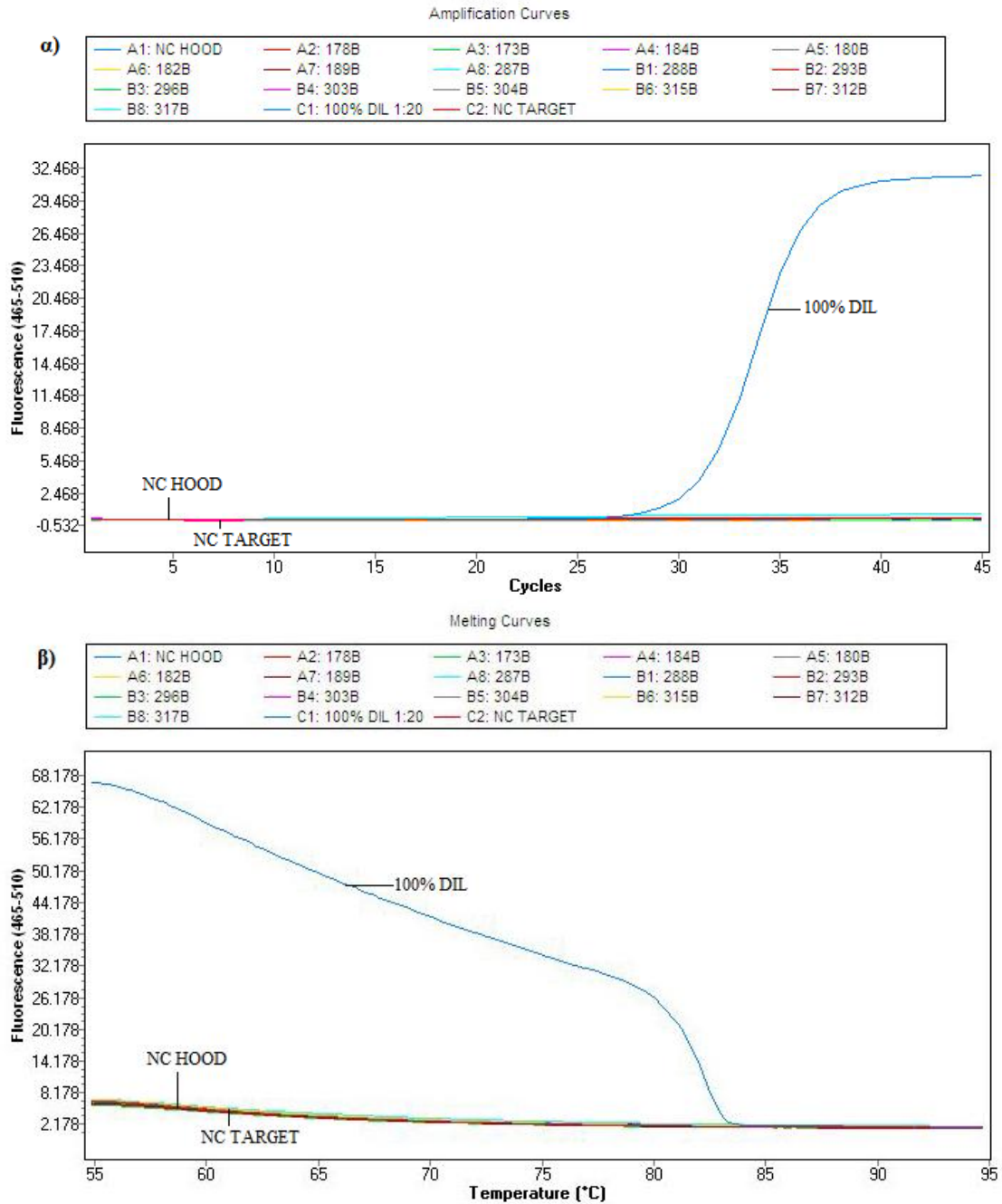


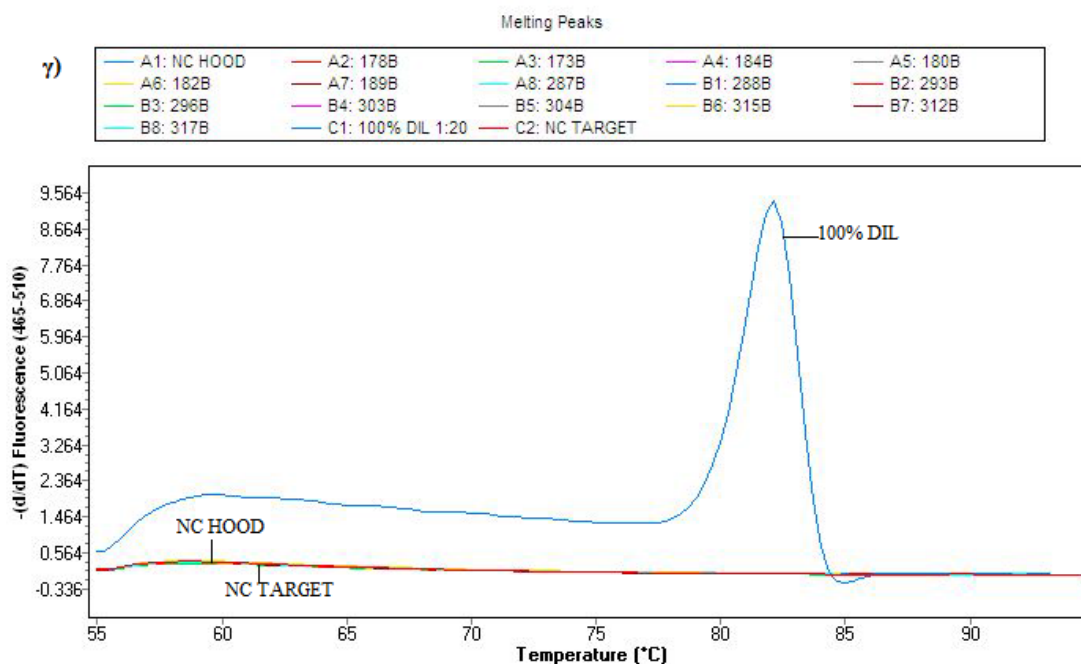
Σχήμα 7.19. Κορυφές τήξης δειγμάτων φυσιολογικών αιμοδοτών και μεταστατικών CTCs δειγμάτων ασθενών. **α)** Από τις κορυφές τήξης φαίνεται ξεκάθαρα ότι κανένα από τα δείγματα που ενισχύθηκαν δεν είναι θετικό δείγμα. **β)** Από τις κορυφές τήξης παρατηρούμε ότι η κορυφή του θετικού μάρτυρα και του δείγματος που ενισχύθηκε είναι σε παρόμοιες θερμοκρασίες, επομένως επιβεβαιώνουμε ότι το δείγμα αυτό είναι θετικό.

Από την μελέτη της μεθυλίωσης προέκυψε ότι σε κανένα από τα δείγματα των φυσιολογικών αιμοδοτών δεν βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος ο υποκινητής του γονιδίου *BRCA1* και βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος σε ένα δείγμα των CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Συνεπώς τα ποσοστά μεθυλίωσης είναι 0% (1/14)

για τους φυσιολογικούς αιμοδότες και 4,17% (1/24) στα δείγματα CTCs των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Τέλος πραγματοποιήσαμε μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου από δείγματα ctDNA ασθενών, και προέκυψαν τα ακόλουθα:





Σχήμα 7.20. Καμπύλες ενίσχυσης, τήξης και κορυφές τήξης δειγμάτων ctDNA ασθενών. α) Σε αυτό το διάγραμμα καμπυλών ενίσχυσης και παρατηρούμε ότι ενισχύεται μόνο ο θετικός μάρτυρας και κανένα από τα δείγματα των ασθενών και κανένας από τους αρνητικούς μάρτυρες. β) Σε αυτό το διάγραμμα καμπυλών τήξης, παρατηρούμε μόνο μια καμπύλη αυτή του θετικού μάρτυρα. γ) Σε αυτό το διάγραμμα κορυφών τήξης παρατηρούμε μόνο την κορυφή του θετικού μάρτυρα.

Από την ανάλυση προέκυψε ότι σε κανένα από τα δείγματα ctDNA των ασθενών με καρκίνο του μαστού δεν βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος ο υποκινητής του γονιδίου *BRCA1*.

Τέλος υπολογίσαμε και εδώ την συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δειγμάτων CTCs και των αντίστοιχων δειγμάτων ctDNA.

