

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός των  
μικρομεταστατικών κυττάρων ασθενών με καρκίνο  
του μαστού**

**ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

**Φεβρουάριος 2015**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

**Θεοδωρόπουλος Παναγιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Θεοδωρόπουλος Παναγιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Αγγελάκη Σοφία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Γεωργούλιας Βασίλειος**, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## **ΛΟΙΠΑ ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Μαυρουδής Δημήτριος**, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Κωτσάκης Αθανάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Κουτσόπουλος Αναστάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Ποντίκογλου Χαράλαμπος**, Επίκουρος Καθηγητής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Μέρος της παρούσας μελέτης υποστηρίχθηκε οικονομικά στα πλαίσια προγράμματος με τίτλο «Υποτροφίες Τμήματος Ιατρικής» του Πανεπιστημίου Κρήτης (κωδικός αριθμός: 2802) και από το Κληροδότημα «Μαρίας Μιχαήλ Μανασσάκη».*

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα κ. Θεοδωρόπουλο Παναγιώτη, Αν. Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, για την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, αλλά και την πολύτιμη βοήθειά του στη συγγραφή του έργου. Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Γεωργούλια Βασίλη, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, καθώς επίσης και για τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης πολύ την κ. Αγγελάκη Σοφία, Επ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στον κ. Μαυρουδή Δημήτρη, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την πολύτιμη συμβολή του στην ερευνητική μου αυτή προσπάθεια, καθώς επίσης και τον κ. Σουγγιάκο Γιάννη, Επ. Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης σε όλους τους συνεργάτες και φίλους στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου. Ιδιαίτερως ευχαριστώ τη Γαλάτεια Καλλέργη για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη από το 2007 κατά την εκπόνηση της προπτυχιακής μου εργασίας μέχρι και σήμερα, αλλά και για το ενδιαφέρον και την αμέριστη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια.

Με όλη μου την αγάπη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για όσα μου πρόσφεραν απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και για τη συνεχή ενθάρρυνση και συμπαράσταση που έλαβα από αυτούς καθ' όλη τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας. Από καρδιάς ευχαριστώ την αδερφή μου για τις αμέτρητες ώρες που διαβάσαμε παρέα και κυρίως γιατί πιστεύει σε μένα και είναι πάντα δίπλα μου. Τέλος, ευχαριστώ το σύντροφο της ζωής μου για την ανεκτίμητη συμπαράσταση και υπομονή του όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την αγάπη και την εμπιστοσύνη του δεν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω αυτό το έργο.

*Στην οικογένειά μου,  
στον άντρα μου*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	9
Abstract.....	19
<b>1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>27</b>
1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ, ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	28
1.2. ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	29
1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	34
1.3.1. Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMM).....	34
1.3.2. Καρκινικά βλαστικά κύτταρα (ΚΒΚ).....	38
1.3.3. Συσχέτιση μεταξύ EMM και ΚΒΚ.....	41
1.3.4. Θεραπευτική στόχευση καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστικά EMM και ΚΒΚ.....	44
1.4. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	46
1.4.1. Σημασία της μελέτης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ).....	46
1.4.2. Μεθοδολογίες ταυτοποίησης των ΚΚΚ.....	48
1.4.2.1. Τεχνικές εμπλουτισμού των ΚΚΚ.....	48
1.4.2.2. Μέθοδοι ανίχνευσης των ΚΚΚ.....	50
1.4.3. Κλινική σημασία της ανίχνευσης των ΚΚΚ στον καρκίνο του μαστού.....	54
1.4.4. Κλινική σημασία της φαινοτυπικής ανάλυσης των ΚΚΚ.....	56
1.5. ΚΚΚ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΚΒΚ ΚΑΙ EMM ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	58
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>64</b>
<b>3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>67</b>
3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	68
3.1.1. Καλλιέργεια καρκινικών σειρών.....	68
3.1.2. Καταμέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και οπτικής μικροσκοπίας.....	71
3.1.3. Εμπλουτισμός δειγμάτων περιφερικού αίματος των ασθενών σε ΚΚΚ.....	72

3.1.3.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης.....	73
3.1.3.2. Ανοσομαγνητική απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων.....	74
3.1.4. Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.....	76
3.1.5. Ανοσοφθορισμός.....	77
3.1.5.1. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους πλάκες.....	78
3.1.5.2. Άμεσος ανοσοφθορισμός σε κυτταρικά εναιωρήματα για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	80
3.1.6. Λειτουργική δοκιμή ALDEFLUOR για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH.....	82
3.1.7. Συστήματα μικροσκοπίας.....	84
3.1.7.1. Οπτική μικροσκοπία.....	84
3.1.7.2. Μικροσκοπία φθορισμού.....	85
3.1.7.3. Σύστημα ημι-αυτοματοποιημένης μικροσκοπίας ARIOL.....	86
3.1.7.4. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser.....	87
3.1.8. Κυτταρομετρία ροής.....	88
3.1.9. Μέθοδος στυπώματος κατά Western ή μέθοδος ανοσοαποτύπωσης.....	90
3.1.9.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα καρκινικών σειρών.....	91
3.1.9.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	92
3.1.9.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	93
3.1.9.4. Ανοσοαποτύπωση.....	95
3.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	98
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>100</b>
4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ ΕΜΜ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ.....	101
4.1.1. Ασθενείς.....	101
4.1.2. Προσδιορισμός των φαινότυπων ΚΒΚ και ΕΜΜ στις καρκινικές σειρές ελέγχου και σε σειρές μαστού.....	101

4.1.3. Ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ και EMM σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.....	106
4.1.4. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ και EMM σε ασθενείς με πρόιμη και μεταστατική νόσο.....	108
4.1.5. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με συνέκφραση των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM σε ασθενείς πρόιμου και μεταστατικού σταδίου.....	112
4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΚΚΚ ΩΣ ΠΡΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ EMM ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ.....	116
4.2.1. Ασθενείς.....	116
4.2.2. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν και μετά τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής.....	118
4.2.3. Συχνότητα εμφάνισης των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM στα ΚΚΚ των ασθενών πριν και μετά τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής.....	118
4.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ EMM ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ.....	126
4.3.1. Συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών.....	126
4.3.2. Συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ και EMM με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών.....	129
4.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ALDH ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ALDH1.....	133
4.4.1. Έλεγχος ενζυμικής ενεργότητας της ALDH σε καρκινικές σειρές μαστού.....	133
4.4.2. Σύγκριση των επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας ALDH και πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 στις σειρές μαστού.....	135
4.5. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ALDH ΣΤΑ ΚΚΚ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ALDH1.....	138

4.5.1. Ασθενείς.....	138
4.5.2. Ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού.....	138
4.5.3. Συγκριτική μελέτη της συχνότητας των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH και υψηλή έκφραση ALDH1 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.....	142
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>147</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>166</b>
Πίνακας Συντμήσεων.....	206
Δημοσίευση στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής.....	207



## Περίληψη

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πρώτη αιτία νόσησης από καρκίνο στις γυναίκες, ο οποίος αρκετά συχνά διαγιγνώσκεται σε πρώιμα στάδια και αντιμετωπίζεται επιτυχώς [1]. Παρόλα αυτά, σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών αναπτύσσονται δευτεροπαθείς μεταστάσεις, οι οποίες αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο [2]. Ο ακριβής μηχανισμός της διαδικασίας ανάπτυξης μεταστάσεων δεν έχει έως σήμερα αποσαφηνιστεί πλήρως, γεγονός που καθιστά επιτακτική την εκτενέστερη μελέτη του.

Πληθώρα δεδομένων που προκύπτουν από μελέτες με καρκινικές σειρές και μοντέλα ζώων, καθώς και από ασθενείς με καρκίνο, υποδεικνύουν ότι η δημιουργία μεταστάσεων είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία [3]. Τα κύρια στάδια του μεταστατικού μηχανισμού είναι αρχικά ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων στην πρωτοπαθή εστία, η διείσδυσή τους στο μεσοκυττάριο χώρο που περιβάλλει τον πρωτοπαθή όγκο, η είσοδός τους στη συστηματική κυκλοφορία (ενδαγγείωση), όπου μετακινούνται είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε ως συσσωματώματα κυττάρων. Ακολουθεί η μετανάστευσή τους σε απομακρυσμένα σημεία, η έξοδος από την κυκλοφορία (εξαγγείωση) και η διείσδυση σε νέους ιστούς προκειμένου να σχηματίσουν μικρομεταστάσεις. Τέλος, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους στα δευτερεύοντα όργανα που έχουν προσβληθεί οδηγεί στην ανάπτυξη μακροσκοπικά ορατών μεταστάσεων. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που ανιχνεύονται είτε ως διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (ΔΚΚ) σε δευτεροπαθείς εστίες, είτε ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ) στο περιφερικό αίμα των ασθενών, αποτελούν τα μικρομεταστατικά κύτταρα [4;5].

Όπως προκύπτει από πολλές μελέτες έως σήμερα, η ανίχνευση ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με καρκίνο μαστού αποτελεί ανεξάρτητο και ισχυρό δείκτη αυξημένης πιθανότητας υποτροπής και μειωμένης ολικής επιβίωσης, τόσο στην πρώιμη όσο και τη μεταστατική νόσο [6-8]. Επιπλέον, η παρουσία ΚΚΚ σε ασθενείς με καρκίνο μαστού έχει συσχετιστεί με μειωμένη ανταπόκριση στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα [9]. Πέραν όμως της εκτίμησης της παρουσίας των ΚΚΚ, ο μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους αποτελεί κεντρικό θέμα σημαντικής ερευνητικής προσπάθειας από πολλές ομάδες, καθώς δεν διαθέτουν όλα τα ΚΚΚ το ίδιο μεταστατικό δυναμικό [10;11]. Η περαιτέρω μοριακή ανάλυσή τους θα μπορούσε να

αναδειξεί τα χαρακτηριστικά εκείνα που ευοδώνουν τη μεταστατική διαδικασία, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της μετάστασης [12]. Επιπλέον, η μελέτη των ΚΚΚ παρέχει τη δυνατότητα του προσδιορισμού του μοριακού προφίλ του όγκου ανά πάσα χρονική στιγμή και επομένως θεωρείται ως μια υγρή βιοψία «πραγματικού χρόνου». Η ανίχνευση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με επιθετική κλινική συμπεριφορά ή με αντίσταση στη θεραπεία στα ΚΚΚ είναι δυνατόν να ταυτοποιήσει υποομάδες ασθενών με φτωχή πρόγνωση [13]. Οι ασθενείς αυτοί πιθανόν είναι υποψήφιοι για πιο επιθετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις ή για θεραπεία με νέους στοχεύοντες παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να επιλεγούν ακόμη και με βάση την έκφραση μορίων-στόχων στα ίδια τα ΚΚΚ [14;15]. Για τους παραπάνω λόγους, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες τεχνικές για την ανίχνευση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με καρκίνο [16;17].

Μία σημαντική διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη μεταστάσεων είναι η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM) των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή η σταδιακή μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου σε φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων [18]. Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα διευκολύνει όχι μόνον την αρχική τους διείσδυση μέσω του πρωτοπαθούς όγκου, αλλά και την ενδαγγείωση και μετακίνησή τους μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, καθώς επίσης και την εξαγγείωση και τελικά τη διείσδυσή τους στο νέο όργανο [19]. Παρόλα αυτά, έχειδειχθεί ότι κατά την τελική φάση του αποικισμού των καρκινικών κυττάρων στο νέο ιστό, ο επιθηλιακός τους φαινότυπος επανακτάται μέσω της αντίστροφης διαδικασίας της μεσεγχυματο-επιθηλιακής μετάβασης (MEM) [20]. Μία από τις κύριες αλλαγές που παρατηρούνται κατά την EMM αφορά στο πρότυπο έκφρασης των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού, όπου παρατηρείται γενικά σημαντική μείωση στην έκφραση της κυτταροκερατίνης, με παράλληλη αύξηση στην έκφραση της βιμεντίνης, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό δείκτη EMM και εμφανίζεται απαραίτητη για τη διείσδυση και ενδαγγείωση των καρκινικών κυττάρων [21;22]. Επιπλέον, σημαντική αλλαγή παρατηρείται στην έκφραση των μορίων που ενέχονται στις διακυτταρικές επαφές, η οποία έχει βρεθεί ότι επάγεται μέσω μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι οι TWIST, SNAIL και SLUG. Ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό δείκτη EMM, ο οποίος ενέχεται σε διάφορα στάδια της

μεταστατικής διαδικασίας, όπως η αρχική διείσδυση και η ενδαγγείωση των καρκινικών κυττάρων [23;24]. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας χαρακτηριστικών συμβατών με EMM στον πρωτοπαθή όγκο των ασθενών με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία, αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη επιβίωση [25-27].

Όπως υποδεικνύεται από πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια, η EMM σχετίζεται άμεσα με τη γένεση καρκινικών βλαστικών κυττάρων (KBK) [28;29]. Τα KBK έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, ως ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων με ιδιότητες χαρακτηριστικές των βλαστικών κυττάρων. Σύμφωνα με το μοντέλο των KBK, τα κύτταρα αυτά θεωρούνται ως τα μόνα ικανά να «αυτο-ανανεώνονται», να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα και να διαφοροποιούνται, επάγοντας το σχηματισμό όλων των κυτταρικών υποπληθυσμών που απαρτίζουν τον πρωτοπαθή όγκο [30;31]. Επιπλέον είναι γνωστό ότι τα KBK συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη μεταστάσεων, καθώς ευθύνονται για τη διασπορά του πρωτοπαθούς όγκου, δίνοντας γένεση σε όλους τους υποπληθυσμούς του [32;33]. Στον καρκίνο του μαστού, ως KBK έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί αποτελεσματικά από καρκινικές σειρές και όγκους τα κύτταρα που φέρουν το φαινοτυπικό προφίλ υψηλής έκφρασης CD44 και απύσας ή χαμηλής έκφρασης CD24 (CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-low</sup>) [34;35], καθώς επίσης και εκείνα με υψηλή ενζυμική ενεργότητα της αλδεϋδικής δεϋδρογονάσης (Aldehyde dehydrogenase - ALDH) [36;37]. Η πρωτεϊνική έκφραση του ισοένζυμου ALDH1A1 έχει επίσης χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως δείκτης KBK, ωστόσο αντικρουόμενα εμφανίζονται τα δεδομένα της βιβλιογραφίας σχετικά με την ενεργότητα των 19 συνολικά διαφορετικών ισοένζυμων της ALDH που εκφράζονται σε καρκινικές σειρές και επιθηλιακούς όγκους μαστού [37-39]. Επιπλέον, *in vitro* και *in vivo* μελέτες υποστηρίζουν ότι τα KBK εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση σε ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και ορμονοθεραπεία [40], ενώ η παρουσία τους στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με καρκίνο μαστού έχει συσχετιστεί με χειρότερη κλινική έκβαση [36;41].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η EMM και η προτεινόμενη θεωρία των KBK πιστεύεται ότι κατέχουν σημαντική θέση στην βιολογία των ΚΚΚ. Η παρουσία δεικτών KBK ή EMM στα ΚΚΚ πιθανόν ταυτοποιεί έναν κυτταρικό υποπληθυσμό με αυξημένη ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και ενισχυμένη ικανότητα να

δημιουργεί μεταστάσεις. Στα πλαίσια αυτά, το 2010 η ομάδα μας έδειξε ότι τα ΚΚΚ των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού εκφράζουν πράγματι σημαντικούς δείκτες ΚΒΚ, όπως είναι το προφίλ  $CD44^{high}/CD24^{-low}$  και η υψηλή έκφραση της ALDH1, σε επίπεδο μονήρων ΚΚΚ [42]. Επιπλέον, σε μελέτη της ομάδας μας το 2011, διαπιστώθηκε ότι τα ΚΚΚ ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού είναι δυνατόν να βρίσκονται σε μία ενδιάμεση κατάσταση EMM, εκφράζοντας παράλληλα επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως είναι η βιμεντίνη και ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε επιπλέον ότι η συχνότητα των ΚΚΚ με φαινότυπο ενδιάμεσης EMM ήταν σημαντικά αυξημένη στο μεταστατικό παρά το πρώιμο στάδιο, υποδεικνύοντας την επιλογή τους κατά τη μεταστατική εξέλιξη της νόσου [43]. Όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια διερευνούν με διάφορες μεθοδολογίες την παρουσία δεικτών για EMM και ΚΒΚ στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού [44;45], εντούτοις δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να περιγράφουν το φαινόμενο σε καλά καθορισμένες ομάδες με μεγάλους αριθμούς ασθενών. Επιπλέον, δεν έχει δειχθεί έως σήμερα η σύγχρονη έκφραση δεικτών ΚΒΚ και EMM στα ΚΚΚ σε επίπεδο μονήρων κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω, σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη για τη διερεύνηση της παρουσίας ΚΚΚ που φέρουν παράλληλα φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Στόχος ήταν η διερεύνηση της συχνότητάς τους σε ασθενείς με πρώιμη και μεταστατική νόσο, η εκτίμηση της πιθανής αντίστασής τους στη χημειοθεραπεία, καθώς επίσης της προγνωστικής τους αξίας.

Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία τριπλού ανοσοφθορισμού σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών, μέσω της οποίας ελέγχθηκε η έκφραση των κυτταροκερατινών 8, 18 και 19 για τον εντοπισμό των ΚΚΚ, ενώ ως δείκτες ΚΒΚ και EMM χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα η ALDH1 και το TWIST. Η συνέκφραση των παραπάνω μορίων αξιολογήθηκε σε επίπεδο μονήρων κυττάρων μέσω του ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος μικροσκοπίας φθορισμού ARIOL. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, διερευνήθηκαν αρχικά τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης της ALDH1 και του TWIST σε κατάλληλες σειρές ελέγχου και σε τρεις καρκινικές σειρές μαστού, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, οι οποίες είναι αντιπροσωπευτικές των κύριων μοριακών υπότυπων του καρκίνου του μαστού, HER2-θετικού, ορμονο-θετικού και τριπλά-αρνητικού, αντιστοίχως. Ειδικότερα, η έκφραση της ALDH1 χαρακτηρίστηκε ως

υψηλή (ALDH1<sup>high</sup>) και χαμηλή ή απύσα (ALDH1<sup>low/neg</sup>), έπειτα από ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω του συστήματος ARIOL, ενώ η έκφραση του TWIST χαρακτηρίστηκε βάσει της υποκυττάριας εντόπισής του σε πυρηνική (TWIST<sup>nuc</sup>) και κυτταροπλασματική ή απύσα (TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Σύμφωνα με τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, ως φαινότυπος KBK και EMM ορίστηκε η υψηλή έκφραση της ALDH1 και η πυρηνική εντόπιση του TWIST, αντιστοίχως [38;46]. Επιπλέον, μέσω μίας σειράς πειραμάτων ελέγχου με τη χρήση των παραπάνω καρκινικών σειρών, καθώς επίσης και δείγματος φυσιολογικών αιμοδοτών, επιβεβαιώθηκε η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης των δύο δεικτών στα ΚΚΚ.

Ακολούθως, η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε στα ΚΚΚ 80 ασθενών με πρώιμο και 50 με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Όπως διαπιστώθηκε, οι δύο δείκτες ανιχνεύτηκαν στα ΚΚΚ στο σύνολο σχεδόν των ασθενών που μελετήθηκαν, ωστόσο το προφίλ της έκφρασής τους διέφερε μεταξύ των δύο κλινικών σταδίων. Η συχνότητα των ΚΚΚ με φαινότυπο KBK (ALDH1<sup>high</sup>) ήταν σημαντικά αυξημένη στη μεταστατική νόσο, σε αντίθεση με την πρώιμη, όπου ανιχνεύτηκαν κυρίως ΚΚΚ μη-βλαστικού φαινότυπου (ALDH1<sup>low/neg</sup>). Επιπλέον, η παρουσία των ΚΚΚ με φαινότυπο ενδιάμεσης EMM (TWIST<sup>nuc</sup>) ήταν σημαντικά συχνότερη στο μεταστατικό στάδιο, ενώ αντίθετως στο πρώιμο ανιχνεύθηκαν συχνότερα ΚΚΚ επιθηλιακού φαινότυπου (TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Αξιολογώντας στη συνέχεια τη συνέκφραση των δύο μορίων σε επίπεδο κυττάρου, διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των ασθενών με μεταστατική νόσο είχε ανιχνεύσιμα ΚΚΚ που έφεραν παράλληλα τους δύο φαινότυπους (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>), σε αντίθεση με τους ασθενείς πρώιμου σταδίου, οι οποίοι εμφάνισαν κυρίως ΚΚΚ μη-βλαστικού επιθηλιακού φαινότυπου (ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Η συσχέτιση μεταξύ των δύο φαινότυπων στα ΚΚΚ των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και στατιστικά. Η παρούσα μελέτη προσέφερε μία νέα, ευαίσθητη και ειδική μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό των ΚΚΚ ως προς τη συνέκφραση δύο πολύ σημαντικών δεικτών KBK και EMM. Η διαπίστωση ότι σε κάθε εξελικτικό στάδιο του καρκίνου μαστού παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των δύο δεικτών, αφενός αναδεικνύει τη σημασία της φαινοτυπικής ανάλυσης των ΚΚΚ, αφετέρου αντικατοπτρίζει τη δυναμική της εξέλιξης των χαρακτηριστικών KBK και EMM. Το γεγονός ότι η συχνότητα των ΚΚΚ με σύγχρονη έκφραση των φαινότυπων KBK και ενδιάμεσης

EMM ήταν σημαντικά αυξημένη στη μεταστατική νόσο υποδεικνύει επίσης ότι ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός ΚΚΚ επιλέγεται κατά την εξέλιξη της νόσου λόγω της συμμετοχής τους στη μεταστατική διαδικασία. Τέλος, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η συνέκφραση δύο σημαντικών δεικτών ΚΒΚ και EMM σε επίπεδο μονήρων ΚΚΚ, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τη συσχέτιση μεταξύ τους, ενώ για πρώτη φορά δείχθηκε ότι οι δύο φαινότυποι μεταβάλλονται παράλληλα στα ΚΚΚ κατά τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της χημειοθεραπείας στη συχνότητα ανίχνευσης των ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM. Για το σκοπό αυτό, η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε μία μεγαλύτερη και καλά καθορισμένη ομάδα 154 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν την έναρξη της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. Στους ασθενείς με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ πριν τη θεραπεία, ελέγχθηκε επιπλέον δείγμα αμέσως μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Τα ΚΚΚ που ανιχνεύθηκαν πριν τη θεραπεία στην πλειοψηφία τους έφεραν τους φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM, παρατήρηση η οποία επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και μετά τη θεραπεία. Παρόλο που στην πλειοψηφία των ασθενών η θεραπεία οδήγησε σε μείωση ή πλήρη εξάλειψη των συνολικών ΚΚΚ, εντούτοις είχε επίσης ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των ΚΚΚ με χαρακτήρες ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM, ενώ ακόμη μεγαλύτερη και στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση των ΚΚΚ που έφεραν παράλληλα τους δύο φαινότυπους. Τα παραπάνω ευρήματα προσφέρουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα ΚΚΚ με χαρακτηριστικά ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM εμφανίζουν αυξημένη χημειο-αντίσταση, με αποτέλεσμα να επιλέγονται έπειτα από τη χορήγηση χημειοθεραπείας. Η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι η ανθεκτικότητα των ΚΚΚ στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα ενισχύεται σημαντικά από τη σύγχρονη παρουσία των χαρακτηριστικών ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM, αναδεικνύοντας περαιτέρω τη συμμετοχή του συγκεκριμένου υποπληθυσμού ΚΚΚ στη μεταστατική διαδικασία.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έδειξαν επίσης για πρώτη φορά την προγνωστική σημασία της ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω της μικροσκοπίας ARIOL. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των συνολικών ΚΚΚ, τόσο πριν, όσο και μετά τη χημειοθεραπεία, συσχετίστηκε με πρόοδο νόσου στο τέλος της χημειοθεραπείας, ενώ η παρουσία τους πριν τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε επίσης με συνολική επιβίωση των ασθενών μικρότερη της διαίτας. Επιπλέον, η παρουσία

ΚΚΚ με χαρακτήρα ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM συσχετίστηκε με την παρουσία μεταστάσεων σε συγκεκριμένα όργανα, όπως τα οστά και τους πνεύμονες, ωστόσο, αντικρουόμενα δεδομένα προέκυψαν όσον αφορά στην προγνωστική τους αξία ως προς την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση. Παρόλο που η χημειοθεραπεία οδήγησε σε σημαντική αύξηση των ΚΚΚ με χαρακτήρες ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM αποκλειστικά στους ασθενείς που έκαναν πρόοδο νόσου και όχι σε εκείνους που ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία, εντούτοις η παρουσία των συγκεκριμένων κυτταρικών υποπληθυσμών συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και αυξημένη επιβίωση έως την υποτροπή. Η παραπάνω παρατήρηση ενδεχομένως οφείλεται σε στατιστικό λάθος, καθώς στην παρούσα ανάλυση εντάχθηκαν αποκλειστικά οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία, οι οποίοι πιθανότατα συνιστούν μία ομάδα ασθενών κακής πρόγνωσης. Η αξιολόγηση όλων των ασθενών μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας και η εκτίμηση της κλινικής τους πορείας αναμένεται να συμβάλλουν στην αποσαφήνιση της προγνωστικής σημασίας της ανίχνευσης ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν τα ΚΚΚ που εμφανίζουν το φαινότυπο ΚΒΚ όπως ορίστηκε βάσει της υψηλής έκφρασης του ισοένζυμου ALDH1A1, φέρουν και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ΚΒΚ. Ως δείκτης λειτουργικότητας ΚΒΚ χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της ALDH, ο έλεγχος της οποίας πραγματοποιήθηκε μέσω κατάλληλης μεθοδολογίας, γνωστής ως δοκιμή ALDEFLUOR με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής [47]. Η συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής ενεργότητας ALDH και της υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 διερευνήθηκε αρχικά μέσω μίας σειράς πειραμάτων ανοσοφθορισμού, ανοσοαποτύπωσης και δοκιμής ALDEFLUOR στη σειρά ελέγχου HepG και τις τρεις αντιπροσωπευτικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Θετική συσχέτιση μεταξύ ενεργότητας και έκφρασης διαπιστώθηκε στα κύτταρα ελέγχου HepG2, σε αντίθεση με τις σειρές μαστού, όπου το ποσοστό των κυττάρων με υψηλή έκφραση ALDH1 ήταν μεγαλύτερο από ότι εκείνων με υψηλή ενεργότητα ALDH, υποδεικνύοντας ότι το ισοένζυμο ALDH1A1 που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα μαστού δεν είναι πάντοτε ενζυμικά ενεργό. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω του συστήματος ARIOL επιτρέπει την ταυτοποίηση του κυτταρικού πληθυσμού που εκφράζει την ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη

ALDH1, ωστόσο παράλληλα ανιχνεύει και τα κύτταρα στα οποία η πρωτεΐνη είναι ανενεργή. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα κύτταρα ελέγχου HepG2 επιβεβαιώνουν ότι δεν πραγματοποιείται απώλεια του ενζυμικά ενεργού κυτταρικού πληθυσμού. Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της υψηλής έκφρασης ALDH1 με την ενεργότητα ALDH στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Η μέθοδος ανίχνευσης της ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ αναπτύχθηκε μέσω μίας σειράς πειραμάτων σε διαδοχικές αραιώσεις των καρκινικών κυττάρων της κάθε σειράς σε απομονωμένα μονοπύρηνια κύτταρα αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών (αραιώσεις των 10, 100, 1.000 και 10.000 κυττάρων ανά  $10^6$  αιμοποιητικών κυττάρων). Η ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης της έκφρασης των μορίων της επιφάνειας EpCAM και CD45, έναντι της κυτταροκερατίνης, καθώς η δοκιμή ALDEFLUOR δεν επιτρέπει τη σύγχρονη ταυτοποίηση ενδοκυττάρων μορίων. Σε συμφωνία με άλλες μελέτες ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω κυτταρομετρίας ροής, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, ωστόσο στις μεγάλες αραιώσεις των 10 και 100 καρκινικών κυττάρων παρατηρήθηκε υπερεκτίμηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η ανίχνευση της ενεργότητας της ALDH πραγματοποιήθηκε με μεγάλη ευαισθησία στο σύνολο των αραιώσεων, ωστόσο και εδώ η παρατηρήθηκε μείωση της ποσοστιαίας ενεργότητας με την αυξανόμενη αραιώση των καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε ενδείκνυται για ασθενείς με υψηλό φορτίο ΚΚΚ.

Ακολούθως, επιλέχθηκε ένα μικρό δείγμα εννέα ασθενών με μεταστατική νόσο και πολλαπλές μεταστάσεις, οι οποίοι είχαν λάβει τουλάχιστον δύο γραμμές χημειοθεραπείας. Στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκε παράλληλα έλεγχος της υψηλής ενεργότητας ALDH και της υψηλής έκφρασης ALDH1 στα ΚΚΚ, μέσω κυτταρομετρίας ροής και της μικροσκοπίας ARIOL, αντίστοιχα. Όπως διαπιστώθηκε, στατιστικά σημαντική ήταν η συσχέτιση τόσο του αριθμού των ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν με τις δύο μεθόδους, όσο και μεταξύ του αριθμού των ΚΚΚ με υψηλή ALDH ενεργότητα και υψηλή ALDH1 έκφραση. Επομένως, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι η έκφραση της ALDH1 στα ΚΚΚ των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού σχετίζεται θετικά με την ενεργότητα του ενζύμου, επιβεβαιώνοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω του ARIOL ταυτοποιεί τον πληθυσμό των ΚΚΚ που εμφανίζει δραστηριότητα ΚΒΚ. Τέλος, μέσω της κυτταρομετρίας ροής ήταν



δυνατή η εκτίμηση της ενεργότητας της ALDH στο σύνολο CD45-αρνητικών κυττάρων ανεξάρτητα από την έκφραση του EpCAM, στα οποία συμπεριλαμβάνεται μεταξύ άλλων ο υποπληθυσμός των ΚΚΚ με πλήρη απώλεια έκφρασης επιθηλιακών δεικτών στα πλαίσια της ολοκληρωμένης EMM. Όπως διαπιστώθηκε, η ενεργότητα της ALDH στο συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων ήταν αυξημένη συγκριτικά με τον πληθυσμό των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η παραπάνω προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση του πληθυσμού των ΚΚΚ με πλήρη EMM και παράλληλα λειτουργικό χαρακτήρα ΚΒΚ.

Συνοψίζοντας, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε μία φαινοτυπική ανάλυση των ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού, ως προς την παρουσία χαρακτηριστικών ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM. Η παρούσα μελέτη προσέφερε μία νέα μεθοδολογία για την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση της συνέκφρασης δύο σημαντικών δεικτών ΚΒΚ και EMM στα ΚΚΚ σε επίπεδο κυττάρου. Όπως διαπιστώθηκε, το προφίλ της έκφρασης των δύο δεικτών στα ΚΚΚ ήταν διαφοροποιημένο μεταξύ της πρώιμης και μεταστατικής νόσου, αναδεικνύοντας τη δυναμική της εξέλιξης των παραπάνω χαρακτηριστικών σε επίπεδο ΚΚΚ. Η διαπίστωση ότι η συχνότητα των ΚΚΚ με χαρακτήρα ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM ήταν σαφώς αυξημένη στη μεταστατική νόσο, πρόσφερε σημαντικές ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στη μεταστατική διαδικασία. Επίσης περιγράφηκε για πρώτη φορά η σύγχρονη έκφραση δεικτών ΚΒΚ και EMM στο ίδιο κύτταρο, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών στα ΚΚΚ. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα ΚΚΚ που έφεραν παράλληλα τους φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στα συνήθη χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ότι η έλλειψη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με τον εμπλουτισμό του συγκεκριμένου υποπληθυσμού ΚΚΚ. Η παρουσία των παραπάνω πληθυσμών ΚΚΚ συσχετίστηκε επίσης με την παρουσία μεταστάσεων σε συγκεκριμένα όργανα, ενώ η προγνωστική αξία της ανίχνευσής τους ως προς την επιβίωση των ασθενών μένει να διερευνηθεί περαιτέρω. Τέλος, αξιολογήθηκε μέσω κατάλληλης λειτουργικής δοκιμής η δραστηριότητα του χαρακτήρα ΚΒΚ των ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, επιβεβαιώνοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω του ARIOL ταυτοποιεί έναν ενεργό υποπληθυσμό ΚΚΚ με λειτουργικά χαρακτηριστικά ΚΒΚ. Επομένως, όπως υποδεικνύεται από τα παραπάνω, τα ΚΚΚ με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων και ενδιάμεσης EMM πιθανά συμμετέχουν στη μεταστατική

εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και επιπλέον εμφανίζουν αντίσταση στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα. Με την παρούσα μελέτη αναδεικνύεται αφενός η σημασία της εκτενούς φαινοτυπικής μελέτης των ΚΚΚ για την αποσαφήνιση του ρόλου τους στη μεταστατική διαδικασία και αφετέρου η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπειών που θα στοχεύουν σε μόρια που σχετίζονται άμεσα με τα χαρακτηριστικά ΚΒΚ και ΕΜΜ. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο μαστού.

## **Abstract**

Breast cancer, the most common type of cancer among women, is frequently diagnosed at an early stage and successfully treated. Nevertheless, distant metastases ensue in a significant proportion of patients, thus representing the main cause of death for these patients. Since the exact mechanism of metastases formation has not yet been elucidated, there is a great need for a more extensive study of the metastatic process. Numerous studies in cancer cell lines and animal models have demonstrated the complexity of the metastatic process. The main stages of metastasis development include the proliferation of cancer cells in the primary site, invasion in surrounding tissues and intravasation into the circulation, where they can migrate either as single cells or clusters. Afterwards, cancer cells can extravasate at distant sites and invade new organs to form micrometastases, where their subsequent proliferation leads to the formation of overt metastases. These cells, identified either as disseminated tumor cells (DTCs) in secondary sites or as circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients, consist the population of micrometastatic cells.

Several studies have shown that the detection of CTCs in peripheral blood of patients with breast cancer is a strong and independent marker for increased risk of relapse and reduced overall survival. Moreover, the presence of CTCs in breast cancer has been strongly correlated with lower response rates to conventional chemotherapies. However, CTCs are a highly heterogeneous population exhibiting differential metastatic potential, therefore their further molecular and phenotypic characterization is of outmost importance. This could highlight those characteristics that prosper metastatic process, contributing to a better understanding of the mechanism of metastasis. Moreover, CTCs are considered as a real time liquid biopsy, which allows the molecular characterization of the tumor at different time points. The identification of CTCs bearing characteristics associated with aggressive behavior or resistance to conventional treatment might also help to identify subgroups of patients with poor prognosis. These patients could be offered more aggressive therapeutic approaches and/or targeted therapies against molecules selected according to their expression on CTCs. Thus, during the last years, a growing number of techniques are being developed for the detection and characterization of CTCs.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells is a process holding an important role in metastasis formation, during which the epithelial phenotype dynamically converts to a mesenchymal one. These mesenchymal characteristics enable the initial invasion and intravasation of cancer cells, their migration through the systemic circulation and the subsequent extravasation and invasion at distant sites. Nevertheless, it has been shown that during the colonization of distant organs, they regain an epithelial phenotype through the reverse process of mesenchymal-to-epithelial transition (MET). One of the major changes during EMT is related to the expression pattern of the cytoskeleton intermediate filaments. Specifically, a significant reduction of cytokeratin expression along with a simultaneous increase in vimentin expression is usually observed. Moreover, the expression of molecules involved in cell to cell contacts, induced by a series of transcription factors, such as TWIST, SNAIL and SLUG is also modulated. The expression of the putative EMT markers, Vimentin and TWIST is considered essential for the invasion and intravasation of cancer cells in the circulation. In addition, numerous studies have shown that characteristics suggestive of the presence of EMT in primary tumors, are strongly associated with resistance to chemotherapy, high risk of relapse and decreased survival.

A growing body of evidence suggests a correlation between the EMT process and the generation of cancer stem cells (CSCs). CSCs have been identified as a small subpopulation in several types of cancers, including breast cancer, and are considered to bear properties of normal stem cells. The CSC model proposes that these cells only, are capable of self-renewal, unlimited proliferation and differentiation, whereas they have also been shown to participate in the metastatic process, giving rise to all the subpopulations that constitute the primary tumor. In breast cancer, CSCs have been effectively identified and isolated from cell lines and tumors on the basis of the CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-low</sup> phenotype or according to the high enzymatic activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH). The expression of the ALDH1A1 isoenzyme is also considered as a putative stem cell marker, however, contradictory data appear in the literature concerning the activity of the 19 ALDH isoenzymes found in cell lines and breast tumors. Numerous in vitro and in vivo studies have shown that CSCs are highly resistant to radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy, whereas the detection

of putative CSCs in primary tumors has been strongly associated with worse clinical outcome.