Πίνακας 7.4. Συμφωνία αποτελεσμάτων των CTCs και του ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού.

		ctDNA	
		+	-
CTCs	+	0	0
	-	0	11
Συμφωνία=11/11 (100%)			

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήσαμε μελέτη της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων *CST6*, *GSTP1* και *BRCA1* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Παρατηρήσαμε ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του *CST6* παρατηρείται σε έναν σημαντικό αριθμό δειγμάτων επίσης από ανάλυση που έγινε παλαιότερα στο εργαστήριό μας μελετήθηκαν δείγματα πλάσματος φυσιολογικών αιμοδοτών και ο υποκινητής του γονιδίου δεν βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος στους φυσιολογικούς αιμοδοτές. Στην συνέχεια κατασκευάσαμε καμπύλες Kaplan-Meier και παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική διαφορά στην συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών που έχουν μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου και εκείνων που δεν έχουν μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου. Παρόλα αυτά όμως είδαμε ότι μία πληθώρα δειγμάτων των ασθενών έχουν υπερμεθυλιωμένο τον υποκινητή της *CST6* συνεπώς η συνέχιση της μελέτης της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *CST6* κρίνεται αρκετά ενδιαφέρουσα για την εκτίμησή της ως προβλεπτικού δείκτη για την ολική επιβίωση ασθενών με καρκίνο του μαστού. Η μελέτη μας έγινε σε αρκετά μικρή (200μL) ποσότητα αρχικού πλάσματος οπότε θα ήταν αρκετά ενδιαφέρον να γίνει ανάλυση της μελέτης της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου και σε δείγματα ctDNA που έχουν προέλθει από απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πλάσματος.

Όσον αφορά την μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *GSTP1* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού παρατηρήσαμε ότι είναι σχεδόν ανύπαρκτη, αποτέλεσμα όμως που συμφωνεί και με την διεθνή βιβλιογραφία καθώς τα ποσοστά μεθυλίωσης που έχουν βρεθεί είναι πολύ χαμηλά.

Και τέλος όσον αφορά την μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού τα ποσοστά μεθυλίωσης και εδώ ήταν πολύ χαμηλά όμως είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο ότι μελετήθηκε μικρός αριθμός δειγμάτων και επίσης τα δείγματα ctDNA που μελετήσαμε είχαν προέλθει από σε αρκετά μικρή (200μL) ποσότητα αρχικού πλάσματος. Η μελέτη της μεθυλίωσης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων γονιδίου και σε δείγματα ctDNA που έχουν προέλθει από απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πλάσματος κρίνεται αρκετά ενδιαφέρουσα για περαιτέρω ανάλυση της.

Από την παρούσα διπλωματική εργασία βλέπουμε την καθοριστικής σημασίας συμβολή της υγρής βιοψίας. Χάρη σε αυτή μπορούμε και έχουμε δείγματα ασθενών από κάθε στάδιο της νόσου για γενετικές και επιγενετικές μελέτες. Καθοριστικός είναι επίσης και ο ρόλος της στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και νέων φαρμακευτικών στόχων.

Και τέλος παρατηρούμε ότι η συμβολή της μεθυλίωσης συμβάλλει σημαντικά στην γονιδιακή έκφραση. Επομένως η μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων και ειδικότερα της μεθυλίωσης του DNA αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας, τόσο για την ανακάλυψη βιοδεικτών που θα βοηθήσουν στην διάγνωση την πρόγνωση και στην πρόβλεψη της έκβασης της νόσου, αλλά και στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

CST6 methylation (real-time MSP)

CST6: in silico design

DNA: [NC_000010.11](#)

Exons: 3

Gene ID: 1474

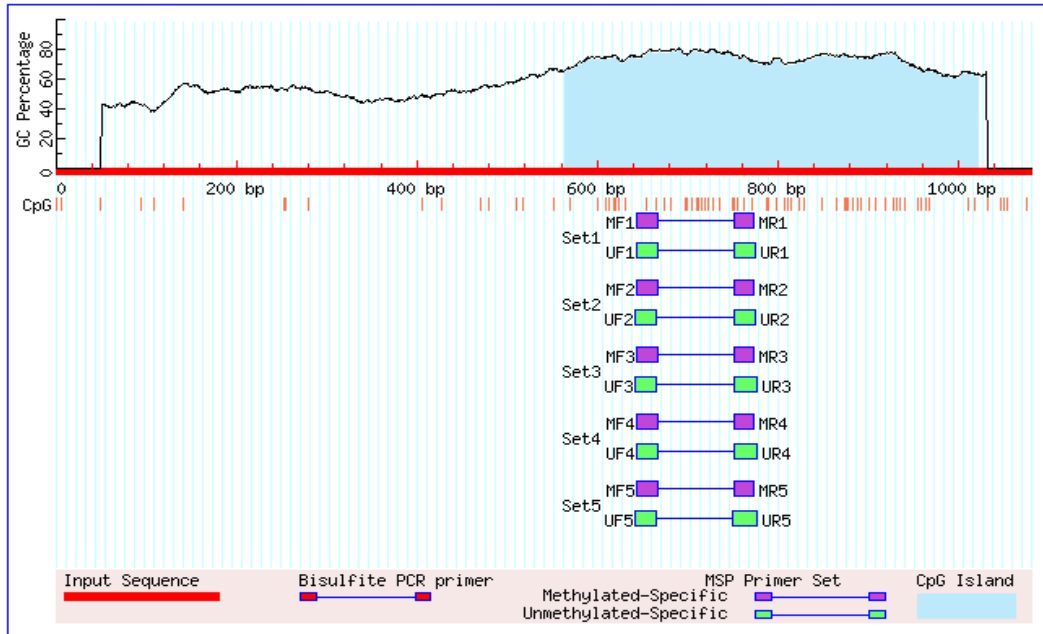
CST6 [ID: 1474, MIM: 601891, NC_000011.10]

Genomic DNA *CST6* (start-end:1-1080)

```
CTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGTGTGAGCCCTCATGCCCGGCCTTCTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTCAGCGTCTAGCTCTGTGCGCCAGGCTGG
AATGCTGCAGTGGTGAGATCACGATTCAGTACTGACTTGAACCTCTGGCTCAAGTGGTCCCTC
CCACCTTGGCCTCTCAAAGTGCTGGAATTACAAGCATGCCTAGGTGCCTGGCCAGGTAGA
AACATTAGTCACTCGCGCTCCAGGAAGGTTGTCAGGCAGCGCTGAGCAGTAATGTGTCCCT
ACTCACCTGCTGTTTATCCAGCACCCAGACCTCTTCTAAGAACTTTACCTGTTTCAGCTCA
CTGAATCCTCACAACACCCATTGTACAGAAGAGGAAACTGAGGCAGCGAGTGGTTAAGTG
ACTTCTCCGAGGTTACACAGCTAGGAAATGGTGGCAACAGTAAGAGCCCACGAAGAGCTG
CGGTTGGTAGTTTATTCTGGACAGCCCTCCCGTGAACCGTCCCTGTACTGGCACTTGTG
CTGGGGACTGTGCTGTCTCTCCCTCCCCGGGCCAGGTGTGTCTGGAGGGCAGGGGAAG
CGTCTTGGCACGCGGGTGCAGCGCCGCCCTCGGCCTCCTGGGCTCCCTGAACCTCGCAG
GACCCCGGCAACTTCGAGCCCCGCCCCAGCTCCAGGCCGCGGGGGCGCATCGCGGGCGTC
GGGCGGGGGCGGCCAGCGGGTAAAAGCTGCGCGGCCGCAAGCTCGGCACTCACGGCTCTG
AGGGCTCCGACGGCACTGACGGCCATGCGCGTTTGAACCTCCCGCTGGCGCTGGGCCTG
GCCCTGGTGCATTCTGCCTCCTGGCGCTGCCACGCGACGCCCGGGCCCGGCCGAGGAG
CGCATGGTTCGGAGAACTCCGGGACCTGTGCCCCGACGACCCGCAGGTGCAGAAGGCGGCG
CAGGCGGCCGTGGCCAGCTACAACATGGGCAGCAACAGCATCTACTACTTCCGAGACACG
CACATCATCAAGGCGCAGAGCCAGGTGCGGCGGGCGGGGTGCTGGGAGGGGACACCCGGC
```

Check for CpG island in genomic sequence of *CST6*

MethPrimer Result: start-end: 1-1080



Sequence Name:
Sequence Length: 1080

CpG island prediction results
Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.60
1 CpG island(s) were found in your sequence
Size (Start - End)
Island 1 459 bp (564 - 1022)

BLAST region 134 bp (underlined, product) with whole genome

Job title: Nucleotide Sequence (134 letters)

RID [N3GTZKX4015](#) (Expires on 07-21 19:10 pm)

Query ID	IdlQuery_90667	Database Name	Genome (GRCh38.p12 reference, Annotation Release 109)
Description	None	Description	Homo sapiens GRCh38.p12 [GCF_000001405.38] chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds (reference assembly in Annotation Release 109)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.8.0+ Citation
Query Length	134		

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [Human genome view](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 7 Blast Hits on 6 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

Query

- 5'-3' converted *CST6* (start-end: 1-1080)