Based on the above, the detection of putative EMT and CSC markers on CTCs could distinguish a subpopulation of CTCs demonstrating chemoresistance and enhanced metastatic potential. In this context, in 2010 our research group showed that CTCs of patients with metastatic breast cancer expressed putative CSC markers, such as CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-/low</sup> and ALDH1<sup>high</sup>. Furthermore, we have recently shown that CTCs of early and metastatic breast cancer patients acquired a partial EMT phenotype, as defined by the co-expression of epithelial and mesenchymal markers, such as Vimentin and TWIST. It was further shown that the frequency of CTCs bearing this partial EMT phenotype was significantly increased in the metastatic setting, suggesting their selection during disease progression. Several studies during the last years have also reported the presence of EMT and CSC characteristics on CTCs by the use of different techniques, however there are no clinical studies including well defined groups with large number of patients. Moreover, the co-expression of CSC and EMT markers at the single CTC level has not yet been reported. On this basis, we investigated whether CTCs of patients with breast cancer, co-express putative stem cell and intermediate EMT phenotypes. Furthermore, we interrogated the frequency of these CTC subpopulations among patients with early and metastatic disease, evaluated their potential prognostic value and assessed the effect of chemotherapy on their distribution.

For this purpose, a novel triple immunofluorescence methodology was developed on isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients, for the detection of cytokeratins 8, 18 and 19 as a CTC marker, along with ALDH1 and TWIST, as putative CSC and EMT markers, respectively. The co-expression of these molecules was evaluated at the single cell level by the use of the semi-automated fluorescence microscopy system ARIOL. For the development of the method, the different expression patterns of ALDH1 and TWIST was initially evaluated in control cell lines and three breast cancer cell lines, SKBR3, MCF7 and MDA.MB.231, representative of the main molecular breast cancer subtypes, HER2-positive, hormone-positive and triple-negative, respectively. Specifically, the expression levels of ALDH1 were characterized as high (ALDH1<sup>high</sup>) and low or absent (ALDH1<sup>low/neg</sup>), according to the quantification of the fluorescence levels by the use of the ARIOL system, while the

expression of TWIST was defined according to its subcellular localization as nuclear (TWIST<sup>nuc</sup>) and cytoplasmic or absent (TWIST<sup>cyt/neg</sup>). According to the current literature, CSC and EMT phenotypes were defined as those bearing high ALDH1 expression levels and nuclear localization of TWIST, respectively. A series of control experiments were also performed in all cell lines above, as well as in normal blood donor samples, to verify that the methodology allows the detection of these markers on CTCs with high sensitivity and specificity.

Subsequently, the current methodology was applied to CTCs from 80 patients with early and 50 with metastatic breast cancer. Both markers could be detected on CTCs in almost all patients evaluated, however their expression pattern was different between the two clinical stages. Specifically, CTCs bearing the CSC phenotype (ALDH1<sup>high</sup>) were more frequently detected in metastatic disease, in contrast to the early disease setting wherein CTCs with a non-stem cell phenotype were mainly detected (ALDH1<sup>low/neg</sup>). Furthermore, CTCs expressing an intermediate EMT phenotype (TWIST<sup>nuc</sup>) were more frequent in metastatic disease, whereas in the early stage, CTCs bearing an epithelial phenotype were mainly identified (TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Assessing the co-expression of the two markers at the single cell level, it was shown that the majority of metastatic patients had detectable CTCs co-expressing the two phenotypes (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>), in contrast to the patients with early disease which harboured mainly CTCs expressing a non-stem, epithelial phenotype (ALDH1<sup>low/neg</sup> /TWIST<sup>cyt/neg</sup>). The correlation between the two phenotypes on CTCs of metastatic breast cancer patients was further statistically confirmed. This study has provided a new, sensitive and specific method for the characterization of CTCs according to the co-expression of two putative CSC and EMT markers. The finding that the expression pattern of the two markers differed between early and metastatic disease reflects the dynamic evolution of the CSC and EMT states. Furthermore, the finding that the frequency of CTCs co-expressing the two phenotypes was significantly increased in metastatic disease, indicates that this subpopulation might be involved in the metastatic process and that it could be selected during disease progression. Finally, this study showed for the first time that two putative CSC and EMT markers are frequently co-expressed on single CTCs, reinforcing their association, as well as that the two phenotypes of CTCs changed in parallel during metastatic progression.

We next evaluated the effect of chemotherapy on the frequency of CTCs bearing CSC and intermediate EMT characteristics. For this purpose, the current methodology was applied to a larger and well defined group of 154 metastatic breast cancer patients before the initiation of first-line chemotherapy. Patients with detectable CTCs, were also evaluated after the completion of treatment. The majority of CTCs identified, both before and after chemotherapy, were shown to express CSC and partial EMT characteristics. Even though treatment resulted in a significant reduction or elimination of CTCs, cells bearing CSC or partial EMT phenotypes were enriched after treatment. Moreover, a statistically significant increase in CTCs co-expressing the two phenotypes was further confirmed. These findings provide important evidence that CTCs with CSC and intermediate EMT features exhibit chemo-resistance and therefore are selected after chemotherapy administration. The current study showed for the first time that the resistance of CTCs to conventional chemotherapy regimens is enhanced by the simultaneous presence of CSC and intermediate EMT characteristics, further supporting the participation of this CTC subpopulation in the metastatic process.

The current study also showed for the first time the prognostic value of CTCs detected by the ARIOL system. Specifically, the total CTC number both before and after chemotherapy was correlated with disease progression at the end of chemotherapy, while CTC detection prior to chemotherapy was further associated with lower rates of 2-year survival. Moreover, the presence of CTCs bearing CSC and EMT phenotypes was also correlated to metastases in specific organs such as bones and lung, however, contradictory data emerged regarding their prognostic value in terms of response to treatment and survival. Even though chemotherapy led to a significant increase of CTCs expressing CSC and partial EMT phenotypes exclusively among patients who progressed at the end of treatment, the detection of these subpopulations was associated with better response to chemotherapy and increased progression-free survival.

We further investigated whether CTCs bearing the stem cell phenotype, as defined by the high expression of the isoenzyme ALDH1A1, also acquire functional stem cell characteristics. The enzymatic activity of ALDH was used as a functional marker of CSCs, which was evaluated by ALDEFLUOR assay and the use of flow cytometry. First, the correlation between ALDH enzymatic activity and high ALDH1

protein expression was interrogated via a series of immunofluorescence experiments, immunoblotting and ALDEFLUOR in HepG control cells and three breast cancer cell lines, SKBR3, MCF7 and MDA.MB.231. A positive correlation between activity and expression was shown in HepG2 cells, confirming that the methodology developed by ARIOL allows the identification of the functional cell population. However, the percentage of cells expressing high ALDH1 levels was higher than the percentage of those bearing high ALDH activity in all breast cancer cell lines evaluated. These findings indicate that the ALDH1A1 isoenzyme which is expressed in breast cancer cells is not always enzymatically active. Therefore, it is suggested that the methodology developed by ARIOL system allows the identification of cell populations that express an enzymatically active ALDH1 protein, however cells that express an inactive protein are also being detected. Subsequently, we investigated the correlation between high ALDH1 expression and ALDH activity in CTCs from metastatic breast cancer patients. The methodology for the detection of ALDH activity on CTCs was developed through a series of experiments using serial dilutions of tumor cells from each cell line into isolated PBMCs from normal blood donors (dilutions of 10, 100, 1.000 and 10.000 cells per  $10^6$  PBMCs). Tumor cells were detected by the expression of EpCAM and CD45 surface molecules instead of cytokeratin, since the evaluation of intracellular proteins cannot be combined with the ALDEFLUOR assay. CTCs could be identified in all the above dilutions, however an overestimation of cell counts was observed in low concentrations of 10 and 100 tumor cells per  $10^6$  PBMCs. ALDH activity could also be detected in all dilutions, however the recovery rate was reduced in low cell concentrations, suggesting that the developed methodology is appropriate for patients bearing high CTC counts only.

Subsequently, the enzymatic activity and expression of ALDH was investigated by the use of flow cytometry and the ARIOL system, respectively, on CTCs from nine breast cancer patients, who had multiple metastases and had received at least two lines of treatment. A statistically significant correlation was confirmed regarding the CTC counts detected by the two methods, as well as between the number of CTCs bearing high ALDH activity and high ALDH1 expression. This study showed for the first time that the expression of ALDH1 on CTCs of metastatic breast cancer patients was correlated to ALDH enzymatic activity, further confirming that the methodology developed by the ARIOL system allows the identification of a CTC population with



CSC activity. Finally, ALDH enzymatic activity was evaluated on CD45-negative cells, which include the subpopulation of CTCs that have completely lost the expression of epithelial markers in the context of full EMT. It was shown that ALDH activity in these cells was increased, compared to the population of EpCAM-positive/CD45-negative cells, suggesting that the current approach allows the detection of CTCs bearing a fully EMT phenotype and also functional characteristics of CSCs.

To summarize, in the context of the present thesis, we performed a phenotypic analysis of CTCs from breast cancer patients, regarding the presence of stem cell and partial EMT characteristics. The present study provides a new methodology that allows the sensitive and specific detection of CSC and EMT markers and their co-expression at the single CTC level. The expression pattern of both markers was differentiated between the early and metastatic disease stage, highlighting the dynamic evolution of these characteristics on CTCs. The observation that the frequency of CTCs bearing a stem cell and partial EMT phenotype was significantly higher in metastatic disease, provides evidence for their involvement in the metastatic process. It was also described for the first time that CSC and EMT markers are frequently co-expressed on the same CTC, further confirming the correlation between the two states in CTCs. Furthermore, it was found that CTCs co-expressing these phenotypes were highly resistant to conventional chemotherapy and that the enrichment of this CTC subpopulation was associated with disease progression at the end of treatment. The detection of CTCs bearing these phenotypes was also associated with metastases in specific organs, while their prognostic value for patients' survival remains to be further investigated. Finally, the simultaneous evaluation of the functional stem cell activity of CTCs in a subset of metastatic breast cancer patients further confirmed that the methodology developed by the ARIOL, identified an active CTC subpopulation with CSC characteristics. To conclude, CTCs acquiring CSC and partial EMT characteristics consist an aggressive CTC population, which might be involved in the metastatic progression of breast cancer and exhibit increased chemoresistance. The present study highlights the significance of the extensive phenotypic analysis of CTCs for the determination of their role in the metastatic process, as well as the need for alternative targeted therapies against molecules associated with stem

cell and EMT features. This approach could contribute to a more effective management of breast cancer patients.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ, ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών στις αναπτυγμένες χώρες του κόσμου, αντιπροσωπεύοντας το 23% του συνόλου των νεοπλασμάτων στις γυναίκες, σε αντίθεση με τους άνδρες στους οποίους αντιπροσωπεύει ποσοστό μικρότερο του 1% [48]. Τα πιο πρόσφατα δεδομένα προκύπτουν από μία βάση αναφοράς που δημιουργήθηκε το 2014 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), στην οποία καταγράφονται οι διάφορες τάσεις των διαφορετικών τύπων κακοήθειας για κάθε χώρα χωριστά. Όπως προκύπτει για τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α), ο καρκίνος μαστού αποτελεί την πρώτη σε συχνότητα εμφάνιση μορφή καρκίνου στις γυναίκες και τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες (16,1% του συνόλου των θανάτων), έπειτα από τον καρκίνο του πνεύμονα. Εντούτοις, τα αντίστοιχα δεδομένα για την Ελλάδα υποστηρίζουν ότι αποτελεί όχι μόνο την πρώτη σε εμφάνιση νεοπλασματική νόσο στις γυναίκες (4.934 νέα κρούσματα ετησίως), αλλά και την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες (18.7% των θανάτων). Παρόλα αυτά, η θνησιμότητα από τον καρκίνο μαστού στις περισσότερες χώρες είναι σταθερή, παρουσιάζοντας επιπλέον μικρή τάση μείωσης [49-51].

Το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης και η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες με προγνωστική σημασία στον καρκίνο του μαστού. Επίσης, σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση της Αμερικάνικης Επιτροπής Καρκίνου (American Joint Committee on Cancer, AJCC) το 2010 για τον καρκίνο του μαστού, η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ) στο περιφερικό αίμα, είτε διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (ΔΚΚ) σε δευτεροπαθείς εστίες, ταξινομείται ως μία νέα κατηγορία μικρομεταστατικής νόσου, γνωστή ως κατηγορία M0(i+), ανεξάρτητα από την κλινική και απεικονιστική επιβεβαίωση της μετάστασης [52]. Πράγματι, σύμφωνα με εκτεταμένες μετα-αναλύσεις των δεδομένων της βιβλιογραφίας των τελευταίων χρόνων, αναμφισβήτητα προκύπτει η ισχυρή προγνωστική αξία της ανίχνευσης των ΚΚΚ σε ασθενείς, τόσο με πρώιμο, όσο και μεταστατικό καρκίνο μαστού [8;53]. Επιπλέον, στη συνήθη κλινική πράξη πραγματοποιείται έλεγχος της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) και του ογκογονιδίου HER2 (c-erbB2), καθώς είναι γνωστή η προγνωστική και

προβλεπτική τους αξία. Βάσει της έκφρασης των παραπάνω μορίων, έχει πραγματοποιηθεί η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου μαστού στους τρεις κύριους υπότυπους: τον ορμονο-θετικό (ER+/PR+/-/HER2-), τον HER2-θετικό (ER+/-/PR+/-/HER2+) και τον τριπλά-αρνητικό (ER-/PR-/HER2-), ενώ σύμφωνα με τελευταίες μελέτες είναι δυνατή η περαιτέρω κατηγοριοποίηση ενός ER-θετικού όγκου σε luminal A και luminal B υπότυπο και η υποδιαίρεση ενός ER-αρνητικού όγκου σε HER2-θετικό, βασικού τύπου και φυσιολογικού τύπου. Ο προσδιορισμός του προφίλ έκφρασης των παραπάνω μορίων συμβάλλει όχι μόνον στην ακριβέστερη πρόγνωση αλλά και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ασθενών, μέσω θεραπείας με αντισώματα και μόρια που στοχεύουν ειδικά τους υποδοχείς ER και HER2 [54;55].

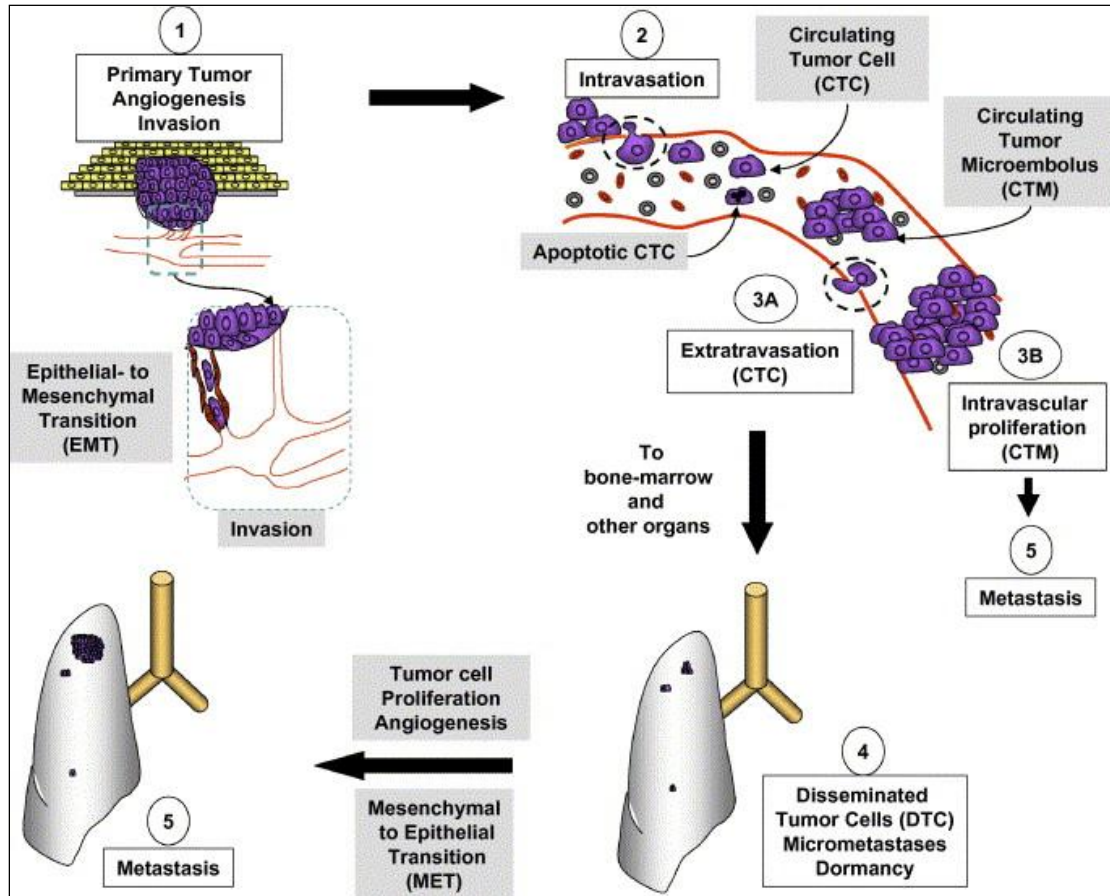
Πράγματι τα τελευταία χρόνια, ο μοριακός χαρακτηρισμός ενός κακοήθους όγκου μαστού έχει συμβάλει στην εξατομίκευση της θεραπείας των ασθενών. Έτσι, παράλληλα με τα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα, χορηγούνται πλέον στοχεύουσες θεραπείες έναντι υποδοχέων και μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και το μεταστατικό δυναμικό του όγκου, προσφέροντας σημαντικό όφελος στην ανταπόκριση και την επιβίωση [56]. Παρόλο που ο καρκίνος του μαστού συχνά διαγιγνώσκεται σε πρώιμα στάδια και αντιμετωπίζεται επιτυχώς έπειτα από χειρουργική εξαίρεση και συμπληρωματική θεραπεία με ακτινοβολία, χημειοθεραπεία και βιολογικούς παράγοντες, εντούτοις σε σημαντικό ποσοστό ασθενών αναπτύσσονται απομακρυσμένες μεταστάσεις [1], οι οποίες ευθύνονται τελικά για το θάνατο του 90% των ασθενών με καρκίνο [2;57]. Επομένως, εδώ και πάρα πολλά έτη το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αποσαφήνιση του πολύπλοκου μηχανισμού της μετάστασης, η αντιμετώπιση της οποίας αναμένεται να αποτελέσει τη ριζική θεραπεία της νόσου.

## **1.2. ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Πληθώρα δεδομένων που προκύπτουν από in vitro και in vivo μελέτες με καρκινικές σειρές και μοντέλα ζώων, καθώς και από πολύπλοκους αλγόριθμους και μαθηματικά μοντέλα, υποδεικνύουν ότι η μετάσταση είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά στάδια [3]. Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται στην πρωτοπαθή εστία, επάγοντας την αγγειογένεση, δηλαδή τη δημιουργία νέων τριχοειδών αγγείων, τα οποία παρέχουν

την απαιτούμενη αιμάτωση για την ανάπτυξη του όγκου [58]. Η αγγειογένεση διευκολύνει επίσης τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη διείσδυσή τους στο μεσοκυττάριο χώρο που περιβάλλει τον πρωτοπαθή όγκο και την επακόλουθη ενδαγγείωσή τους, δηλαδή την είσοδό τους στη συστηματική κυκλοφορία [59;60]. Η διαφυγή των καρκινικών κυττάρων μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί έμμεσα μέσω του λεμφικού συστήματος [61]. Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία δεν είναι εύκολη, λόγω των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και της απόπτωσης λόγω stress [62;63]. Όσα από τα κύτταρα επιβιώσουν, είναι δυνατόν να μεταναστεύσουν μέσω αυτής είτε μεμονωμένα, είτε συλλογικά ως συσσωματώματα κυττάρων, γνωστά ως καρκινικά μικροέμβολα [64]. Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να ακολουθήσει η έξοδός τους από την κυκλοφορία (εξαγγείωση) στα απομακρυσμένα σημεία όπου έχουν μετακινηθεί [65], ενώ όσον αφορά στα καρκινικά συσσωματώματα η εξαγγείωσή τους επιτυγχάνεται έπειτα από ρήξη στα τοιχώματα των αγγείων, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους [66]. Ακολουθεί η διείσδυση των κυττάρων στο γειτονικό ιστό και ο μερικός πολλαπλασιασμός τους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρομετάστασης [67]. Ωστόσο, η δημιουργία μίας ολοκληρωμένης μετάστασης πολλές φορές μπορεί να επέλθει έπειτα από χρόνια, καθώς τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι δυνατόν να παραμείνουν σε μία φάση αδράνειας, γνωστή ως λήθαργο [68]. Τέλος, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων στα δευτερεύοντα όργανα που έχουν προσβληθεί, οδηγεί τελικά στην ανάπτυξη μακροσκοπικά ορατών μεταστάσεων (Εικόνα 1) [69].

Σύμφωνα με την υπόθεση "σπόρου και εδάφους" που διατυπώθηκε πρώτη φορά το 1889 από τον Stephen Paget, η μετάσταση δεν αναπτύσσεται τυχαία σε κάποιο όργανο, αλλά αντιθέτως είναι αποτέλεσμα της ειδικής συγγένειας συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων (σπόρος) για το βιολογικά μοναδικό μικροπεριβάλλον που υπάρχει σε κάθε όργανο (έδαφος) [70-72]. Πράγματι, η ιστοειδική ανάπτυξη της μετάστασης έχει περιγραφεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού οι μεταστατικές εστίες αναπτύσσονται συχνότερα σε οστά, ήπαρ, πνεύμονες και εγκέφαλο [73;74]. Αντιθέτως, μία άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι το όργανο στο οποίο θα αναπτυχθεί η μετάσταση, είναι εκείνο με το οποίο τα καρκινικά κύτταρα θα έρθουν πρώτα σε επαφή σύμφωνα με τη ροή της κυκλοφορίας [75;76].



**Εικόνα 1. Κύρια στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης μετάστασης**

Τα κύτταρα του όγκου πολλαπλασιάζονται και επάγουν την αγγειογένεση (angiogenesis), η οποία διευκολύνει τη διείσδυσή τους (invasion) μέσω του επιθηλιακού ιστού (1). Η κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετάβασης (EMM), η οποία τα μετατρέπει από επιθηλιακά κύτταρα, σε κύτταρα μεσεγγυματικού φαινότυπου. Ακολουθεί η είσοδός τους στην κυκλοφορία (intravasation), όπου συνιστούν τον πληθυσμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ) (Circulating Tumor Cells, CTCs), τα οποία είτε οδηγούνται σε απόπτωση (apoptotic CTCs), είτε κυκλοφορούν ως μεμονωμένα κύτταρα (CTCs) ή συσσωματώματα κυττάρων (Circulating Tumor Microembolus, CTMs) (2). Τα μεμονωμένα κύτταρα είναι δυνατόν να εξέλθουν της κυκλοφορίας μέσω της εξαγγείωσης (extravasation) σε δευτερεύοντα όργανα (3A), όπου έπειτα από τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό τους σχηματίζουν μικρές εστίες, γνωστές ως μικρομεταστάσεις (micrometastases). Τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (ΔΚΚ) (Disseminated Tumor Cells, DTCs) στο νέο όργανο είναι δυνατόν να παραμείνουν αδρανή σε μία φάση λήθαργου (dormancy) (4). Τέλος, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους (tumor cell proliferation) επάγει εκ νέου την αγγειογένεση (angiogenesis), η οποία διευκολύνει την περαιτέρω ανάπτυξη μίας μακροσκοπικά ορατής μετάστασης στο δευτερεύον όργανο (5). Προϋπόθεση για τον αποικισμό των κυττάρων στο νέο όργανο αποτελεί η μεσεγγυματο-επιθηλιακή μετάβαση (MEM), η οποία επαναφέρει τον επιθηλιακό τους φαινότυπο. Όσον αφορά στα συσσωματώματα καρκινικών κυττάρων (CTM), εκείνα δεν υφίστανται εξαγγείωση, αλλά αντιθέτως πολλαπλασιάζονται μέσα στα αγγεία (intravascular proliferation), με αποτέλεσμα τη ρήξη των αγγείων σε κάποιο σημείο, όπου στη συνέχεια αναπτύσσεται η μετάσταση (3B-5) [3].

Η άποψη που τείνει σήμερα να επικρατήσει είναι ότι παρόλο που το σημείο στο οποίο οδηγούνται τα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος είναι εκείνο που δέχεται το μεγαλύτερο φορτίο καρκινικών κυττάρων, ο μετέπειτα αποικισμός τους ενέχει δυσκολίες και προϋποθέτει μία σειρά από μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του νέου μικροπεριβάλλοντος [77;78]. Σύμφωνα μάλιστα με το μοντέλο της «μεταστατικής φωλιάς», η ανάπτυξη ενός πρόσφορου μικροπεριβάλλοντος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον αποικισμό και τον πολλαπλασιασμό τους στο μεταστατικό όργανο [79]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix metalloproteinases, MMPs) της εξωκυττάριας ουσίας, δηλαδή της μήτρας του όγκου, η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου μέσω της ιντερλευκίνης, η έκφραση αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF- $\alpha$  και TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor), η ρύθμιση γονιδίων που καταστέλλουν τη μετάσταση, όπως είναι το BRMS1, η παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για υποδοχείς χημειοκινών, όπως είναι οι CXCR4 και CCR7 και η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS αποτελούν κάποια μόνο από τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος που ευνοούν την έξοδο των καρκινικών κυττάρων από την κυκλοφορία και την επακόλουθη ανάπτυξή τους στη μεταστατική εστία [80-85].

Όσον αφορά στη χρονική στιγμή κατά την οποία ξεκινάει η μεταστατική διαδικασία, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν το μοντέλο γραμμικής εξέλιξης, σύμφωνα με το οποίο η μετάσταση ξεκινάει ως ένα μεταγενέστερο γεγονός μόνον έπειτα από την εκτεταμένη επέκταση του πρωτοπαθούς όγκου [86;87]. Αντιθέτως, πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης, το οποίο προτείνει ότι η μετάσταση είναι ένα πολύ πρώιμο γεγονός που ξεκινάει παράλληλα με την καρκινογένεση [88;89]. Εντούτοις, όλα τα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η ανάπτυξη της μετάστασης είναι μία αναποτελεσματική διαδικασία, καθώς προϋποθέτει ότι όλα τα επιμέρους στάδια θα ολοκληρωθούν με επιτυχία [90-92]. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες σε μοντέλα ζώων, στις οποίες μέσω βιντεοσκόπησης ελέγχθηκε η ακριβής *in vivo* πορεία των καρκινικών κυττάρων που μεταναστεύουν, βρέθηκε ότι τα πρώτα στάδια της μετάστασης, από τη διείσδυση έως την εξαγγείωσή τους πραγματοποιούνται με μεγάλη αποτελεσματικότητα, σε αντίθεση με τα μετεγενέστερα στάδια του σχηματισμού της μικρομετάστασης και τελικά της μακρομετάστασης, τα οποία ολοκληρώνονται με ιδιαίτερη δυσκολία [75;93]. Το αποτέλεσμα είναι ποσοστό μικρότερο του 0,01% των καρκινικών κυττάρων που



εισέρχονται στην κυκλοφορία να είναι ικανό να οδηγήσει τελικά σε μία ολοκληρωμένη μακροσκοπικά ορατή μετάσταση [94;95]. Μία πιθανή εξήγηση μπορεί να δοθεί λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ετερογένεια ανάμεσα στα κύτταρα ενός όγκου, η οποία έχει περιγραφεί εδώ και δεκαετίες. Οι ετερογενείς υποπληθυσμοί κυττάρων ενός όγκου εμφανίζουν διαφορετικά γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και επομένως διαφορετικό μεταστατικό δυναμικό. Σύμφωνα μάλιστα με την θεωρία της κλωνικής εξέλιξης, η μετάσταση προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό μονήρων ή μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία φέρουν τα ιδιαίτερα εκείνα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανά να ολοκληρώσουν όλα τα στάδια που απαιτούνται για τη δημιουργία μίας επιτυχούς μετάστασης [96-98].

Ένα σημαντικό βιολογικό φαινόμενο που εμφανίζει ενεργό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία, είναι η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM) (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή η μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου σε φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων [18]. Αποτέλεσμα της EMM είναι η αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων, η οποία αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή τους στα πρώιμα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας και ειδικότερα της διείσδυσης, ενδαγγείωσης, μετανάστευσης, εξαγγείωσης και της εκ νέου διείσδυσης στον ιστό όπου θα ακολουθήσει η ανάπτυξη μετάστασης [19]. Ωστόσο, κατά τη φάση του σχηματισμού της μικρομετάστασης και της ολοκληρωμένης τελικά μετάστασης στο νέο όργανο, τα καρκινικά κύτταρα ανακτούν τον επιθηλιακό φαινότυπο έπειτα από την αντίστροφη διαδικασία της μεσεγχυματο-επιθηλιακής μετατροπής (MEM) (Mesenchymal-to-Epithelial transition, MET) [20]. Επομένως, η επαγωγή της EMM αποτελεί ένα είδος επιλογής του καρκινικού υποπληθυσμού που θα συμμετάσχει στα πρώτα μεταστατικά στάδια και αντιστοίχως, η επαγωγή της MEM λαμβάνει χώρα στον υποπληθυσμό εκείνο που θα ολοκληρώσει τη μεταστατική διαδικασία [99]. Πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια υποστηρίζουν ότι η EMM σχετίζεται άμεσα με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (KBK), δηλαδή καρκινικά κύτταρα με ιδιότητες χαρακτηριστικές των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων [28]. Δεν είναι σαφές εάν η EMM επάγει τη γένεση των KBK ή αν τα KBK αποτελούν τον κυτταρικό υποπληθυσμό που επιλεκτικά υφίσταται την EMM μετάβαση προκειμένου να μεταναστεύσει ή ακόμη εάν οι δύο μηχανισμοί συμβαίνουν παράλληλα. Εντούτοις, τόσο ο EMM, όσο και ο βλαστικός φαινότυπος

των καρκινικών κυττάρων αποτελούν χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με αυξημένη μεταστατική ικανότητα και αντίσταση στη θεραπεία [100], επομένως το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί στη μελέτη των δύο αυτών βιολογικών χαρακτηριστικών, συμβάλλοντας ολοένα και περισσότερο στην αποσαφήνιση της μεταστατικής διαδικασίας.

### **1.3. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

#### **1.3.1. Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή**

Ως επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMM) ορίζεται μία σειρά μοριακών αλλαγών που υφίστανται τα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα τη μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου σε φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή φυσιολογικά λαμβάνει χώρα στην ανάπτυξη κατά την εμβρυογένεση (τύπου I), σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής ή αναδόμησης των ιστών κατά την ομοιόσταση (τύπου II) και στον καρκίνο κατά τη μεταστατική διαδικασία (τύπου III) [18;101]. Πράγματι, η EMM έχει βρεθεί να συμβάλλει στην εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου, όπως στον καρκίνο μαστού, πνεύμονα, κόλου, ήπατος και προστάτη [19;20;102-104]. Στην πραγματικότητα πρόκειται για μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται πληθώρα μορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα κύρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την EMM είναι η απώλεια των ισχυρών διακυτταρικών επαφών που χαρακτηρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα, η αναδιάταξη του κυτταροσκελετού τους και η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας και επομένως της μεταναστευτικής τους ικανότητας.

Κατά την EMM παρατηρείται γενικά μείωση έως και απώλεια της έκφρασης επιθηλιακών μορίων, όπως είναι η κυτταροκερατίνη, E-cadherin, occludin, claudin και desmoplakin, με παράλληλη αύξηση της έκφρασης μεσεγχυματικών μορίων, όπως η βιμεντίνη, N-cadherin, fibronectin και alpha-smooth muscle actin [105]. Η διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη E-cadherin είναι ένα ογκογονίδιο, το οποίο συμμετέχει ενεργά στη διατήρηση της πολικότητας και της κυτταρικής συνάφειας των επιθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας στην αρχιτεκτονική των επιθηλιακών

ιστών. Πρόκειται για ένα μόριο προσκόλλησης, το οποίο μέσω της εξωκυττάριας υπομονάδας του σχηματίζει ισχυρές διασυνδέσεις μεταξύ των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων. Η E-cadherin δρα επίσης ενδοκυττάρια συνδεόμενη με κατενίνες ( $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin, p120-catenin), επάγοντας την περαιτέρω σύνδεσή τους με τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού [106]. Η καταστολή της E-cadherin που προκαλείται κατά την EMM, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των κυτταρικών διασυνδέσεων και τη μετατόπιση της  $\beta$ -catenin από τη μεμβράνη στον πυρήνα του κυττάρου, όπου με τη σειρά της συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην EMM [107]. Η αναστολή της έκφρασης της E-cadherin προκαλείται είτε μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της, είτε μέσω μεταγραφικής καταστολής, η οποία επάγεται από μία σειρά μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι SNAIL, TWIST1, SLUG, ZEB1, ZEB2 και FOXC2 [18]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα άμεσης μεταγραφικής καταστολής της E-cadherin αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες SNAIL και ZEB1 [108], ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST1 έχει βρεθεί ότι μπορεί να καταστέλλει την E-cadherin, είτε άμεσα μέσω πρόσδεσης στον υποκινητή της, είτε έμμεσα μέσω επαγωγής μεσεγχυματικών πρωτεϊνών, όπως η βιμεντίνη και φιμπρονεκτίνη [109]. Ο αυξητικός παράγοντας TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) επίσης καταστέλλει έμμεσα την E-cadherin, επάγοντας ρυθμιστικά άλλους μεταγραφικούς καταστολείς της E-cadherin μέσω ενεργοποίησης του Smad [110]. Αποτέλεσμα της αναστολής της E-cadherin είναι η επαγωγή της έκφρασης της N-cadherin, η οποία οδηγεί σε αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και επιπλέον έχει βρεθεί ότι συμμετέχει ακόμη και στο σχηματισμό νηματοποδίων, συμβάλλοντας στην αποκόλληση των κυττάρων και την αύξηση της κινητικότητάς τους [111;112].

Μία άλλη σημαντική μοριακή αλλαγή που παρατηρείται κατά την EMM είναι η μείωση της έκφρασης της κυτταροκερατίνης, η οποία αποτελεί ενδιάμεσο ινίδιο του κυτταροσκελετού με ειδική έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα. Αποτέλεσμα είναι η παράλληλη αύξηση της έκφρασης της βιμεντίνης, του τυπικού ενδιάμεσου ινιδίου του κυτταροσκελετού των μεσεγχυματικών κυττάρων [22], η οποία αλληλεπιδρά με την ιντεγκρίνη και συμβάλλει δυναμικά στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε επιμήκη κύτταρα, αυξάνοντας σημαντικά την κινητικότητά τους [21;113;114]. Ιδιαίτερα σημαντικός στη επαγωγή EMM εμφανίζεται επίσης ο ρόλος αυξητικών παραγόντων, όπως οι HGF (hepatocyte

growth factor), ο FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) και PDGF (platelet derived growth factor) [18], καθώς επίσης και μιας σειράς σηματοδοτικών μονοπατιών. Πολύ σημαντικός είναι ο ρόλος της κινάσης Akt και το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, καθώς έχει βρεθεί ότι διάφορα μόρια, όπως ο CXCR4, επάγουν μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού την EMM και την αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων [115]. Επιπλέον, μόρια που εμπλέκονται στα μονοπάτια σηματοδότησης μέσω Ras, Src, Wnt, Notch, β-κατενίνης και Hedgehog έχει επίσηςδειχθεί ότι ενέχονται στην EMM, παρέχοντας τα κατάλληλα σήματα για την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και την περαιτέρω διασπορά των κυττάρων [116;117]. Το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων αποτελεί επίσης ένα μηχανισμό επαγωγής της EMM, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα μόρια ESPR1 και ESPR2 (epithelial splicing regulator) που εμπλέκονται στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με EMM [118].

Επιπλέον, κατά την EMM παρατηρείται η ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες MMPs, τα οποία αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα, διευκολύνοντας τα κύτταρα να διαπεράσουν τη βάση του επιθηλιακού ιστού [119;120]. Επίσης παρατηρούνται μεταβολές της σύστασης της εξωκυττάριας μήτρας και συγκεκριμένα μετατροπή των βασικών πρωτεϊνών του επιθηλιακού ιστού σε δομές όπως είναι το κολλαγόνο τύπου I, η φιβρονεκτίνη, η εκκρινόμενη πρωτεΐνη SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) και η tenascin C, ενισχύοντας περαιτέρω τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων [121]. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που έχει βρεθεί να επάγει την EMM είναι η υποξία (μειωμένα επίπεδα οξυγόνου), η οποία προκαλείται κυρίως μέσω του παράγοντα HIF-1 (Hypoxia-inducible factor), ο οποίος με τη σειρά του προκαλεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα TWIST [122]. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχειδειχθεί ότι τα microRNAs, τα οποία είναι μικρά μη-κωδικοποιά RNA, συμμετέχουν ενεργά στην EMM των καρκινικών κυττάρων ως μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές [123], με χαρακτηριστικό παράδειγμα την οικογένεια των miR-200, τα οποία καταστέλλουν μετα-μεταγραφικά τους μεταγραφικούς παράγοντες ZEB1 και ZEB2 [124].

Όπως προκύπτει από πληθώρα μελετών, η EMM αυξάνει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διεισδύουν μέσω του πρωτοπαθούς όγκου στο φυσιολογικό ιστό και να εισέρχονται στην κυκλοφορία [125;126]. Πράγματι, η έκφραση μιας

σειράς δεικτών EMM έχει ταυτοποιηθεί στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο αίμα ασθενών με καρκίνο [127]. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός της μετάστασης στο νέο όργανο, είναι απαραίτητη η αντιστροφή της EMM διαδικασίας μέσω της MEM μετατροπής, η οποία επαναφέρει τον επιθηλιακό φαινότυπο στα κύτταρα. Η MEM έχει ως αποτέλεσμα τη σύναψη ξανά ισχυρών διακυτταρικών επαφών και την κυτταρική αναδιοργάνωση που απαιτούνται για τον αποικισμό των καρκινικών κυττάρων στο μεταστατικό ιστό [128]. Επομένως, η EMM είναι μία δυναμική διαδικασία, η οποία είναι αναστρέψιμη και επομένως τα κύτταρα δεν βρίσκονται πάντοτε σε απόλυτα επιθηλιακή ή μεσεγχυματική κατάσταση, αλλά μπορεί να εμφανίζουν μία ενδιάμεση κατάσταση. Πράγματι, σε διάφορες μελέτες έχουν ταυτοποιηθεί καρκινικά κύτταρα με έναν ενδιάμεσο επιθηλιο-μεσεγχυματικό φαινότυπο, τα οποία επιπλέον εμφάνισαν χαρακτηριστικά συλλογικής μετανάστευσης και γενικότερα είχαν ένα περισσότερο επιθετικό προφίλ σε σχέση με τα αμιγώς επιθηλιακά ή μεσεγχυματικά κύτταρα [129;130]. Επομένως η εκτίμηση παράλληλα επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών είναι απαραίτητη για το χαρακτηρισμό της φαινοτυπικής κατάστασης των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψη ότι η EMM είναι μία δυναμική μετάβαση και επομένως ο χαρακτηρισμός της κατάστασης του κυττάρου αντιπροσωπεύει τη δεδομένη στιγμή της παρατήρησής του. Επιπλέον, υπάρχουν μια σειρά από ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι κάποιοι υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία χωρίς να μεσολαβήσει η EMM μετατροπή τους ή να εξέλθουν της κυκλοφορίας χωρίς να συμβεί η MEM, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου αυτό επιτυγχάνεται δεν έχει έως σήμερα αποσαφηνιστεί [127].

Πέρα από τη συμβολή της EMM στην εξέλιξη του καρκίνου μέσω αύξησης της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων, πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η EMM εμφανίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής της πρόωρης γήρανσης και του κυτταρικού θανάτου, η οποία επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αντι-αποπτωτικής δράσης του TWIST, καθώς επίσης και του SNAIL μέσω επαγωγής του TGF- $\beta$  [131-133]. Επιπλέον η EMM έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα έναντι της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω ενεργοποίησης ανοσο-κατασταλτικών πληθυσμών κυττάρων, με χαρακτηριστική τη συμβολή του SNAIL και των αυξητικών παραγόντων TGF- $\beta$ , EGF, και HGF

[134;135]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η αύξηση της ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία και τα συνήθη χημειοθεραπευτικά φάρμακα που έχει βρεθεί να προκαλείται μέσω της EMM, κυρίως μέσω της δράσης των TWIST και SNAIL [136-138]. Πληθώρα δεδομένων συγκλίνουν επίσης στο ότι η EMM των καρκινικών κυττάρων συνδέεται άμεσα με χαρακτηριστικά καρκινικών βλαστικών κυττάρων (KBK) [29] και ότι τα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν παράλληλα τα δύο αυτά χαρακτηριστικά εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερο μεταστατικό δυναμικό και αυξημένη αντίσταση στις συνήθεις αντικαρκινικές θεραπείες [139]. Επομένως, η συμβολή της EMM στην εξέλιξη της νόσου εμφανίζεται σημαντική και πολυδιάστατη και όπως είναι αναμενόμενο κλινικά μεταφράζεται σε χειρότερη έκβαση των ασθενών. Πάρα πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ταυτοποίηση δεικτών EMM στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με διάφορους τύπους κακοήθειας, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου μαστού, αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη μειωμένου διαστήματος έως την υποτροπή της νόσου και μειωμένης συνολικής επιβίωσης των ασθενών [25;27;140].

### **1.3.2. Καρκινικά βλαστικά κύτταρα**

Σύμφωνα με το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (KBK), τα μόνα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να επάγουν την αρχική δημιουργία του όγκου και να δίνουν γένεση σε όλους τους ετερογενείς υποπληθυσμούς κυττάρων που απαρτίζουν τον όγκο, είναι εκείνα με ιδιότητες χαρακτηριστικές των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων, όπως είναι η ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης, τα οποία αποτελούν έναν ιδιαίτερα μικρό υποπληθυσμό κυττάρων του όγκου [30;31]. Δεν έχει έως σήμερα αποσαφηνιστεί εάν τα KBK προέρχονται από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα έπειτα από διαδοχική και προοδευτική συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων ή από προγονικά κύτταρα στα οποία κατά την κακοήθη εξέλιξή τους ενεργοποιούνται μονοπάτια που εμπλέκονται στην αυτο-ανανέωση [141]. Εντούτοις, όλο και περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο ότι τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα μπορούν υπό κατάλληλες συνθήκες να αποδιαφοροποιηθούν και να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες [142].

Η ταυτοποίηση των KBK περιγράφηκε πρώτη φορά το 1997 στο αιμοποιητικό σύστημα ασθενών με λευχαιμία [143] και έκτοτε πληθώρα μελετών έχουν

επιβεβαιώσει την παρουσία τους σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, κόλου, προστάτη, πνεύμονα, ήπατος και εγκεφάλου [144-148]. Όσον αφορά στους συμπαγείς όγκους, η ανίχνευση KBK πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά στον καρκίνο του μαστού το 2003, όπου ανάμεσα σε καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από πλευριτικές συλλογές ασθενών, ανιχνεύτηκε ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων με υψηλή έκφραση του μορίου CD44 και παράλληλα χαμηλή έως απύουσα έκφραση του CD24 (CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-/low</sup>), τα οποία εμφάνιζαν ιδιότητες χαρακτηριστικές των βλαστικών κυττάρων, όπως η αυτο-ανανέωση και η ικανότητα διαφοροποίησης. Ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός συνιστούσε μόλις το 1% έως 10% του συνόλου των κυττάρων και ήταν ικανός να αναπτύσσει όγκους σε μοντέλα ποντικών έπειτα από ένεση μόλις 200 κυττάρων, οι οποίοι επιπλέον εμφάνιζαν την ετερογένεια του αρχικού όγκου [34]. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι τα CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> κύτταρα που απομονώθηκαν από όγκους μαστού είχαν την ικανότητα κάτω από ειδικές συνθήκες καλλιέργειας να σχηματίζουν σφαίρες, δηλαδή σφαιρικά συσσωματώματα κυττάρων, μία ιδιότητα η οποία είναι επίσης χαρακτηριστική των βλαστικών κυττάρων του μαστού [35;149]. Ακολούθως διαπιστώθηκε ότι η ταυτοποίηση των KBK σε όγκους μαστού μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ αποτελεσματικά μέσω ανίχνευσης της υψηλής ενεργότητας του ενζύμου της ALDH (aldehyde dehydrogenase), το οποίο είναι υπεύθυνο για την οξείδωση των ενδοκυττάρων αλδευδών. [36;47]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα ALDH<sup>high</sup> κύτταρα που παράλληλα εκφράζουν το φαινότυπο CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-/low</sup> είναι ικανά να σχηματίσουν όγκους σε ποντικούς έπειτα από ένεση μόλις 20 κυττάρων [37]. Σε μία πρόσφατη μελέτη δείχθηκε επίσης ότι ο συνδυασμός των φαινότυπων CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup> και EpCAM<sup>high</sup>CD49f<sup>+</sup> μπορεί να χαρακτηρίσει ακόμη πιο αποτελεσματικά τον πληθυσμό των KBK στον καρκίνο του μαστού [150], ενώ μια σειρά από άλλους σημαντικούς δείκτες για KBK έχουν σήμερα περιγραφεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως είναι οι CD133, CD34, CD123, ESA, Oct4, Sox2, Nanog, c-kit και ABCG2 [151;152].

Η βλαστικότητα των κυττάρων έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται μέσω μιας σειράς μορίων και μονοπατιών που εμπλέκονται επίσης στον καρκίνο του μαστού [153]. Μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η γένεση βλαστικών ιδιοτήτων σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα μαστού μέσω υπερέκφρασης του υποδοχέα HER2, καθιστώντας τη στοχεύουσα θεραπεία έναντι του HER2 trastuzumab μία

αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση έναντι των KBK [154;155]. Η πολύ συχνή στον καρκίνο του μαστού απώλεια της φωσφατάσης PTEN έχει επίσης συσχετιστεί με την αυτο-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων [156]. Επίσης, η ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων έχει βρεθεί ότι επιτυγχάνεται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών με γνωστό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, όπως είναι η σηματοδότηση Wnt μέσω ρύθμισης της β-κατενίνης [157], το μονοπάτι Notch [158] και το Hedgehog μέσω ρύθμισης του γονιδίου Bmi-1 [159]. Σημαντικός φαίνεται και εδώ ο ρόλος των microRNAs ως μετα-μεταγραφικών ρυθμιστών που καταστέλλουν τη βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων [160].

Επιπλέον, όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια υποστηρίζουν ότι η ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των KBK συνδέεται άμεσα με την EMM των κυττάρων και ότι οι δύο αυτές διαδικασίες ενισχύουν σημαντικά τη μεταναστευτική τους ικανότητα [161]. Πράγματι, μελέτες σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού έχουν δείξει ότι τα KBK συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη μεταστάσεων [33;162-164]. Ειδικότερα, τα καρκινικά κύτταρα μαστού με φαινότυπους CD44+/CD24low και υψηλής ενεργότητας και έκφρασης της ALDH εμφανίζονται ιδιαίτερα επιθετικά και ικανά να αναπτύσσουν μεταστάσεις [32;36;165;166]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των KBK στην κυκλοφορία και στους μεταστατικούς όγκους ασθενών με καρκίνο μαστού, αποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν προκειμένου να συμβάλουν στην ανάπτυξη μεταστάσεων [167-169]. Η μετανάστευση των KBK φαίνεται να ενισχύεται περαιτέρω μέσω της αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης, διαδικασίες οι οποίες επάγονται από τα ίδια τα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας [170;171].

Επίσης, τα KBK εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπεία [40]. Η ενεργοποίηση πρωτεϊνών που αναστέλλουν την απόπτωση αποτελεί γνωστό μηχανισμό αντίστασης των βλαστικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία [172;173], ενώ όσον αφορά στη χημειο-ανθεκτικότητα, πολύ σημαντικός φαίνεται ο ρόλος της οικογένειας γονιδίων ABC (ATP-binding cassette), όπως είναι τα MDR1 και BCRP1, τα οποία έχει βρεθεί ότι καταλύουν τη μεταφορά των χημειοθεραπευτικών ουσιών έξω από το κύτταρο [174;175]. Μάλιστα, βάσει της συγκεκριμένης ιδιότητας των βλαστικών κυττάρων έχει αναπτυχθεί μέσω κυτταρομετρίας ροής ακόμη μία μέθοδος για την ταυτοποίηση



των KBK σε συμπαγείς όγκους, γνωστή ως side population (SP) [176;177]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν την προγνωστική αξία της ανίχνευσης KBK στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου. Ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού, η ταυτοποίηση των KBK με φαινότυπο CD44+/CD24-/low και υψηλή ενεργότητα ή έκφραση της ALDH, αποτελεί σημαντικό δείκτη έλλειψης ανταπόκρισης στις συνήθεις θεραπείες, αυξημένης πιθανότητας υποτροπής και μειωμένης συνολικής επιβίωσης των ασθενών [36;37;41;178]. Επομένως, η στόχευση των KBK αποτελεί μεγάλη πρόκληση και εμφανίζει πλέον κεντρικό ρόλο στο σχεδιασμό στοχευουσών θεραπειών.

### **1.3.3. Συσχέτιση μεταξύ επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής και καρκινικών βλαστικών κυττάρων**

Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια προτείνουν ότι υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ της EMM και των βλαστικών κυττάρων. Αρχικά, είναι γνωστό ότι πολλές από τις κυτταρικές διαδικασίες που επάγονται μέσω της EMM κατά τη μεταστατική διαδικασία, εμφανίζονται ανάλογες με εκείνες που ακολουθούν τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα κατά την ανοικοδόμηση των ιστών [179]. Επιπλέον, πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην EMM των καρκινικών κυττάρων εμφανίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ικανότητα αυτο-ανανέωσης και επιβίωσης των KBK, όπως για παράδειγμα είναι η σηματοδότηση μέσω TGF- $\beta$ , PAR6A, Notch, Hedgehog, Wnt και Ras, οι ιντεγκρίνες, οι κλαουντίνες, οι πρωτεΐνες PRC1 (polycomb repressive complex 1) και Bmi-1, μια σειρά από κινάσες και οι υποδοχείς τους, καθώς και οι Rho GTPases [180-184]. Τα κοινά αυτά μόρια και μονοπάτια θεωρείται ότι συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη αντίστασης των καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστές EMM και KBK στην απόπτωση και τις συνήθειες αντικαρκινικές θεραπείες [100;185-187]. Επιπλέον, πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι τα KBK μαστού και κυρίως εκείνα που ταυτοποιούνται στον καρκίνο μαστού βασικού τύπου, εμφανίζουν συγχρόνως υψηλή έκφραση γονιδίων και μορφολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται άμεσα με EMM [178;188-192], ενώ στον HER2-θετικό καρκίνο μαστού έχει δειχθεί η παράλληλη επαγωγή EMM και χαρακτηριστικών KBK μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης HER2 [193;194].

Η πρώτη μελέτη που πρόσφερε ισχυρά στοιχεία για την άμεση συσχέτιση μεταξύ της EMM και των βλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε το 2008, όπου βρέθηκε ότι η επαγωγή EMM μέσω έκτοπης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων TWIST1, SNAIL1 και SLUG και ενεργοποίησης του TGF- $\beta$  σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού, οδήγησε σε εμπλουτισμό των κυττάρων με φαινοτυπικό προφίλ CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>/- και αυξημένη ικανότητα σχηματισμού σφαιρών και ανάπτυξης όγκων σε ποντικούς [29]. Επιπλέον, δείχθηκε ότι τόσο τα βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το φυσιολογικό μαστό ποντικών ή ανθρώπων, όσο και τα KBK από όγκους μαστού ασθενών, παρουσίαζαν μεσεγχυματικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και υψηλή έκφραση δεικτών EMM, όπως είναι η βιμεντίνη και ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST. Μία άλλη μελέτη επιβεβαίωσε ότι η επαγωγή EMM σε επιθηλιακά μη-βλαστικά κύτταρα μαστού είναι δυνατόν να επάγει τη γένεση KBK με φαινότυπο CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>/low μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Ras/MAPK [28]. Επιπλέον, η επαγωγή της έκφρασης TWIST1 σε σειρές μαστού βρέθηκε να επάγει στα κύτταρα την έκφραση του φαινότυπου CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> και να αυξάνει την υψηλή ενεργότητα ALDH, ενισχύοντας την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και το μεταστατικό τους δυναμικό [195]. Σε μία άλλη μελέτη δείχθηκε επίσης ότι η ένεση καρκινικών κυττάρων με χαρακτήρα EMM σε ποντικούς οδήγησε σε ανάπτυξη όγκων εμπλουτισμένων σε CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-</sup>/low κύτταρα [196].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μια σειρά ακόμη από μελέτες που ακολούθησαν συγκλίνουν στο ότι η EMM λειτουργεί ως μία διαδικασία αποδιαφοροποίησης των κυττάρων, μετατρέποντας τα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα σε βλαστικά [139;197]. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι η επαγωγή EMM μέσω TWIST1 και SNAIL1 σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού επάγει την έκφραση μιας σειράς βλαστικών δεικτών και μετατρέπει τα κύτταρα σε πολυδύναμα και ικανά να διαφοροποιηθούν εκ νέου σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα ή οστεοβλάστες [198]. Η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων έχει βρεθεί να επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους μέσω καλά μελετημένων επαγωγέων EMM. Για παράδειγμα ο TWIST1 έχει δείχθει ότι ρυθμίζει την έκφραση του ογκογονιδίου Bmi-1 που σχετίζεται άμεσα με την αυτο-ανανέωση και ότι τα δύο αυτά μόρια δρουν σε συνέργεια προκειμένου να καταστείλουν την έκφραση της E-cadherin [199]. Ομοίως, ο ZEB1 ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση των γονιδίων SOX2 και KLF4 που σχετίζονται με το βλαστικό φαινότυπο, μέσω

καταστολής miRNAs που αναστέλλουν τη βλαστικότητα [200], ενώ ο SNAIL2 έχει βρεθεί να επάγει τη βλαστικότητα σε συνεργασία με το SOX9 [201].

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων είναι επίσης μία δυναμική διαδικασία και ότι η ισορροπία μεταξύ βλαστικών και διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων ρυθμίζεται ανάλογα με τα περιβαλλοντικά σήματα μέσω της δυναμικής εναλλαγής μεταξύ EMM και MET. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα μετατρέπονται αρχικά σε μία ενδιάμεση κατάσταση διαφοροποίησης, από την οποία στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει η πλήρης αποδιαφοροποίηση ή ο μετασχηματισμός τους [161;202;203]. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τα μη-βλαστικά καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε KBK μέσω τροποποίησης της διάταξης χρωματίνης του υποκινητή του ZEB1, η οποία επιτυγχάνεται μέσω άμεσης ανταπόκρισης σε αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος [204]. Επιπλέον, σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα με ενδιάμεσο φαινότυπο EMM ήταν πολύ πιο πιθανό να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες σε σχέση με εκείνα με αμιγώς επιθηλιακό ή μεσεγχυματικό φαινότυπο, πιθανότητα η οποία ρυθμίζεται άμεσα μέσω του παράγοντα NF-κB [205]. Η μελέτη αυτή έρχεται σε συμφωνία και με άλλες ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι ο βλαστικός χαρακτήρας εμφανίζεται απαραίτητος στα αρχικά στάδια της EMM, ωστόσο μεταγενέστερα φαίνεται ότι δυσχεραίνει την πλήρη EMM του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων [206]. Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε στον καρκίνο του μαστού ότι υπάρχει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ μεσεγχυματικών και επιθηλιακών KBK. Τα μεσεγχυματικά KBK ήταν εκείνα με το φαινοτυπικό προφίλ CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-</sup>, τα οποία ήταν περισσότερο αδρανή και ταυτοποιήθηκαν στα όρια του όγκου με το φυσιολογικό επιθήλιο, εκεί δηλαδή όπου ξεκινάει η διείδυση, ενώ αντιθέτως τα επιθηλιακά KBK ήταν εκείνα με την υψηλή ενεργότητα ALDH, τα οποία ήταν περισσότερο πολλαπλασιαζόμενα και ανιχνεύτηκαν στο πιο κεντρικό τμήμα του όγκου [207].

Όπως υποδεικνύεται από τα παραπάνω, υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ EMM και KBK, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου συνδέονται τα δύο αυτά χαρακτηριστικά βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Παρόλα αυτά, όλο και περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο ότι τα κύτταρα με ιδιότητες EMM και KBK εμφανίζουν αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, με αποτέλεσμα όχι μόνον να μη στοχεύονται

αποτελεσματικά, αλλά και να εμπλουτίζονται περαιτέρω [100;208;209]. Επιπλέον, μία σειρά από μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα που ταυτοποιούνται στο περιφερικό αίμα των ασθενών και επομένως είναι εκείνα που συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία, συχνά εκφράζουν παράλληλα δείκτες EMM και KBK [167]. Επομένως, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν ειδικά το συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων.

#### **1.3.4. Θεραπευτική στόχευση καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστικά επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής και καρκινικών βλαστικών κυττάρων**

Μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων με χαρακτήρες EMM και KBK, είναι οι στοχεύουσες θεραπείες έναντι μορίων που συμμετέχουν ενεργά στην EMM και παράλληλα εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης που ενέχονται στην αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των KBK [210]. Μια σειρά από προκλινικά δεδομένα στον καρκίνο του μαστού υποστηρίζουν ότι υποπληθυσμός των KBK μπορεί να στοχευθεί αποτελεσματικά μέσω του αναστολέα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, everolimus, είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και βιολογικούς παράγοντες, ενώ στα πλαίσια μελέτης φάσης III έχει δειχθεί το όφελός του σε συνδυασμό με exemestane σε ασθενείς με ορμονοθετικό HER2-αρνητικό μεταστατικό καρκίνο μαστού [211-215]. Ομοίως, οι αναστολείς του μονοπατιού Notch στοχεύουν επίσης αποτελεσματικά τα KBK μέσω αναστολής της  $\gamma$ -secretase (MK-0752 και RO4929097) και το όφελός τους έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού με μελέτες φάσης I και II, ενώ υπό διερεύνηση είναι η αποτελεσματικότητά τους σε συνδυασμό με έναν ανταγωνιστή του μονοπατιού Hedgehog (vismodegib), ο οποίος φαίνεται να στοχεύει τα ανθεκτικά στην ταμοξιφένη καρκινικά κύτταρα [216-220]. Επιπλέον, σε ένα μοντέλο ποντικού καρκίνου μαστού με υπερέκφραση HER2, βρέθηκε ότι η στόχευση των KBK ήταν δυνατή μέσω ενός αναστολέα του μονοπατιού Wnt (PKF118-310) [221], ενώ υπό διερεύνηση είναι επίσης η επίδραση της θεραπείας με αναστολείς της πρωτεΐνης GSK3, η οποία εμπλέκεται στα μονοπάτια σηματοδότησης Wnt και Hedgehog [222].

Άλλες θεραπείες που στοχεύουν αποτελεσματικά τα KBK στον καρκίνο του μαστού είναι ένας αναστολέας της πολυμεράσης PARP (olaparib) [223] και το οξύ ATRA (all-trans retinoic acid), το οποίο ωστόσο σε συνδυασμό με paclitaxel δεν έδειξε κάποιο όφελος σε μελέτη φάσης II [224;225]. Επιπλέον, η σαλινομυκίνη, η μετφορμίνη και ένας αναστολέας ABC (ATP binding cassette) (MS-209), έχει επίσης βρεθεί ότι μπορούν να στοχεύσουν τα KBK σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά [226-229]. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η στόχευση των KBK είναι δυνατή με αντισώματα έναντι των επιφανειακών μορίων CD44, CD123, CD33 και CD133 [230-233], ενώ τα τελευταία χρόνια διερευνάται η θεραπευτική χρήση των microRNAs, τα οποία αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές των KBK [234]. Τέλος, μια σειρά από δεδομένα έχουν δείξει την άμεση συσχέτιση μεταξύ των KBK και του υποδοχέα HER2 και την αποτελεσματική στόχευση των KBK μέσω του trastuzumab που στοχεύει την εξωκυττάρια υπομονάδα του HER2, ενώ η αντίσταση στο trastuzumab έχειδειχθεί να σχετίζεται με την επαγωγή των KBK μέσω της ιντερλευκίνης 6 [154;155;235]. Επιπλέον, τόσο το lapatinib το οποίο στοχεύει ενδοκυττάρια τους υποδοχείς EGFR και HER2, όσο και αναστολείς των υποδοχέων CXCR1/2, έχειδειχθεί ότι μπορούν να στοχεύσουν τα KBK μέσω αναστολής της δράσης της ιντερλευκίνης 8, η οποία επίσης ενέχεται στη ρύθμιση των KBK [236-238].

Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται επίσης θεραπείες που στοχεύουν σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την έκφραση μορίων με ενεργό συμμετοχή στην EMM των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, είναι δυνατή η αναστολή της φωσφορυλίωσης της STAT3 [239] και του μονοπατιού Ras/MAPK μέσω στόχευσης του uPA (sorafenib) [240], του μονοπατιού Hedgehog (cyclopamin) [241], των μονοπατιών Src, MEK1/2-ERK1/2 και Akt μέσω στόχευσης των FGFR4 και ILK [242;243], καθώς επίσης και των μονοπατιών MAPK, PI3K/AKT μέσω στόχευσης του AXL RTK [244]. Η στόχευση του TGF-β είναι επίσης δυνατή μέσω αναστολής της κινάσης ALK [100;245], είτε μέσω άμεσης μεταγραφικής καταστολής, η οποία έχει βρεθεί ότι είναι δυνατή για μια σειρά από παράγοντες που συμμετέχουν ενεργά στην επαγωγή EMM, όπως είναι οι TWIST1, ZEB1, SLUG, SNAIL και MMP3/9 (metformin και resveratol) [246;247]. Επομένως, υπάρχουν θεραπείες που στοχεύουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των καρκινικών κυττάρων σε EMM και των KBK. Ο συνδυασμός των κοινών θεραπειών με νέες θεραπείες που στοχεύουν το

συγκεκριμένο υποπληθυσμό, πιθανά να αποτελέσουν στο μέλλον μία ριζική θεραπεία της νόσου, προσφέροντας πραγματικό όφελος στην επιβίωση των ασθενών με πρώιμο κυρίως καρκίνο [210]. Η αξία μιας τέτοιας θεραπευτικής προσέγγισης μένει να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερες και προοπτικές κλινικές μελέτες.

## **1.4. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

### **1.4.1. Σημασία της μελέτης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ) είναι τα καρκινικά κύτταρα που ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα των ασθενών με καρκίνο και συμπεριλαμβάνουν τον πληθυσμό των κυττάρων που ενέχεται στην ανάπτυξη της μετάστασης [5]. Η πρώτη αναφορά στην ύπαρξη των κυττάρων αυτών έγινε το 1869 από τον Thomas Ashworth [248] και έως σήμερα πληθώρα δεδομένων που προκύπτουν από μελέτες σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανόμενου του καρκίνου του μαστού, έχουν δείξει την παρουσία και την κλινική σημασία της ανίχνευσής τους στο αίμα των ασθενών [53;249]. Παρόλα αυτά, λόγω της έλλειψης ευαίσθητων και ειδικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση ενός τόσο σπάνιου πληθυσμού κυττάρων, η συχνότητα του οποίου στο αίμα ανέρχεται περίπου σε 1 ΚΚΚ ανά  $10^6$  με  $10^7$  λευκά αιμοσφαίρια [250], το ενδιαφέρον στράφηκε αρχικά στην ταυτοποίηση των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (ΔΚΚ) στο μυελό των οστών. Ο μυελός των οστών αποτελεί το σύνηθες σημείο ανάπτυξης μικρομεταστάσεων [4] και επιπλέον θεωρείται ως το όργανο στο οποίο οδηγούνται τα ΚΚΚ που μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας προκειμένου να επιβιώσουν, λειτουργώντας ως μία δεξαμενή καρκινικών κυττάρων [251]. Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας ΚΚΚ και ΔΚΚ στο μυελό των οστών [252], ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι η συχνότητα των ΔΚΚ είναι μεγαλύτερη [253;254]. Παρόλο που πληθώρα μελετών εδώ και αρκετά χρόνια έχει δείξει ότι η παρουσία ΔΚΚ στο μυελό των οστών σχετίζεται σημαντικά με χειρότερη κλινική έκβαση [255], η ανίχνευσή τους αποτελεί μία ιδιαίτερα επεμβατική μέθοδο, η οποία πραγματοποιείται μέσω επίπονης δειγματοληψίας και επομένως χωρίς τη δυνατότητα επανάληψης ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Αντιθέτως, η ταυτοποίηση των ΚΚΚ απαιτεί μία απλή και ανώδυνη αιμοληψία, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί συχνά και

επαναλαμβανόμενα κατά τη διάρκεια της θεραπείας και της περαιτέρω παρακολούθησης των ασθενών. Για τους παραπάνω λόγους, η ανίχνευση των ΚΚΚ επικράτησε στη συνέχεια και αποτελεί έως σήμερα ένα ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στην κλινική ογκολογική πράξη.

Η ταυτοποίηση των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών σηματοδοτεί την παρουσία υπολειπόμενης νόσου και επομένως μπορεί να συμβάλλει στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Πέραν όμως της εκτίμησης της παρουσίας των ΚΚΚ, ο μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους αποτελεί κεντρικό θέμα σημαντικής ερευνητικής προσπάθειας από πολλές ομάδες, καθώς έχει βρεθεί ότι δεν διαθέτουν όλα τα ΚΚΚ το ίδιο μεταστατικό δυναμικό [11]. Η αναζήτηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με επιθετική κλινική συμπεριφορά ή με αντίσταση στη θεραπεία, μπορεί να ταυτοποιήσει υποομάδες ασθενών με φτωχή πρόγνωση, οι οποίοι πιθανόν είναι υποψήφιοι για προσέγγιση με κάποια διαφορετική θεραπεία, ενδεχομένως περισσότερο επιθετική. Αντιστοίχως, η ταυτοποίηση ΚΚΚ με ένα ευνοϊκότερο προφίλ θα μπορούσε να συμβάλλει στην αντιμετώπιση των ασθενών μέσω λιγότερο επιθετικών θεραπευτικών προσεγγίσεων [12]. Επιπλέον, τα ΚΚΚ συχνά εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου και επομένως η ανάλυσή τους θεωρείται ως μια «υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου», η οποία μπορεί όχι μόνο να προσδιορίσει το φορτίο της νόσου, αλλά και να παρέχει σημαντική πληροφορία ως προς το μοριακό προφίλ του όγκου οποιαδήποτε χρονική στιγμή [13;256]. Η πληροφορία που προκύπτει από το φαινότυπο των ΚΚΚ είναι δυνατόν να οδηγήσει σε θεραπείες με νέους στοχευτικούς παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να επιλεγούν ακόμη και βάσει έκφρασης μορίων-στόχων στα ίδια τα ΚΚΚ [257]. Η στόχευση των ΚΚΚ θα μπορούσε να αποτρέψει τη δημιουργία μεταστάσεων, η οποία αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου στον καρκίνο μαστού και επομένως να συμβάλλει στη βελτίωση της κλινικής έκβασης των ασθενών. Τέλος, η φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των ΚΚΚ θα μπορούσε να αναδείξει τα χαρακτηριστικά εκείνα που προάγουν τη μεταστατική διαδικασία, συμβάλλοντας στην κατανόηση των μηχανισμών της μετάστασης [15]. Για όλους τους παραπάνω λόγους, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες τεχνολογίες για την ανίχνευση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των ΚΚΚ.

## **1.4.2. Μεθοδολογίες ταυτοποίησης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Ένας σημαντικός περιορισμός κατά την ανίχνευση των ΚΚΚ είναι η υψηλή ετερογένεια των κυττάρων αυτών ως προς την έκφραση των διαφόρων μορίων. Λόγω της έλλειψης ειδικών δεικτών για ΚΚΚ, η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται κυρίως βάσει της ανίχνευσης μορίων που εκφράζονται στα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης και όχι στα κύτταρα του αίματος. Ανάλογα λοιπόν με τον τύπο του καρκίνου χρησιμοποιούνται δείκτες επιθηλιακής προέλευσης, όπως είναι οι κυτταροκερατίνες (cytokeratin, CK) και ο καρκίνο-σχετιζόμενος μεταγωγέας σήματος ασβεστίου EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), οι οποίοι ωστόσο έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζουν έναν υποπληθυσμό των ΚΚΚ και όχι το σύνολο αυτών [258;259]. Είναι γνωστή πλέον η σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης διαφόρων μορίων μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και ΚΚΚ, ή ακόμη και μεταξύ μετάστασης και ΚΚΚ στον ίδιο ασθενή [260]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια του μοριακού προφίλ των ΚΚΚ μεταξύ διαφορετικών ασθενών ή ακόμη και σε επίπεδο ενός ασθενή [10]. Ένας άλλος σημαντικός περιορισμός είναι η ιδιαίτερα μικρή συχνότητα των ΚΚΚ μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να αυξάνεται κατά το μέγιστο δυνατό η ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης των ΚΚΚ, προηγείται σχεδόν πάντοτε ο εμπλουτισμός του δείγματος σε ΚΚΚ.

### **1.4.2.1. Τεχνικές εμπλουτισμού των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Οι στρατηγικές εμπλουτισμού των ΚΚΚ βασίζονται είτε σε μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η ικανότητα παραμόρφωσης, είτε σε βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η έκφραση ορισμένων μορίων [17]. Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ βάσει του αυξημένου τους μεγέθους είναι σήμερα δυνατός μέσω μιας σειράς συσκευών που εμπεριέχουν ειδικά φίλτρα μεμβράνης, όπως είναι οι τεχνολογίες ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) [261], ScreenCell® [262], CellOptics® [263] και η μικροσυσκευή MEMS (micro electro-mechanical system) [264]. Μία άλλη μορφή εμπλουτισμού επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής πυκνότητας των ΚΚΚ, όπως για παράδειγμα είναι η φυγοκέντρωση με διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης [265] και η συσκευή OncoQuick™ [266]. Παρόλα αυτά, λόγω της μεγάλης ετερογένειας των ΚΚΚ, η



πιθανότητα απώλειας ορισμένων υποπληθυσμών με διαφορετικό μέγεθος και πυκνότητα είναι αυξημένη [265;267]. Μια σειρά από συσκευές έχουν επίσης κατασκευαστεί για το διαχωρισμό των ΚΚΚ βάσει της ικανότητας παραμόρφωσης και του ηλεκτρικού τους φορτίου, όπως είναι η φωτοακουστική κυτταρομετρία ροής [268], ένα καινοτόμο τσιπ τρισδιάστατης γεωμετρίας το οποίο βασίζεται στη διαφορετική ικανότητα παραμόρφωσης των κυττάρων [269], συσκευές που χρησιμοποιούν την κλασματοποίηση μέσω πολλαπλών οπών (multiorifice flow fractionation, MOFF) ή τη διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP) [270;271] και η συσκευή ApoStream, η οποία παγιδεύει τα καρκινικά κύτταρα σε θάλαμο ροής [272].

Μία εναλλακτική προσέγγιση εμπλουτισμού αφορά στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό των κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα και τη βοήθεια κατάλληλου μαγνήτη, όπως για παράδειγμα είναι η θετική επιλογή των ΚΚΚ με τη χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του EpCAM, το οποίο εκφράζεται στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων διαφόρων όγκων [273;274]. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η αρνητική επιλογή των ΚΚΚ, μέσω απομάκρυνσης των κυττάρων του αίματος έπειτα από χρήση σφαιριδίων με αντίσωμα έναντι του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 [275]. Η κυριότερη μέθοδος ταυτοποίησης ΚΚΚ στο αίμα που βασίζεται στον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό βάσει έκφρασης EpCAM είναι η τεχνολογία CellSearch, η οποία είναι και η μοναδική τεχνική απομόνωσης και ανίχνευσης ΚΚΚ με έγκριση από τον παγκόσμιο οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) [276]. Άλλες μεθοδολογίες στις οποίες πραγματοποιείται ανοσομαγνητική απομόνωση βάσει έκφρασης EpCAM, είναι το MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) [277], το AdnaTest (επιπλέον χρήση σφαιριδίων με αντίσωμα έναντι του MUC1) [278], το CTC chip με ιδιαίτερα υψηλή απόδοση και καθαρότητα [279], καθώς επίσης και η τεχνική RARE™ (RosetteSep-Applied imaging Rare Event), η οποία συνδυάζει το μαγνητικό διαχωρισμό των ΚΚΚ μέσω έκπλυσης των CD45-θετικών φυσιολογικών κυττάρων και επιπλέον βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα των κυττάρων [280]. Μία καινοτόμος τεχνική περιλαμβάνει επίσης τη στόχευση των ΚΚΚ σε ολικό αίμα, χρησιμοποιώντας μαγνητική απομόνωση με σφαιρίδια, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία και νανοσωματίδια SERS (surface-enhanced Raman scattering (SERS) συνδεδεμένα με αντίσωμα έναντι των EpCAM, HER2 ή EGFR [281;282].