TTGTTTCGGTTTTTTTTAAAGTGTTGGGATTATAAGTGTGAGTTTTTATGTTTCGGTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTTAGCGTTTAGTTTTGTCGTTTAGGTTGG
AATGTTGTAGTGGTGAGATTACGATTTATTGATTTGAATTTTTTGGTTTAAGTGGTTTTTT
TTATTTTGGTTTTTTTTAAAGTGTTGGAATTATAAGTATGTTTAGGTGTTTGGTTAGGTAGA
AATATTAGTTATTCGCGTTTTAGGAAGGTTGTTAGGTAGCGTTGAGTAGTAATGTGTTTT
ATTTATTTGTTGTTTATTTAGTATTAGATTTTTTTTTAAGAATTTTATTTGTTTTAGTTTA
TTGAATTTTTATAATATTTATTGTATAGAAGAGGAAAATTGAGGTAGCGAGTGGTTAAGTG
ATTTTTTCGAGGTTATATAGTTAGGAAATGGTGGTAATAGTAAGAGTTTACGAAGAGTTG
CGGTTGGTAGTTTATTTTGGATAGTTTTTTCGTGAATCGTTTTTGTATTGGTATTTGTTG
TTGGGGATTGTCGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGGTAGGTGTGTTTTGGAGGGTAGGGAAG
CGTTTTGGTACGCGGGTGC CGTCGTTTTTTTTTCGGTTTTTTGGGTTTTTTGAATTTTCGTAG
GATTTTCGGTAATTTTCGAGTTTCGTTTTAGTTTTAGGTCGCGGGGGCGTATCGCGGGCGTC
GGGCGGGGCGGTTTAGCGGGTAAAAGTTGCGCGGTCGTAAGTTCGGTATTTACGGTTTTG
AGGGTTTTCGACGGTATTGACGGTTATGGCGCGTTCGAATTTTTTCGTTGGCGTTGGGTTTG
GTTTTGGTCGTATTTTGTTTTTTGGCGTTGTACGCGACGTTTCGGGTTTCGGTTCGTAGGAG
CGTATGGTCGGAGAATTTTCGGGATTTGTCGTTTCGACGATTCGTAGGTGTAGAAGCGGGCG
TAGGCGGTTCGTGGTTAGTTATAATATGGGTAGTAATAGTATTTATTATTTTCGAGATACG
TATATTATTAAGGCGTAGAGTTAGTGC GCGCGGGCGGGGTGTTGGGAGGGGATATTCGGT

Methylation-specific primers underlined (product: 134 bp)

Primer premier: Forward primer

Primer Premier

Primer: Search Results Edit Primers

(1) 74 (480) 207

Direct Select:

5' TCGACTTTCGTTTTACTTTTAGCTC 3'
|||||
3' CTAAGCCATTAAAGCTCAAAGCAAATCAAATCCAGCGCCCGCATAGCGCCCGCAACCGCCCGCCAAATCGCCCAT 5'

70 80 90 100 110 120 130 140
D F C N F E F R F S F R S R G R I A C V G R G C L A G K

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/100]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	89	74	25	59.1	36.0	-44.2	33.3	1	--
Anti-sense	100	207	20	56.5	50.0	-38.2	31.7	1	--
Product	82	--	134	88.1	53.7	--	--	--	53.6

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer	No Hairpins Found
Sense	None	Found	None	Found	
Anti-sense	None	None	None		

Primer premier: Reverse primer

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	89	74	25	59.1	36.0	-44.2	33.3	1	--
Anti-sense	100	207	20	56.5	50.0	-38.2	31.7	1	--
Product	82	--	134	88.1	53.7	--	--	--	53.6

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer	No Hairpins Found
Sense	None	Found	None	Found	
Anti-sense	None	None	None		

Probe

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	59	74	30	75.5	50.0	-62.7	31.7	1	--

GSTP1 methylation (real-time MSP)

1. *GSTP1*: in silico design

DNA: [NC_000011.10](#)

Exons: 7

Gene ID: 2950

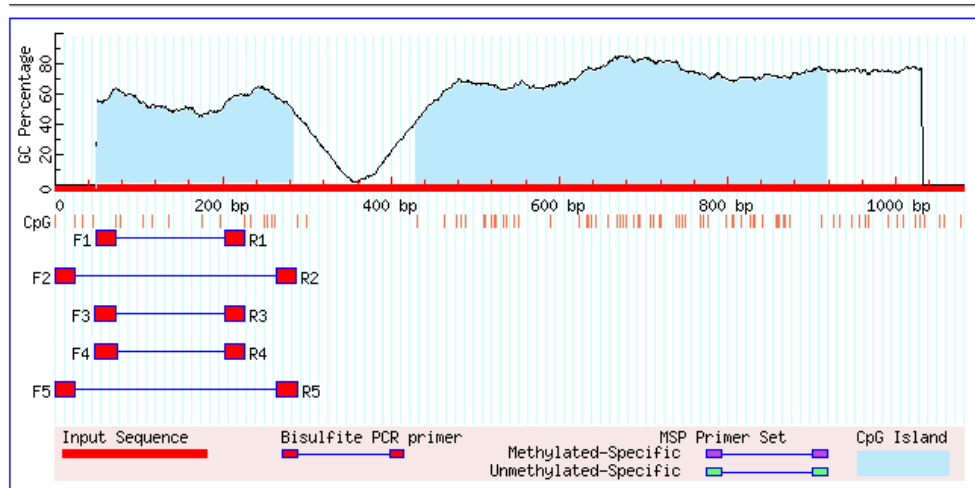
***GSTP1* [ID: 2950, MIM: 134660, NC_000011.10]**

Genomic DNA *GSTP1* (start-end: 1-1080)

CCCAGAACTTCAAATAAAAAGTTGGACGGCCAGGCGTGGTGGCTCACGCCGTGTAATCCCAG
 CACTTTGGGAAGCCGAGGCGTGCAGATCACCTAAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCCGGC
 CAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATCAGCCAGATGTGGCAGGCAC
 CTATAATTCCACCTACTCGGGAGGCTGAAGCAGAATTGCTTGAACCCGAGAGGCGGAGGT
 TGCAGTGAGCCGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCCACAGCGTGAGACTAC
 GTCATAAAAATAAAAATAAAAATAACACAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAAT
 AAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAGCAATTTCC
 TTTCTCTAAGCGGCCTCCACCCCTCTCCCTGCCCTGTGAAGCGGGTGTGCAAGCTCCG
 GGATCGCAGCGGTCTTAGGGAATTTCCCCCGCGATGTCCCGGCGCGCCAGTTCGCTGCG
 CACACTTCGCTGCGGTCTCTTCTGCTGTCTGTTACTCCCTAGGCCCGCTGGGGACC
TGGGAAAGAGGGAAAGGCTTCCCCGGCCAGCTGCGCGGCGACTCCGGGGACTCCAGGGCC
CCCCTCTGCGGCCGACGCCCGGGGTGCAGCGGCCGCGGGGCTGGGGCCGGCGGGAGTCC
GCGGGACCTTCAGAAGAGCGGCCGGCGCCGTGACTCAGCACTGGGGCGGAGCGGGGCGG
GACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGCCGCGAGGCCTTCGCTGGAGTTTCGCCGCCGCAGTC
TTCGCCACCAGTGAGTACGCGCGGCCCGCGTCCCCGGGGATGGGGCTCAGAGCTCCCAGC
 ATGGGGCCAACCCGCAGCATCAGGCCCGGGCTCCCGGCAGGGCTCCTCGCCCACCTCGAG
 ACCCGGGACGGGGCCTAGGGGACCCAGGACGTCCCCAGTGCCGTTAGCGGCTTTCAGGG
 GGCCCGGAGCGCTCGGGGAGGGATGGGACCCCGGGGGCGGGGAGGGGGGCAGACTGCC

Check for CpG island in genomic sequence of *GSTP1*

MethPrimer Result: start-end: 1-1080

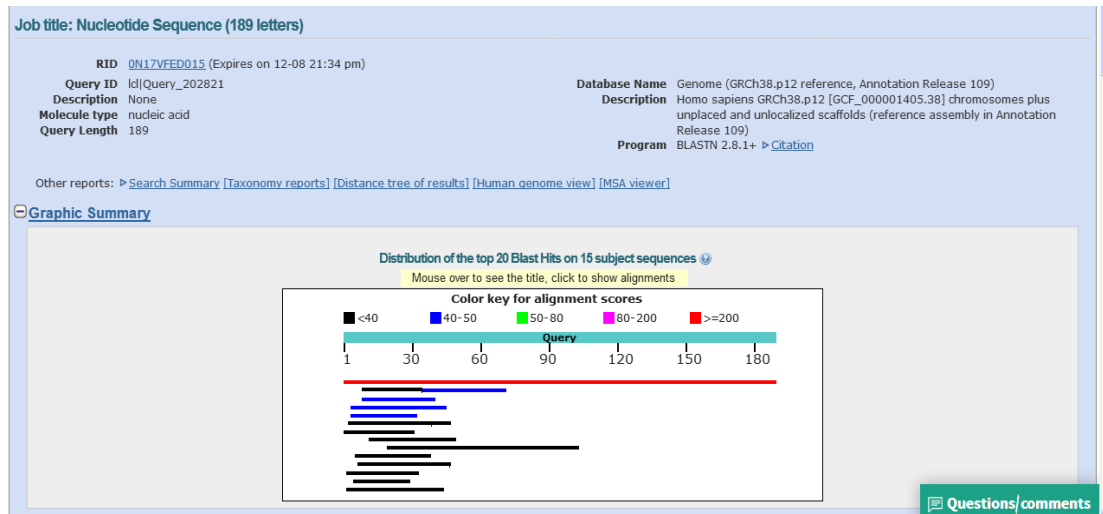


Sequence Name:
 Sequence Length: 1080

CpG island prediction results
 (Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.6)
 2 CpG island(s) were found in your sequence