Παρόλα αυτά, είναι πλέον γνωστή η αδυναμία των παραπάνω μεθόδων να απομονώσουν τον υποπληθυσμό των ΚΚΚ που δεν εκφράζουν το μόριο EpCAM, στα πλαίσια της EMM που συχνά υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα [283]. Η δοκιμή CAM αποτελεί μία καινοτόμο μέθοδο εμπλουτισμού ζωντανών ΚΚΚ, η οποία βασίζεται στην υψηλή συγγένεια των επιθετικών ΚΚΚ προς τις πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης CAM (cell adhesion matrix). Το αίμα τοποθετείται σε σωληνίσκους επικαλυμμένους με πρωτεΐνες CAM, με αποτέλεσμα τα επιθετικά ΚΚΚ να συνδέονται στα μόρια αυτά και να τα καταστρέφουν, μέσω ενός μηχανισμού όμοιου με εκείνο που χρησιμοποιούν κατά τη διείσδυση στο μεταστατικό ιστό [284]. Τέλος, υπάρχουν πλέον καινοτόμες μεθοδολογίες που συνδυάζουν φυσικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ΚΚΚ, όπως είναι το CTC-iChip, το οποίο χρησιμοποιώντας μία τεχνολογία ελεγχόμενης μικρο-ροής πραγματοποιεί την απομόνωση των ΚΚΚ ανεξάρτητα από την παρουσία διαφόρων επιφανειακών αντιγόνων [285].

Σε όλες τις μεθόδους εμπλουτισμού των ΚΚΚ, είτε αυτές βασίζονται στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, είτε στις διαφορετικές φυσικές ιδιότητες των κυττάρων, η απόδοση της μεθόδου, δηλαδή ο βαθμός της απώλειας των ΚΚΚ θα πρέπει να καθορίζεται με πειράματα ανάκτησης και να λαμβάνεται υπόψη κατά την αξιολόγηση της μεθόδου και φυσικά κατά την εκτίμηση του αποτελέσματος. Τέλος, καμία από τις παραπάνω μεθόδους δεν επιτρέπει την απόλυτη απομόνωση των ΚΚΚ χωρίς πρόσμιξη φυσιολογικών κυττάρων. Αντιθέτως, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που επιτρέπουν την απομόνωση μονήρων ΚΚΚ με απόλυτη καθαρότητα, όπως είναι η απομόνωση με τη βοήθεια του ειδικού μικροχειριστή TransferMan NKII [286] και το αυτοματοποιημένο σύστημα DEPArray, το οποίο απομονώνει μονήρη ΚΚΚ μέσω διηλεκτροφόρησης, έπειτα από ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό [287].

#### **1.4.2.2. Μέθοδοι ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Μία γενική ταξινόμηση των μεθοδολογιών ανίχνευσης των ΚΚΚ στηρίζεται στο αν η μέθοδος ανιχνεύει πρωτεΐνες που εκφράζονται στα κύτταρα ή τα νουκλειικά οξέα τους, κατηγοριοποιώντας τις σε κυτταρομετρικές και μοριακές, αντίστοιχα [17]. Και οι δύο κατηγορίες βασίζονται στην ανίχνευση των ΚΚΚ μέσω της χρήσης ειδικών δεικτών, ωστόσο οι κυτταρομετρικές μέθοδοι εμπεριέχουν σε μεγαλύτερο βαθμό τον παράγοντα της υποκειμενικής αξιολόγησης. Η υποκειμενικότητα αφορά ακόμη και

τις ημι-αυτοματοποιημένες κυτταρομετρικές μεθόδους, όπως για παράδειγμα είναι η πλατφόρμα CellSearch™, στην οποία έπειτα από το μαγνητικό εμπλουτισμό των ΚΚΚ βάσει έκφρασης EpCAM, ακολουθεί ημι-αυτοματοποιημένος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι των κυτταροκερατινών (CK) 8, 18 και 19, ως δείκτη επιθηλιακών κυττάρων, του CD45 ως δείκτη αιμοποιητικών κυττάρων και της χρωστικής dapi (4', 6-diamidino-2-phenylindole) για τον εντοπισμό του πυρήνα των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθεί σάρωση μέσω ημι-αυτοματοποιημένου αναλυτή μικροσκοπίας και απεικόνιση των κυττάρων που πληρούν τα κριτήρια της αρνητικότητας για CD45 και θετικότητας για CK και dapi, τα οποία αξιολογούνται και επιβεβαιώνονται από τον παρατηρητή, ενώ υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ενός ακόμη αντισώματος επιλογής [288]. Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των ΚΚΚ είναι η ανοσοκυτταροχημεία, όπου έπειτα από εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ πραγματοποιείται ανοσοφθορισμός με οποιοδήποτε επιθυμητό αντίσωμα έναντι μορίων επιθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων και παρατήρηση μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Πέραν του απλού μικροσκοπίου φθορισμού και της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με Laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) που έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ΚΚΚ [289;290], τα τελευταία χρόνια έχει κατασκευαστεί ένα ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού, το σύστημα ARIOL, το οποίο περιλαμβάνει λογισμικό κατασκευασμένο ειδικά για την ανίχνευση των ΚΚΚ [43;291]. Η μεθοδολογία αυτή παρέχει τη δυνατότητα του πολλαπλού χαρακτηρισμού των ΚΚΚ έπειτα από ανοσοφθορισμό με διαφορετικά αντισώματα, την αυτόματη σάρωση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και τον εντοπισμό των ΚΚΚ βάσει κριτηρίων που ορίζονται από το χειριστή. Έτσι, είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ΚΚΚ βάσει της απουσίας έκφρασης αιμοποιητικών δεικτών και ανίχνευσης έκφρασης οποιουδήποτε επιθηλιακού δείκτη, με αποτέλεσμα η μέθοδος να εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά θετικότητας σε ΚΚΚ σε σχέση με το CellSearch [292]. Το σύστημα ARIOL επιτρέπει επίσης τον περαιτέρω φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ΚΚΚ ως προς επιπλέον μόρια του ενδιαφέροντος, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε μελέτης, καθώς επίσης και την ποσοτικοποίηση της έντασης της έκφρασης κάθε μορίου, συμβάλλοντας στην πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση της αξιολόγησης των ΚΚΚ στη βάση της σημαντικής τους ετερογένειας. Επιπλέον, λόγω της δυνατότητας παρατήρησης των υποψήφιων ΚΚΚ στην επιθυμητή εστίαση και μεγέθυνση, είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους και της πυκνότητας

του πυρήνα ή της αποδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού και επομένως η ασφαλέστερη αξιολόγηση από τον χειριστή. Ένα αντίστοιχο ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα είναι η τεχνολογία FAST (fiber-optic array scanning technology), όπου η εκπομπή φάσματος φθορισμού συλλέγεται με τη χρήση μίας συστοιχίας οπτικών ινών με αποτέλεσμα τη γρήγορη σάρωση του δείγματος [293]. Ομοίως, έχει αναπτυχθεί μία μέθοδος πολλαπλού χαρακτηρισμού των κυττάρων με τη χρήση χρωστικών της τεχνολογίας DyLight, η οποία περιλαμβάνει κβαντικά σημεία με μικρό φάσμα εκπομπής, οδηγώντας σε καλύτερη ένταση και απεικόνιση του σήματος σε σχέση με τις φθορίζουσες χρωστικές [294;295]. Άλλες αυτοματοποιημένες συσκευές ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω ανοσοφθορισμού, είναι τα κυτταρόμετρα σάρωσης με laser (Laser Scanning Cytometer, LSC), όπως είναι το Maintrac<sup>®</sup> [296], καθώς και το κυτταρόμετρο απεικόνισης CellTracks, το οποίο επιτρέπει παράλληλα την ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού και την αξιολόγηση μορφολογικών χαρακτηριστικών [297]. Η ανίχνευση των ΚΚΚ έχει επίσης επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια μέσω απλής κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι EpCAM, CK και CD45 [298].

Μία ιδιαίτερα καινοτόμος μεθοδολογία που αναπτύχθηκε πρόσφατα είναι το CellCollector<sup>TM</sup>, το οποίο αποτελείται από ένα ειδικό σύρμα επικαλυμμένο με ανοσοσφαιρίδια EpCAM, το οποίο εισέρχεται μέσω ειδικού σωληνίσκου στη φλέβα του ασθενή, επιτρέποντας την *in vivo* ανίχνευση των ΚΚΚ στην κυκλοφορία. Η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση 1,5 λίτρου αίματος σε διάρκεια μισής ώρας, αυξάνοντας κατά πολύ την ευαισθησία της μεθόδου [299]. Μία άλλη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια είναι το CTC-chip, μία πλατφόρμα η οποία επιτρέπει την απομόνωση των ΚΚΚ από ολικό αίμα, το οποίο ρέει μέσα σε κολώνες ανάμεσα σε μικροβοθρία επικαλυμμένα με αντίσωμα EpCAM υπό ελεγχόμενες συνθήκες ροής και την ανίχνευσή τους με αντισώματα έναντι των CK και CD45 [279;300]. Αντίστοιχα τσιπ είναι το Ephesia chip [301], το IsoFlux system [302], το Herringbone-Chip [303] και η συσκευή JETTA<sup>TM</sup> [304]. Τέλος, η τεχνολογία EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) αποτελεί μία μεθοδολογία που ταυτοποιεί έμμεσα την παρουσία ζωντανών ΚΚΚ, μέσω ανίχνευσης των πρωτεϊνών που εκκρίνονται ή διαχέονται ελεύθερα από τα ΚΚΚ σε καλλιέργεια που διαρκεί 24 με 48 ώρες [305].

Όσον αφορά στις μοριακές τεχνικές ανίχνευσης ΚΚΚ, γενικά θεωρούνται πιο ευαίσθητες και αντικειμενικές σε σχέση με τις κυτταρομετρικές μεθόδους. Ωστόσο δεν επιτρέπουν το μορφολογικό χαρακτηρισμό των κυττάρων και επιπλέον απαιτούν καλύτερο εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ, καθώς η πρόσμιξη με τα φυσιολογικά κύτταρα μειώνει πολύ την ειδικότητά τους [306;307]. Η ανίχνευση του DNA των ΚΚΚ είναι δυνατή μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), η οποία ωστόσο έχει το μειονέκτημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω της ανίχνευσης και του ελεύθερου DNA που απελευθερώνεται στο αίμα από αποπτωτικά ΚΚΚ [308]. Για το λόγο αυτό οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) για την ανίχνευση του mRNA, το οποίο προέρχεται κυρίως από ζωντανά ΚΚΚ δεδομένου του ιδιαίτερα μικρού χρόνου ζωής του [309]. Η προγνωστική αξία της ανίχνευσης γονιδίων που σχετίζονται με καρκινικά και επιθηλιακά αντιγόνα, όπως είναι οι CK7 και CK19, το EpCAM, το MUC1, ο υποδοχέας HER2 και η μαστοσφαιρίνη A (mammaglobin A) έχει επανειλημμένα δειχθεί μέσω RT-PCR στον καρκίνο του μαστού, με το mRNA της CK19 να αποτελεί το συχνότερα μελετημένο μόριο σε κλινικές μελέτες [310-312]. Οι κύριοι περιορισμοί στις μοριακές μεθόδους είναι η ετερογένεια της έκφρασης των διαφόρων δεικτών, καθώς επίσης και η σημαντική πρόσμιξη των δειγμάτων με φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, τα οποία είναι δυνατόν να εκφράζουν επιθηλιακούς ή καρκινικούς δείκτες, αν και σε ιδιαίτερα μικρά επίπεδα [313;314]. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πλέον ευρέως η ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time RT-PCR), η οποία παρέχει τη δυνατότητα αφενός της ποσοτικοποίησης του καρκινικού φορτίου και αφετέρου του προσδιορισμού ενός ορίου μεταγράφων του εκάστοτε δείκτη μεταξύ θετικού και αρνητικού σε ΚΚΚ δείγματος, αυξάνοντας ιδιαίτερα την ειδικότητα της ανίχνευσης [5;315;316]. Μία εμπορικά διαθέσιμη τεχνολογία που βασίζεται στη μοριακή ανίχνευση των ΚΚΚ είναι το AdnaTest, το οποίο μέσω μη-ποσοτικής RT-PCR πραγματοποιεί την ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με EMM μετάβαση (PI3Ka, Akt-2, TWIST1) ή KBK (ALDH1), έπειτα από ανοσομαγνητικό διαχωρισμό των ΚΚΚ με σφαιρίδια επικαλυμμένα με MUC1, HER2 και EpCAM [278]. Βεβαίως κι εδώ υπάρχει το μειονέκτημα της απώλειας του πληθυσμού των ΚΚΚ που δεν εκφράζει τα συγκεκριμένα μόρια [317]. Μία νέα ημι-αυτοματοποιημένη τεχνολογία με μεγάλη ευαισθησία είναι το σύστημα CTCscore, το

οποίο επιτρέπει την αποτελεσματική ποσοτικοποίηση των RNA μετάγραφων με *in situ* υβριδοποίηση [318]. Τέλος, η επιπλέον ενίσχυση του γονιδιώματος (whole genome amplification, WGA) είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μοριακή ανάλυση σε επίπεδο ενός κυττάρου, έπειτα από την εφαρμογή μεθόδων που απομονώνουν μονήρη ΚΚΚ [287].

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μεθοδολογιών που στοχεύουν στην αποτελεσματική απομόνωση και ανίχνευση των ΚΚΚ στο αίμα ασθενών με καρκίνο είναι ραγδαία. Παρόλα αυτά η ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι μεγάλη [319;320], γεγονός που δυσχεραίνει την εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πράξη. Επιπλέον, είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη κλινικών μελετών να ακολουθούνται μεθοδολογίες, όχι μόνον με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, αλλά και σημαντική επαναληψιμότητα [308;321].

#### **1.4.3. Κλινική σημασία της ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού**

Σύμφωνα με μελέτες στον πρώιμο καρκίνο μαστού, η παρουσία των ΚΚΚ ταυτοποιείται σε ποσοστό 22-31% των ασθενών έπειτα από χειρουργική εξαίρεση του όγκου και πριν την έναρξη της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, η οποία έχει βρεθεί να οδηγεί σε σημαντική μείωση του ποσοστού αυτού περίπου στο 7% [322;323]. Η προγνωστική αξία της ταυτοποίησης των ΚΚΚ στον πρώιμο καρκίνο μαστού δείχθηκε πρώτη φορά το 2002, όπου βρέθηκε ότι η ανίχνευση του mRNA της CK19 πριν την έναρξη της συμπληρωματικής θεραπείας ήταν ανεξάρτητος και σημαντικός δείκτης μειωμένου διαστήματος ελεύθερου νόσου και μειωμένης συνολικής επιβίωσης των ασθενών [324]. Η ίδια ομάδα στη συνέχεια, πραγματοποιώντας μια σειρά από μελέτες ανίχνευσης της CK19 μέσω ποσοτικής RT-PCR, επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία της ανίχνευσης ΚΚΚ στον πρώιμο καρκίνο μαστού, πριν, κατά τη διάρκεια και στο τέλος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας [7;311;312;325]. Εν συνεχεία, διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση ΚΚΚ κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών έπειτα από χημειοθεραπεία και ορμονοθεραπεία ήταν επίσης σημαντικός δείκτης αυξημένου κινδύνου υποτροπής και θανάτου και ισχυρή ένδειξη παρουσίας ανθεκτικής υπολειπόμενης νόσου [326]. Η προγνωστική αξία της ανίχνευσης των ΚΚΚ ως προς το διάστημα ελεύθερου νόσου και ολικής

επιβίωσης επιβεβαιώθηκε πρόσφατα με μία πολύ μεγάλη κλινική μελέτη (SUCCESS) που συμπεριέλαβε 2.026 ασθενείς [249], από την οποία προέκυψε επίσης ότι τα ΚΚΚ ανιχνεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες, εντούτοις η ανίχνευση ΚΚΚ έχει βρεθεί να αποτελεί ισχυρό δείκτη κακής πρόγνωσης ακόμη και απουσία λεμφαδενικής διήθησης [312]. Επιπλέον, σε μία μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε το 2012 και συμπεριέλαβε δεδομένα από 2.993 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, επιβεβαιώθηκε η σημαντική αξία της ταυτοποίησης ΚΚΚ ως προγνωστικού δείκτη μειωμένης επιβίωσης έως την υποτροπή και συνολικής επιβίωσης [8]. Τέλος, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία ΚΚΚ πριν ή μετά τη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία επίσης αποτελεί σημαντικό δείκτη μειωμένης ολικής επιβίωσης, συμβάλλοντας στην ακριβέστερη εκτίμηση και θεραπευτική προσέγγιση της συγκεκριμένης ομάδας ασθενών [327-330].

Στο μεταστατικό καρκίνο μαστού, αντιστοίχως, η ανίχνευση ΚΚΚ περιγράφεται σε ποσοστό περίπου 50% των ασθενών. Μία σειρά από μελέτες από το 2004 έως σήμερα δείχνουν πως η ταυτοποίηση ΚΚΚ μέσω της τεχνολογίας του CellSearch αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη μειωμένης επιβίωσης έως την υποτροπή και μειωμένης ολικής επιβίωσης [331;332], με αποτέλεσμα την έγκριση της συγκεκριμένης πλατφόρμας από τον FDA για την κλινική της εφαρμογή ως εργαλείο για την πρόγνωση και την αντιμετώπιση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Η προγνωστική αξία της ανίχνευσης ΚΚΚ πριν την έναρξη και στο τέλος της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας έχει επίσης δειχθεί μέσω μοριακών μεθόδων [6;333]. Επιπλέον η παρακολούθηση των ΚΚΚ αποτελεί ισχυρό δείκτη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [9;334;335], με προβλεπτική αξία μεγαλύτερη ακόμη και από εκείνη της κλασικής εκτίμησης με απεικονιστικές μεθόδους [336;337]. Η κλινική σημασία της παρακολούθησης των ΚΚΚ πριν και κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, επιβεβαιώθηκε πρόσφατα από συγκεντρωτικές μελέτες 1.944 και 3.069 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, ενισχύοντας περαιτέρω την αξία της μελέτης των ΚΚΚ [8;53].

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης τα αποτελέσματα κλινικών μελετών που αποδεικνύουν ότι η συμπληρωματική χορήγηση στοχευουσών θεραπειών αυξάνει την επίδραση της χημειοθεραπείας στη μείωση ή εξάλειψη των ΚΚΚ [14;338]. Με βάση τα παραπάνω, πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια στοχεύουν στη μελέτη του πιθανού όφελους από αλλαγή της θεραπείας στην περίπτωση της παραμονής των

ΚΚΚ έπειτα από χημειοθεραπεία, κάτι το οποίο ωστόσο δεν έχει έως σήμερα αποδειχθεί [339]. Τέλος, η προγνωστική αξία της ανίχνευσης ΚΚΚ εμφανίζεται μειωμένη στην περίπτωση του HER2-υπότυπου του πρωτοπαθούς, πιθανόν λόγω της χορήγησης θεραπειών με στοχεύοντες παράγοντες κι επομένως πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό κλινικών μελετών [340-342].

#### **1.4.4. Κλινική σημασία της φαινοτυπικής ανάλυσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Στα πλαίσια του περαιτέρω χαρακτηρισμού των ΚΚΚ στον καρκίνο του μαστού και της σημασίας της εκτίμησής τους ως μία «υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου», μία σημαντική εφαρμογή είναι η διερεύνηση της έκφρασης των μορίων ER, PR και HER, τα οποία αποτελούν αποτελεσματικούς θεραπευτικούς στόχους στην καθημερινή κλινική ογκολογική πράξη. Ωστόσο πολλές μελέτες έχουν δείξει με τη χρήση διαφορετικών τεχνολογιών ότι το προφίλ των δεικτών αυτών διαφοροποιείται όσο η νόσος εξελίσσεται, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ασυμφωνία μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου, ΚΚΚ και μετάστασης, υποδεικνύοντας ότι η κατάλληλη θεραπεία θα μπορούσε να επιλεγεί βάσει της έκφρασής τους στα ΚΚΚ [256;333;343-345]. Πράγματι, σε μία πρόσφατη μελέτη φάσης II σε ασθενείς με HER2-αρνητικό πρώιμο καρκίνο μαστού, δείχθηκε ότι η χορήγηση trastuzumab, το οποίο στοχεύει τον υποδοχέα HER2, μείωσε αποτελεσματικά τα ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία ΚΚΚ, αυξάνοντας σημαντικά την ελεύθερη νόσου επιβίωση [14], κάτι το οποίο έχει περιγραφεί και σε επίπεδο ΔΚΚ στο μυελό των οστών [323]. Σε εξέλιξη βρίσκονται επίσης μεγάλες κλινικές μελέτες, όπως οι CTC-TREAT, DETECT και CirCe T-DM1, οι οποίες στοχεύουν στην εκτίμηση της προβλεπτικής αξίας της έκφρασης HER2 στα ΚΚΚ ως προς την ανταπόκριση σε στοχεύουσες έναντι του HER2 θεραπείες [346;347]. Επιπλέον, έχει περιγραφεί ότι τα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού εκφράζουν υποδοχείς και ενεργοποιημένες κινάσες που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι EGFR/HER2/PI3K/Akt και επομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους στόχους θεραπείας με κατάλληλους αναστολείς τυροσινικής κινάσης [289;348]. Πράγματι, η ίδια ομάδα έχει δείξει ότι η χορήγηση στοχεύουσας θεραπείας έναντι του EGFR (gefitinib) οδήγησε σε σημαντική μείωση των EGFR-θετικών ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού [349].



Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα ΚΚΚ συχνά εκφράζουν μόρια που εμπλέκονται στη μεταστατική διαδικασία επάγοντας την αγγειογένεση (VEGF και VEGFR), έναντι των οποίων επίσης υπάρχουν διαθέσιμες στοχεύουσες θεραπείες, προσφέροντας ακόμη μια πιθανή θεραπευτική επιλογή σε αυτούς τους ασθενείς [350]. Ένας άλλος πιθανός στόχος, ο οποίος σχετίζεται με την αυξημένη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και έχει βρεθεί να εκφράζεται στα ΚΚΚ είναι ο υποδοχέας uPAR, έναντι του οποίου αναπτύσσονται στοχεύουσες θεραπείες [351]. Υπάρχουν επίσης θεραπείες που στοχεύουν σε μόρια που έχουν ταυτοποιηθεί στα ΚΚΚ, με γνωστό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΚΚΚ και αιμοποιητικών κυττάρων (VCAM-1, ICAM-1, TGF-β1, PDGF) συμβάλλοντας στη μετανάστευσή τους [352-354]. Όπως επίσης προκύπτει από προκλινικές μελέτες και μελέτες φάσης I/II, πιθανόν μελλοντικά να είναι δυνατή η στόχευση των EpCAM-θετικών ΚΚΚ μέσω θεραπειών που στοχεύουν ειδικά το μόριο EpCAM [355;356]. Παράλληλα, η διερεύνηση της ικανότητας των ΚΚΚ να πολλαπλασιάζονται ή να βρίσκονται σε λήθαργο είναι δυνατόν να προσφέρει σημαντική πληροφορία σχετικά με την αυξημένη πιθανότητα αντίστασης στη χημειοθεραπεία και το πιθανό όφελος από κάποια διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση [291;357;358].

Επομένως, η εκτίμηση της παρουσίας των ΚΚΚ μπορεί πράγματι να προσφέρει στην αποτελεσματικότερη εκτίμηση της κλινικής έκβασης των ασθενών με καρκίνο μαστού, ωστόσο η αντιμετώπιση της νόσου απαιτεί τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των κυττάρων αυτών και την ειδική στόχευσή τους μέσω νέων βιολογικών παραγόντων [359]. Στα πλαίσια της προσέγγισης των ΚΚΚ ως «υγρής βιοψίας πραγματικού χρόνου», τη μεγαλύτερη πρόκληση αποτελεί η στόχευση των κυττάρων εκείνων που φέρουν χαρακτηριστικά EMM και KBK, τα οποία τους προσδίδουν αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα και αντίσταση στην ακτινοθεραπεία και τα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα [257]. Για τους παραπάνω λόγους, πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια στοχεύουν στην ταυτοποίηση ΚΚΚ με φαινότυπο EMM και KBK, η οποία θα μπορούσε να παρέχει σημαντική πληροφορία για την ανταπόκριση στη θεραπεία και επιπλέον να αποτελέσει τη βάση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## 1.5. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η ταυτοποίηση μικρομεταστατικών κυττάρων με βλαστικά χαρακτηριστικά περιγράφηκε πρώτη φορά το 2006, όπου δείχθηκε μέσω ανοσοϊστοχημείας ότι η πλειοψηφία των ΔΚΚ στο μυελό των οστών σε ασθενείς με καρκίνο μαστού εξέφραζαν το φαινοτυπικό προφίλ  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  [360]. Αντίστοιχα, η πρώτη αναφορά ανίχνευσης χαρακτηριστικών EMM στα μικρομεταστατικά κύτταρα έγινε το 1999 σε σειρές που αναπτύχθηκαν από ΔΚΚ του μυελού των οστών ασθενών με καρκίνο μαστού, όπου ταυτοποιήθηκαν τόσο κύτταρα με παράλληλη έκφραση CK και βιμεντίνης, δηλαδή έναν ενδιάμεσο EMM φαινότυπο, όσο και κύτταρα με απώλεια έκφρασης CK και αποκλειστική έκφραση βιμεντίνης, δηλαδή πλήρως μεσεγχυματικά [126;361]. Εν συνεχεία, ακολούθησε μία σειρά από μελέτες με στόχο το χαρακτηρισμό των ΚΚΚ ως προς δείκτες KBK και EMM.

Ένας πολύ σημαντικός περιορισμός κατά τη διερεύνηση δεικτών EMM και KBK στα ΚΚΚ είναι η έλλειψη δεικτών με ειδική έκφραση στα καρκινικά κύτταρα και όχι στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Καθώς η πλήρης καθαρότητα του δείγματος σε ΚΚΚ δεν είναι δυνατή με τις συνήθεις τεχνικές εμπλουτισμού, η πρόσμιξη με τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος επηρεάζει σημαντικά την ειδικότητα της ανίχνευσης των δεικτών αυτών στα ΚΚΚ. Ο περιορισμός αυτός αφορά κυρίως στις μοριακές μεθόδους, οι οποίες δεν επιτρέπουν την εκτίμηση της συνέκφρασης διαφορετικών μορίων σε επίπεδο ενός κυττάρου ή την αξιολόγηση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Στα πλαίσια αυτά, η ομάδα μας ανέπτυξε το 2009 μία μεθοδολογία ανοσοφθορισμού, για το χαρακτηρισμό του φαινότυπου KBK των ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού σε επίπεδο ενός κυττάρου, όπου η ανίχνευση των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε βάσει της έκφρασης των CK 8, 18 και 19, ενώ ο βλαστικός τους φαινότυπος χαρακτηρίστηκε μέσω ανίχνευσης των δεικτών ALDH1, CD44 και CD24 [42]. ΚΚΚ με χαρακτήρα KBK ανιχνεύτηκαν στο 80% των ασθενών και ειδικότερα, οι φαινότυποι  $ALDH1^{high}$ ,  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  και  $ALDH1^{high}/CD24^{-/low}$  ταυτοποιήθηκαν στο 78%, 33% και 18% των ΚΚΚ, αντιστοίχως. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η παρουσία ΚΚΚ με χαρακτήρες KBK είναι συχνή στη μεταστατική νόσο και ότι το φαινοτυπικό προφίλ των ΚΚΚ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια,

υπογραμμίζοντας περαιτέρω την ανάγκη του χαρακτηρισμού των ΚΚΚ σε επίπεδο κυττάρου.

Όσον αφορά στον φαινότυπο EMM, η ανίχνευση των αμιγώς μεσεγγυματικών ΚΚΚ δεν είναι δυνατή με τις κλασικές μεθόδους εμπλουτισμού και ανίχνευσης, καθώς η ταυτοποίηση των ΚΚΚ βασίζεται στην έκφραση επιθηλιακών δεικτών. Ωστόσο ο χαρακτηρισμός της συνέκφρασης επιθηλιακών και μεσεγγυματικών δεικτών σε επίπεδο κυττάρου επιτρέπει τουλάχιστον την ταυτοποίηση των ΚΚΚ που φέρουν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο EMM. Στα πλαίσια αυτά, η ομάδα μας ανέπτυξε μία ιδιαίτερα ειδική και ευαίσθητη μέθοδο ανοσοφθορισμού, η οποία επιτρέπει την εκτίμηση της συνέκφρασης των CK 8, 18 και 19, του CD45 και παράλληλα δύο καλά μελετημένων δεικτών EMM, της βιμεντίνης και του TWIST, σε επίπεδο ενός κυττάρου [43]. Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού, προκειμένου να διερευνηθεί στα δύο διαφορετικά εξελικτικά στάδια της νόσου η συχνότητα των επιθηλιακών ΚΚΚ και εκείνων με ενδιάμεσο φαινότυπο EMM, δηλαδή συνέκφραση CK και βιμεντίνης ή/και TWIST. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η ανίχνευση ΚΚΚ με φαινότυπο ενδιάμεσης EMM ήταν δυνατή σε όλους τους ασθενείς με μεταστατική νόσο, με τη συντριπτική πλειοψηφία των ΚΚΚ να εκφράζουν βιμεντίνη και TWIST (74% και 97% του συνόλου των ΚΚΚ, αντιστοίχως). Η ταυτοποίηση ΚΚΚ με ενδιάμεσο φαινότυπο EMM επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και στην πρώιμη νόσο, ωστόσο η συχνότητά τους ήταν σημαντικά μειωμένη, καθώς βιμεντίνη-θετικά ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν στο 81% των ασθενών και αντιπροσώπευαν το 56% του συνόλου των ΚΚΚ, ενώ ο TWIST ανιχνεύτηκε στο 73% των ασθενών και στο 53% των κυττάρων. Επομένως, με τη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι παρόλο που τα ΚΚΚ είναι δυνατόν να υφίστανται μερική μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου ακόμη και στα αρχικά στάδια της νόσου, ο υποπληθυσμός των ΚΚΚ με φαινότυπο ενδιάμεσης EMM εμπλουτίζεται σημαντικά κατά την εξέλιξη της νόσου, υποδεικνύοντας την επιθετικότητα και την ενεργό συμμετοχή τους στη μεταστατική διαδικασία. Στη συνέχεια, μία άλλη μελέτη επιβεβαίωσε μέσω ανοσοκυτταροχημείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, ότι η συχνότητα των ΚΚΚ με ενδιάμεσο φαινότυπο EMM, δηλαδή συνέκφραση κυτταροκερατίνης και βιμεντίνης, ήταν μεγαλύτερη από εκείνων με πλήρως επιθηλιακό φαινότυπο και ότι επιπλέον σε κάποιες περιπτώσεις ο ενδιάμεσος EMM φαινότυπος ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στα ΚΚΚ και όχι στα κύτταρα της αντίστοιχης μετάστασης [362],

υποδεικνύοντας περαιτέρω την δυναμική αντιστροφή της EMM μέσω της διαδικασίας MEM στα τελικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας [116].

Τα παραπάνω ευρήματα συγκλίνουν με μια σειρά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μέσω της μεθοδολογίας AdnaTest, η οποία περιλαμβάνει τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των ΚΚΚ με EpCAM και MUC1 αντισώματα και την ταυτοποίηση τους με RT-PCR μέσω ανίχνευσης της έκφρασης EpCAM, MUC1 και HER2, επιτρέποντας παράλληλα την ταυτοποίηση τριών δεικτών EMM (TWIST, Akt2 και PI3K) και ενός δείκτη KBK (ALDH1). Η πρώτη μελέτη δημοσιεύτηκε το 2009, όπου δείχθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ότι στο 62% των ΚΚΚ-θετικών δειγμάτων ανιχνεύθηκε έκφραση τουλάχιστον ενός από τους παραπάνω δείκτες EMM, η οποία ανιχνεύθηκε επίσης σε ποσοστό 7% των ΚΚΚ-αρνητικών δειγμάτων, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά έκφρασης της ALDH1 ήταν 69% και 14%. Επιπλέον, η παρουσία των δεικτών EMM και KBK συσχετίστηκε με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία [44]. Σε μελέτη της ίδιας ομάδας που ακολούθησε το 2012 σε ασθενείς πρώιμου σταδίου, η έκφραση δεικτών EMM ανιχνεύτηκε στο 29% και 18% των ΚΚΚ-θετικών και ΚΚΚ-αρνητικών δειγμάτων, αντιστοίχως, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά της έκφρασης της ALDH1 ήταν 46% και 5%, ωστόσο δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με την κλινική έκβαση των ασθενών [278]. Μία άλλη ομάδα το 2012 μελέτησε μέσω AdnaTest τα παραπάνω μόρια στα ΚΚΚ ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, προσθέτοντας ακόμη δύο δείκτες KBK, τους Bmi1 και CD44. Ποσοστό 39% των ασθενών είχε ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με EMM ή/και KBK φαινότυπο, η παρουσία των οποίων συσχετίστηκε με λεμφαδενική διήθηση [363]. Οι ερευνητές έδειξαν στη συνέχεια ότι τα κύτταρα αυτά, τα οποία όρισαν ως αποδιαφοροποιημένα ΚΚΚ, ανιχνεύθηκαν στο 37,6% των ασθενών, έναντι του 8,8% των ασθενών με επιθηλιακά ΚΚΚ [364].

Μία άλλη ομάδα ανέπτυξε μία μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας των ΚΚΚ στη χημειοθεραπεία, ανιχνεύοντας μέσω RT-PCR έπειτα από EpCAM-ανοσοεμπλουτισμό, την έκφραση μιας σειράς πρωτεϊνών MRPs (multidrug-resistance-related proteins), οι οποίες σχετίζονται με αντίσταση έναντι διαφόρων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [365]. Στη συνέχεια, διερεύνησαν παράλληλα την έκφραση των μορίων CK, CD45, ER, HER2, ALDH1 και MRPs στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, όπου δείχθηκε ότι η ανίχνευση ΚΚΚ με έκφραση MRPs ήταν πράγματι δείκτης μειωμένης επιβίωσης έως την υποτροπή

και επιπλέον συσχετίστηκε με την έκφραση της ALDH1 στα ΚΚΚ [366]. Η ίδια ομάδα μελέτησε στη συνέχεια την έκφραση CK, CD45, ER, HER2, ALDH1, βιμεντίνης και φιβρονεκτίνης σε ασθενείς με πρώιμη νόσο, καταλήγοντας ότι η έκφραση της ALDH1 στα ΚΚΚ συσχετίστηκε με το στάδιο νόσου και την έκφραση βιμεντίνης και φιβρονεκτίνης. Οι δύο αυτοί δείκτες EMM ανιχνεύτηκαν στο 28% και 18% των ΚΚΚ-θετικών δειγμάτων, ενώ στο 34% των ασθενών ταυτοποιήθηκε η έκφραση αποκλειστικά των δεικτών EMM, με πλήρη απουσία έκφρασης κυτταροκερατίνης και CD45, υποδεικνύοντας την παρουσία καρκινικών κυττάρων με έναν περισσότερο μεσεγχυματικό φαινότυπο [45]. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός κυττάρων ανιχνεύτηκε στη συνέχεια σε ποσοστό 46% των ασθενών με μεταστατική νόσο, στους οποίους επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η συνέκφραση CK και των παραπάνω δεικτών EMM στα ΚΚΚ ήταν αποτελεσματικότερος δείκτης μειωμένης επιβίωσης έως την υποτροπή, συγκριτικά με την αποκλειστική έκφραση της CK [367]. Σε μία πρόσφατη και πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού χρησιμοποιήθηκε το Herringbone-Chip, όπου η πρόσδεση των ΚΚΚ πραγματοποιείται μέσω αντισωμάτων έναντι των EpCAM, HER2 ή EGFR και ακολούθησε χαρακτηρισμός της έκφρασης επτά επιθηλιακών (EpCAM, CK 5, 7, 8, 18, 19 και cadherin 1) και τριών μεσεγχυματικών δεικτών (SERPINE1/PAI1, cadherin 2, and fibronectin 1) μέσω RNA in situ υβριδισμού (ISH). Οι ερευνητές όρισαν 5 φαινοτυπικές υποκατηγορίες, ξεκινώντας από τα πλήρως επιθηλιακά ΚΚΚ (E), σε ΚΚΚ με ενδιάμεσους φαινότυπους ( $E > M$ ,  $E = M$ ,  $M > E$ ) και καταλήγοντας στα πλήρως μεσεγχυματικά ΚΚΚ (M), τα οποία ταυτοποιήθηκαν κυρίως σε ασθενείς με τριπλά-αρνητικό υπότυπο πρωτοπαθούς όγκου. Επιπλέον, η χημειοθεραπεία φάνηκε να εμπλουτίζει τα μεσεγχυματικά ΚΚΚ αποκλειστικά στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν [368]. Από τη μελέτη αυτή αναδείχθηκε επιπλέον η πλαστικότητα του φαινομένου της EMM και η φαινοτυπική ετερογένεια των ΚΚΚ.