Island	Size	(Start - End)
Island 1	234 bp	(50 - 283)
Island 2	488 bp	(430 - 917)

BLAST region 189 bp (underlined, product) with whole genome



- **5'-3' converted *GSTP1* (start-end: 1-1080)**

```
TTTAGAATTTTAAATAAAAGTTGGACGGTTAGGCGTGGTGGTTTACGTTTGTAAATTTTAG
TATTTTGGGAAGTCGAGGCGTGTAGATTATTTAAGGTTAGGAGTTCGAGATTAGTTCGGT
TAATATGGTGAAATTTTCGTTTTTATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA
TTATAATTTTATTTATTCGGGAGGTTGAAGTAGAATTGTTTGAATTCGAGAGGCGGAGGT
TGTAGTGAGTCGTCGAGATCGCGTTATTGTATTTTAGTTTGGGTTATAGCGTGAGATTAT
GTTATAAAATAAAATAAAATAATATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAAT
AAAATAAAATAAAATAAAATAAAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAAGTAAATTTT
TTTTTTTTAAGCGGTTTTTATTTTTTTTTTTTTGTTTTGTGAAGCGGGTGTGTAAGTTTCG
GGATCGTAGCGGTTTTAGGGAATTTTTTTTCGCGATGTTTCGGCGCGTTAGTTCGTTGCG
TATATTTTCGTTGCGGTTTTTTTTTTTTGTTTGTATTATTTTTTAGGTTTCGTTGGGGATT
TGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTCGGTTAGTTGCGCGGCGATTTCGGGGATTTTAGGGCG
TTTTTTTTGCGGTTCGACGTTTCGGGGTGTAGCGGTCGTCGGGGTTGGGGTCGGCGGGAGTTT
GCGGGATTTTTTAGAAGAGCGGTCGGCGTCGTGATTTAGTATTGGGGCGGAGCGGGGCGG
GATTATTTTTATAAGGTTTCGGAGGTCGGAGGTTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTCGTAGTT
TTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTCGCGTTTTTCGGGATGGGGTTTAGAGTTTTTAGT
ATGGGGTTAATTCGTAGTATTAGGTTTCGGTTTTTCGGTAGGTTTTTCGTTTATTTTCGAG
ATTTCGGGACGGGGTTTTAGGGGATTTAGGACGTTTTTATGTCGTTAGCGGTTTTTAGGG
GGTTCGGAGCGTTTTTCGGGGAGGGATGGGATTTTCGGGGCGGGAGGGGGGGTAGATTGCG
```

Methylation-specific primers underlined (product: 189 bp)

Primer premier

December 7, 2018

Primer Analysis Report

Page: 1

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' TTGGGGGTGTAGCGGTGTC 3'
 |||
 3' (678) AAGCCCCACATCGCCAGCAG (697) 5'

(Anti-sense primer) 5' AACCCGCGGTACTCACTAATAACG 3'
 |||
 3' (866) TTGGCGGCATGAGTGATTATTGC (843) 5'

Properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μ g/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	73	678	20	65.3	65.0	-42.8	33.7	1	--
Anti-sense	39	866	24	64.9	50.0	-47.4	31.6	1	--
Product	41	--	189	89.4	54.5	--	--	--	57.1

BRCA1 methylation

October 9, 2018

Primer Analysis Report

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' TCGTGGTAACGGAAAAGCGC 3'
 |||
 3' (957) AGCACCATTTGCCTTTTTCGCG (976) 5'

(Anti-sense primer) 5' AAATCTCAACGAACTCAGCCG 3'
 |||
 3' (1031) TTTAGAGTTGCTTGAGTGCGGC (1010) 5'

Properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μ g/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	59	957	20	63.5	55.0	-42.7	31.4	1	--
Anti-sense	71	1031	22	64.1	50.0	-43.7	31.7	1	--
Product	55	--	75	80.6	42.7	--	--	--	50.5

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Disseminating Tumor Cells	DTCs
Cancer Stem Cells	CSCs
Metastasis initiating cells	MICs
Epithelial to Mesenchymal Transition	EMT
microRNAs	miRNAs
Mesenchymal to Epithelial Transition	MET
Cancer-Associated Fibroblasts	CAFs
Circulating Tumor Cells	CTCs
Tumor Associated Macrophages	TAMs
Overall Survival	OS
Progression Free Survival	PFS
Natural Killers	NK
Neutrophil Extracellular Traps	NETs
Matrix Metalloproteinases	MMPs
Transendothelial Migration	TEM
microRNAs	miRNAs
long non coding RNAs	lncRNAs
DNA methyltransferases	DNMTs
8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	8-OHdG

5-methylcytosine	5-mC
CG islands	CGI
Methyl-CpG-binding domain	MBD
Transcriptional Repression Domain	TRD
ten-eleven translocation enzymes	TETs
5-hydroxymethylcytosine	5hmC
5-formilcytosine	5fC
5-carboxylcytosine	5cC
thymine DNA glycosylase	TDG
base excision repair	BER
activation-induced cytidine deaminase	AID
apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide	APOBEC
single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase	SMUG1
circulating tumor DNA	ctDNA
circulating free DNA	cfDNA
minimal residual disease	MRD
mutant allele fraction	MAF
circulating tumor microemboli	CTMs
Extracellular vesicles	EVs

Exosomes	EXOs
circulating tumor RNA	ctRNA
Tumor Educated Platelets	TEP
Estrogen Receptor a	ERa
Progesterone receptor	PR
human epidermal growth factor receptor 2	HER2
American Joint Committee on Cancer	AJCC

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pan Y, Liu G, Zhou F, Su B, Li Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clin Exp Med*. 2018 Feb 27;18(1):1–14.
2. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2016 Sep;4(9):e609–16.
3. About This Website - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Jul 7]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-website>
4. What Is Cancer? - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Jul 7]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
7. Riggi N, Aguet M, Stamenkovic I. Cancer Metastasis: A Reappraisal of Its Underlying Mechanisms and Their Relevance to Treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2018 Jan 24;13(1):117–40.
8. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453–8.
9. Oskarsson T, Batlle E, Massagué J. Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14(3):306–21.
10. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):670–91.
11. Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, Coombes RC, Evans J, Hall JA, et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Mar 4;16(3):185–204.
12. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):283–96.
13. Celià-Terrassa T, Kang Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev*. 2016 Apr 15;30(8):892–908.

14. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol.* 2012 Aug 6;198(3):281–93.
15. Tlsty TD, Coussens LM. TUMOR STROMA AND REGULATION OF CANCER DEVELOPMENT. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006 Feb;1(1):119–50.
16. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016 Jun 30;166(1):21–45.
17. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar 21;15(3):178–96.
18. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007 Jun 17;7(6):415–28.
19. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle.* 2011 Sep 28;10(17):2865–73.
20. Huang RY-J, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AHC, Chung VY, et al. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis.* 2013 Nov 7;4(11):e915–e915.
21. Grigore A, Jolly M, Jia D, Farach-Carson M, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med.* 2016 Apr 29;5(5):51.
22. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015 Sep 3;21(9):998–1009.
23. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871–90.
24. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Feb 20;20(2):69–84.
25. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2012 Aug 1;14(8):777–83.

26. Veracini L, Grall D, Schaub S, Beghelli-de la Forest Divonne S, Etienne-Grimaldi M-C, Milano G, et al. Elevated Src family kinase activity stabilizes E-cadherin-based junctions and collective movement of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2015 Apr 10;6(10):7570–83.
27. Chung Y-C, Wei W-C, Hung C-N, Kuo J-F, Hsu C-P, Chang K-J, et al. Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2016 Dec;46(12):1002–11.
28. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Dec 25;9(12):1392–400.
29. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* (80-). 2013 Feb 1;339(6119):580–4.
30. Khoo BL, Lee SC, Kumar P, Tan TZ, Warkiani ME, Ow SG, et al. Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):15578–93.
31. Ocaña OH, Córcoles R, Fabra Á, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012 Dec 11;22(6):709–24.
32. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell*. 2012 Dec 11;22(6):725–36.
33. del Pozo Martin Y, Park D, Ramachandran A, Ombrato L, Calvo F, Chakravarty P, et al. Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep*. 2015 Dec 22;13(11):2456–69.
34. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. Edison T. Liu, editor. *PLoS Biol*. 2004 Jan 13;2(2):e7.

35. Maheswaran S, Haber DA. Ex Vivo Culture of CTCs: An Emerging Resource to Guide Cancer Therapy. *Cancer Res.* 2015 Jun 15;75(12):2411–5.
36. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015 Jan 1;7(1):1–11.
37. Haber DA, Velculescu VE. Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014 Jun 1;4(6):650–61.
38. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol.* 2011 Feb 7;192(3):373–82.
39. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):781–91.
40. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2014 Apr;15(4):406–14.
41. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell.* 2014 Aug 28;158(5):1110–22.
42. Labelle M, Hynes RO. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* 2012 Dec 1;2(12):1091–9.
43. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H. Activated Platelets Interact with Lung Cancer Cells Through P-Selectin Glycoprotein Ligand-1. *Pathol Oncol Res.* 2012 Oct 26;18(4):989–96.
44. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011 Feb 24;11(2):123–34.
45. Palumbo JS, Talmage KE, Massari J V, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):178–85.
46. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer.* 2016 Jul 10;16(7):431–46.

47. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2013 Dec 22;13(12):858–70.
48. Wu Q Di, Wang JH, Condrón C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Physiol*. 2001 Apr;280(4):C814–22.
49. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development. *Cancer Res*. 2010 Jul 15;70(14):6071–82.
50. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):100–2.
51. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):834–46.
52. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005 Dec 8;438(7069):820–7.
53. Turajlic S, Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science (80-)*. 2016 Apr 8;352(6282):169–75.
54. Carey N, editor. *Epigenetics for Drug Discovery*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2015. 1–19 p. (Drug Discovery).
55. Ollikainen M, Craig JM. Epigenetic discordance at imprinting control regions in twins. *Epigenomics*. 2011 Jun;3(3):295–306.
56. Ferrari F, Alekseyenko AA, Park PJ, Kuroda MI. Transcriptional control of a whole chromosome: emerging models for dosage compensation. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Feb 5;21(2):118–25.
57. Carey N, Royal Society of Chemistry (Great Britain). *Epigenetics for drug discovery*. 5th ed. Reuter SCE and G, editor. Cold Spring Harbor Perspect. Biol; 2013. 321 p.
58. García-Giménez JL. *Epigenetic biomarkers and diagnostics*. 1st ed. García-Giménez JL, editor. Madrid Spain: Elsevier; 2016. 680 p.

59. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol*. 2007 Jun;1(1):26–41.
60. Verma M, editor. *Cancer Epigenetics*. New York, NY: Springer New York; 2015. 16–17 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 1238).
61. Choi JD, Lee J-S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform*. 2013 Dec;11(4):164.
62. Lee D-H, O'Connor TR, Pfeifer GP. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG->TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res*. 2002 Aug 15;30(16):3566–73.
63. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*. 2012 Apr;81(4):303–11.
64. Soussi T, Bérroud C. Significance of TP53 mutations in human cancer: A critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):192–200.
65. Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*. 2004 Aug 3;32(14):4100–8.
66. Chen ZQ, Zhang CH, Kim CK, Xue Y. Quantum mechanics study and Monte Carlo simulation on the hydrolytic deamination of 5-methylcytosine glycol. *Phys Chem Chem Phys*. 2011 Apr 14;13(14):6471.
67. Ziegel R, Shallop A, Upadhyaya P, Jones R, Tretyakova N. Endogenous 5-Methylcytosine Protects Neighboring Guanines from N7 and O 6 -Methylation and O 6 -Pyridyloxobutylation by the Tobacco Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone †. *Biochemistry*. 2004 Jan 20;43(2):540–9.
68. Donkena KV, Young CYF, Tindall DJ. Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010:1–14.
69. Maltseva D V., Baykov AA, Jeltsch A, Gromova ES. Impact of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine on Methylation of the CpG Site by Dnmt3a †. *Biochemistry*. 2009 Feb 17;48(6):1361–8.

70. Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res.* 2010 May 15;2(3):254–84.
71. Zukiel R, Nowak S, Barciszewska A-M, Gawronska I, Keith G, Barciszewska MZ. A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors. *Mol Cancer Res.* 2004 Mar 1;2(3):196–202.
72. Bommarito PA, Fry RC. The Role of DNA Methylation in Gene Regulation. In: *Toxicoepigenetics.* Chapel Hill, NC, United States: Elsevier; 2019. p. 127–51.
73. Wang S, Wu W. DNA Methylation Alterations in Human Cancers. In: *Epigenetics in Human Disease.* Elsevier; 2018. p. 109–39.
74. Ioshikhes IP, Zhang MQ. Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):61–3.
75. Johnson TB, Coghill RD. RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS 1. *J Am Chem Soc.* 1925 Nov;47(11):2838–44.
76. Hotchkiss R. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948 Aug;175(1):315–32.
77. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan 24;187(4173):226–32.
78. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Genome Res.* 1975;14(1):9–25.
79. Bird A. Molecular Biology:DNA Methylation de Novo. *Science (80-).* 1999 Dec 17;286(5448):2287–8.
80. Wallace RG, Twomey LC, Custaud M-A, Moyna N, Cummins PM, Mangone M, et al. Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Epigenetic Drift within the Cardiovascular Compartment. *Biomed Res Int.* 2016 Nov 24;2016:1–10.
81. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Jan 11;38(1):23–38.

82. Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, et al. Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1992 May 11;20(9):2287–91.
83. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene.* 1999 Aug 5;236(1):87–95.
84. Neidhart M. *Complex Human Disease and Complex.* University Hospital Zurich, Switzerland: Elsevier Inc.; 2016. 1–8 p.
85. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12;274(46):33002–10.
86. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 May 9;97(10):5237–42.
87. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 1992 Nov 27;71(5):865–73.
88. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):48350–9.
89. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Jun 21;102(25):8905–9.
90. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):359–83.
91. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009 Nov 30;10(11):805–11.
92. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):247–57.

93. Aapola U, Shibuya K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, et al. Isolation and Initial Characterization of a Novel Zinc Finger Gene, DNMT3L, on 21q22.3, Related to the Cytosine-5- Methyltransferase 3 Gene Family. *Genomics*. 2000 May 1;65(3):293–8.
94. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. 2002 Apr;129(8):1983–93.
95. Aapola U, Lyle R, Krohn K, Antonarakis SE, Peterson P. Isolation and initial characterization of the mouse *Dnmt3l* gene. *Cytogenet Genome Res*. 2001;92(1–2):122–6.
96. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*. 1993 Oct 25;21(21):4886–92.
97. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*. 1989 Aug 11;58(3):499–507.
98. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):905–14.
99. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6538–47.
100. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):185–8.
101. Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, et al. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Mar 30;96(7):3969–74.
102. Hendrich B, Hardeland U, Ng H-H, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. 1999 Sep 16;401(6750):301–4.

103. Petronzelli F, Riccio A, Markham GD, Seeholzer SH, Stoerker J, Genuardi M, et al. Biphasic Kinetics of the Human DNA Repair Protein MED1 (MBD4), a Mismatch-specific DNA N-Glycosylase. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32422–9.
104. Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, et al. Enhanced CpG Mutability and Tumorigenesis in MBD4-Deficient Mice. *Science* (80-). 2002 Jul 19;297(5580):403–5.
105. Wong E, Yang K, Kuraguchi M, Werling U, Avdievich E, Fan K, et al. Mbd4 inactivation increases C>T transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Nov 12;99(23):14937–42.
106. Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):386–9.
107. Ng H-H, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):58–61.
108. Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly. *Mol Cell*. 2004 Aug 27;15(4):595–605.
109. Kimura H, Shiota K. Methyl-CpG-binding Protein, MeCP2, Is a Target Molecule for Maintenance DNA Methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4806–12.
110. Bogdanović O, Veenstra GJC. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct 9;118(5):549–65.
111. Yu F, Zingler N, Schumann G, Strätling WH. Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res*. 2001 Nov 1;29(21):4493–501.
112. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct 13;28(10):1057–68.
113. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):501–2.

114. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*. 2000 Apr 20;10(8):475–8.
115. Paroush Z, Keshet I, Yisraeli J, Cedar H. Dynamics of demethylation and activation of the α -actin gene in myoblasts. *Cell*. 1990 Dec 21;63(6):1229–37.
116. Zhang F, Pomerantz JH, Sen G, Palermo AT, Blau HM. Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Mar 13;104(11):4395–400.
117. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* (80-). 2009 May 15;324(5929):930–5.
118. Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V., Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1129–33.
119. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jun 23;14(6):341–56.
120. Yim RL-H, Kwong YL, Wong KY, Chim CS. DNA Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Front Genet*. 2012;3:233.
121. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415–28.
122. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011 Sep 23;11(10):726–34.
123. Sproul D, Meehan RR. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Brief Funct Genomics*. 2013 May 1;12(3):174–90.
124. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res*. 1982 Apr 24;10(8):2709–21.