Το 2011 εκτιμήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής για πρώτη φορά λειτουργικά ο βλαστικός φαινότυπος των ΔΚΚ σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, όπου δείχθηκε ότι η υψηλή ενεργότητα ALDH και η έκφραση του φαινότυπου  $CD44^+/CD24^{-low}$  στα ΔΚΚ σχετίζεται με τριπλά αρνητικό υπότυπο πρωτοπαθή όγκου και αυξημένη διήθηση λεμφαδένων, ενώ η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία βρέθηκε να εμπλουτίζει περαιτέρω τα ΔΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH [369]. Η ίδια ομάδα διερεύνησε στη συνέχεια τα ΚΚΚ ασθενών με HER2-θετική μεταστατική νόσο, όπου

μέσω κυτταρομετρίας ροής εκτιμήθηκε η υψηλή ενεργότητα της ALDH και η έκφραση των φαινότυπων CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> ή CD133<sup>+</sup>, ενώ μέσω RT-PCR ανιχνεύτηκε η έκφραση μιας σειράς μεταγραφικών επαγωγέων EMM, των TWIST1, SNAIL1, ZEB1 και TG2. Στη μελέτη αυτή δείχθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω δεικτών EMM και KBK στα ΚΚΚ και επιπλέον ότι τα διπλά αρνητικά για ErCAM και CD45 κύτταρα είχαν αυξημένη συχνότητα ενεργότητας ALDH [370]. Επιπλέον, η παρουσία των παραπάνω δεικτών EMM στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατική νόσο έπειτα από μεγα-χημειοθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση έως την υποτροπή [371]. Πειράματα με καρκινικές σειρές έχουν επίσης οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων μοριακής ανίχνευσης της έκφρασης δεικτών KBK στα ΚΚΚ (ALDH1 και CD44) μέσω του Profile Kit του CellSearch έπειτα από ανοσομαγνητική απομόνωση βάσει έκφρασης ErCAM, παρόλα αυτά δεν έχει έως σήμερα περιγραφεί η εφαρμογή τους σε επίπεδο ασθενών [372;373].

Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε ότι έπειτα από την καλλιέργεια των ΚΚΚ που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο μαστού και την ένεσή τους σε ποντικούς, τα ΚΚΚ με τη μοριακή υπογραφή ErCAM-/ALDH1+/HER2+/EGFR+/HPSE+/Notch1+ ήταν εκείνα που ανέπτυξαν ειδικά μεταστάσεις στους πνεύμονες και κυρίως στον εγκέφαλο σε [374]. Ομοίως, σε μία επίσης πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι ο υποπληθυσμός των ΚΚΚ με μοριακό προφίλ EPCAM+CD44+CD47+MET+ ήταν εκείνος με την ικανότητα να αναπτύσσει μεταστάσεις στα οστά, τους πνεύμονες και το ήπαρ σε μοντέλα ποντικών και ότι η ταυτοποίησή του στο αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού ήταν δείκτης μειωμένης ολικής επιβίωσης και αυξημένου αριθμού μεταστάσεων [375]. Οι μελέτες αυτές πρόσφεραν ισχυρά δεδομένα για τη μεταστατική ικανότητα των ΚΚΚ με φαινότυπους EMM και KBK στον καρκίνο του μαστού και την ιστο-ειδική ανάπτυξη μεταστάσεων.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η παρουσία δεικτών EMM και KBK είναι πράγματι συχνή στα ΚΚΚ των ασθενών με καρκίνο μαστού και επιπλέον τα δύο αυτά χαρακτηριστικά φαίνεται να συσχετίζονται. Επιπλέον, από κάποιες μελέτες προκύπτει ότι η ανίχνευση ΚΚΚ με χαρακτήρες EMM και KBK συσχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και χειρότερη έκβαση των ασθενών. Συνεπώς, όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια στοχεύουν στην αποσαφήνιση του ρόλου των κυττάρων αυτών στην εξέλιξη της νόσου και στην αποτελεσματική

στόχευσή τους, η οποία θα μπορούσε να βελτιώσει την ανταπόκριση των ασθενών στις συνήθεις θεραπείες και να μειώσει ουσιαστικά τον κίνδυνο υποτροπής.

# **ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**



Σύμφωνα με τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, προϋπόθεση της αποτελεσματικής αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού αποτελεί η πρόληψη της δημιουργίας μεταστάσεων. Ένας πολλά υποσχόμενος στόχος είναι τα ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών, καθώς τα κύτταρα αυτά ενέχονται στη μεταστατική διαδικασία. Παρόλα αυτά δεν εμφανίζουν όλα τα ΚΚΚ την ίδια επιθετικότητα, αλλά αντιθέτως υπάρχει αξιοσημείωτη ετερογένεια ως προς τα χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά αυτών των κυττάρων, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη της ανίχνευσης και στη συνέχεια της στόχευσης του υποπληθυσμού των ΚΚΚ με το πλέον αυξημένο μεταστατικό δυναμικό. Η EMM των καρκινικών κυττάρων θεωρείται ως μία δυναμική βιολογική διαδικασία, η οποία οδηγεί σε μερική ή πλήρη μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου σε μεσεγχυματικό, με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητάς τους να διεισδύουν στον υγιή ιστό και να εισέρχονται στην κυκλοφορία προκειμένου να μεταναστεύσουν. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά ΚΒΚ έχει βρεθεί ότι προσδίδουν στα κύτταρα αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και αντίσταση σε ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα που επιλέγονται να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να μεταναστεύσουν ως ΚΚΚ, είναι εκείνα που φέρουν ιδιότητες των ΚΒΚ. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι η EMM σχετίζεται άμεσα με τη γένεση των ΚΒΚ και ότι τα καρκινικά κύτταρα που φέρουν παράλληλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι εκείνα με το πλέον επιθετικό προφίλ και επομένως ένας ιδανικός στόχος θεραπείας. Η συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών EMM και ΚΒΚ έχει δειχθεί σε εμπλουτισμένους σε ΚΚΚ κυτταρικούς πληθυσμούς, εντούτοις δεν έχει έως σήμερα επιβεβαιωθεί σε επίπεδο ενός ΚΚΚ. Επιπλέον δεν υπάρχουν μελέτες που να περιγράφουν το φαινόμενο σε μεγάλες και καλά καθορισμένες ομάδες ασθενών.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο φαινοτυπικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού ως προς χαρακτηριστικά EMM και ΚΒΚ και η διερεύνηση της συμβολής τους στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και στην ανθεκτικότητα στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα. Στα πλαίσια της υψηλής ετερογένειας των ΚΚΚ, αρχικά μελετήθηκε εκτενώς το προφίλ έκφρασης δύο σημαντικών δεικτών EMM και ΚΒΚ στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η συσχέτιση και η συνέκφρασή τους στα ΚΚΚ σε επίπεδο κυττάρου. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα ΚΚΚ με χαρακτήρες EMM και ΚΒΚ ενέχονται στη μεταστατική εξέλιξη της νόσου, εκτιμήθηκε παράλληλα η

συχνότητά τους σε ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Επιπλέον, διερευνήθηκε η ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών στη χημειοθεραπεία, μέσω εκτίμησης της παρουσίας τους σε ασθενείς με μεταστατική νόσο προ και μετά χημειοθεραπείας. Επίσης εκτιμήθηκε η πιθανή τους συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών. Τέλος, η λειτουργική δραστηριότητα του φαινότυπου ΚΒΚ των ΚΚΚ διερευνήθηκε περαιτέρω σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, μέσω λειτουργικών δοκιμασιών. Η αποσαφήνιση του ρόλου του επιθετικού αυτού υποπληθυσμού των ΚΚΚ θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ακριβέστερη εκτίμηση της έκβασης των ασθενών με καρκίνο μαστού και στην προσέγγισή τους με νέες και αποτελεσματικότερες θεραπείες.

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1.1. Καλλιέργεια καρκινικών σειρών**

Όλες οι καρκινικές σειρές ελήφθησαν από τον μη-κερδοσκοπικό οργανισμό παραγωγής, ελέγχου και ταυτοποίησης πρότυπων μικροοργανισμών και κυτταρικών σειρών αναφοράς ATCC (American Type Culture Collection). Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την καλλιέργεια μίας κυτταρικής σειράς, αποτελείται από τις επιμέρους διαδικασίες της καλλιέργειας, της ανακαλλιέργειας, της κατάψυξης και απόψυξης των κυττάρων. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται πάντοτε υπό αυστηρά στείρες συνθήκες μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar-flow hood), ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε πιθανή μόλυνση. Επίσης χρησιμοποιούνται πάντοτε στείρα υλικά, τα οποία προθερμαίνονται με τη χρήση κατάλληλου υδατόλουτρου για 15 λεπτά στους 37°C προτού έλθουν σε επαφή με τα κύτταρα, ώστε να αποφευχθεί η απότομη αλλαγή στην θερμοκρασία της καλλιέργειας.

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Καρκινικές σειρές μαστού
  1. SKBR3
  2. MCF7
  3. MDA.MB.231
- Καρκινικές σειρές ελέγχου
  1. Σειρά καρκίνου τραχήλου HeLa (Henrietta Lacks)
  2. Σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2 (Human Liver Hepatocellular Carcinoma)
- Καλλιεργητικά υλικά υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης
  1. GlutaMAX<sup>(TM)</sup> DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
  2. GlutaMAX<sup>(TM)</sup> McCoys 5A
- Εμβρυϊκός ορός βοός (Fetal Bovine Serum - FBS)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Διάλυμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη)
- Ινσουλίνη

- Διάλυμα 0,05% τρυψίνης - αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA)
- Παράγοντας διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide - DMSO)
- Φλάσκες καλλιέργειας (75cm<sup>3</sup>, 25cm<sup>3</sup>)
- Επωαστικός κλίβανος
- Οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (OLYMPUS IMT2)

### **Αναλυτική πορεία**

Η **καλλιέργεια** όλων των καρκινικών σειρών πραγματοποιείται σε κλίβανο επώασης, ο οποίος παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> για την ανάπτυξή τους. Η θερμοκρασία επιλέγεται στους 37°C, η συγκέντρωση του παρεχόμενου CO<sub>2</sub> στο 5%, ενώ τα επίπεδα υγρασίας ρυθμίζονται στο 95%, μέσω τοποθέτησης στη βάση του κλιβάνου τεσσάρων ανοιχτών δοχείων με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και λαμβάνει χώρα εντός κατάλληλης φλάσκας, μεσαίου (75cm<sup>3</sup>) ή μικρού μεγέθους (25cm<sup>3</sup>), ανάλογα με το στάδιο της καλλιέργειας και τον αριθμό των κυττάρων (πληρότητα φλάσκας). Ο απαιτούμενος όγκος θρεπτικού υλικού για μία 75cm<sup>3</sup> ή 25cm<sup>3</sup> φλάσκα είναι 12ml ή 6ml, αντιστοίχως. Το πλήρες θρεπτικό μέσο αποτελείται από το καλλιεργητικό υλικό που προτείνεται για την κάθε σειρά, με προσθήκη 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Συγκεκριμένα για τη σειρά SKBR3 χρησιμοποιήθηκε το καλλιεργητικό υλικό GlutaMAX<sup>(TM)</sup> McCoys5A, ενώ για τις σειρές MCF-7, MDA.MB.231, HepG2 και HeLa χρησιμοποιήθηκε το GlutaMAX<sup>(TM)</sup> DMEM. Για την καλλιέργεια των MCF-7 πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη ινσουλίνης 0.28%. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων ανανεώνεται κάθε δύο ημέρες και η καλλιέργεια παρακολουθείται κάθε ημέρα με τη βοήθεια οπτικής μικροσκοπίας, ώστε να ελέγχεται η πορεία πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η πιθανή παρουσία μολυσματικών παραγόντων. Όταν η πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας σε κύτταρα υπερβαίνει το 70%, ακολουθεί η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Σκοπός της **ανακαλλιέργειας** είναι είτε η αραίωση της καλλιέργειας όταν έχει φτάσει σε πληρότητα, είτε η περαιτέρω χρήση των κυττάρων σε κάποια πειραματική διαδικασία. Για τη αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα, απαιτείται η

προσθήκη διαλύματος τρυψίνης-EDTA, το οποίο προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Αρχικά αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο από το εσωτερικό της φλάσκας με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα και απορρίπτεται στα απόβλητα. Πραγματοποιούνται δύο προσεκτικές εκπλύσεις με διάλυμα PBS (12ml για την 75cm<sup>3</sup> φλάσκα, 6ml για την 25cm<sup>3</sup>) για την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού, προκειμένου να δράσει καλύτερα η τρυψίνη. Ακολουθεί η σταδιακή προσθήκη τρυψίνης στη φλάσκα έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια των κυττάρων (1ml στη 75cm<sup>3</sup> φλάσκα, 0,5ml στη 25cm<sup>3</sup>). Η φλάσκα τοποθετείται για 2 έως 5 λεπτά στον κλίβανο προκειμένου η τρυψίνη να δράσει ταχύτερα και τα κύτταρα ελέγχονται κάθε λίγο μέσω οπτικού μικροσκοπίου. Μόλις παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων, ακολουθεί προσθήκη 9ml θρεπτικού υλικού στην επιφάνεια των κυττάρων και ανάδευση με πιπέτα των 5ml συνεχώς, ώστε να γίνει διάσπαση των συσσωματωμάτων. Κάποιες σειρές απαιτούν ακόμη και πέρασμα των κυττάρων μέσα από σύριγγα των 10ml. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 50ml και η τρυψίνη απομακρύνεται με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές. Λαμβάνεται η πελέτα των κυττάρων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κάποια πειραματική διαδικασία, διαφορετικά εάν η καλλιέργεια πρόκειται να συνεχισθεί, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 6ml θρεπτικού υλικού, φέρεται σε φλάσκες καλλιέργειας και τοποθετείται ξανά στον κλίβανο. Τέλος, η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται με την αποθήκευσή τους σε υπερκατάψυξη σταθερής θερμοκρασίας -80°C.

Η διαδικασία της **κατάψυξης** των κυττάρων οφείλει να γίνεται σταδιακά έτσι ώστε να περιορίζεται όσο είναι δυνατόν το στρες των κυττάρων. Αρχικά, γίνεται αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη, όπως περιγράφηκε παραπάνω και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές. Ακολουθεί η καταμέτρηση των κυττάρων με τη χρήση κατάλληλου αιματοκυτταρόμετρου (περιγράφεται παρακάτω) και η αραίωση των κυττάρων σε διάλυμα ψύξης, το οποίο αποτελείται από θρεπτικό υλικό με 20% FBS και 10% DMSO. Το DMSO είναι ένα κρυοπροστατευτικό μέσο που αποτρέπει την κρυστάλλωση του ύδατος στο εσωτερικό των κυττάρων και επομένως την καταστροφή τους, όμως καθώς είναι και τοξικό για τα κύτταρα η διαδικασία γίνεται με μεγάλη ταχύτητα. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 2x10<sup>6</sup> κύτταρα ανά ml διαλύματος ψύξης και το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρεται ανά

1ml σε σωληνάρια των 1,5ml, τα οποία αποθηκεύονται σε ειδικό κουτί ψύξης και διατήρησης των κυττάρων (Mr frosty), το οποίο έχει ήδη διατηρηθεί στους 4°C. Το κουτί αυτό εν συνεχεία φυλάσσεται στους -80°C και λόγω της παγωμένης ισοπροπανόλης που περιέχει προκαλείται σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων κατά 1°C ανά ώρα, αποτρέποντας το κυτταρικό σοκ λόγω απότομης μείωσης της θερμοκρασίας.

Αντίστοιχα, κατά τη διαδικασία της **απόψυξης** των κυττάρων από τους -80°C, τα σωληνάρια μεταφέρονται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου και μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται περίπου δέκα φορές με διάλυμα απόψυξης. Πρόκειται για το θρεπτικό υλικό που είναι κατάλληλο για την κάθε σειρά με προσθήκη 1% πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και επιπλέον 20% έναντι 10% FBS, προκειμένου να διευκολυνθεί η αρχική ανάπτυξη της καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές, ώστε να απομακρυνθεί το τοξικό DMSO που είχε προστεθεί κατά την ψύξη των κυττάρων. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 6 ml θρεπτικού υλικού και τα αραιωμένα κύτταρα μεταφέρονται σε 25cm<sup>3</sup> φλάσκα, προκειμένου να κατανέμονται σε όλη την επιφάνειά της για την καλύτερη και ομοιόμορφη ανάπτυξή τους. Την επόμενη ημέρα ανανεώνεται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό με 20% FBS ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα, και το ίδιο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται για λίγες ημέρες έως ότου αρχίσει η καλλιέργεια να αποδίδει ικανοποιητικά.

### **3.1.2. Καταμέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και οπτικής μικροσκοπίας**

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Κύτταρα από καρκινικές σειρές, κύτταρα αίματος ασθενών ή υγιών εθελοντών
- Χρωστική Trypan Blue
- Αιματοκυτταρόμετρο Mallasez
- Οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο (OLYMPUS Bx40F)

### **Αναλυτική πορεία**

Για την καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται αρχικά διάλυσή τους σε χόγκο κατάλληλου διαλύματος (πλήρες θρεπτικό υλικό για κύτταρα καρκινικής σειράς ή PBS για κύτταρα του αίματος). Στη συνέχεια μεταφέρονται 10μl κυτταρικού διαλύματος σε σωληνάριο των 1,5ml, στο οποίο προστίθενται 90μl χρωστικής Trypan Blue, η οποία έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται στις μεμβράνες των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων, χρωματίζοντάς τα μπλε. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μεταφορά 20μl από το διάλυμα σε αιματοκυτταρόμετρο (Mallasez) και με τη χρήση κατάλληλου οπτικού μικροσκοπίου πραγματοποιείται μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, δηλαδή εκείνων που δεν εμφανίζουν χρώση. Το συγκεκριμένο αιματοκυτταρόμετρο αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα, κάθε ένα από τα οποία περιέχει 16 μικρότερα τετράγωνα. Όσο περισσότερα μεγάλα τετράγωνα μετρηθούν, τόσο περισσότερο αντικειμενική είναι μία μέτρηση, επομένως συμπεριλαμβάνοντας τα 9 μεγάλα τετράγωνα, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται ως εξής:

**Συνολικός αριθμός κυττάρων =**

**(Αριθμός μετρηθέντων κυττάρων/9<sub>(α)</sub>) x 10<sup>4</sup><sub>(β)</sub> x 10<sub>(γ)</sub> x τελικός όγκος διαλύματος**

**α:** αριθμός μετρηθέντων μεγάλων τετραγώνων

**β:** σταθερή τιμή αιματοκυτταρόμετρου, αντιστοιχεί στον όγκο διαλύματος που καλύπτεται από τα 16 τετράγωνα, ο οποίος ισούται με 0.1 mm<sup>3</sup>

**γ:** αραιώση 1:10 της χρωστικής Trypan Blue

### **3.1.3. Εμπλουτισμός δειγμάτων περιφερικού αίματος των ασθενών σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα**

Η συχνότητα των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο είναι περίπου 1 έως 10 κύτταρα ανά ml ολικού αίματος, συγκριτικά με μερικά εκατομμύρια λευκά αιμοσφαίρια και ένα δισεκατομμύριο ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ είναι ακόμη μικρότερη σε ασθενείς πρώιμου σταδίου. Η πολύ μικρή συχνότητα των κυττάρων αυτών καθιστά την ανίχνευσή τους ιδιαίτερα δύσκολη, απαιτώντας πολλές φορές τη χρήση επιπλέον τεχνικών για την απομόνωσή τους, ή πιο σωστά τον εμπλουτισμό των δειγμάτων σε ΚΚΚ, καθώς πάντοτε υπάρχει σημαντική πρόσμιξη με φυσιολογικά



κύτταρα του αίματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές εμπλουτισμού ΚΚΚ, η απομόνωση μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και η ανοσομαγνητική απομόνωση με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων.

### **3.1.3.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης**

Η φυγοκέντρηση με διαβάθμιση πυκνότητα φικόλης αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού των κυττάρων βάσει της διαφορετικής τους πυκνότητας. Μέσω της μεθόδου επιτυγχάνεται η συλλογή των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs), στα οποία εμπεριέχονται και τα ΚΚΚ, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ.

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Φλεβικό αίμα ασθενή
- Σωληνάρια συλλογής αίματος
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid -EDTA)
- Φυσιολογικός ορός 0,9% (NaCl)
- Φικόλη πυκνότητας 1,077 gr/ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)

#### **Αναλυτική πορεία**

Αρχικά γίνεται λήψη φλεβικού αίματος από τον ασθενή και τα πρώτα 5ml απορρίπτονται προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσμιξη με τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος. Τα επόμενα 20ml αίματος που λαμβάνονται τοποθετούνται σε σωληνάρια τα οποία περιέχουν EDTA, μία ουσία με αντιπηκτική δράση. Στη συνέχεια το αίμα αραιώνεται με ίση ποσότητα ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl, υπό στείρες συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε δύο νέα σωληνάρια των 50ml τοποθετούνται από 20ml φικόλης, στην επιφάνεια της οποίας προστίθενται σταδιακά από 20ml αραιωμένου αίματος, προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί η ανάμιξη μεταξύ των δύο φάσεων.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές χωρίς φρένο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C. Λόγω της ειδικής πυκνότητας της φικόλης (1,077 gr/ml), μετά την φυγοκέντρηση δημιουργείται ένας δακτύλιος μεταξύ του κλάσματος της φικόλης και του πλάσματος, ο οποίος περιέχει τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η λήψη του δακτύλιου γίνεται προσεκτικά με χρήση πιπέτας των 5ml, αποφεύγοντας την αναρρόφηση φικόλης, η οποία έχει κυτταροτοξική δράση. Στη συνέχεια ακολουθεί η έκπλυση των κυττάρων, τα οποία μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο των 50ml, στο οποίο προστίθενται επιπλέον 30ml διαλύματος PBS. Ακολουθεί ανάδευση των κυττάρων και φυγοκέντρηση σε 1600 στροφές για 10 λεπτά. Πραγματοποιείται λήψη του ιζήματος, στο οποίο περιέχονται τα μονοπύρρηνα κύτταρα και επανάληψη της έκπλυσης.

Τέλος, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml PBS και ακολουθεί η καταμέτρησή τους με τη βοήθεια της χρωστικής Trypan Blue, αιματοκυτταρόμετρου Mallasez και οπτικού μικροσκοπίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, τα απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα είτε χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω εμπλουτισμό με τη χρήση ειδικών ανοσομαγνητικών σφαιριδίων, είτε επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες προκειμένου να ακολουθήσει ανοσοφθορισμός και παρατήρηση με μικροσκοπία, είτε σε επίπεδο κυτταρικού εναιωρήματος πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός ή/και λειτουργική δοκιμή για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH και ανάλυση μέσω κυτταρομετρία ροής.

### **3.1.3.2. Ανοσομαγνητική απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων**

Πρόκειται για μία ανοσομαγνητική μέθοδο κατά την οποία τα κύτταρα απομονώνονται με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους ειδικά αντισώματα έναντι αντιγόνων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά τη θετική επιλογή των ΚΚΚ, γίνεται χρήση σφαιριδίων τα οποία είναι επικαλυμμένα με αντισώματα έναντι αντιγόνων των επιθηλιακών κυττάρων, όπως το μόριο επιφανείας EpCAM. Αντιθέτως κατά την αρνητική επιλογή των ΚΚΚ, χρησιμοποιούνται σφαιρίδια τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους αντίσωμα έναντι του CD45, το οποίο είναι επιφανειακό των κυττάρων του αίματος. Επομένως μέσω

της συλλογής και απομάκρυνσης των αιμοποιητικών κυττάρων, επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του δείγματος σε ΚΚΚ. Στην παρούσα μελέτη η ανοσομαγνητική απομόνωση πραγματοποιήθηκε έπειτα από απομόνωση των PBMCs μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, καθώς ο εμπλουτισμός του δείγματος σε ΚΚΚ αυξάνεται περαιτέρω μέσω του συνδυασμού των δύο τεχνικών.

### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Δείγματα απομονωμένων PBMCs του αίματος των ασθενών
- Μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα anti-CD45
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)  
100Mm αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamino tetraacetic acid - EDTA)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin - BSA)
- Μαγνητική συσκευή για σωληνάρια των 1,5 ml

### **Αναλυτική πορεία**

Έπειτα από την απομόνωση των PBMCs από το αίμα των ασθενών μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και την καταμέτρησή τους, ακολουθεί η επαναραίωσή τους σε διάλυμα PBS/BSA 0,1%, 2mM EDTA, σε όγκο τέτοιο ώστε να περιέχονται  $10 \times 10^6$  κύτταρα ανά 1ml διαλύματος. Στη συνέχεια τα κύτταρα μοιράζονται ανά 1ml, δηλαδή  $10 \times 10^6$  κύτταρα, σε σωληνάρια των 1,5ml.

Πριν τη χρήση των μαγνητικών σφαιριδίων προηγείται η έκπλυσή τους. Υπολογίζοντας ότι απαιτείται ποσότητα 100μl σφαιριδίων ανά  $10 \times 10^6$  κύτταρα, μεταφέρεται ο κατάλληλος όγκος σφαιριδίων σε σωληνάριο των 1,5ml. Στη συνέχεια, το σωληνάριο τοποθετείται σε ειδική μαγνητική συσκευή για 2 λεπτά κι ενώ βρίσκεται σε αυτήν, γίνεται απομάκρυνση της υγρής φάσης με πιπέτα των 1.000μl από την αντίθετη πλευρά, ώστε να μην έρθει καθόλου σε επαφή με τα σφαιρίδια που συγκρατούνται στην πλευρά του μαγνήτη. Στη συνέχεια, γίνεται επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε ίσο όγκο διαλύματος PBS/BSA 0,1%, 2mM EDTA και μεταφορά 100μl διαλυμένων σφαιριδίων σε κάθε ένα σωληνάριο που περιέχει  $10 \times 10^6$  κύτταρα. Ακολουθεί καλή ανάδευση και τοποθέτηση των σωληναρίων σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (test-tube-rotator) σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετούνται στη μαγνητική συσκευή για 2 λεπτά, οπότε τα σφαιρίδια που έχουν προσδέσει στην επιφάνειά τους τα κύτταρα του αίματος συγκρατούνται στον μαγνήτη. Επομένως, τα ΚΚΚ θα περιέχονται στο υπερκείμενο υγρό, το οποίο λαμβάνεται πολύ προσεκτικά με 1.000μl πιπέτα και μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές και η πελέτα διαλύεται σε διάλυμα PBS/FBS 2% προκειμένου να ακολουθήσει η επίστρωσή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το σύνολο των σφαιριδίων επιστρώνεται πάντοτε σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα, προκειμένου να ελέγχεται η ακρίβεια της μεθόδου.

### **3.1.4. Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες**

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Κύτταρα από καρκινικές σειρές, απομονωμένα PBMCs ασθενών ή υγιών αιμοδοτών
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Εμβρυϊκός ορός βοός (Fetal Bovine Serum - FBS)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες

#### **Αναλυτική πορεία**

Αφού μετρηθεί ο ακριβής αριθμός των κυττάρων, προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος PBS/FBS 2% έτσι ώστε σε κάθε 1ml να περιέχονται 500.000 κύτταρα. Στη συνέχεια μεταφέρονται 500μl κυτταρικού διαλύματος (250.000 κύτταρα) μέσα σε ειδικά σωληνάρια που εφαρμόζονται στην επιφάνεια κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε κυτταροφυγόκεντρο με ειδικές θήκες για αντικειμενοφόρες πλάκες για 2 λεπτά στις 1.800 στροφές. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται έως ότου στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για ανοσοφθορισμό, είτε φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 3.1.5. Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια ανοσοχημική μέθοδος η οποία επινοήθηκε το 1950 από τους Coons και Kaplan και κατά την οποία ένα αντιγόνο γίνεται ορατό έπειτα από την πρόσδεσή του σε αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία. Φθορίζουσες χρωστικές ή φθοριοχρώματα είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν, δηλαδή να εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν ακτινοβολούνται από φως μικρότερου μήκους κύματος. Ειδικότερα, τα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος μπορούν να διεγερθούν μέσω αόρατης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και να απελευθερώσουν την ενέργεια με τη μορφή φωτονίων, παράγοντας ορατή ακτινοβολία. Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας κι επομένως απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος.

Ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται ευρύτατα στην μελέτη των ενδοκυττάρων και των επιφανειακών αντιγόνων του κυττάρου, τόσο σε κυτταρικά εναιωρήματα, όσο και σε κυτταρικές επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου ή ιστολογικές τομές παραφίνης. Με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού ή της κυτταρομετρίας ροής, ο ανοσοφθορισμός επιτρέπει τον έλεγχο των κυττάρων για την παρουσία συγκεκριμένων αντιγόνων, μέσω της χρήσης ειδικών μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Κατά τον *έμμεσο ανοσοφθορισμό*, το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για να αντιδράσει με το κυτταρικό αντιγόνο δεν είναι το ίδιο σημασμένο κι επομένως απαιτείται η χρήση ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία, το οποίο προσδένεται στο πρώτο. Κατά τον *άμεσο ανοσοφθορισμό*, το αντίσωμα που προσδένεται στο αντιγόνο είναι άμεσα σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες φθορίζουσες ουσίες οι οποίες προσδένονται απευθείας σε συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου, όπως είναι η DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) και η 7-AAD (7-aminoactinomycin D), οι οποίες προσδένονται απευθείας στο DNA.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τύποι ανοσοφθορισμού (έμμεσος και άμεσος) και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά συστήματα μικροσκοπίας και κυτταρομετρία ροής. Ο εντοπισμός των ΚΚΚ ανάμεσα στα PBMCs βασίστηκε στην ταυτοποίηση της επιθηλιακής τους προέλευσης, δηλαδή στην ανίχνευση της έκφρασης των κυτταροκερατινών 8, 18 και 19, έναντι των οποίων προσδένεται ειδικά το αντίσωμα A45-B/B3, είτε στην

ανίχνευση του μορίου επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων EpCAM. Η απουσία της έκφρασης του μορίου επιφανείας των αιμοποιητικών κυττάρων CD45 χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για την επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα που ταυτοποιήθηκαν ήταν ΚΚΚ και όχι κύτταρα στα οποία υπήρχε έκτοπη έκφραση της κυτταροκερατίνης ή του EpCAM. Διαφορετικοί δείκτες στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον περαιτέρω φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό των ΚΚΚ.

### **3.1.5.1. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους πλάκες**

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Αντικειμενοφόροι πλάκες με κύτταρα καρκινικών σειρών ή κύτταρα ασθενών
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin - BSA)
- Παραφορμαλδεΐδη (Paraformaldehyde - PFA)
- NaOH 1M
- 0,5% TRITON 100-x
- Μονοκλωνικά αντισώματα: mouse anti-A45-B/B3, mouse anti-ALDH1A1, mouse anti-EpCAM
- Πολυκλωνικά αντισώματα: rabbit anti-CD45, rabbit anti-TWIST
- Φθορίζουσες χρωστικές Alexa Fluor®: Alexa 555 anti-rabbit, Alexa 633 anti-rabbit, Zenon® Alexa 488 anti-mouse
- Φθορίζουσα ουσία DAPI anti-fade (4,6-diamidino-2-phenylindole)

#### **Αναλυτική πορεία**

Αρχικά, τα πλακίδια εκτίθενται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αποψυχθούν από τους -80 °C όπου φυλάσσονται. Ακολουθεί η οριζόντια τοποθέτησή τους σε ειδική κασετίνα και επώαση με διάλυμα PBS/PFA 3% για 30 λεπτά μέσα σε απαγωγό, με σκοπό την μονιμοποίηση των κυττάρων στο υπόστρωμα (fixation). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, διάρκειας 3 λεπτών και ακολουθεί επώαση με διάλυμα 0,5% TRITON x-100 για 10 λεπτά, το οποίο αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων στην είσοδο των

αντισωμάτων (permeabilization). Ακολουθούν δύο εκπλύσεις διάρκειας 3 λεπτών με διάλυμα PBS/BSA 1% (blocking buffer), το οποίο προσδένεται στις μη-ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη μείωση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων. Κατά την τρίτη έκπλυση, το διάλυμα παραμένει στην επιφάνεια των πλακιδίων έως την επόμενη μέρα στη συντήρηση, μέσα σε κασετίνα με κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή μείωση της μη-ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων.

Ακολουθούν οι επώσεις με τα αντισώματα και ανάλογα με την επιθυμητή χρώση, προστίθενται τα αντίστοιχα αντισώματα που είναι προσδεδεμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα. Η αραίωση όλων των αντισωμάτων γίνεται σε διάλυμα PBS/BSA 1% και όλες οι επώσεις έχουν διάρκεια μίας ώρας. Η ποσότητα του αραιωμένου αντισώματος που προστίθενται ανά πλακίδιο είναι 100μl, έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πλακιδίου. Έπειτα από κάθε επώαση, ακολουθούν πάντοτε 3 εκπλύσεις με το ίδιο διάλυμα διάρκειας 3 λεπτών για την απομάκρυνση της περίσσειας του μη-δεσμευμένου αντισώματος.

Κατά το συνδυασμό αντισωμάτων του ίδιου είδους, τα οποία δεν είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική, χρησιμοποιείται η τεχνολογία αντισωμάτων Zenon Alexa Fluor για τη σύζευξη του ενός από των δύο αντισωμάτων με την επιθυμητή φθορίζουσα ουσία. Το αντίσωμα το οποίο σημαίνεται μέσω της τεχνολογίας Zenon Alexa Fluor προστίθεται πάντοτε τελευταίο σε σειρά. Η μέθοδος απαιτεί την προσθήκη 5μl χρωστικής Zenon (labeling reagent) και 5μl αντισώματος Zenon (blocking reagent) για κάθε 1μg αντισώματος το οποίο πρόκειται να σημανθεί. Αρχικά πραγματοποιείται επώαση του αντισώματος με τη χρωστική Zenon για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να συνδεθούν. Ακολούθως προστίθεται το αντίσωμα Zenon κι ακολουθεί δεύτερη επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να δεσμευθεί η περίσσεια της χρωστικής που δεν προσδέθηκε αποτελεσματικά. Το αντίσωμα είναι έτοιμο για αραίωση στο διάλυμα PBS/BSA 1% και επώαση των δειγμάτων όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τέλος, πραγματοποιείται ξανά μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος PBS/PFA 3% (post fixation) και ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών με PBS.

Τέλος, σε κάθε πλακίδιο προστίθεται μία σταγόνα φθορίζουσας χρωστικής Dapi anti-fade, η οποία προσδένεται απευθείας στο DNA και σημαίνει τον πυρήνα των κυττάρων. Στην επιφάνεια κάθε πλακιδίου τοποθετείται καλυπτρίδα, προκειμένου να

ακολουθήσει η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα δείγματα φυλάσσονται σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας -20 °C και η παρατήρησή τους ολοκληρώνεται το συντομότερο δυνατόν ώστε να αποφευχθεί η μείωση της έντασης του φθορισμού.