125. Diala ES, Hoffman RM. Hypomethylation of HeLa cell DNA and the absence of 5-methylcytosine in SV40 and adenovirus (type 2) DNA: analysis by HPLC. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Jul 16;107(1):19–26.
126. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983 Jan 6;301(5895):89–92.
127. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009 Dec;1(2):239–59.
128. Wild L, Flanagan JM. Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2010 Aug;1806(1):50–7.
129. Hon GC, Hawkins RD, Caballero OL, Lo C, Lister R, Pelizzola M, et al. Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res*. 2012 Feb 1;22(2):246–58.
130. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2006 Apr 26;8(4):416–24.
131. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb;4(2):143–53.
132. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):2042–54.
133. Pfeifer G. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 12;19(4):1166.
134. H ZX and W. *Genetics and Epigenetics in Tumorigenesis: Acting Separately or Linked?* 1st ed. Department of Environmental Health, University of Cincinnati College of Medicine, USA: Austin J Clin Med.; 2014. 1016 p.
135. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Aug 9;10(8):472–84.
136. Diamantis A, Magiorkinis E, Koutselini H. Fine-needle aspiration (FNA) biopsy: historical aspects. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009 Dec 10;47(2):191–7.

137. Hompes D, Ruers T. Incidence and clinical significance of Bevacizumab-related non-surgical and surgical serious adverse events in metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Sep;37(9):737–46.
138. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*. 2018 Jan 29;10:175883591879463.
139. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med*. 2017 Dec 25;11(4):522–7.
140. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med*. 2017 Dec 6;15(1):75.
141. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Sep 2;14(9):531–48.
142. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Mar;40(3):172–86.
143. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes, Chromosom Cancer*. 2019 Apr;58(4):219–32.
144. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med*. 2017 Feb;5(3):46–46.
145. Pinsky PF, Prorok PC, Kramer BS. Prostate Cancer Screening — A Perspective on the Current State of the Evidence. *N Engl J Med*. 2017 Mar 30;376(13):1285–9.
146. Duffy MJ, McDermott EW, Crown J. Blood-based biomarkers in breast cancer: From proteins to circulating tumor cells to circulating tumor DNA. *Tumor Biol*. 2018 Apr 18;40(5):101042831877616.
147. Bhardwaj M, Gies A, Werner S, Schrotz-King P, Brenner H. Blood-Based Protein Signatures for Early Detection of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017 Nov 30;8(11):e128.
148. Surinova S, Radová L, Choi M, Srovnal J, Brenner H, Vitek O, et al. Non-invasive prognostic protein biomarker signatures associated with colorectal cancer. *EMBO Mol Med*. 2015 Sep;7(9):1153–65.

149. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr 24;17(4):223–38.
150. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *J Biol Chem*. 2014 Feb 14;289(7):3869–75.
151. STROUN M, MAURICE P, VASIOUKHIN V, LYAUTEY J, LEDERREY C, LEFORT F, et al. The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jan 25;906(1):161–8.
152. Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang ME, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med*. 2015 Aug;7(8):1034–47.
153. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. Mardis ER, editor. *PLOS Med*. 2016 Dec 20;13(12):e1002198.
154. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6;8(346):346ra92-346ra92.
155. Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2017 Apr 2;21(2):225–32.
156. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2016 Mar 8;35(10):1216–24.
157. Mego M, Cierna Z, Janega P, Karaba M, Minarik G, Benca J, et al. Relationship between circulating tumor cells and epithelial to mesenchymal transition in early breast cancer. *BMC Cancer*. 2015 Dec 22;15(1):533.
158. Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys Biol*. 2012 Feb 1;9(1):016001.

159. Sharma S, Zhuang R, Long M, Pavlovic M, Kang Y, Ilyas A, et al. Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis. *Biotechnol Adv.* 2018 Jul;36(4):1063–78.
160. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* (80-). 2014 Jul 11;345(6193):216–20.
161. Riethdorf S, O’Flaherty L, Hille C, Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Feb 1;125:102–21.
162. Keup C, Storbeck M, Hauch S, Hahn P, Sprenger-Haussels M, Tewes M, et al. Cell-Free DNA Variant Sequencing Using CTC-Depleted Blood for Comprehensive Liquid Biopsy Testing in Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Feb 18;11(2):238.
163. Taylor J, Bebawy M. Proteins Regulating Microvesicle Biogenesis and Multidrug Resistance in Cancer. *Proteomics.* 2019 Jan;19(1–2):1800165.
164. van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr 17;19(4):213–28.
165. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373–83.
166. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):569–79.
167. Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983 Jul;33(3):967–78.
168. Harding C V., Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: Looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):367–71.
169. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Rürger R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017;14(1):1–15.
170. Tucci M, Mannavola F, Passarelli A, Stucci LS, Cives M, Silvestris F. Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget.* 2018 Apr 16;9(29):20826–37.

171. Torrano V, Royo F, Peinado H, Loizaga-Iriarte A, Unda M, Falcón-Perez JM, et al. Vesicle-MaNiA: extracellular vesicles in liquid biopsy and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2016 Aug;29:47–53.
172. Garcia-Romero N, Esteban-Rubio S, Rackov G, Carrión-Navarro J, Belda-Iniesta C, Ayuso-Sacido A. Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application. *Mol Aspects Med*. 2018 Apr;60:27–37.
173. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2007 Jan;1775(1):181–232.
174. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015 Jul 24;523(7559):177–82.
175. Krishnan SR, Luk F, Brown RD, Suen H, Kwan Y, Bebawy M. Isolation of Human CD138+ Microparticles from the Plasma of Patients with Multiple Myeloma. *Neoplasia*. 2016 Jan;18(1):25–32.
176. Wang C-C, Tseng C-C, Chang H-C, Huang K-T, Fang W-F, Chen Y-M, et al. Circulating microparticles are prognostic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2017 Sep 29;8(44):75952–67.
177. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High Prevalence of Mutant KRAS in Circulating Exosome-derived DNA from Early Stage Pancreatic Cancer Patients. *Ann Oncol*. 2017 Jan 18;28(4):mdx004.
178. Stroun M, Anker P, Beljanski M, Henri J, Lederrey C, Ojha M, et al. Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res*. 1978 Oct;38(10):3546–54.
179. Wiczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, Rhyner K, Perruchoud AP, H Block L. Diagnostic and prognostic value of RNA-Proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Vol. 47, Cancer research*. 1988. 6407–6412 p.
180. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002 Oct;48(10):1647–53.

181. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Mar 22;108(12):5003–8.
182. Zaporozhchenko IA, Ponomaryova AA, Rykova EY, Laktionov PP. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Feb 15;18(2):133–45.
183. Pellegrini KL, Sanda MG, Moreno CS. RNA biomarkers to facilitate the identification of aggressive prostate cancer. *Mol Aspects Med*. 2015 Nov;45:37–46.
184. Calverley DC, Phang TL, Choudhury QG, Gao B, Oton AB, Weyant MJ, et al. Significant Downregulation of Platelet Gene Expression in Metastatic Lung Cancer. *Clin Transl Sci*. 2010 Oct;3(5):227–32.
185. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3680–3.
186. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015 Nov 9;28(5):666–76.
187. Peng M, Chen C, Hulbert A, Brock M V., Yu F. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 15;8(40):69162–73.
188. Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun J-L, Lopez-Lopez R, Muinelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro MM. Liquid Biopsy in Oral Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
189. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16(1):80.
190. Lowy DR. Breast Anatomy | SEER Training [Internet]. National Institutes of Health. [cited 2019 Jul 8]. Available from: <https://training.seer.cancer.gov/breast/anatomy/>
191. Winslow T. Anatomy of the Female Breast [Internet]. National Cancer Institute. 2011 [cited 2019 Jul 8]. Available from: <https://www.teresewinslow.com/>

192. Breast Anatomy and How Cancer Starts [Internet]. National Breast Cancer Foundation. 2001 [cited 2019 Jul 8]. Available from: <https://nbcf.org.au/about-national-breast-cancer-foundation/about-breast-cancer/what-you-need-to-know/breast-anatomy-cancer-starts/>
193. WHO | Breast cancer. WHO. 2018;
194. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
195. Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers—blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Mar 2;8(3):142–50.
196. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):623–31.
197. Types of Breast Cancer| Cancer |Breast Cancer | [Internet]. [cited 2019 Jul 8]. Available from: <https://www.diarystore.com/health-and-beauty/diseases/316/types-breast-cancer-cancer-breast-cancer>
198. Allison KH. Molecular Pathology of Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*. 2012 Dec 1;138(6):770–80.
199. Parkin DM. Is the recent fall in incidence of post-menopausal breast cancer in UK related to changes in use of hormone replacement therapy? *Eur J Cancer*. 2009 Jun;45(9):1649–53.
200. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*. 2007 Apr 19;356(16):1670–4.
201. Olsen AH, Bihrmann K, Jensen M-B, Vejborg I, Lynge E. Breast density and outcome of mammography screening: a cohort study. *Br J Cancer*. 2009 Apr 17;100(7):1205–8.
202. Vankrunkelsven P, Kellen E, Lousbergh D, Cloes E, Op de Beeck L, Faes C, et al. Reduction in hormone replacement therapy use and declining breast cancer incidence in the Belgian province of Limburg. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Nov 24;118(2):425–32.

203. Li CI, Daling JR. Changes in Breast Cancer Incidence Rates in the United States by Histologic Subtype and Race/Ethnicity, 1995 to 2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Dec 1;16(12):2773–80.
204. Adami H-O, Hunter DJ (David J, Ligiou P, Mucci LA. Textbook of cancer epidemiology. Third Edit. New York, NY: Oxford University Press; 726 p.
205. Health W, Mortality O, Annuals S, Secretariat O. OECD Health Statistics 2019 Definitions , Sources and Methods Causes of mortality. 2019;01(Icd).
206. Brooke HL, Talbäck M, Hörnblad J, Johansson LA, Ludvigsson JF, Druid H, et al. The Swedish cause of death register. *Eur J Epidemiol.* 2017 Sep 5;32(9):765–73.
207. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424.
208. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse TA. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl).* 2014;8:145–55.
209. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol.* 2005 Oct 3;18(10):1305–20.
210. Joshi H, Press MF. Molecular Oncology of Breast Cancer. In: *The Breast.* 5th Editio. Elsevier; 2018. p. 282–307.
211. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet.* 2014 Sep 1;15(9):585–98.
212. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2016 Apr 1;34(10):1134–50.
213. Van Poznak C, Somerfield MR, Bast RC, Cristofanilli M, Goetz MP, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2015 Aug 20;33(24):2695–704.

214. Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* 2009 Oct 29;11(5):R77.
215. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015 Jan;16(1):25–35.
216. Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2018 Aug;51:22–35.
217. Hinshelwood RA, Clark SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J Mol Med.* 2008 Dec 21;86(12):1315–28.
218. Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, Shipitsin M, Campbell LL, Mani SA, et al. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci.* 2008 Sep 16;105(37):14076–81.
219. Maruyama R, Choudhury S, Kowalczyk A, Bessarabova M, Beresford-Smith B, Conway T, et al. Epigenetic Regulation of Cell Type–Specific Expression Patterns in the Human Mammary Epithelium. Schübeler D, editor. *PLoS Genet.* 2011 Apr 21;7(4):e1001369.
220. Pal B, Bouras T, Shi W, Vaillant F, Sheridan JM, Fu N, et al. Global Changes in the Mammary Epigenome Are Induced by Hormonal Cues and Coordinated by Ezh2. *Cell Rep.* 2013 Feb 21;3(2):411–26.
221. El Helou R, Wicinski J, Guille A, Adélaïde J, Finetti P, Bertucci F, et al. Brief reports: A distinct DNA methylation signature defines breast cancer stem cells and predicts cancer outcome. *Stem Cells.* 2014 Nov;32(11):3031–6.
222. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics.* 2014 Jan 13;9(1):3–12.

223. Felicio PS, Melendez ME, Arantes LMRB, Kerr LM, Carraro DM, Grasel RS, et al. Genetic and epigenetic characterization of the BRCA1 gene in Brazilian women at-risk for hereditary breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 10;8(2):2850–62.
224. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011 May 15;25(10):1010–22.
225. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):242–54.
226. Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Watts GS, Kim CJ, Futscher BW. Agglomerative Epigenetic Aberrations Are a Common Event in Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 2008 Oct 15;68(20):8616–25.
227. Son KS, Kang H-S, Kim SJ, Jung S-Y, Min SY, Lee SY, et al. Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues. *The Breast*. 2010 Dec;19(6):484–8.
228. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Datta Gupta S, Pandya P, et al. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients. *Clin Biochem*. 2010 Mar;43(4–5):373–9.
229. Singh P, Yang M, Dai H, Yu D, Huang Q, Tan W, et al. Overexpression and hypomethylation of flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers. *Mol Cancer Res*. 2008 Nov;6(11):1710–7.
230. Kim SJ, Kang H-S, Chang HL, Jung YC, Sim H-B, Lee KS, et al. Promoter hypomethylation of the N-acetyltransferase 1 gene in breast cancer. *Oncol Rep*. 2008 Mar;19(3):663–8.
231. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-Cadherin Overexpression Is an Indicator of Clinical Outcome in Invasive Breast Carcinomas and Is Associated with CDH3 Promoter Hypomethylation. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5869–77.
232. Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA. Reversal of the Hypomethylation Status of Urokinase (uPA) Promoter Blocks Breast Cancer Growth and Metastasis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):31735–44.
233. Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J. Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Feb 1;63(3):664–73.

234. Cao Y, Li Y, Zhang N, Hu J, Yin L, Pan Z, et al. Quantitative DNA hypomethylation of ligand Jagged1 and receptor Notch1 signifies occurrence and progression of breast carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2015;5(5):1621–34.
235. Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington’s canal. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Aug 15;10(8):526–37.
236. García-Giménez JL. Epigenetic biomarkers and diagnostics. Spain: Elsevier Inc; 2016. 279–312 p.
237. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Med.* 2012;4(3):26.
238. Roll JD, Rivenbark AG, Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Carey LA, et al. Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast cancers: Basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation. *Exp Mol Pathol.* 2013 Dec;95(3):276–87.
239. Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics.* 2014 Dec;6(6):651–64.
240. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1148–59.
241. Fleischer T, Klajic J, Aure MR, Louhimo R, Pladsen A V, Ottestad L, et al. DNA methylation signature (SAM40) identifies subgroups of the Luminal A breast cancer samples with distinct survival. *Oncotarget.* 2017 Jan 3;8(1):1074–82.
242. Shinozaki M. Distinct Hypermethylation Profile of Primary Breast Cancer Is Associated with Sentinel Lymph Node Metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 15;11(6):2156–62.
243. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 1997 Aug 15;57(16):3347–50.
244. Werner H, Bruchim I. IGF-1 and BRCA1 signalling pathways in familial cancer. *Lancet Oncol.* 2012 Dec;13(12):e537–44.

245. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):16–7.
246. BERMAN H, ZHANG J, CRAWFORD YG, GAUTHIER ML, FORDYCE CA, McDERMOTT KM, et al. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells Identify a Subpopulation of Cells Involved in Early Carcinogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005 Jan 1;70(0):317–27.
247. Klotten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res.* 2013 Feb 15;15(1):R4.
248. Chimonidou M, Tzitzira A, Strati A, Sotiropoulou G, Sfikas C, Malamos N, et al. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 2013 Feb;46(3):235–40.
249. Fackler MJ, Lopez Bujanda Z, Umbrecht C, Teo WW, Cho S, Zhang Z, et al. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2014 Apr 15;74(8):2160–70.
250. Wittenberger T, Sleight S, Reisel D, Zikan M, Wahl B, Alunni-Fabbroni M, et al. DNA methylation markers for early detection of women's cancer: promise and challenges. *Epigenomics.* 2014 Jun;6(3):311–27.
251. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659–65.
252. Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2005 Sep;16(8):797–803.
253. Klionsky DJ. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science (80-).* 2000 Dec 1;290(5497):1717–21.
254. Sui B-Q, Zhang C-D, Liu J-C, Wang L, Dai D-Q. HOXB13 expression and promoter methylation as a candidate biomarker in gastric cancer. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):8833–40.

255. Nickel A, Stadler SC. Role of epigenetic mechanisms in epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Transl Res*. 2015 Jan;165(1):126–42.
256. Nowsheen S, Aziz K, Tran PT, Gorgoulis VG, Yang ES, Georgakilas AG. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. *Cancer Lett* January 28, 2014;342(2):213–22.
257. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* April 2009;9(4):265–73.
258. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* December 11, 2012;22(6):725–36.
259. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* February 23, 2007;128(4):683–92.
260. Kerdivel G, Flouriot G, Pakdel F. Modulation of estrogen receptor alpha activity and expression during breast cancer progression. *Vitam Horm* 2013;93:135–60.
261. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* May 15, 1994;54(10):2552–5.
262. Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* June 1, 1995;55(11):2279–83.
263. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991;285:213-9.
264. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 1997;272:903-10.
265. Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, et al. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 1997;272:10853-8.