Σε κάθε πειραματική διαδικασία που λαμβάνει χώρα συμπεριλαμβάνονται πάντοτε πλακίδια επιστρωμένα με κατάλληλες καρκινικές σειρές που εκφράζουν ή δεν εκφράζουν το κάθε αντίσωμα, ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, αντιστοίχως. Ως επιπλέον αρνητικός μάρτυρας για κάθε αντίσωμα, συμπεριλαμβάνεται πάντοτε ένα πλακίδιο στο οποίο δεν γίνεται προσθήκη του συγκεκριμένου αντισώματος, προστίθεται όμως το φθοριόχρωμα με το οποίο αυτό σημαίνεται, καθώς και όλα τα υπόλοιπα αντισώματα και φθοριοχρώματα. Με τον τρόπο αυτό υπάρχει η πληροφορία του θορύβου από όλα τα αντισώματα και τα φθοριοχρώματα της συγκεκριμένης χρώσης, εξασφαλίζοντας την καλύτερη ειδικότητα του σήματος που αξιολογείται στη συνέχεια ως θετική έκφραση. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι διαφορετικοί συνδυασμοί και αραιώσεις των αντισωμάτων και των φθορίζουσων χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

- mouse **ALDH1A1** (1:100) - Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:600) / rabbit **TWIST** (1:100) - Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1:600) / mouse **A45-B/B3** - Zenon Alexa 488 anti-mouse (1:75)
- rabbit **CD45** (1:50) - Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1:600) / mouse **ALDH1A1** (1:100) - Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:600) / mouse **EpCAM** - Zenon Alexa 488 anti-mouse (1:25)

### **3.1.5.2. Άμεσος ανοσοφθορισμός σε κυτταρικά εναιωρήματα για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής**

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Κύτταρα καρκινικής σειράς, απομονωμένα PBMCs ασθενών ή υγιών αιμοδοτών
- Σωληνάρια ειδικά για χρήση σε κυτταρομετρία ροής (πολυστυρενίου των 5ml, με στρογγυλό πυθμένα, 12 x 75 mm)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Εμβρυϊκός ορός βοός (Fetal Bovine Serum - FBS)



- Αζίδιο του νατρίου ( $\text{NaN}_3$ )
- Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές: mouse EpCAM/allophycocyanin (APC), mouse CD45/phycoerythrin (PE)
- Φθορίζουσα ουσία 7-AAD (7-aminoactinomycin D)
- Κυτταρομετρητής FACSCalibur

### **Αναλυτική πορεία**

Τα κύτταρα αφού μετρηθούν αραιώνονται σε διάλυμα PBS/FBS1%/ $\text{NaN}_3$ 0,01% και τοποθετούνται σε κατάλληλα σωληνάρια, έτσι ώστε κάθε σωληνάριο να περιέχει 200μl διαλύματος με  $2 \times 10^6$  κύτταρα. Ακολουθεί η προσθήκη των αντισωμάτων EpCAM (30μl) και CD45 (10μl) και πραγματοποιείται επώαση για 30 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$  σε σκοτάδι. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml του ίδιου διαλύματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η περίσσεια αντισωμάτων. Τέλος, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200μl του ίδιου διαλύματος, προστίθενται 10μl της χρωστικής 7-AAD, η οποία προσδένεται στο DNA των νεκρών ή αποπτωτικών κυττάρων και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Χωρίς να ακολουθήσει έκπλυση της 7-AAD χρωστικής, τα δείγματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) και ειδικότερα με τη χρήση του κυτταρομετρητή FACSCalibur.

Η ανίχνευση του EpCAM πραγματοποιείται στο κανάλι FL4 (661/16) του κυτταρομετρητή μέσω του φθοριοχρώματος APC με το οποίο είναι προσδεδεμένο. Αντίστοιχα το CD45 ανιχνεύεται στο FL2 κανάλι (585/42) όπου εκπέμπει το PE, ενώ το 7-AAD ανιχνεύεται στο FL3 κανάλι (670LP). Σε κάθε πειραματική διαδικασία υπάρχει πάντοτε ένα δείγμα  $1 \times 10^6$  κυττάρων (NIL), στο οποίο ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία χωρίς όμως την προσθήκη των αντισωμάτων, το οποίο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ελέγχου για την έκφραση των υπό μελέτη μορίων.

### 3.1.6. Λειτουργική δοκιμή ALDEFLUOR για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH

Η δοκιμή ALDEFLUOR™ είναι μία τεχνολογία που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια για την ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση της αυξημένης δραστηριότητας του ενδοκυττάρου ενζύμου αλδεϋδική δεϋδρογονάση ALDH. Η μέθοδος έχει εφαρμοσθεί για την ταυτοποίηση πολλών διαφορετικών τύπων βλαστικών κυττάρων, όπως είναι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, καθώς και καρκινικά βλαστοκύτταρα από καρκινικές σειρές και πρωτοπαθείς όγκους σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Τα κύτταρα που εμφανίζουν υψηλή ALDH ενεργότητα ανιχνεύονται μέσω κυτταρομετρητή ροής, ενώ μπορούν επιπλέον να απομονωθούν για περαιτέρω χαρακτηρισμό εφόσον παρέχεται η δυνατότητα από το μηχάνημα.

Η τεχνολογία ALDEFLUOR βασίζεται στην ιδιότητα της ALDH να καταλύει την οξείδωση των αλδεϋδών προς καρβοξυλικά οξέα. Το αντιδραστήριο ALDEFLUOR παρέχεται σε μία ξηρά μορφή, σταθερή αλλά ανενεργή, το BODIPY®-aminoacetaldehyde-diethylacetate (BAAA-DA). Μέσω κατάλληλης διαδικασίας ενεργοποίησής του, πραγματοποιείται η μετατροπή του σε ένα υγρής μορφής φθορίζον, μη-φορτισμένο αντιδραστήριο, το BODIPY®-aminoacetaldehyde (BAAA). Η αμινοακεταλδεϋδή αυτή διαχέεται παθητικά εντός και εκτός των κυττάρων και αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο της ALDH. Σε όσα κύτταρα υπάρχει ενεργό το ένζυμο, ακολουθεί μετατροπή της σε ένα αρνητικά φορτισμένο προϊόν, το αμινοακετικό οξύ BODIPY®-aminoacate (BAA). Το φθορίζον αυτό προϊόν της αντίδρασης παραμένει λόγω του φορτίου του στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να ταυτοποιηθούν με κυτταρομετρία ροής στο κανάλι φθορισμού 520-540nm.

Η ανίχνευση του φθορίζοντος προϊόντος της αντίδρασης πραγματοποιείται μόνο σε ζωντανά μη-μονιμοποιημένα κύτταρα, καθώς οι κυτταρικές μεμβράνες πρέπει να είναι άθικτες για την παραμονή του στο εσωτερικό των κυττάρων. Σε αυτό συμβάλλει επιπλέον η χρήση κατάλληλου διαλύματος ALDEFLUOR™ assay buffer, το οποίο περιέχει αναστολείς που εμποδίζουν άλλους παράγοντες (μεταφορείς ATP-binding cassette, ABC) να μεταφέρουν το προϊόν ενεργητικά έξω από τα κύτταρα. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό όλοι οι χειρισμοί καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας να γίνονται με τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος. Επίσης, σε κάθε

αντίδραση συμπεριλαμβάνεται πάντοτε ένας αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή κύτταρα στα οποία έχει ακολουθηθεί όλη η διαδικασία, αφού αρχικά έχει προστεθεί σε αυτά ο παράγοντας DEAB ο οποίος προκαλεί αναστολή της αντίδρασης. Ο αρνητικός αυτός μάρτυρας χρησιμοποιείται στη συνέχεια κατά την αξιολόγηση των δειγμάτων για τη σωστή οριοθέτηση των θετικών κυττάρων, καθώς παρέχει την πληροφορία του θορύβου του σήματος από τα κύτταρα στα οποία έχει εισέλθει το φθορίζον υπόστρωμα, χωρίς ωστόσο να έχει λάβει χώρα η αντίδραση.

### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Κύτταρα καρκινικής σειράς, απομονωμένα PBMCs ασθενών ή υγιών αιμοδοτών
- Σωληνάρια ειδικά για χρήση σε κυτταρομετρία ροής
- Διάλυμα ALDEFLUOR™ assay
- Υπόστρωμα BODIPY®- aminoacetaldehyde-diethylacetate (BAAA-DA)
- Παράγοντας διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide - DMSO)
- Υδροχλώριο (HCl) 2N
- Αναστολέας ενζυμικής αντίδρασης ALDEFLUOR™ DEAB
- Φθορίζουσα ουσία 7-AAD (7-aminoactinomycin D)
- Κυτταρομετρητής FACSCalibur

### **Αναλυτική πορεία**

Για την **ενεργοποίηση** του υποστρώματος BAAA-DA πραγματοποιείται αρχικά ανάμιξη του με 25μl DMSO και επώαση για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 25μl HCl, καλή ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος, προσθήκη 360μl διαλύματος ALDEFLUOR. Με τη διαδικασία αυτή δημιουργείται ένα φθορίζον υπόστρωμα αμινοακεταλδεΐδης BAAA, το οποίο φυλάσσεται ανά 5μl σε σωληνάρια στους -20°C.

Για την **ενζυμική αντίδραση** της ALDH, αποψύχονται αρχικά όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται καταμέτρηση των κυττάρων που πρόκειται να μελετηθούν και επαναδιάλυσή τους σε 1ml διαλύματος ALDEFLUOR σε κατάλληλο σωληνάριο, έτσι ώστε να περιέχονται  $1 \times 10^6$  κύτταρα ανά ml διαλύματος. Στο κυτταρικό αυτό διάλυμα προστίθενται στη συνέχεια 5μl BAAA υποστρώματος, ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και μεταφορά της

μισής ποσότητας κυττάρων (500μl) σε δεύτερο σωληνάριο, στο οποίο έχουν ήδη προστεθεί 5μl του DEAB αναστολέα (αρνητικός μάρτυρας). Ακολουθεί η αντίδραση για 40 λεπτά στους 37°C σε υδατόλουτρο στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης είναι σημαντικό όλες οι διεργασίες που ακολουθούν να γίνονται στον πάγο προκειμένου να αποτρέπεται περαιτέρω η έξοδος του υποστρώματος από τα κύτταρα. Στη συνέχεια λοιπόν ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές στους 4°C προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του υποστρώματος και ακολουθεί διάλυση των κυττάρων σε 500μl διαλύματος ALDEFLUOR το οποίο διατηρείται στον πάγο. Τα δείγματα τοποθετούνται επίσης στον πάγο.

Σε περίπτωση που παράλληλα με την αντίδραση της ALDH πρόκειται να πραγματοποιηθεί επιπλέον φαινοτυπική ανάλυση με τη χρήση άλλων δεικτών, σε αυτό το σημείο μπορεί να ακολουθήσει ο ανοσοφθορισμός. Προϋπόθεση για τα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν είναι να στοχεύουν αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας, καθώς δεν υπάρχει η δυνατότητα μονιμοποίησης των κυττάρων, η οποία θα οδηγήσει στην έξοδο του προϊόντος της αντίδρασης από τα κύτταρα. Επίσης η αραίωση και οι εκπλύσεις των αντισωμάτων πραγματοποιούνται πάντοτε με παγωμένο διάλυμα ALDEFLUOR, το οποίο συγκρατεί επιπλέον το προϊόν της αντίδρασης στο εσωτερικό των κυττάρων.

Τέλος, προστίθενται πάντοτε 10μl 7-AAD σε κάθε δείγμα, προκειμένου η αξιολόγηση της ενεργότητας της ALDH να πραγματοποιείται στα ζωντανά μόνο κύτταρα. Έπειτα από 10 λεπτά ακολουθεί η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση του FACSCalibur. Ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων που πρέπει να ελεγχθεί προκειμένου να υπάρξει αντικειμενική αξιολόγηση της ALDH ενεργότητας είναι 100.000 κύτταρα.

### **3.1.7. Συστήματα μικροσκοπίας**

#### **3.1.7.1. Οπτική μικροσκοπία**

Οπτικά ή φωτονικά μικροσκόπια είναι εκείνα που χρησιμοποιούν το ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, δηλαδή από 380-760nm. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης, τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται

σε φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης. Στα σύνθετα μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στα ιατρικά και ερευνητικά εργαστήρια, το παρατηρούμενο αντικείμενο τοποθετείται πολύ κοντά στον αντικειμενικό φακό, ο οποίος σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλό του. Το είδωλο αυτό μεγεθύνεται από τον συγκλίνοντα ή προσοφθάλμιου φακό, ο οποίος σχηματίζει ένα φανταστικό είδωλο, το οποίο παρατηρεί το μάτι. Η μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού π.χ. 20X, πολλαπλασιάζεται με εκείνη του αντικειμενικού φακού π.χ. 10X, δίνοντας μία τελική μεγέθυνση του αντικειμένου 200X. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης OLYMPUS IMT2 για την παρατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια, καθώς και το οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο OLYMPUS Bx40F για την καταμέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο.

### **3.1.7.2. Μικροσκοπία φθορισμού**

Από πλευράς κατασκευής το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο, στο οποίο το παρασκεύασμα μπορεί να φωτίζεται επιπλέον με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι φακοί των μικροσκοπίων αυτών κατασκευάζονται από γυαλί που δεν εμφανίζει "αυτοφθορισμό", μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και για παρατήρηση σε διάταξη φωτεινού πεδίου. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για την παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές και επομένως μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν.

Στη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου, το δείγμα διεγείρεται με φως που προέρχεται από μία λάμπα φθορισμού. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα αφού περάσει μέσα από φίλτρα εκπομπής ανιχνεύεται είτε άμεσα από τον παρατηρητή είτε έμμεσα από φωτογραφική ή ψηφιακή κάμερα. Ανάλογα με τις δυνατότητες του μικροσκοπίου (αριθμός φίλτρων, είδος φωτεινής πηγής) μπορούν να ανιχνευτούν ταυτόχρονα πολλά διαφορετικά συστατικά τα οποία είναι σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές με διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής.

Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία, καθώς η απαιτούμενη συγκέντρωση φθοριοχρώματος είναι πολύ μικρή, με αποτέλεσμα να μην

προκύπτουν τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts). Επίσης είναι μία ιδιαίτερα ειδική και αξιόπιστη μέθοδος, καθώς χρησιμοποιούνται πολύ εξειδικευμένα φθοριοχρώματα και φίλτρα, ενώ η παρατήρηση των δειγμάτων είναι εύκολη και γρήγορη.

### **3.1.7.3. Σύστημα ημι-αυτοματοποιημένης μικροσκοπίας ARIOL**

Το σύστημα ARIOL είναι ένα σύστημα οπτικής μικροσκοπίας και παράλληλα μικροσκοπίας φθορισμού, το οποίο έχει τη δυνατότητα μέσω ειδικού λογισμικού να πραγματοποιεί μία ημι-αυτοματοποιημένη αξιολόγηση πολλαπλών δειγμάτων, βάσει συγκεκριμένων παραμέτρων που ορίζονται από το χρήστη. Στην περίπτωση του ανοσοφθορισμού, υπάρχει δυνατότητα ρύθμισης διαφόρων παραμέτρων, όπως είναι τα φθοριοχρώματα και τα αντισώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί, καθώς και το επίπεδο έντασης του κάθε φθοριοχρώματος. Ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος, είναι δυνατή η καταχώρηση διαφορετικών εντολών από το χρήστη, καθιστώντας το συγκεκριμένο σύστημα κατάλληλο για μια σειρά διαφορετικών εφαρμογών.

Αρχικά πραγματοποιείται μία κωδικοποιημένη καταχώρηση των υπό μελέτη δειγμάτων, μέσω προσθήκης ειδικού κώδικα αναγνώσιμου από το σύστημα (barcode). Στη συνέχεια επιλέγεται η επιθυμητή περιοχή σάρωσης και το επίπεδο εστίασης για το κάθε παρασκεύασμα χωριστά. Έπειτα, ανάλογα με το πείραμα και τα φθοριοχρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί, ορίζεται από το χρήστη μία τιμή έντασης φθορισμού βάσει της οποίας επιθυμεί να επιλεγεί ένα κύτταρο ως θετικό για το κάθε φίλτρο φθορισμού. Για το λόγο αυτό συμπεριλαμβάνονται πάντοτε κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για όλα τα αντισώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μία αυτοματοποιημένη σάρωση της αντικειμενοφόρου πλάκας από το μηχάνημα, με επιπλέον δυνατότητα εναλλαγής μεταξύ διαφορετικών αντικειμενοφόρων πλακών, με όριο τα 50 δείγματα ανά σάρωση. Βάσει των εντολών που έχουν καταχωρηθεί από το χρήστη, το σύστημα αναγνωρίζει και φωτογραφίζει όλα τα υποψήφια θετικά κύτταρα κάθε δείγματος, αποθηκεύοντας την πληροφορία του συνόλου των θετικών κυττάρων ανά δείγμα.

Στη συνέχεια ακολουθεί η αξιολόγηση από το χρήστη, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αξιολογήσει το κάθε κύτταρο χωριστά, προκειμένου να επιβεβαιώσει τη θετικότητά του. Το σύστημα παρέχει μία σειρά από επιπλέον χρήσιμες

πληροφορίες, όπως είναι το μέγεθος του κυττάρου, η ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού των διάφορων φθοριοχρωμάτων, ακόμα και ο λόγος μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η δυνατότητα του συστήματος να μετακινεί την αντικειμενοφόρο πλάκα στο οπτικό εκείνο πεδίο όπου έχει εντοπιστεί το κάθε κύτταρο (relocation). Με τον τρόπο αυτό δίνεται στο χρήστη η δυνατότητα αρχικά να επιβεβαιώσει ότι πρόκειται για αξιολογήσιμο κύτταρο με άθικτο πυρήνα και κυτταρική μεμβράνη και επιπλέον να χαρακτηρίσει περαιτέρω την έκφραση των μορίων, όπως για παράδειγμα την κατανομή και την υποκυττάρια εντόπισή τους.

Το σύστημα ARIOL έχει λογισμικό ειδικά σχεδιασμένο για την ανίχνευση των ΚΚΚ μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Η ταυτοποίηση κυττάρων τα οποία είναι θετικά στην έκφραση επιθηλιακών δεικτών, όπως η κυτταροκερατίνη και το EpCAM και παράλληλα αρνητικά στην έκφραση του CD45, πραγματοποιείται από το σύστημα με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Έπειτα ο χρήστης μπορεί να αξιολογήσει περαιτέρω την έκφραση περισσότερων δεικτών στα κύτταρα αυτά, ανάλογα με τη χρώση που έχει πραγματοποιηθεί.

#### **3.1.7.4. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser**

Σε αντίθεση με τον κλασσικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης στο κοινό μικροσκόπιο, στη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) ο φωτισμός και η παρατήρηση περιορίζονται σε ένα σημείο του παρασκευάσματος, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται σήμα από μόρια που δεν βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο εστίασης. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με υπεριώδες φως ή φως ορατού μήκους κύματος και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα laser. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές, αλλά η παρατήρησή τους γίνεται στην οθόνη υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μικροσκόπιο, μέσω ειδικών προγραμμάτων που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας.

Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι ελαττώνεται κατά πολύ το σήμα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast). Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη διαδοχική σάρωση του παρασκευάσματος σε πολλαπλά επίπεδα (οπτικές τομές), όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς

τον z (βάθος), με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η προβολή των οπτικών τομών σε ένα επίπεδο, αλλά και η λήψη καλά εστιασμένων τρισδιάστατων εικόνων. Σε συνδυασμό με τη μικροσκοπία φθορισμού, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με ευκρίνεια οπτικές τομές σε φθορίζοντα παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των 10 $\mu$ m (όπως είναι οι ιστολογικές τομές), στα οποία επιπλέον διακρίνεται η κατανομή των φθοριοχρωμάτων σε όλα τα επίπεδα. Η ευκρίνεια της εικόνας είναι επίσης καλύτερη και σε λεπτά παρασκευάσματα, όπως μία λεπτή στρώση κυττάρων.

Το CLSM αποτελείται από μικροσκόπιο φθορισμού, πολλαπλές πηγές φωτός laser, την κεφαλή σάρωσης με οπτικά και ηλεκτρονικά στοιχεία, ηλεκτρονικό υπολογιστή, καθώς και λογισμικό και οθόνες για τη συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση της εικόνας. Το laser παρέχει τη φωτεινή δέσμη η οποία υπό τον έλεγχο ηλεκτρονικού υπολογιστή «σαρώνει» το παρασκεύασμα. Η κεφαλή σάρωσης κατευθύνει τα φθορίζοντα σήματα από το παρασκεύασμα στο διάφραγμα, το οποίο αποκλείει το φθορισμό από σημεία εκτός του επιπέδου εστίασης. Ο φωτοπολλαπλασιαστής δέχεται τα σήματα και τα μετατρέπει σε αλλαγές ηλεκτρικής τάσης και τέλος, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μετατρέπει τις διαφορές έντασης φωτός σε ψηφιακή εικόνα. Μία σειρά ρυθμίσεων είναι δυνατές από το χρήστη, όπως διάφορες ρυθμίσεις του αντικειμενικού φακού, του φωτοπολλαπλασιαστή και του διαφράγματος, η ταχύτητα σάρωσης και η μεγέθυνση της εικόνας, παράμετροι που μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την ποιότητα της εικόνας.

### **3.1.8. Κυτταρομετρία ροής**

Πρόκειται για μία αυτοματοποιημένη μέθοδο κυτταρικής ανάλυσης, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κύτταρων ή σωματιδίων, τα οποία βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή και προσπίπτει σε δέσμη ακτίνας φωτός laser. Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από κατάλληλους ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω κατάλληλου λογισμικού. Εφόσον η επεξεργασία των υπό μελέτη κυττάρων γίνει με ανιχνευτές που φθορίζουν, όπως μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές ή χημικές φθορίζουσες ουσίες που συνδέονται με το DNA και RNA, εκτός από τη σκεδαζόμενη



πρωτογενή ακτινοβολία, μπορεί να ανιχνευθεί και η δευτερογενής από τον φθορισμό ακτινοβολία.

Αρχικά, λοιπόν, τα κύτταρα ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο, μέσω ενός υδροδυναμικού συστήματος ροής. Στη συνέχεια δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος και κατάλληλου για τη διέγερση των διαφορετικών φθοριοχρωμάτων, προσπίπτουν στην κυτταρική διάταξη. Κάθε κύτταρο δέχεται την ακτινοβολία κάθετα προς την ροή του και ένα μέρος αυτής απορροφάται ενώ το υπόλοιπο σκεδαζέται προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζομένου φωτός. Στη συνέχεια λαμβάνονται τέσσερα κυρίως φωτεινά σήματα: το προσθίως σκεδαζόμενο φως (Forward Light Scatter, FSC), το πλαγίως σκεδαζόμενο φως (Side Scatter, SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μέσω ειδικών μετατροπέων αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system) μετατρέπονται σε ψηφιακά. Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικού ηλεκτρονικού συστήματος ανάλυσης δεδομένων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε "πραγματικό χρόνο" (περισσότερα από 1.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο).

Η μέτρηση του προσθίως σκεδαζομένου φωτός (FSC) αντιστοιχεί στο μέγεθος του κυττάρου και χρησιμοποιείται για να ξεχωρίσει διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, ενώ η μέτρηση του πλαγίως σκεδαζομένου φωτός (SSC) δίνει πληροφορίες για την κυτταροπλασματική κοκκίωση. Έτσι, με βάση τις παραπάνω παραμέτρους σκέδασης του φωτός ακολουθεί ο διαχωρισμός των κυτταρικών υποπληθυσμών και η οριοθέτηση του υπό εξέταση υποπληθυσμού (gating). Στη συνέχεια υπάρχει η δυνατότητα μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή τα δεδομένα του φθορισμού να απομονωθούν ώστε να αφορούν αποκλειστικά τον οριοθετημένο πληθυσμό. Ο συνηθέστερος τύπος ανάλυσης δεδομένων είναι το σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος (dot plot), ενώ σε ένα οριοθετημένο πληθυσμό είναι επιπλέον δυνατή η ανάλυση μέσω ιστογράμματος φθορισμού.

Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο, με το πλεονέκτημα της ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών χαρακτηριστικών του κυττάρου με μεγάλη ταχύτητα. Μέσω κατάλληλου λογισμικού προσφέρονται πληροφορίες για το σχετικό μέγεθος, τον όγκο, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το περιεχόμενο DNA και την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού ταυτοχρόνως. Η αύξηση του αριθμού των λέιζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων, δίνοντας τη δυνατότητα ενός αποτελεσματικότερου φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής FACSCalibur, ο οποίος περιέχει δύο χωριστά λέιζερ, ένα αερόψυκτο λέιζερ αργού (μπλε) και μία δίοδο κόκκινου λέιζερ, εξασφαλίζοντας την ανάλυση ακόμη και αντιγόνων χαμηλής πυκνότητας. Με τη χρήση του συγκεκριμένου κυτταρομετρητή ήταν δυνατός ο χαρακτηρισμός παράλληλα τεσσάρων διαφορετικών φθοριοχρωμάτων, στα τέσσερα διαφορετικά κανάλια FL1 (530/30), FL2 (585/42), FL3 (670LP) και FL4 (661/16).

### 3.1.9. Μέθοδος στύψματος κατά Western ή μέθοδος ανοσοαποτύπωσης

Το στύψωμα κατά Western (Western Blotting) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Towbin το 1979 και αποτελεί μία μέθοδο αποτύπωσης των πρωτεϊνών πάνω σε κατάλληλη μεμβράνη, στην επιφάνεια της οποίας είναι δυνατός ο ποιοτικός και ημι-ποσοτικός προσδιορισμός τους. Ονομάζεται επίσης και ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting) διότι η ανίχνευση της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης ειδικού αντισώματος. Η μεθοδολογία προϋποθέτει την **απομόνωση** αρχικά όλων των πρωτεϊνών από τα κύτταρα και τον **ποσοτικό προσδιορισμό** τους. Στη συνέχεια, επιτυγχάνεται **διαχωρισμός** των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλη αποδιατακτική πηκτή και ακολουθεί η **ηλεκτροφορητική μεταφορά** ή στύψωμα των διαχωρισμένων πρωτεϊνικών μορίων από την πηκτή σε κατάλληλη μεμβράνη. Έπειτα από τη μεταφορά όλων των πρωτεϊνών στην επιφάνεια της μεμβράνης, πραγματοποιείται **επώαση με αντίσωμα** έναντι του αντιγόνου του ενδιαφέροντος, το οποίο σημαίνεται κατάλληλα. Τέλος, το σήμα του αντισώματος αποτυπώνεται σε κατάλληλο φιλμ εμφάνισης, όπου με κατάλληλα μέσα εμφάνισης είναι δυνατή η **ανίχνευση της πρωτεΐνης** του ενδιαφέροντος. Η ημι-

ποσοτικοποίησή της είναι επίσης δυνατή, καθώς η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου στη μεμβράνη.

### **3.1.9.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα καρκινικών σειρών**

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Διάλυμα λύσεως (pH 8,8)
  1. 50mM τρις- υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) pH 7,4
  2. 150mM NaCl
  3. 1% Triton x-100
  4. 1% δεοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate)
  5. 0,1% δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate - SDS)
  6. 1mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylene-diamino-tetra-aceticacid - EDTA)
- Αναστολείς
  1. 1mM φαίνυλομεθυλοσουλφονικό φθόριο (phenyl methyl sulfonyl fluoride - PMSF)
  2. 1mM ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate)
  3. 25μg/ml λιπεπτίνη (leupeptin)
  4. 25μg/ml απροτινίνη (aprotinin)

#### **Αναλυτική πορεία**

Αρχικά πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις των κυττάρων με PBS και στη συνέχεια οι φλάσκες μεταφέρονται στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 500μl διαλύματος λύσης των κυττάρων έτσι ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της φλάσκας και προσθήκη ξανά στον πάγο για λίγα λεπτά. Το ήπιο αυτό διάλυμα λύσης των κυττάρων περιέχει επίσης αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών προκειμένου να αποφευχθεί η πρωτεόλυση και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Μόλις επέλθει η αποκόλληση των κυττάρων, η επιφάνεια της φλάσκας σαρώνεται με τη βοήθεια

κατάλληλης σπάτουλας και πραγματοποιείται συλλογή και μεταφορά του υγρού σε σωληνάριο, το οποίο τοποθετείται στον πάγο. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές στους 4°C, οι κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζουν πελέτα, ενώ οι πρωτεΐνες παραμένουν στο υπερκείμενο, το οποίο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωληνάριο. Το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C, αφού προηγουμένως μεταφερθούν 2μl και 5μl από κάθε δείγμα σε νέα σωληνάρια προκειμένου να ακολουθήσει η δοκιμή Bradford.

### **3.1.9.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Πρόκειται για μία χρωματομετρική ανάλυση για τη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford, το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Η χρωστική αυτή προσδένεται σε βασικές και σε αρωματικές ομάδες αμινοξέων και έχει την ιδιότητα να αλλάζει χρώμα έπειτα από τη δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων ολικής πρωτεΐνης. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται στα 595nm, καθώς η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής όταν προσδένεται σε πρωτεΐνες είναι 465 έως 595 nm. Η μέθοδος προϋποθέτει την παρουσία μίας πρότυπης ουσίας, όπως είναι η αλβουμίνη ορού βοός ή η γ-σφαιρίνη βοός, για τη δημιουργία της τυπικής πρότυπης καμπύλης, μέσω της οποίας υπολογίζεται η ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος.

#### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Αντιδραστήριο Bradford
- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin - BSA) (1 μg/μl)
- Φωτόμετρο
- Κυψελίδες φωτόμετρου των 1,5 ml

#### **Αναλυτική πορεία**

Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των πρότυπων δειγμάτων έπειτα από την αραιώση της αλβουμίνης ορού βοός σε διαφορετικές συγκεντρώσεις: 1μg, 2μg, 5μg, 10μg, 15μg και 20μg σε τελικό όγκο 800μl απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί

προσθήκη 200μl συμπυκνωμένου αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε δείγμα και καλή ανάδευση. Ομοίως, ακολουθεί η αραιώση 2μl από κάθε δείγμα πρωτεϊνών με απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 800μl και προσθήκη 200μl αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα πρωτεϊνών και τα πρότυπα δείγματα παραμένουν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η φωτομέτρηση τους στα 595nm, αφού πρώτα μηδενιστεί η ένδειξη της απορρόφησης στο φωτόμετρο με ένα τυφλό δείγμα, το οποίο περιέχει απεσταγμένο νερό και αντιδραστήριο Bradford. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης για κάθε δείγμα γίνεται μέσω της πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας των διαφορετικών αραιώσεων της αλβουμίνης.

### **3.1.9.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου**

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-Page Gel Electrophoresis of Proteins), αφενός λόγω της σύστασης της συγκεκριμένης πηκτής σε χημικά ουδέτερες ενώσεις και αφετέρου λόγω της εύκολης ρύθμισης του μεγέθους των πόρων της μέσω αλλαγής στη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου-μεθυλενοδισακρυλαμιδίου. Προκειμένου να επιτευχθεί σωστός διαχωρισμός των πρωτεϊνών, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο τμήματα, το πήκτωμα επιστοίβασης και το πήκτωμα διαχωρισμού. Οι πρωτεΐνες διέρχονται αρχικά μέσω του πηκτώματος επιστοίβασης, το οποίο λόγω της μικρότερης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου και του μεγαλύτερου μεγέθους των πόρων, επιτρέπει τη συμπίκνωση των πρωτεϊνών στην αρχή και το σχηματισμό μίας στικτής ζώνης. Στο δεύτερο πήκτωμα, το μέγεθος των πόρων είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του πολυακρυλαμιδίου, επιτρέποντας το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει της μοριακής τους μάζας. Για πρωτεΐνες μεγάλης μοριακής μάζας χρησιμοποιείται πήκτωμα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου, ενώ για μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου είναι μεγάλη.

Το απορρυπαντικό δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS) χρησιμοποιείται για την καταστροφή των μη ομοιοπολικών δεσμών και την αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών, ενώ η μερκαπτοαιθανόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, πραγματοποιείται η ηλεκτροφορητική μετακίνηση των

πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού ανάλογα με το μέγεθος τους με κατεύθυνση από επάνω προς τα κάτω, δηλαδή οι μικρές πρωτεΐνες κινούνται ταχύτερα, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται παράλληλα κατάλληλος δείκτης μοριακού βάρους, ο οποίος περιέχει μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Διάλυμα μετουσίωσης 3X
  1. 150 mM Tris-HCl
  2. 15% β-μερκαπτοαιθανόλη
  3. 6% δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (sodiumdodecylsulfate - SDS)
  4. 0,3% κυανούν της βρωμοφαινόλης
  5. 30% κ.β. γλυκερόλη
- Πήκτωμα επιστοίβασης 10% πολυακρυλαμίδιο τελικού όγκου 3ml
  1. 2,1ml απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O),
  2. 500μl διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (ακρυλαμίδιο/δισακρυλαμίδιο: 29/1)
  3. 380μl Tris (1 M, pH:6,8)
  4. 30μl SDS (10%)
  5. 30μl υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate - APS) (10%)
  6. 3 μl διάλυμα N,N,N',N'- τετραμεθυλαιθυλενεδιαμίνης (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine - TEMED)
- Πήκτωμα διαχωρισμού 10% πολυακρυλαμίδιο, τελικού όγκου 10ml
  1. 3,95 ml απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
  2. 3,35ml διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (ακρυλαμίδιο/δισακρυλαμίδιο: 29/1)
  3. 2,5ml Tris (1,5 M, pH: 8,8)
  4. 100μl SDS (10%)
  5. 96μl APS (10%)
  6. 4μl διάλυμα TEMED
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X
  1. 25 mM τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο (Tris base)
  2. 250 mM γλυκίνη (pH: 8,3)
  3. 10% SDS

- Δείκτες μοριακού βάρους
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης: Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell
- Συσκευή τροφοδοσίας ηλεκτρικού ρεύματος

### **Αναλυτική πορεία**

Αρχικά γίνεται η ετοιμασία του πηκτώματος διαχωρισμού, το οποίο τοποθετείται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου και παραμένει για περίπου 30 λεπτά έως ότου πήξει. Στη συνέχεια ετοιμάζεται το πήκτωμα επιστοίβασης, το οποίο προστίθεται προσεκτικά πάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού και ταυτόχρονα πραγματοποιείται τοποθέτηση ειδικής χτένας για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Το μίγμα παραμένει επίσης 30 λεπτά έως ότου πήξει.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η διάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στο διάλυμα μετουσίωσης και έπειτα από τη θέρμανσή τους για 5 λεπτά στους 100°C λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση για δευτερόλεπτα στις 1.200 στροφές προκειμένου να επανέλθουν στο δείγμα οι υδρατμοί και τα σύμπλοκα SDS-αποδιεταγμένων πρωτεϊνών τοποθετούνται προσεκτικά στις ειδικές θέσεις φορτώματος της πηκτής επιστοίβασης με κατάλληλη σύριγγα Hamilton. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στη συσκευή Mini-PROTEAN με 1X διάλυμα ηλεκτροφόρησης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αρχικά στα 120V και στη συνέχεια αφού εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού στα 150V. Τέλος, η πηκτή λαμβάνεται προσεκτικά από τις γυάλινες πλάκες της συσκευής και με τη βοήθεια σπάτουλας απομακρύνεται το πήκτωμα επιστοίβασης προκειμένου να ακολουθήσει η ανοσοαποτύπωση.

#### **3.1.9.4. Ανοσοαποτύπωση**

Η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή σε πολυβινυλιδική φθορίζουσα μεμβράνη (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF). Επίσης, η σήμανση των αντισωμάτων είναι δυνατή χρησιμοποιώντας είτε κάποια φθορίζουσα ουσία, είτε βιοτίνη, αλκαλική φωσφατάση (Alkaline phosphatase, AP) ή υπεροξειδάση του ραπανιού (Horse radish peroxidase,

HRP). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η HRP, η οποία μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μέσω κατάλληλου υποστρώματος χημειοφωταύγειας. Το προϊόν της αντίδρασης του ενζύμου HRP με το υπόστρωμα αποτυπώνεται και τελικά ανιχνεύεται σε κατάλληλο φιλμ, όπου η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας της μεθόδου και των αντισωμάτων, ελέγχεται εάν η ζώνη που ανιχνεύεται αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το οποίο προσδιορίζεται μέσω του δείκτη μοριακού βάρους που έχει επίσης αποτυπωθεί στη μεμβράνη, καθώς επίσης και μέσω αντισώματος αναφοράς, όπως είναι η β-ακτίνη, μέσω του οποίου ελέγχεται εάν έχει μεταφερθεί και αποτυπωθεί η σωστή συγκέντρωση πρωτεϊνών ανά δείγμα.

### **Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα**

- Διάλυμα μεταφοράς 1X
  1. 192mM γλυκίνη
  2. 25mM τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο (Tris-hydroxymethyl-aminomethane)
  3. 20% μεθανόλη
- TBST 1X
  1. 20mM Tris-HCl
  2. 150mM NaCl
  3. 0,05% Tween 20
- Άπαχο γάλα
- Πρωτογενή αντισώματα: rabbit anti-ALDH1A1, mouse anti-β-ακτίνη
- Χρωστικές: HRP anti-rabbit, HRP anti-mouse (Horse radish peroxidase)
- Δείκτης Μοριακών Βαρών
- Υπόστρωμα χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence - ECL)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Σφουγγάρια και χρωματογραφικό χαρτί Whatman 3mm
- Φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (X-ray films)
- Συσκευή μεταφοράς Mini Trans-Blot Cell



## Αναλυτική πορεία

Αρχικά πραγματοποιείται επώαση της πηκτής με διάλυμα μεταφοράς για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, αφού η μεμβράνη, τα σφουγγαράκια και τα χαρτιά Whatman κοπούν έτσι ώστε να έχουν το ίδιο ακριβώς μέγεθος με την πηκτή, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης για 5 λεπτά σε μεθανόλη και έπειτα για 5 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς, ενώ τα σφουγγαράκια και τα χαρτιά Whatman επίσης διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς. Η τοποθέτηση των υλικών γίνεται με την εξής σειρά από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής: σφουγγάρι, Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη, Whatman, σφουγγάρι. Η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στα 100V στους 4°C και για 1 ώρα. Η μεμβράνη που λαμβάνεται φέρει το πρότυπο όλων των πρωτεϊνών της πηκτής.

Για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων, δεσμεύονται στη συνέχεια οι μη-ειδικές θέσεις των πρωτεϊνών μέσω επώασης της μεμβράνης με TBST/γάλα 5% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με TBST, 3 φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα του ενδιαφέροντος υπό ανάδευση στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, έπειτα από αραίωσή του σε TBST/BSA 1% στην επιθυμητή συγκέντρωση.

Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με TBST, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με δευτερογενές αντίσωμα που έχει σημανθεί με υπεροξειδάση του ραπανιού, έπειτα από αραίωση του σε TBST/γάλα 2%. Η μεμβράνη υφίσταται ξανά 3 διαδοχικές εκπλύσεις με TBST για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η έκφραση της ALDH1A1 σε καρκινικές σειρές, καθώς επίσης και της β-ακτίνης ως μάρτυρα συγκέντρωσης πρωτεΐνης, τα οποία ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας HRP ένζυμα, σύμφωνα με τους εξής συνδυασμούς και αραιώσεις:

- rabbit **ALDH1** (1:500) - HRP anti-rabbit (1:2.000)
- mouse **β-ακτίνη** (1:1.000) - HRP anti-mouse (1:8.000)

Τέλος, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με 2ml υπόστρωμα χημειοφωταύγειας για 1 λεπτό και κάλυψή της με διαφανή πλαστική μεμβράνη.

Ακολουθεί η μεταφορά της σε κατάλληλη κασετίνα εμφάνισης και η έκθεση της σε φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο, δοκιμάζοντας διάφορα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια το φιλμ εκτίθεται σε κατάλληλα μέσα εμφάνισης έως ότου γίνει διάφανο και εμφανιστούν σε αυτό οι μπάντες. Η ημι-ποσοτικοποίηση του σήματος είναι δυνατή στον H/Y μέσω κατάλληλου λογισμικού, όπως είναι το Volume analysis report, Biorad.

### **3.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω της έκδοσης 20 του στατιστικού προγράμματος IBM SPSS Statistics. Σε όλους τους ελέγχους το 0.05 ορίστηκε ως επίπεδο σημαντικότητας. Η κανονικότητα της κατανομής των τιμών ελέγχθηκε μέσω Kolmogorov-Smirnov normality test.

Η συσχέτιση μεταξύ μεταβλητών τιμών ελέγχθηκε μέσω Spearman's rho analysis για εκείνες με μη κανονική κατανομή και μέσω Pearson correlation για εκείνες με κανονική κατανομή. Η εξάρτηση μεταξύ μεταβλητών τιμών ελέγχθηκε επίσης μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης Linear Regression ( $R^2$ ). Η συσχέτιση μεταξύ κατηγορικών τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το κατάλληλο κατά περίπτωση Chi-square test (π.χ. στάδιο νόσου, κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά κτλ).

Η σύγκριση μεταξύ μεταβλητών τιμών μη κανονικής κατανομής ανάμεσα σε δύο ανεξάρτητες κατηγορίες πραγματοποιήθηκε μέσω Mann-Whitney U test (2 independent samples, π.χ. τιμές X σε ασθενείς με πρώιμη και μεταστατική νόσο), ενώ μεταξύ μεταβλητών τιμών μη κανονικής κατανομής ανάμεσα σε δύο σχετιζόμενες κατηγορίες μέσω Wilcoxon Signed Ranks test (2 related samples, π.χ. τιμές X στους ίδιους ασθενείς προ και μετά χημειοθεραπείας). Η συσχέτιση μεταξύ μεταβλητών τιμών κανονικής κατανομής μεταξύ δύο διαφορετικών κατηγοριών ελέγχθηκε μέσω κατάλληλου κατά περίπτωση T-test. Οι συσχετίσεις των μεταβλητών τιμών κανονικής κατανομής σε περισσότερες από δύο ανεξάρτητες κατηγορίες ελέγχθηκαν μέσω One-way ANOVA, ενώ των μη κανονικών μεταβλητών σε περισσότερες από δύο ανεξάρτητες κατηγορίες μέσω του Kruskal-Wallis test (K independent samples).

Στις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier οι συσχετίσεις έγιναν μέσω Log-rank test, ενώ για την μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση πραγματοποιήθηκε

ανάλυση Cox regression (Univariate και Multivariate analysis, αντιστοίχως). Το διάστημα έως την υποτροπή υπολογίστηκε σε μήνες, από την ημερομηνία της παρατήρησης (πριν ή μετά τη χημειοθεραπεία) έως την ημερομηνία της υποτροπής ή την ημερομηνία τελευταίας επαφής για όσους δεν είχαν υποτροπιάσει, ενώ ο συνολικός χρόνος επιβίωσης υπολογίστηκε σε μήνες από την ημερομηνία παρατήρησης έως την ημερομηνία θανάτου ή τελευταίας επαφής για όσους αντίστοιχα ήταν εν ζωή.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ EMM ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ**

### **4.1.1. Ασθενείς**

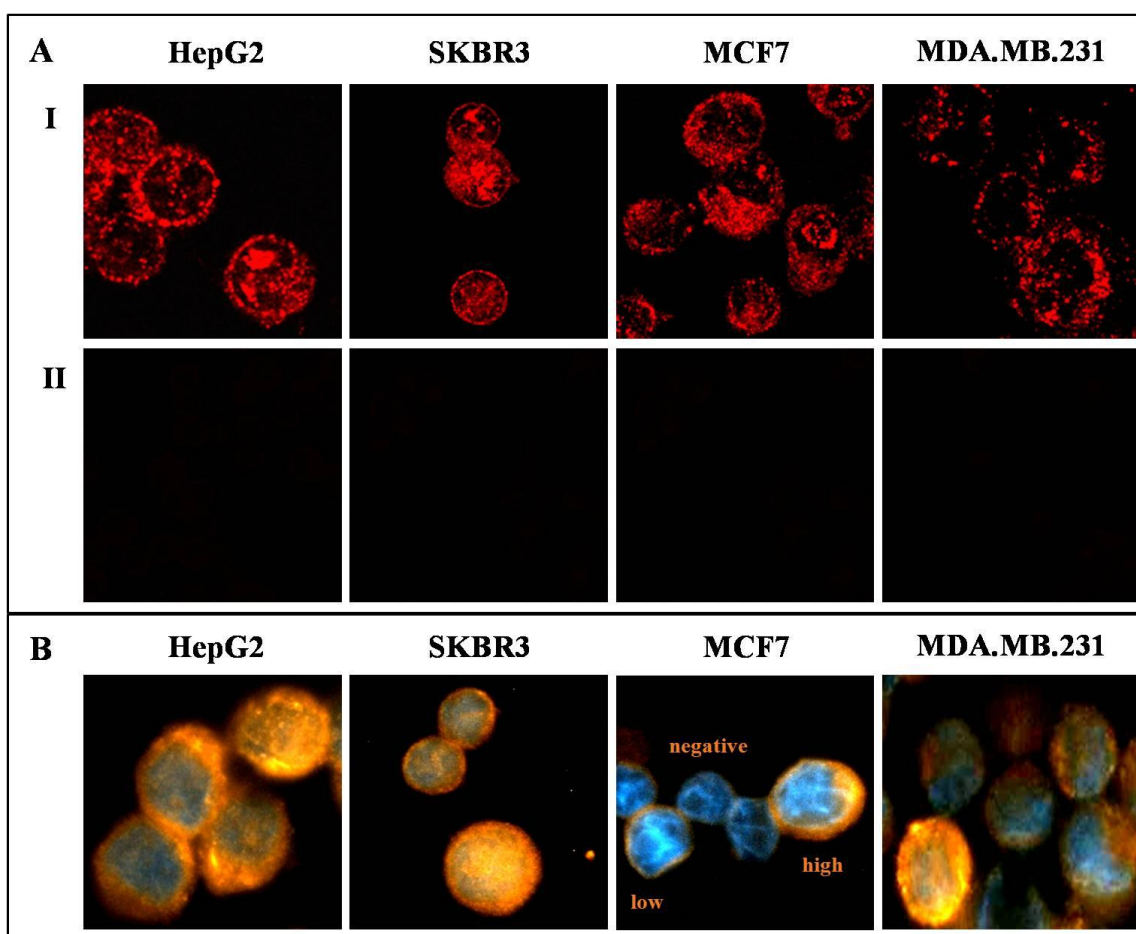
Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 80 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, στους οποίους υπήρχε διαθεσιμότητα δείγματος απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος πριν την έναρξη της συμπληρωματικής θεραπείας. Επιπλέον μελετήθηκαν 50 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, στους οποίους αντίστοιχα υπήρχε διαθέσιμο δείγμα πριν την έναρξη της θεραπείας πρώτης γραμμής.

### **4.1.2. Προσδιορισμός των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM στις καρκινικές σειρές ελέγχου και σε σειρές μαστού**

Για τη μελέτη των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM αξιολογήθηκε η έκφραση των μορίων ALDH1 και TWIST, αντιστοίχως, μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού. Η έκφραση της ALDH1 διερευνήθηκε αρχικά στη σειρά ελέγχου HepG2. Για τη ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, οι οποίοι αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της CLSM μικροσκοπίας και του συστήματος ARIOL (Εικόνα 2). Όπως διαπιστώθηκε, τα επίπεδα έκφρασης της ALDH1 διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κυττάρων HepG2, με σαφή διαχωρισμό μεταξύ υψηλής έκφρασης ALDH1 (ALDH1<sup>high</sup>), χαμηλής έκφρασης (ALDH1<sup>low</sup>) και απουσίας έκφρασης (ALDH1<sup>neg</sup>). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί περαιτέρω ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της ALDH1, καταμετρήθηκε η ένταση φθορισμού για καθένα από τους τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων μέσω του συστήματος ARIOL. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 500 κύτταρα από κάθε διαφορετικό υποπληθυσμό (σύνολο 1.500 κύτταρα), έπειτα από τυχαία παρατήρηση 50 οπτικών πεδίων ανά δείγμα.

Όπως διαπιστώθηκε, το εύρος της έντασης για τα ALDH1<sup>high</sup> κύτταρα ήταν από 5 έως 25, ενώ για τα ALDH1<sup>low</sup> κύτταρα ήταν από 30 έως 45. Επομένως, η τιμή έντασης 25 ορίστηκε ως το ανώτερο κατώφλι για το χαρακτηρισμό της υψηλής έκφρασης, ενώ οι μετρήσεις 30 και 55 ορίστηκαν ως το κατώτερο και ανώτερο όριο, αντιστοίχως, για το χαρακτηρισμό της χαμηλής έκφρασης. Η ένταση των ALDH1<sup>neg</sup>

κυττάρων ποσοτικοποιήθηκε επιπλέον με τη χρήση κατάλληλων αρνητικών μαρτύρων, δίνοντας τιμές μεταξύ 60 και 90 και επομένως η τιμή 60 ορίστηκε ως το κατώτερο όριο για την απουσία έκφρασης. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των κυττάρων με το διαφορετικό προφίλ έκφρασης της ALDH1, όπου οι τιμές αντιστοιχούν στην ελάχιστη απαιτούμενη ένταση του συστήματος ARIOL για την ανίχνευση σήματος φθορισμού.



**Εικόνα 2.** Έκφραση της ALDH1 σε κύτταρα της καρκινικής σειράς ελέγχου HepG2 και στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. **A)** Απεικόνιση της έκφρασης της ALDH1 μέσω CLSM, 400X, (I) Θετικός μάρτυρας: επώαση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ALDH1 και δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία Alexa 555 (κόκκινο), (II) Αρνητικός μάρτυρας: επώαση αποκλειστικά με το συνδεδεμένο με Alexa 555 δευτερογενές αντίσωμα. **B)** Σύνθετες εικόνες της έκφρασης ALDH1 και των κυτταρικών πυρήνων μέσω ARIOL, 400X. Η σήμανση της ALDH1 πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας ουσίας Alexa 555 (πορτοκαλί), ενώ των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε). Σημείωση ενδεικτικά ενός κυττάρου από καθένα υποπληθυσμό με υψηλή (high), χαμηλή (low) και απύσα (negative) έκφραση της ALDH1.

Σημαντική ήταν η διαπίστωση ότι δεν παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη των μετρήσεων μεταξύ των τριών διαφορετικών υποπληθυσμών, αποδεικνύοντας την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Η διάμεση τιμή του συνόλου των μετρήσεων στους υποπληθυσμούς ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> και ALDH1<sup>neg</sup> ήταν 15, 45 και 70, αντίστοιχα.

ALDH1 expression levels	HepG2		SKBR3		MCF7		MDA.MB.231	
	Range	Median ± SE	Range	Median ± SE	Range	Median ± SE	Range	Median ± SE
<b>High</b>	5 - 25	15 ± 0.25	10 - 25	15 ± 0.23	20 - 25	20 ± 0.11	15 - 25	20 ± 0.18
<b>Low</b>	30 - 55	45 ± 0.30	35 - 55	45 ± 0.29	35 - 55	45 ± 0.29	30 - 55	45 ± 0.29
<b>Negative</b>	60 - 90	70 ± 0.30	60 - 90	80 ± 0.39	60 - 90	75 ± 0.29	60 - 100	80 ± 0.46

**Πίνακας 1. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της ALDH1 σε κύτταρα της καρκινικής σειράς ελέγχου HepG2 και στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, μέσω του συστήματος ARIOL.**

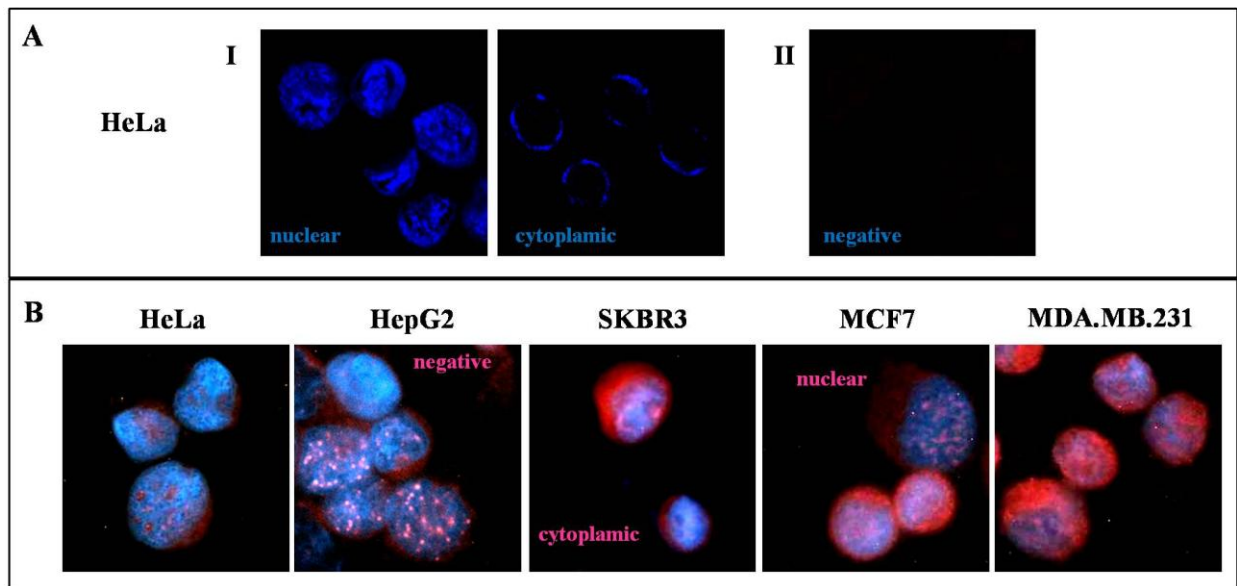
Σε όλες τις σειρές πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός μέσω αντισώματος έναντι της ALDH1 και της φθορίζουσας ουσίας Alexa 555. Σε κάθε σειρά έγινε καταμέτρηση 500 κυττάρων για κάθε υποπληθυσμό με διαφορετικό προφίλ έκφρασης της ALDH1, έπειτα από τυχαία παρατήρηση 50 διαφορετικών οπτικών πεδίων. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν στην ελάχιστη απαιτούμενη τιμή έντασης του συστήματος ARIOL για την ανίχνευση σήματος φθορισμού. *Range: εύρος, Median: διάμεση τιμή, SE=Standard error: τυπική απόκλιση*

Εν συνεχεία, η έκφραση της ALDH1 διερευνήθηκε στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, οι οποίες είναι αντιπροσωπευτικές των τριών κύριων υπότυπων του καρκίνου του μαστού, HER2-θετικού, ορμονο-θετικού και τριπλά-αρνητικού, αντιστοίχως. Όπως διαπιστώθηκε, η έκφραση της ALDH1 ανιχνεύτηκε στο σύνολο των σειρών, παρόλα αυτά τα επίπεδα της έκφρασης της διέφεραν μεταξύ των κυττάρων σε όλες τις σειρές (Εικόνα 2). Ακολούθως, μέσω της παραπάνω μεθοδολογίας και χρησιμοποιώντας το ανώτερο και κατώτερο κατώφλι έντασης της σειράς ελέγχου HepG2, καταμετρήθηκε η ένταση της έκφρασης της ALDH1 στους τρεις υποπληθυσμούς ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> και ALDH1<sup>neg</sup> της κάθε σειράς. Από τα παραπάνω πειράματα ελέγχου διαπιστώθηκε μία μικρή διαφοροποίηση της διάμεσης τιμής και της διακύμανσης των τιμών έντασης των

τριών υποπληθυσμών μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών (Πίνακας 1). Παρόλα αυτά, σε καμία σειρά δεν παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη της έντασης μεταξύ των διαφορετικών υποπληθυσμών, υποδεικνύοντας την καταλληλότητα της παρούσας μεθοδολογίας για το χαρακτηρισμό της έκφρασης της ALDH1 στα ΚΚΚ των ασθενών με ευαισθησία και ειδικότητα, ανεξάρτητα από το μοριακό υπότυπο του πρωτοπαθούς όγκου. Στην παρούσα μελέτη, ως φαινότυπος ΚΒΚ ορίστηκε η υψηλή έκφραση της ALDH1, σε συμφωνία με τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας.

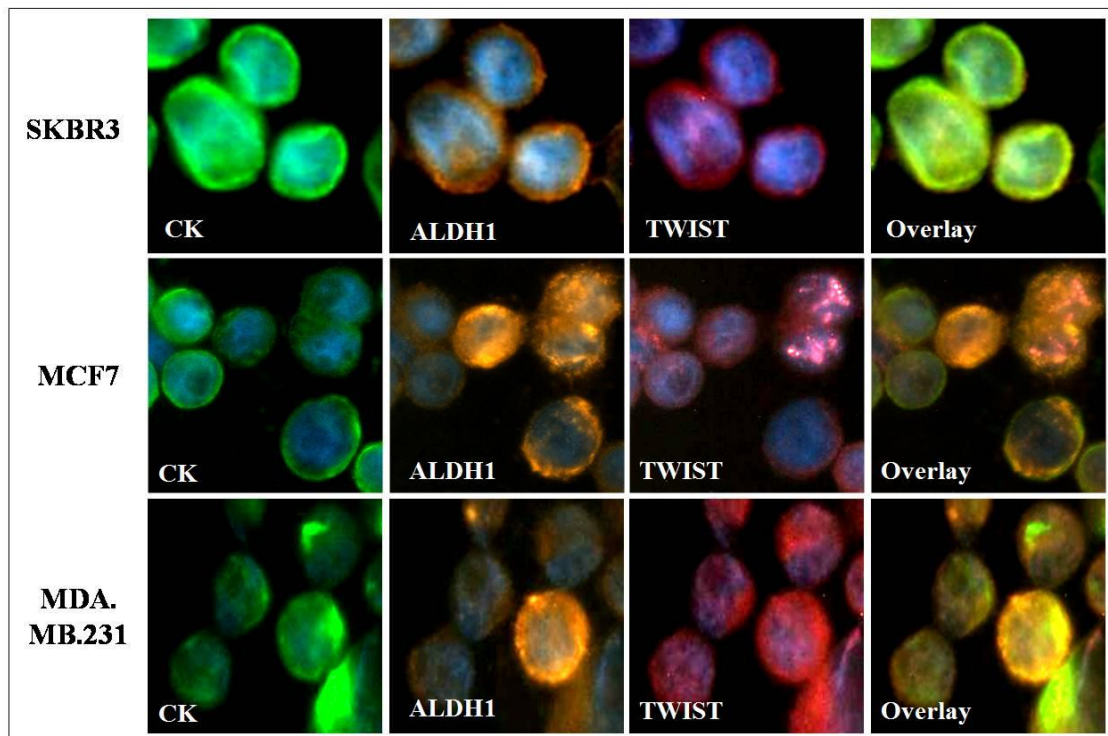
Ακολούθως, διερευνήθηκε η έκφραση του TWIST στην κυτταρική σειρά ελέγχου HeLa. Η ανάπτυξη της μεθόδου ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων και με τη βοήθεια της CLSM μικροσκοπίας και του συστήματος ARIOL (Εικόνα 3). Όπως διαπιστώθηκε, το πρότυπο της έκφρασης του TWIST διέφερε μεταξύ των κυττάρων και ειδικότερα η ανίχνευσή του ήταν δυνατή στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Οι διαφορετικοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί κατηγοριοποιήθηκαν ως εκείνοι με πυρηνική εντόπιση TWIST, ανεξάρτητα από την πιθανή συνέκφρασή του στο κυτταρόπλασμα (TWIST<sup>nuc</sup>), εκείνοι με αποκλειστικά κυτταροπλασματική εντόπιση (TWIST<sup>cyt</sup>) και τέλος εκείνοι χωρίς έκφραση TWIST (TWIST<sup>neg</sup>). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η έκφραση του TWIST στη σειρά HepG2 και τις σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, στο σύνολο των οποίων διαπιστώθηκε ότι ήταν επίσης δυνατή η ταυτοποίηση των τριών παραπάνω φαινοτυπικά διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών. Όπως υποδεικνύεται από τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, ο ορισμός του φαινότυπου EMM στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε βάσει της πυρηνικής εντόπισης του μεταγραφικού παράγοντα TWIST.





**Εικόνα 3.** Διερεύνηση της έκφρασης του TWIST στα κύτταρα ελέγχου HeLa και HepG2 και στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. **A)** Απεικόνιση της έκφρασης του TWIST μέσω CLSM, 400X, (I) Θετικός μάρτυρας: επώαση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του TWIST και δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία Alexa 633 (μπλε), (II) Αρνητικός μάρτυρας: επώαση αποκλειστικά με το συνδεδεμένο με Alexa 633 δευτερογενές αντίσωμα. **B)** Σύνθετες εικόνες της έκφρασης TWIST και των κυτταρικών πυρήνων μέσω ARIOL, 400X. Η σήμανση του TWIST πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας ουσίας Alexa 633 (ροζ), ενώ των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε). Σημείωση ενδεικτικά ενός κυττάρου από καθένα υποπληθυσμό με πυρηνική (nuclear), κυτταροπλασματική (cytoplasmic) και απύουσα (negative) έκφραση TWIST.

Τέλος, αναπτύχθηκε η μεθοδολογία του τριπλού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της συνέκφρασης των CK, ALDH1 και TWIST στις σειρές ελέγχου HepG2 και HeLa και στη συνέχεια εφαρμόστηκε στις σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231 (Εικόνα 4). Όπως διαπιστώθηκε, σε όλες τις σειρές ταυτοποιήθηκαν κύτταρα με συνέκφραση των τριών παραπάνω μορίων, ενώ ήταν επίσης δυνατή η ανίχνευση όλων των φαινότυπων που προκύπτουν από το συνδυασμό των διαφορετικών προφίλ έκφρασης της ALDH1 και του TWIST.

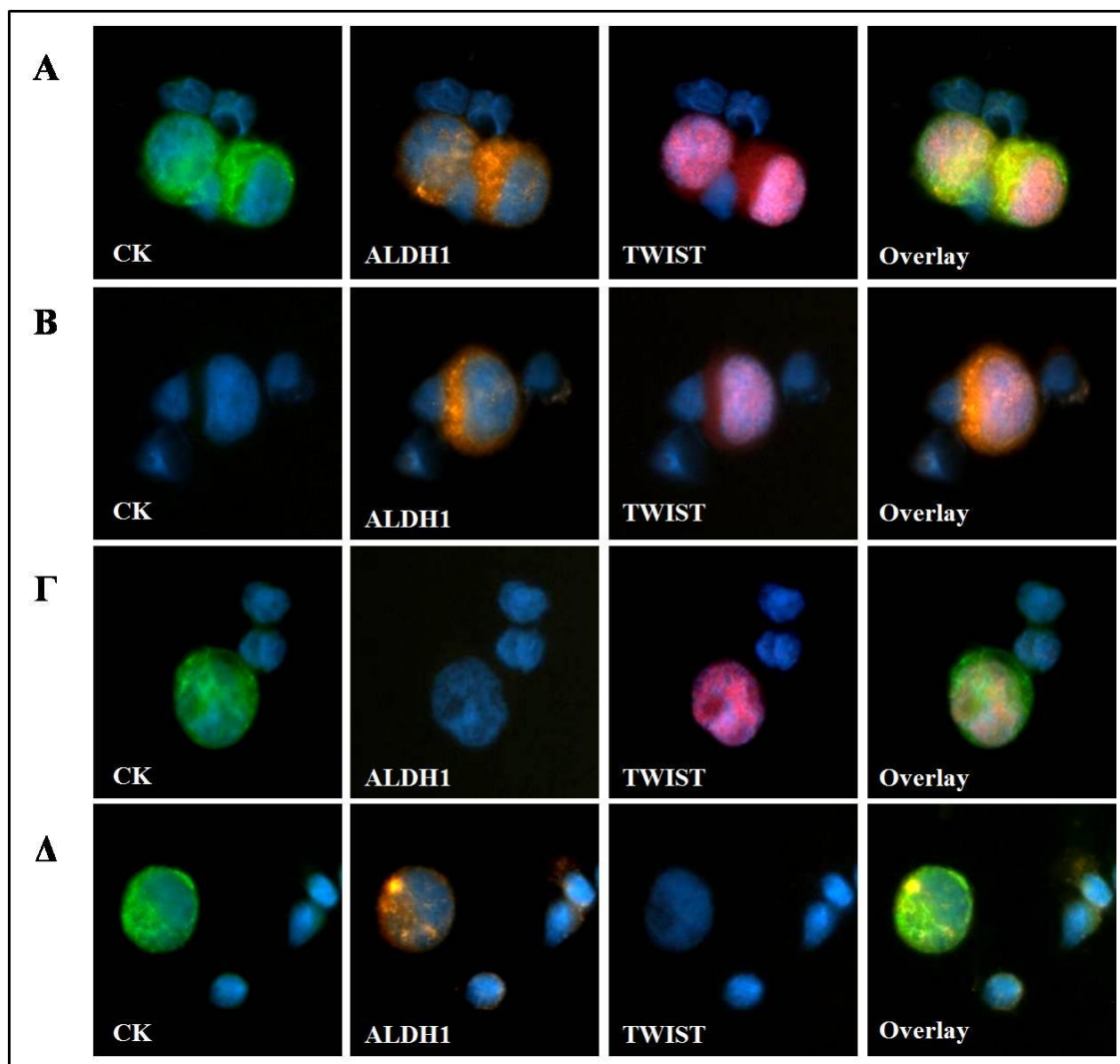


**Εικόνα 4.** Εκτίμηση της συνέκφρασης των μορίων CK, ALDH1 και TWIST στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, ARIOL, 400X. Η σήμανση της CK πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας χρωστικής Zenon Alexa 488 (πράσινο), της ALDH1 μέσω της χρωστικής Alexa 555 (πορτοκαλί) και του TWIST μέσω της χρωστικής Alexa 633 (ροζ), έπειτα από τριπλό ανοσοφθορισμό. Σε όλες τις εικόνες εμφανίζεται συγχρόνως η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων μέσω της Dapi (μπλε).

#### **4.1.3. Ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης KKK με φαινότυπους KBK και EMM σε ασθενείς με καρκίνο μαστού**

Η ανάπτυξη της μεθόδου εκτίμησης της συνέκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα KKK των ασθενών, πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων τριπλού ανοσοφθορισμού για CK/ALDH1/TWIST σε κύτταρα HepG2 αναμεμιγμένα με PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών. Η ειδικότητα των αντισωμάτων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες για την έκφραση του κάθε μορίου χωριστά, οι οποίοι εκτιμήθηκαν μέσω του συστήματος ARIOL (Εικόνα 5). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η ειδικότητα της μεθόδου μέσω τριπλού ανοσοφθορισμού για CK/ALDH1/TWIST σε δείγμα απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων από 10 υγιείς αιμοδότες, όπου διαπιστώθηκε ότι η ALDH1 και το TWIST εκφράζονται στην

πλειονηφία των κυττάρων, όμως σε κανένα δείγμα δεν ταυτοποιήθηκαν κύτταρα θετικά στην έκφραση CK.



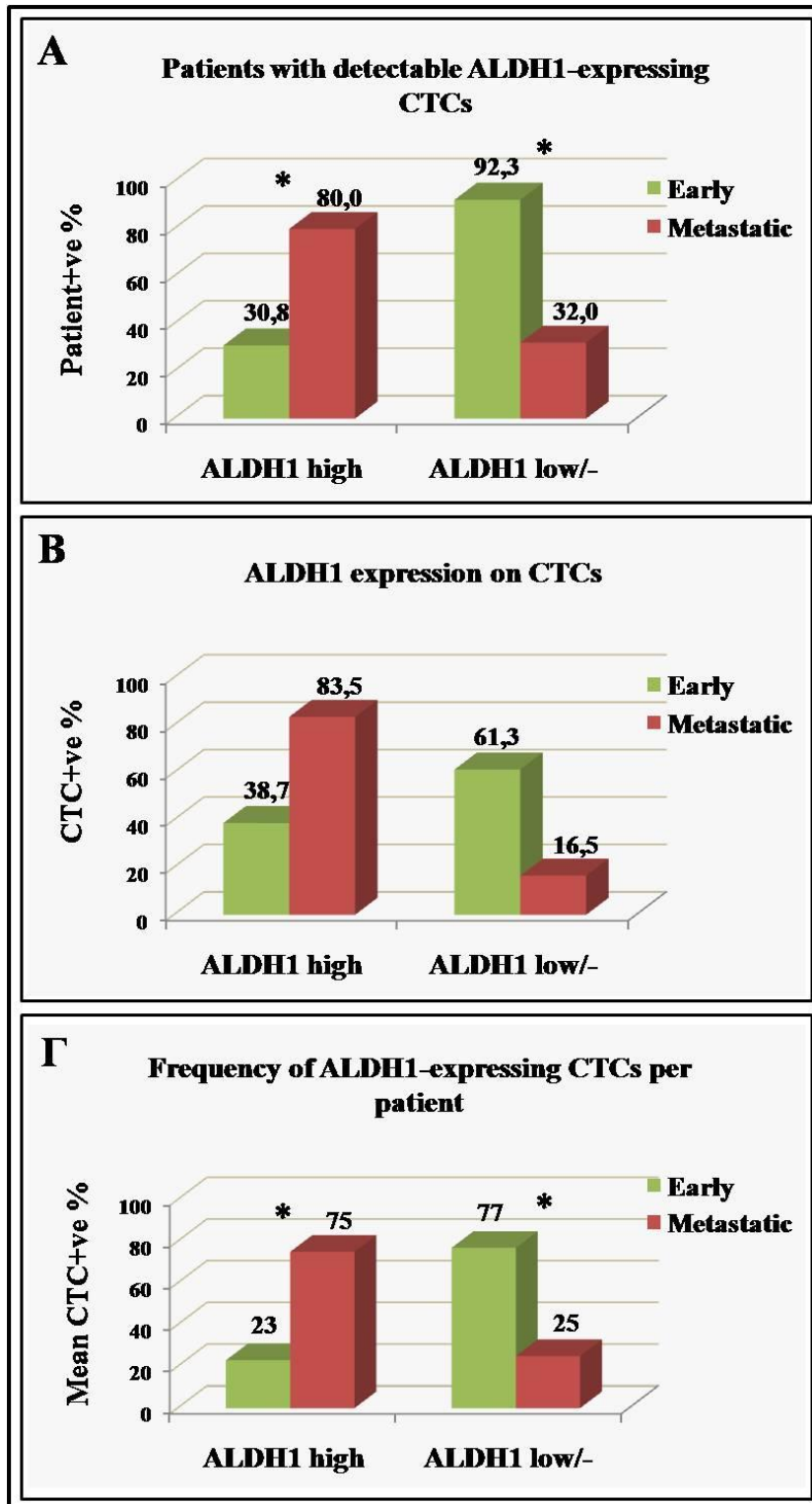
**Εικόνα 5.** Πειράματα ελέγχου για τη συνέκφραση των μορίων CK, ALDH1 και TWIST σε αναμεμιγμένα κύτταρα ελέγχου HepG2 με PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών, ARIOL, 200X. Η σήμανση της CK πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας χρωστικής Zenon Alexa 488 (πράσινο), της ALDH1 μέσω της χρωστικής Alexa 555 (πορτοκαλί) και του TWIST μέσω της χρωστικής Alexa 633 (ροζ), έπειτα από τριπλό ανοσοφθορισμό. Σε όλες τις εικόνες εμφανίζεται συγχρόνως η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε). Στους αρνητικούς μάρτυρες πραγματοποιήθηκε επώαση με όλα τα πρωτογενή αντισώματα και τα αντίστοιχα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές δευτερογενή αντισώματα, παραλείποντας αποκλειστικά το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του αντίστοιχου μορίου. **A)** Επώαση με όλα τα αντισώματα, **B)** αρνητικός μάρτυρας για CK, **Γ)** αρνητικός μάρτυρας για ALDH1, **Δ)** αρνητικός μάρτυρας για TWIST.

#### 4.1.4. Συχνότητα ανίχνευσης KKK με φαινότυπους KBK και EMM σε ασθενείς με πρώιμη και μεταστατική νόσο

Η παρουσία KKK διερευνήθηκε σε δείγμα μονοπύρηνων κυττάρων 80 ασθενών με πρώιμο και 50 με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προκειμένου να ακολουθήσει περαιτέρω χαρακτηρισμός τους για την έκφραση της ALDH1 και του TWIST. KKK ανιχνεύτηκαν στους 13 ασθενείς με πρώιμη νόσο (16%), με ένα συνολικό αριθμό 31 KKK (διάμεσος αριθμός KKK ανά δείγμα ασθενή: 1, εύρος: 1-6). Στη μεταστατική νόσο αντίστοιχα, 25 ασθενείς (50%) είχαν ανιχνεύσιμα KKK, με συνολικό αριθμό 91 KKK (διάμεσος αριθμός KKK ανά ασθενή: 2, εύρος: 1-21).

Διερευνώντας αρχικά την έκφραση της ALDH1, ALDH1-θετικά KKK ταυτοποιήθηκαν σε όλους τους ασθενείς με πρώιμο καρκίνο, πλην ενός, και στο σύνολο των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο. Ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο σταδίων. KKK με υψηλή έκφραση ALDH1 (ALDH1<sup>high</sup>) ανιχνεύτηκαν στο 80% των ασθενών με μεταστατική νόσο, έναντι του 30,8% των ασθενών με πρώιμη νόσο ( $p=0.009$ ) (Γράφημα 1A). Επιπλέον, περισσότεροι ασθενείς με μεταστατικό παρά πρώιμο καρκίνο εμφάνισαν αποκλειστικά ALDH1<sup>high</sup> KKK (68% και 15,4%, αντιστοίχως,  $p=0.006$ ). Σε επίπεδο κυττάρων, το ποσοστό των ALDH1<sup>high</sup> KKK επί του συνόλου των KKK ήταν επίσης αυξημένο στη μεταστατική νόσο (83,5% έναντι 38,7%) (Γράφημα 1B), όπως επίσης ήταν και το μέσο ποσοστό των ALDH1<sup>high</sup> KKK ανά ασθενή (75%, εύρος: 0-100%, έναντι 23%, εύρος: 0-100%,  $p=0.001$ ) (Γράφημα 1Γ). Αντιθέτως, KKK με χαμηλή ή απουσία έκφραση ALDH1 (ALDH1<sup>low/neg</sup>) ταυτοποιήθηκαν κυρίως στους ασθενείς πρώιμου σταδίου (92,3% έναντι 32% στη μεταστατική νόσο,  $p=0.006$ ) (Γράφημα 1A). Επίσης, περισσότεροι ήταν οι ασθενείς στην πρώιμη παρά μεταστατική νόσο με ανιχνεύσιμα KKK αποκλειστικά αυτού του φαινότυπου (69,2% έναντι 20%,  $p=0.009$ ). Επιπλέον, το ποσοστό των ALDH1<sup>low/neg</sup> KKK ήταν μεγαλύτερο στην πρώιμη νόσο (61,3% έναντι 16,5%) (Γράφημα 1B), όπως ήταν επίσης και το μέσο ποσοστό των ALDH1<sup>low/neg</sup> KKK ανά ασθενή (77%, εύρος: 0-100%, έναντι 25%, εύρος: 0-100%,  $p=0.001$ ) (Γράφημα 1Γ).