266. Stenman G, Astrom AK, Roijer E, Sotiropoulou G, Zhang M, Sager R. Assignment of a novel cysteine proteinase inhibitor (CST6) to 11q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76:45-6.
267. Zeeuwen PL, Cheng T, Schalkwijk J. The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol* 2009;129:1327-38.
268. Cheng T, Hitomi K, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Yamamoto K, Nishi K, et al. Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem* 2006;281:15893-9.
269. Gawenda J, Traub F, Lück HJ, Kreipe H, von Wasielewski R. Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:1-6.
270. Murthy RV, Arberman G, Gao J, Roodman GD, Sun XF. Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2293-9.
271. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:764-75.
272. Ai L, Kim W, Kim TY, Fields CR, Massoll NA, Robertson KD, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor cystatin M occurs during breast cancer progression. *Cancer Res* 2006;66:7899-909.
273. Rivenbark AG, Jones WD, Coleman WB. DNA methylation-dependent silencing of CST6 in human breast cancer cell lines. *Lab Invest* 2006;86:1233-42.
274. Schagdarsurengin U, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic inactivation of cystatin M in breast carcinoma. *Oncogene* 2007;26:3089-94
275. CST6: Chr11 - Genome Data Viewer [Internet]. [cited 2019 Jul 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=1474>
276. Fang C, Wei X-M, Zeng X-T, Wang F-B, Weng H, Long X. Aberrant GSTP1 promoter methylation is associated with increased risk and advanced stage of breast cancer: a meta-analysis of 19 case-control studies. *BMC Cancer*. 2015 Dec 19;15(1):920.

277. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci.* 2012;103(5):913–20.
278. Jhaveri MS, Morrow CS. Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene.* 1998;210(1):1–7.
279. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58(20):4515–8.
280. Saxena A, Dhillon VS, Shahid M, Khalil HS, Rani M, Prasad DT, et al. GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp Ther Med.* 2012; 4(6):1097–103.
281. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100(2):169–76.
282. Ronneberg, J. A., Tost, J., Solvang, H. K., Alnaes, G. I. G., Johansen, F. E., Brendeford, E. M., ... Kristensen, V. N. (2008). GSTP1 Promoter Haplotypes Affect DNA Methylation Levels and Promoter Activity in Breast Carcinomas. *Cancer Research*, 68(14), 5562–5571.
283. Chow NW, Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Tam MF, Lai HC, Tu CP. Human glutathione S-transferases. The Ha multigene family encodes products of different but overlapping substrate specificities. *J Biol Chem* 1988;263: 12797–800.
284. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 1999;18:1321–34.
285. Lee WP, Lee CL, Lin HC. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase are essential in the early stage of adriamycin resistance before P-glycoprotein overexpression in HOB1 lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;38:45–51.
286. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11733–7.

287. Jhaveri MS, Morrow CS. Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene* 1998;210:1–7.
288. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225–9
289. Otani Y, Miyake T, Kagara N, Shimoda M, Naoi Y, Maruyama N, et al. BRCA1 promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor for BRCA1-methylated breast cancer. *Cancer Sci.* 2014;105(10): 1369–76
290. Alnaes, G., Ronneberg, J., Kristensen, V., & Tost, J. Heterogeneous DNA Methylation Patterns in the GSTP1 Promoter Lead to Discordant Results between Assay Technologies and Impede Its Implementation as Epigenetic Biomarkers in Breast Cancer. *Gene* 2015; 6(3), 878–900.
291. Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, Edvardsen H, Warnberg F, Bukholm I, et al. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer.* 2013 Dec;13(1):456.
292. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:169–76.
293. Saxena A., Dhillon V., Shahid M., Khalil H., Rani M., Prasad T., et al. GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp Ther Med.* 2012 Dec;4(6):1097–1103.
294. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58: 4515-18.
295. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100: 169-76.
296. Hoque MO, Feng Q, Toure P. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24: 4262-9.

297. Parrella P, Poeta ML, Gallo AP. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5349-54.
298. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11: 2156-62.
299. Lee JS: GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Arch* 2007;450: 637-42.
300. Maxwell A., McCudden C. R., Wians F., Willis, M. S.. Recent Advances in the Detection of Prostate Cancer Using Epigenetic Markers in Commonly Collected Laboratory Samples. *Laboratory Medicine* 2009;40(3),171–8.
301. Foulkes WD, Shuen AY. In Brief: BRCA1 and BRCA2. *J Pathol.* 2013 Aug;230(4):347–9.
302. Al-Moghrabi NM. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells and predisposition to breast cancer. *J Taibah Univ Med Sci.* 2017 Jun 1;12(3):189–93.
303. Vos S, Moelans CB, van Diest PJ. BRCA promoter methylation in sporadic versus BRCA germline mutation-related breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2017 Dec 31;19(1):64.
304. R. Dana Nindrea¹, W. Arif Harahap, T. Aryandono, L. Lazuardi. Association of BRCA1 Promoter Methylation with Breast Cancer in Asia: A Meta- Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19 (4), 885-9.
305. Jacinto FV, Esteller M. Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis* 2007; 22: 247e253.
306. Arver B, Du Q, Chen J, Luo L, Lindblom A. Hereditary breast cancer: a review. *Seminars Cancer Biol* 2000; 10: 271e288.
307. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 2011;12:68–78.
308. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2

mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.

309. Begg CB, Haile RW, Borg A, Malone KE, Concannon P, Thomas DC, et al. Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. *JAMA.* 2008;299:194–201.

310. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci.* 2014;19:605–18.

311. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002;108:171–82.

312. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25:1329–33.

313. Vos S, Van der Groep P, Van der Wall E, Van Diest PJ. Hereditary Breast Cancer Syndromes: Molecular Pathogenesis and Diagnostics. In: eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 1–16.

314. Stefansson OA, Esteller M. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *Am J Pathol.* 2013;183:1052–63.

315. Day TK, Bianco-Miotto T. Common gene pathways and families altered by DNA methylation in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20:R215–32.

316. Nowsheen S, Aziz K, Tran PT, Gorgoulis VG, Yang ES, Georgakilas AG. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. *Cancer Lett.* 2014; 342:213–22.

317. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Med.* 2012;4:26.

318. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol.* 2010;4:242–54.

319. Suijkerbuijk KPM, van Diest PJ, van der Wall E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation. *Ann Oncol.* 2011;22:24–9.

320. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene.* 2002;21:5462–82.

321. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3225–9.
322. Tapia T, Smalley SV, Kohen P, Muñoz A, Solis LM, Corvalan A, et al. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics.* 2008;3:157–63.
323. Dworkin AM, Spearman AD, Tseng SY, Sweet K, Toland AE. Methylation not a frequent “second hit” in tumors with germline BRCA mutations. *Fam Cancer.* 2009;8:339–46.
324. Goodheart MJ, Rose SL, Hattermann-Zogg M, Smith BJ, De Young BR, Buller RE, et al. BRCA2 alteration is important in clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Genet.* 2009;76:161–7.
325. Kontorovich T, Cohen Y, Nir U, Friedman E. Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and P53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116: 195–200.
326. Rennstam K, Ringberg A, Cunliffe HE, Olsson H, Landberg G, Hedenfalk I, et al. Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency. *Genes Chromosom Cancer.* 2010;49:78–90.
327. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz ALT, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer.* 2013;108:2172–7.
328. Toffoli S, Bar I, Abdel-Sater F, Delrée P, Hilbert P, Cavallin F, et al. Identification by array comparative genomic hybridization of a new amplicon on chromosome 17q highly recurrent in BRCA1 mutated triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16:466.
329. Severson TM, Peeters J, Majewski I, Michaut M, Bosma A, Schouten PC, et al. BRCA1-like signature in triple negative breast cancer: molecular and clinical characterization reveals subgroups with therapeutic potential. *Mol Oncol.* 2015;9:1528–38.

330. Tung N, Miron A, Schnitt SJ, Gautam S, Fettes K, Kaplan J, et al. Prevalence and predictors of loss of wild type BRCA1 in estrogen receptor positive and negative BRCA1-associated breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R95.
331. Lisowska KM, Dudaladava V, Jarzab M, Huzarski T, Chmielik E, Stobiecka E, et al. BRCA1-related gene signature in breast cancer: the role of ER status and molecular type. *Front Biosci.* 2011;3:125–36.
332. Magic Z, Supic G. Epigenetics: A New Link Between Nutrition and Cancer. *Nutr Cancer.*
333. Betweenmates.com. Differenza tra SYBR Green e Taqman | SYBR Green vs Taqman - 2019 - Scienza e natura [Internet]. *Scienza e natura.* 2017 [cited 2019 Jul 16]. Available from: <https://it.betweenmates.com/difference-between-sybr-green-and-taqman-11155>
334. LC Green [Internet]. [cited 2019 Jul 16]. Available from: <http://www.spectron.com.cn/product.asp?id=906>
335. Fausel R. Aberrant DNA Methylation in Colorectal Cancer.
336. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Apr 5;92(7):564–9.
337. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Kouneli S, Georgoulas V, Lianidou E, et al. Direct comparison study of DNA methylation markers in EpCAM-positive circulating tumour cells, corresponding circulating tumour DNA, and paired primary tumours in breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Sep 22;8(42):72054–68.