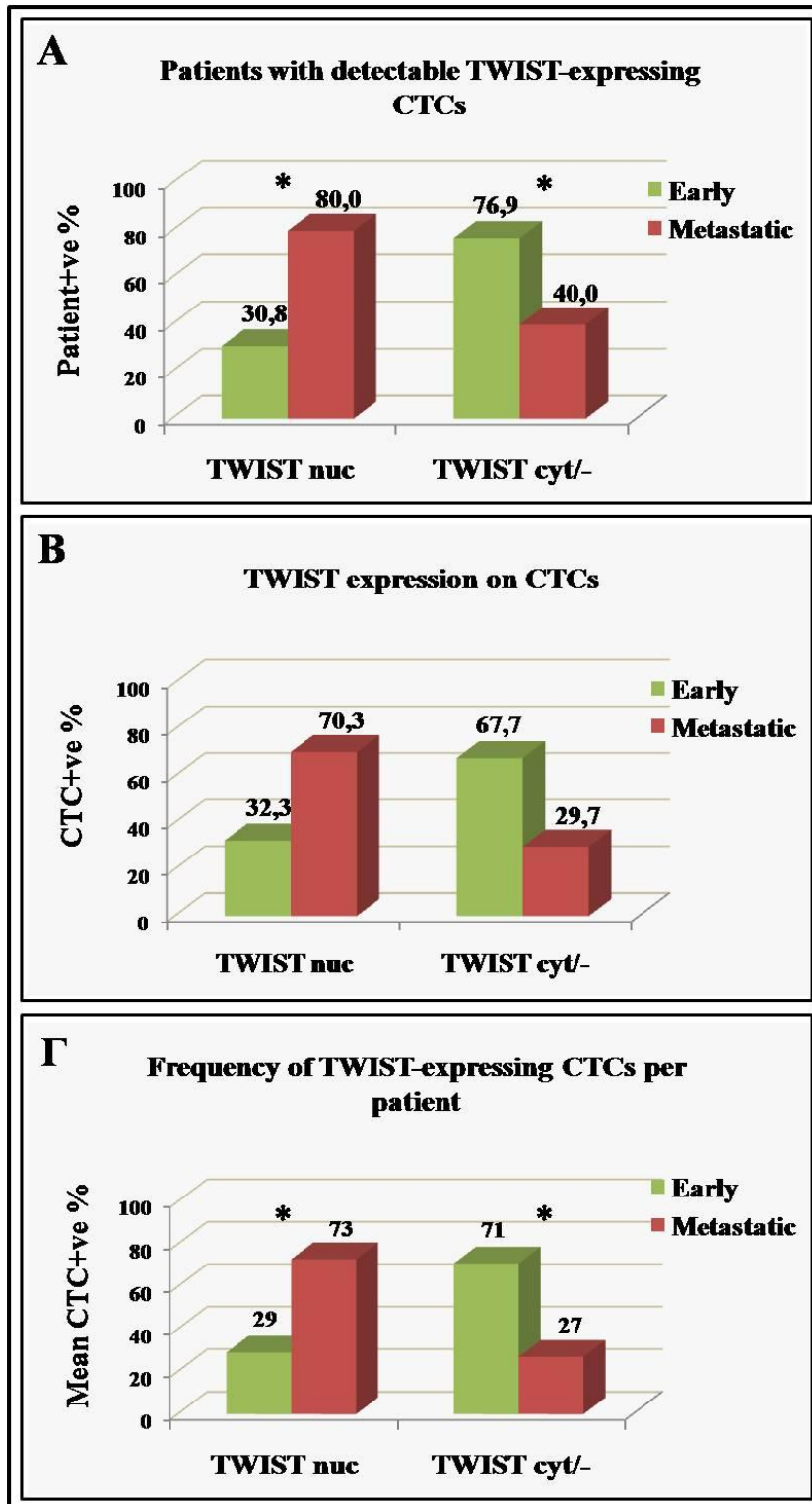
Επομένως, η συχνότητα των KKK με φαινότυπο KBK (ALDH1<sup>high</sup>) ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε αντίθεση με τους ασθενείς με πρώιμη νόσο, όπου ανιχνεύτηκαν συχνότερα KKK μη-βλαστικού φαινότυπου (ALDH1<sup>low/neg</sup>).



Γράφημα 1. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση ALDH1 σε απομονωμένα μονοπύρηνα κύτταρα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Α) Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Chi-square test*. Β) Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ στο πρώιμο και μεταστατικό στάδιο. Γ) Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Mann-Whitney U test*.

Αξιολογώντας στη συνέχεια την έκφραση του TWIST στα ΚΚΚ των παραπάνω ασθενών, βρέθηκε ότι ΚΚΚ θετικά στην έκφραση TWIST ανιχνεύθηκαν σε 15 από τους 16 ασθενείς με πρώιμη και στο σύνολο των 25 ασθενών με μεταστατική νόσο, παρόλα αυτά το πρότυπο έκφρασης του TWIST ήταν διαφορετικό ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι ΚΚΚ με πυρηνικό TWIST (TWIST<sup>nuc</sup>) εμφάνισε το 80% των ασθενών με μεταστατική νόσο, έναντι του 30,8% των ασθενών με πρώιμη νόσο ( $p=0.009$ ) (Γράφημα 2Α), ενώ μεγαλύτερο ήταν επίσης στη μεταστατική νόσο το ποσοστό των ασθενών που εμφάνισε αποκλειστικά TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ (64% έναντι 23,1%,  $p=0.040$ ). Επιπλέον, στους ασθενείς μεταστατικού σταδίου ανιχνεύθηκε αυξημένο ποσοστό TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ (70,3% έναντι 32,3%) (Γράφημα 2Β), αλλά και μέσο ποσοστό TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή (73%, εύρος: 0-100%, έναντι 29%, εύρος: 0-100%,  $p=0.006$ ) (Γράφημα 2Γ). Αντιθέτως, ΚΚΚ με κυτταροπλασματική ή απύσα έκφραση TWIST (TWIST<sup>cyt/neg</sup>) ανιχνεύθηκαν κυρίως στους ασθενείς με πρώιμη παρά μεταστατική νόσο (76,9% έναντι 40% των ασθενών,  $p=0.040$ ) (Γράφημα 2Α). Περισσότεροι ήταν επίσης στο πρώιμο στάδιο οι ασθενείς που είχαν αποκλειστικά TWIST<sup>cyt/neg</sup> ΚΚΚ (69,2% έναντι 20%,  $p=0.009$ ). Τέλος, το ποσοστό των TWIST<sup>cyt/neg</sup> ΚΚΚ ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στην πρώιμη νόσο (67,7% έναντι 29,7%) (Γράφημα 2Β), όπως επίσης ήταν και το μέσο ποσοστό των TWIST<sup>cyt/neg</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή (71%, εύρος: 0-100%, έναντι 27%, εύρος: 0-100%,  $p=0.006$ ) (Γράφημα 2Γ).

Επομένως, η ανίχνευση των ΚΚΚ με φαινότυπο ενδιάμεσης EMM (TWIST<sup>nuc</sup>) υπερίσχυε σημαντικά στους ασθενείς μεταστατικού σταδίου, ενώ αντιθέτως στην πρώιμη νόσο ανιχνεύθηκαν κυρίως ΚΚΚ με επιθηλιακό φαινότυπο (TWIST<sup>cyt/neg</sup>).



Γράφημα 2. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση TWIST σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Α) Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Chi-square test*. Β) Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ στο πρώιμο και μεταστατικό στάδιο. Γ) Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Mann-Whitney U test*.

#### 4.1.5. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με συνέκφραση των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM σε ασθενείς πρώιμου και μεταστατικού σταδίου

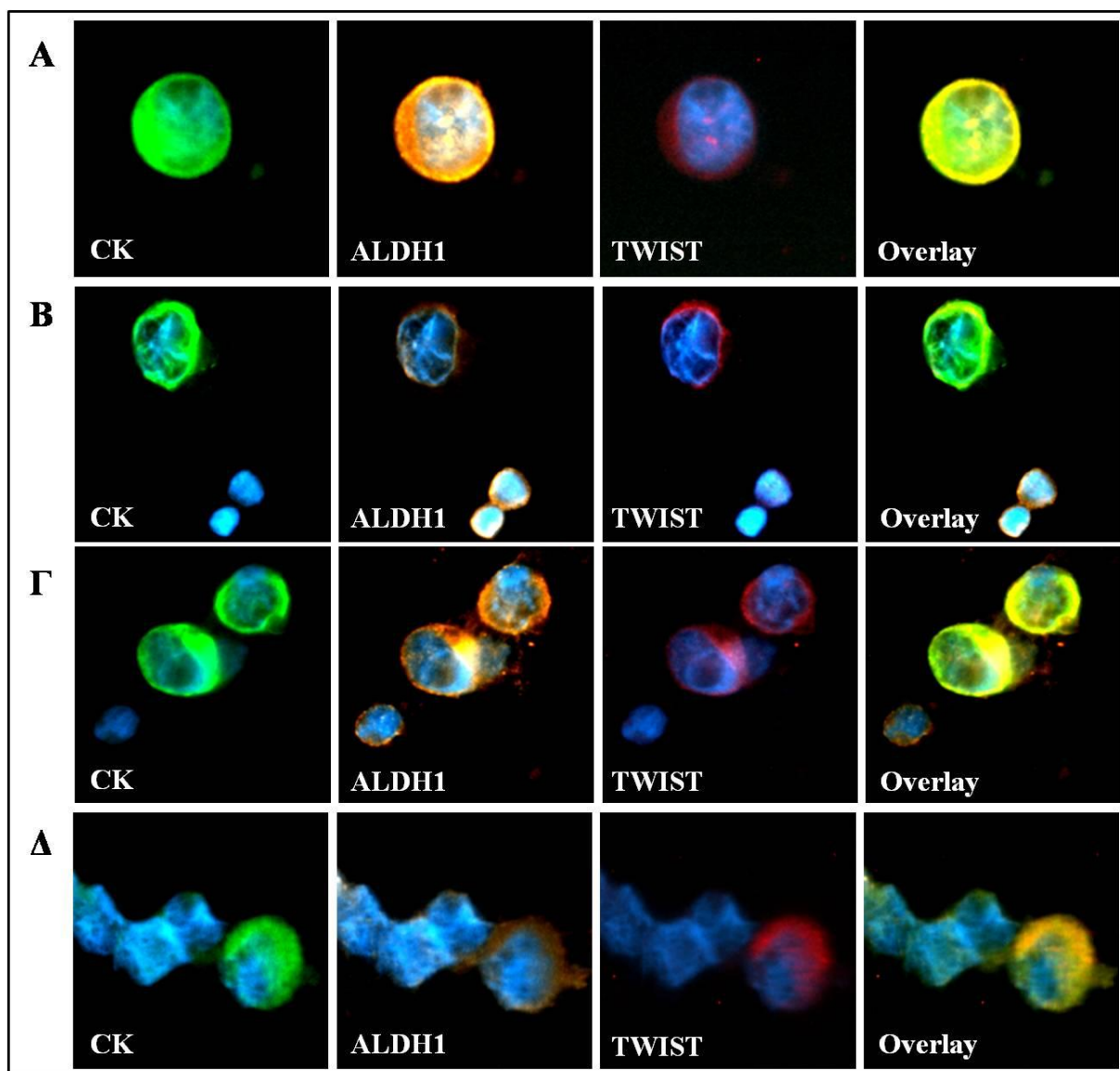
Εκτιμώντας παράλληλα το προφίλ έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στο ίδιο κύτταρο, ήταν δυνατή η ταυτοποίηση τεσσάρων διαφορετικών φαινότυπων (Γράφημα 3, Εικόνα 6). Ο επικρατέστερος φαινότυπος στο μεταστατικό στάδιο ήταν ο  $ALDH1^{high}/TWIST^{nuc}$  (Εικόνα 6A), ο οποίος ταυτοποιήθηκε στα ΚΚΚ στο 76% των ασθενών (έναντι 15,4% στην πρώιμη νόσο,  $p=0.001$ ) (Γράφημα 3A). Επίσης στο 56% των ασθενών ανιχνεύτηκαν μόνο ΚΚΚ αυτού του φαινότυπου (έναντι 0% στην πρώιμη νόσο,  $p=0.002$ ). Σε επίπεδο κυττάρων επίσης βρέθηκε να εκφράζεται στην πλειοψηφία των ΚΚΚ (61,5% έναντι 12,9% στην πρώιμη νόσο) (Γράφημα 3B), με ένα μέσο ποσοστό  $ALDH1^{high}/TWIST^{nuc}$  ΚΚΚ ανά ασθενή: 64% (εύρος: 0-100%) (έναντι 6%, εύρος: 0-50%,  $p=0.000$ ) (Γράφημα 3Γ). Στη μεταστατική νόσο, η παρατηρούμενη συσχέτιση μεταξύ των φαινότυπων  $ALDH1^{high}$  και  $TWIST^{nuc}$  επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και στατιστικά ( $p=0.001$ ).

Αντιθέτως, ο επικρατέστερος φαινότυπος στα ΚΚΚ στην πρώιμη νόσο ήταν ο  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$  (Εικόνα 6B), καθώς ταυτοποιήθηκε στο 61,5% των ασθενών (έναντι του 20% στη μεταστατική νόσο,  $p=0.078$ ) (Γράφημα 3A), ενώ το 53,8% των ασθενών είχε ανιχνεύσιμα ΚΚΚ μόνο αυτού του φαινότυπου (έναντι 16%,  $p=0.078$ ). Ομοίως και σε επίπεδο κυττάρων, τα  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$  ΚΚΚ ήταν ο πιο συχνός υποπληθυσμός των ΚΚΚ στην πρώιμη νόσο (41,9% έναντι 7,7% στη μεταστατική) (Γράφημα 3B), όπου το μέσο ποσοστό των  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$  ΚΚΚ ανά ασθενή ήταν επίσης αυξημένο (54%, εύρος: 0-100%, έναντι 16%, εύρος: 0-100%,  $p=0.026$ ) (Γράφημα 3Γ).

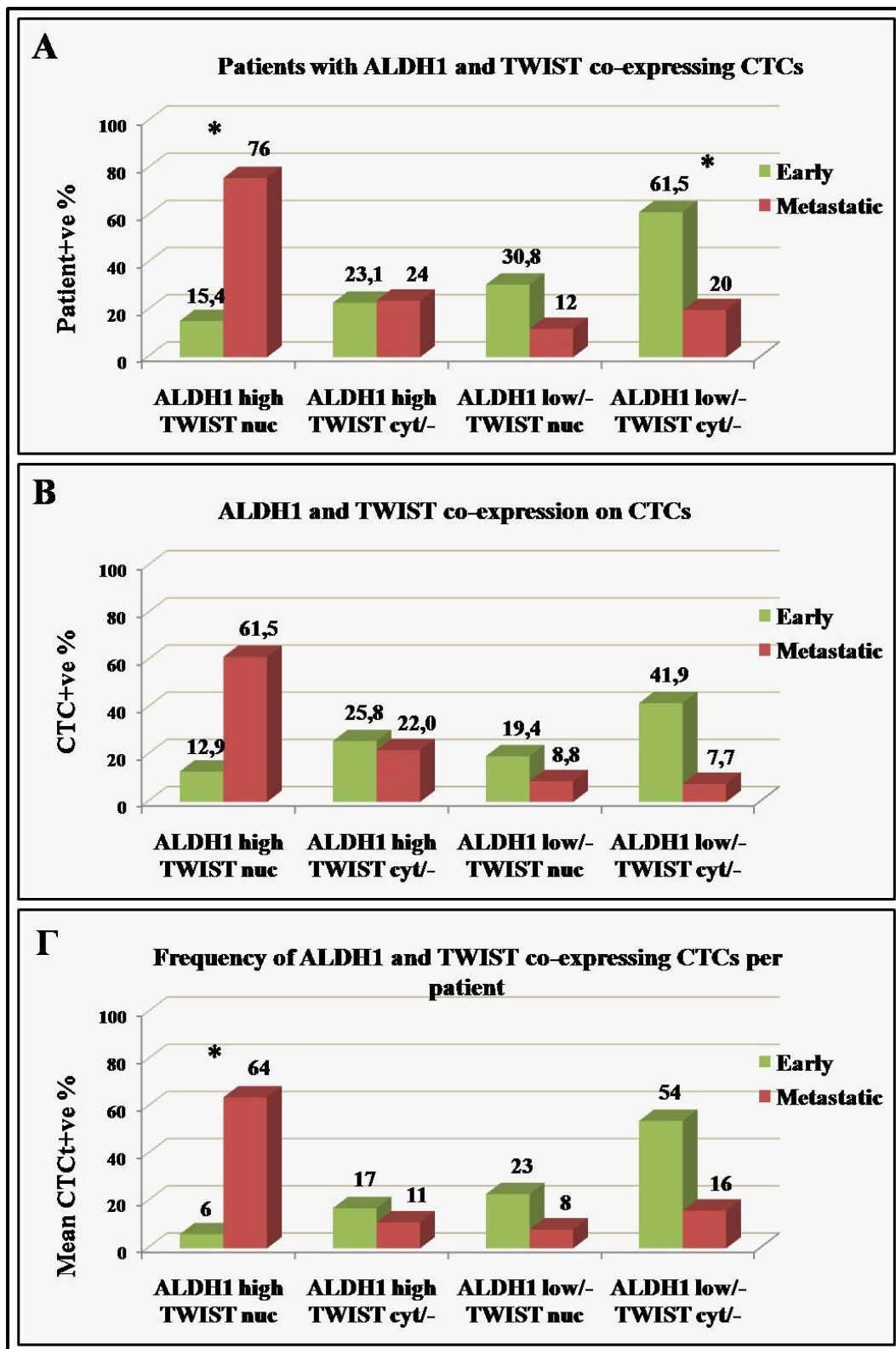
Τέλος, οι υπόλοιποι φαινότυποι,  $ALDH1^{high}/TWIST^{cyt/neg}$  (Εικόνα 6Γ) και  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{nuc}$  (Εικόνα 6Δ), ανιχνεύτηκαν και στα δύο στάδια της νόσου με μικρή συχνότητα, πρακτικά χωρίς διαφορά σε επίπεδο ασθενών ή ΚΚΚ (Γράφημα 3). Επομένως, η συχνότητα των ΚΚΚ με φαινότυπο ΚΒΚ και παράλληλα ενδιάμεσης EMM ( $ALDH1^{high}/TWIST^{nuc}$ ) ήταν σημαντικά αυξημένη στο μεταστατικό στάδιο, σε αντίθεση με το πρώιμο όπου ανιχνεύθηκαν κυρίως ΚΚΚ μη-βλαστικού και παράλληλα επιθηλιακού φαινότυπου ( $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$ ), ενώ η συχνότητα των ενδιάμεσων φαινότυπων πρακτικά δεν διέφερε μεταξύ των δύο κλινικών σταδίων. Παρόλα αυτά, όπως καταγράφεται στον Πίνακα 2, όπου παρουσιάζεται η κατανομή των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ενδεικτικά σε 5 ασθενείς με πρώιμο



και 7 με μεταστατικό καρκίνο μαστού, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή ετερογένεια του φαινοτυπικού προφίλ των ΚΚΚ, τόσο μεταξύ των διαφορετικών ασθενών, όσο και μέσα στον ίδιο ασθενή.



**Εικόνα 6.** Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανάμεσα σε φυσιολογικά κύτταρα των ασθενών με καρκίνο μαστού, ARIOL, 400X. Η σήμανση της CK πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας χρωστικής Zenon Alexa 488 (πράσινο), της ALDH1 μέσω της Alexa 555 (πορτοκαλί) και του TWIST μέσω της Alexa 633 (ροζ), έπειτα από τριπλό ανοσοφθορισμό. Σε όλες τις εικόνες εμφανίζεται συγχρόνως η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε). **A)** ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>, **B)** ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup>, **Γ)** ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup>, **Δ)** ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>



Γράφημα 3. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με συνέκφραση ALDH1 και TWIST σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού. Α) Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Chi-square test*. Β) Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ στο πρώιμο και μεταστατικό στάδιο. Γ) Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή στην πρώιμη και μεταστατική νόσο, *Mann-Whitney U test*.

Στάδιο νόσου (Ασθενείς)	ΚΚΚ ανά δείγμα ασθενή (500.000 PBMCs) Αριθμός (%)				
	ALDH1high TWISTnuc	ALDH1high TWISTcyt/neg	ALDH1low/neg TWISTnuc	ALDH1low/neg TWISTcyt/neg	Συν. αριθμός ΚΚΚ
<b>Πρώιμο</b>					
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3
2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	5
3	1 (33.3)	0 (0)	2 (66.7)	0 (0)	3
4	3 (50)	1 (16.7)	2 (33.3)	0 (0)	6
5	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	6
<b>Μεταστατικό</b>					
1	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
2	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)	11
3	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	2
4	1 (20)	2 (80)	0 (0)	0 (0)	3
5	5 (23.8)	14 (66.7)	0 (0)	2 (9.5)	21
6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2
7	3 (27.2)	2 (18.2)	6 (54.5)	0 (0)	11

**Πίνακας 2.** Κατανομή των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ως προς τη συνέκφραση της ALDH1 και του TWIST σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Αριθμός ΚΚΚ ανά δείγμα ασθενή (500.000 PBMCs) και ποσοστό ΚΚΚ επί του συνόλου. Ενδεικτική παρουσίαση 5 ασθενών με πρώιμη και 7 με μεταστατική νόσο.

Επομένως οι δύο δείκτες βρέθηκαν να συνεκφράζονται στα ΚΚΚ των ασθενών τόσο με πρώιμο, όσο και μεταστατικό καρκίνο μαστού, ωστόσο το πρότυπο έκφρασής τους ήταν σημαντικά διαφοροποιημένο ανάμεσα στην πρώιμη και τη μεταστατική νόσο. Παρόλο που και στα δύο κλινικά στάδια διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια του φαινοτυπικού προφίλ των ΚΚΚ, η συχνότητα ανίχνευσης των ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ (ALDH1<sup>high</sup>) και ενδιάμεσης EMM (TWIST<sup>nuc</sup>), καθώς επίσης και των ΚΚΚ που έφεραν συγχρόνως τα δύο χαρακτηριστικά (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>), ήταν σαφώς μεγαλύτερη στη μεταστατική, συγκριτικά με την πρώιμη νόσο.

## **4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΚΚΚ ΩΣ ΠΡΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ ΕΜΜ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ**

### **4.2.1. Ασθενείς**

Στη μελέτη εντάχθηκαν 154 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής. Στους 72 από τους παραπάνω ασθενείς που ανιχνεύτηκαν ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία, πραγματοποιήθηκε συλλογή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Αριθμός ασθενών (%)			
Ηλικία σε έτη (διάμεση τιμή, εύρος)		60 (23 - 82)	
<b>Δείκτης γενικής κατάστασης (ECOG)</b>		<b>Προσβεβλημένα όργανα</b>	
0-1	62 (86.1)	1-2	42 (58.3)
2-3	8 (11.1)	≥ 3	26 (36.1)
Άγνωστο	2 (2.8)	Άγνωστο	4 (5.6)
<b>Εμμηνόπαυση</b>		<b>Μεταστατικές εστίες</b>	
Προεμμηνόπαυση	24 (33.3)	Τοπικά	30 (41.7)
Μετεμμηνόπαυση	42 (58.3)	Λεμφαδένες	30 (41.7)
Άγνωστο	6 (8.3)	Πνεύμονας	34 (47.2)
<b>Στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση</b>		<b>Οστά</b>	
I-III	26 (36.1)	Ήπαρ	25 (34.7)
IV	31 (43.1)	Δέρμα	4 (5.6)
Άγνωστο	15 (20.8)	ΚΝΣ	3 (4.2)
<b>Βαθμός διαφοροποίησης</b>		<b>Πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας</b>	
I-II	23 (31.9)	Ανθρακυκλίνη	3 (4.2)
III	36 (50)	Ταξάνη	31 (43.1)
Άγνωστο	13 (18.1)	Ανθρακυκλίνη/Ταξάνη	18 (25)
<b>Ιστολογικός τύπος</b>		<b>Άλλο</b>	
Πορογενές	55 (76.4)		20 (27.8)
Λοβιακό	5 (6.9)	<b>Ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία</b>	
Μικτό	7 (9.7)	Πλήρης ανταπόκριση	5 (6.9)
Άλλο	5 (6.9)	Μερική ανταπόκριση	32 (44.4)
<b>Μοριακός υπότυπος</b>		<b>Σταθερή νόσος</b>	
Ορμονο-θετικός (ER/PR)	47 (65.3)	Πρόοδος νόσου	16 (22.2)
HER2-θετικός	14 (19.4)	Άγνωστο	15 (20.9)
Τριπλά αρνητικός	10 (13.9)	<b>Κατάσταση νόσου στο τέλος της θεραπείας</b>	
Άγνωστο	1 (1.4)	Πλήρης ανταπόκριση	6 (8.3)
<b>Συμπληρωματική θεραπεία</b>		Μερική ανταπόκριση	
Ναι	33 (45.8)	Σταθερή νόσος	25 (34.7)
Όχι	35 (48.6)	Πρόοδος νόσου	18 (25)
Άγνωστο	4 (5.6)	Άγνωστο	19 (26.4)
<b>Διάστημα έως την υποτροπή (μήνες) (Διάμεση τιμή ± τυπική απόκλιση) (95% CI)</b>		<b>Διάστημα ολικής επιβίωσης (μήνες) (Διάμεση τιμή ± τυπική απόκλιση) (95% CI)</b>	
12.5 ± 1.6 (9.3 - 15.8)		39 ± 3.9 (31.2 - 46.8)	

**Πίνακας 3. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των 72 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού που είχαν ανιχνεύσιμα ΚΚΚ πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας**

#### **4.2.2. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν και μετά τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής**

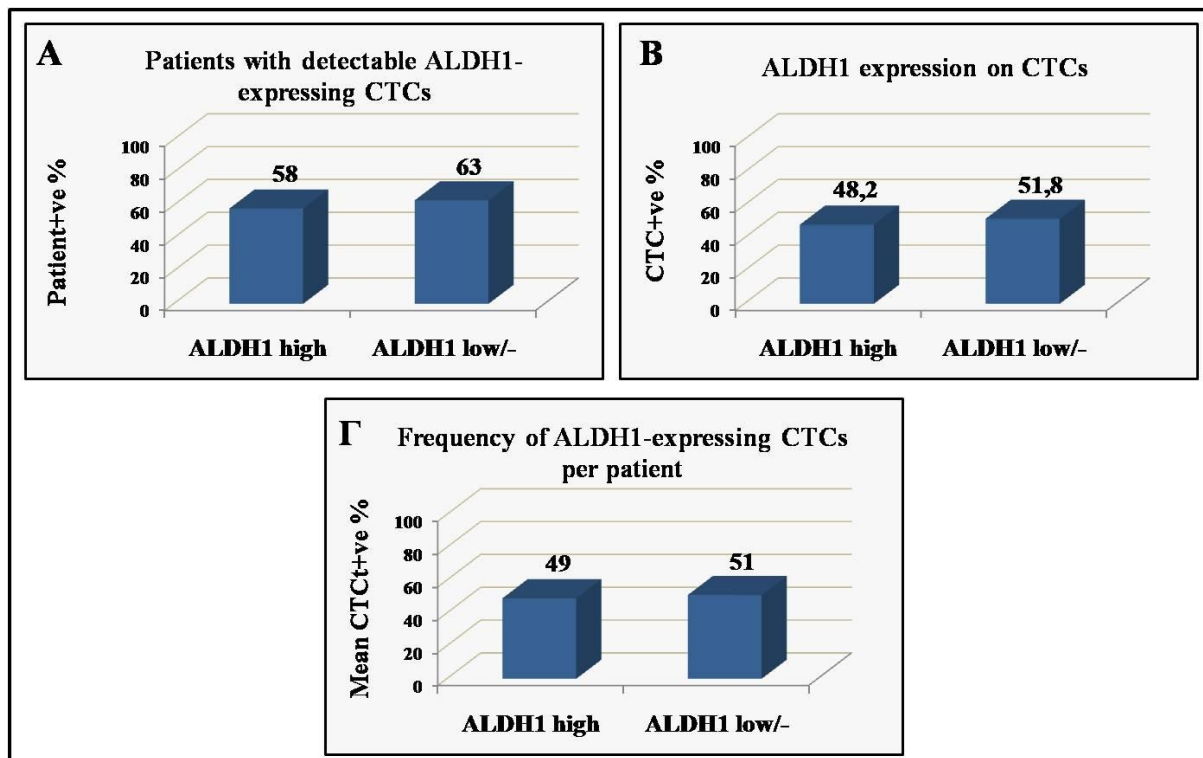
Η παραπάνω μεθοδολογία ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των ΚΚΚ ως προς την έκφραση της ALDH1 και του TWIST εφαρμόστηκε σε δείγμα απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος σε 154 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, πριν την έναρξη της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν σε 74 από τους 154 ασθενείς (48%), από τους οποίους αποκλείστηκαν ένας ασθενής με ανιχνεύσιμα 2.500 ΚΚΚ και ένας στον οποίον ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά συσσωματώματα κυττάρων και όχι μεμονωμένα ΚΚΚ. Επομένως στους 72 ασθενείς που αναλύθηκαν, ανιχνεύτηκαν συνολικά 1.481 ΚΚΚ, με ένα διάμεσο αριθμό 2 ΚΚΚ ανά ασθενή (εύρος: 1 έως 600). Σε 65 από τους παραπάνω ασθενείς, στους οποίους υπήρχε διαθεσιμότητα δείγματος, διερευνήθηκε ακολούθως η παρουσία ΚΚΚ μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν σε 45 από αυτούς (69%), από τους οποίους οι 6 αποκλείστηκαν λόγω ανίχνευσης αποκλειστικά συσσωματωμάτων ΚΚΚ. Επομένως, στους παραπάνω 39 ασθενείς ανιχνεύτηκαν συνολικά 335 ΚΚΚ, με διάμεσο αριθμό 4 ΚΚΚ ανά ασθενή (εύρος: 1 έως 94).

Η χημειοθεραπεία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση ή εξάλειψη των ΚΚΚ σε ποσοστό 61,5% των ασθενών, η οποία ωστόσο δεν ήταν σημαντική ( $p=0.102$ ). Σε ένα μικρό ποσοστό 1,6% των ασθενών δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα επίπεδα των ΚΚΚ, ενώ στο 37,1% των ασθενών διαπιστώθηκε αύξηση του αριθμού των ΚΚΚ. Εντούτοις, στο σύνολο των 39 ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ και τις δύο χρονικές στιγμές, ο συνολικός αριθμός των ΚΚΚ πρακτικά δεν μεταβλήθηκε (323 έναντι 335), ενώ η παρατηρούμενη μικρή αύξηση του διάμεσου αριθμού των ΚΚΚ ανά ασθενή από 2 σε 4 δεν ήταν σημαντική ( $p=0.377$ ).

#### **4.2.3. Συχνότητα εμφάνισης των φαινότυπων KBK και EMM στα ΚΚΚ των ασθενών πριν και μετά τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής**

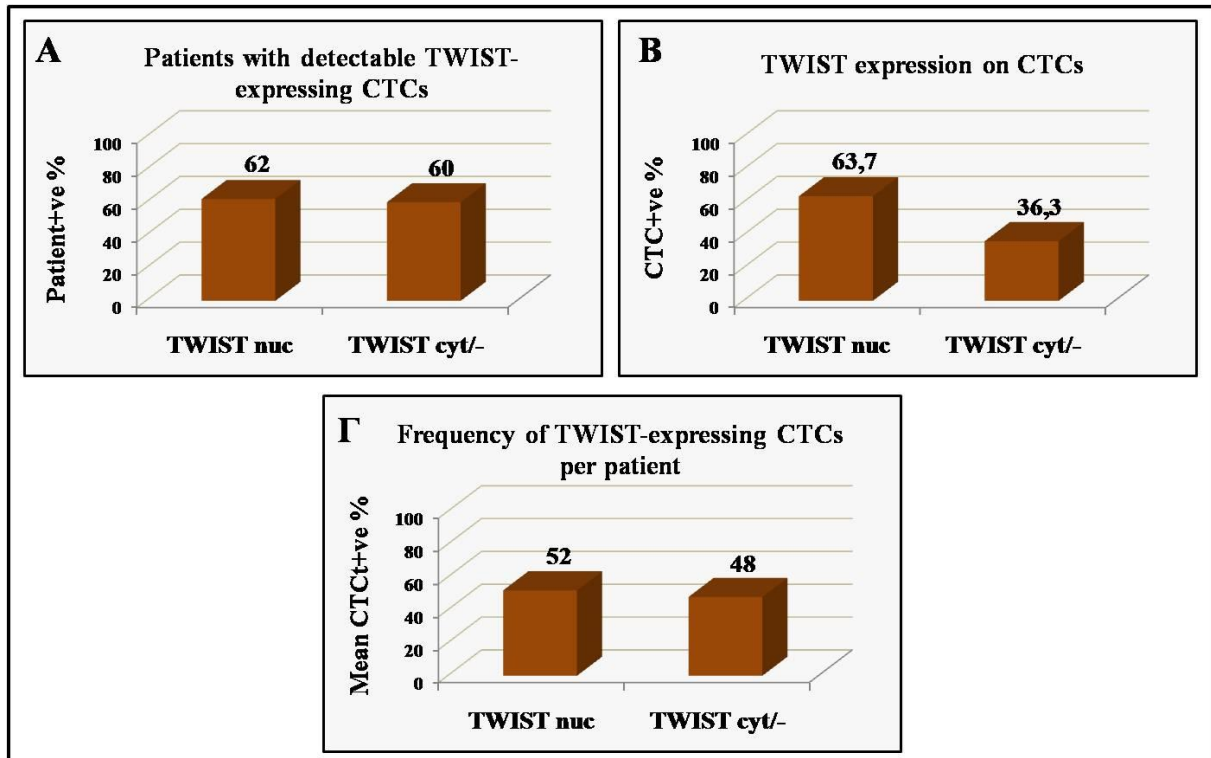
Η ανάλυση του βλαστικού φαινότυπου ΚΚΚ των ασθενών πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, έδειξε ότι ΚΚΚ με υψηλή έκφραση ALDH1 (ALDH1<sup>high</sup>) ανιχνεύτηκαν στο 58% των ασθενών και αντιπροσώπευαν το 48,2% του συνόλου των ΚΚΚ, με ένα μέσο ποσοστό ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή: 49% (εύρος: 1 έως 100%). Αντίστοιχα, ΚΚΚ με χαμηλή ή απύουσα έκφραση ALDH1 (ALDH1<sup>low/neg</sup>)

ταυτοποιήθηκαν στο 63% των ασθενών, ενώ το μέσο ποσοστό των ALDH1<sup>low/neg</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή ήταν 51% (εύρος: 1 έως 100%) (Γράφημα 4).



**Γράφημα 4.** Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση ALDH1 σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν την έναρξη χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. **A)** Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικό φαινότυπο. **B)** Ποσοστό ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ. **Γ)** Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή.

Όσον αφορά στην έκφραση του φαινότυπου EMM, στο 62% των ασθενών ανιχνεύτηκαν ΚΚΚ με πυρηνικό TWIST (TWIST<sup>nuc</sup>), τα οποία αντιστοιχούσαν στο 63,7% των ΚΚΚ, με μέσο ποσοστό TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή: 52% (εύρος: 1 έως 100%). Αντίστοιχα, ΚΚΚ με κυτταροπλασματική ή απύσα έκφραση TWIST (TWIST<sup>cyt/neg</sup>) ανιχνεύτηκαν στο 60% των ασθενών, ενώ το μέσο ποσοστό των TWIST<sup>cyt/neg</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή ήταν 48% (εύρος: 1 έως 100%) (Γράφημα 5).

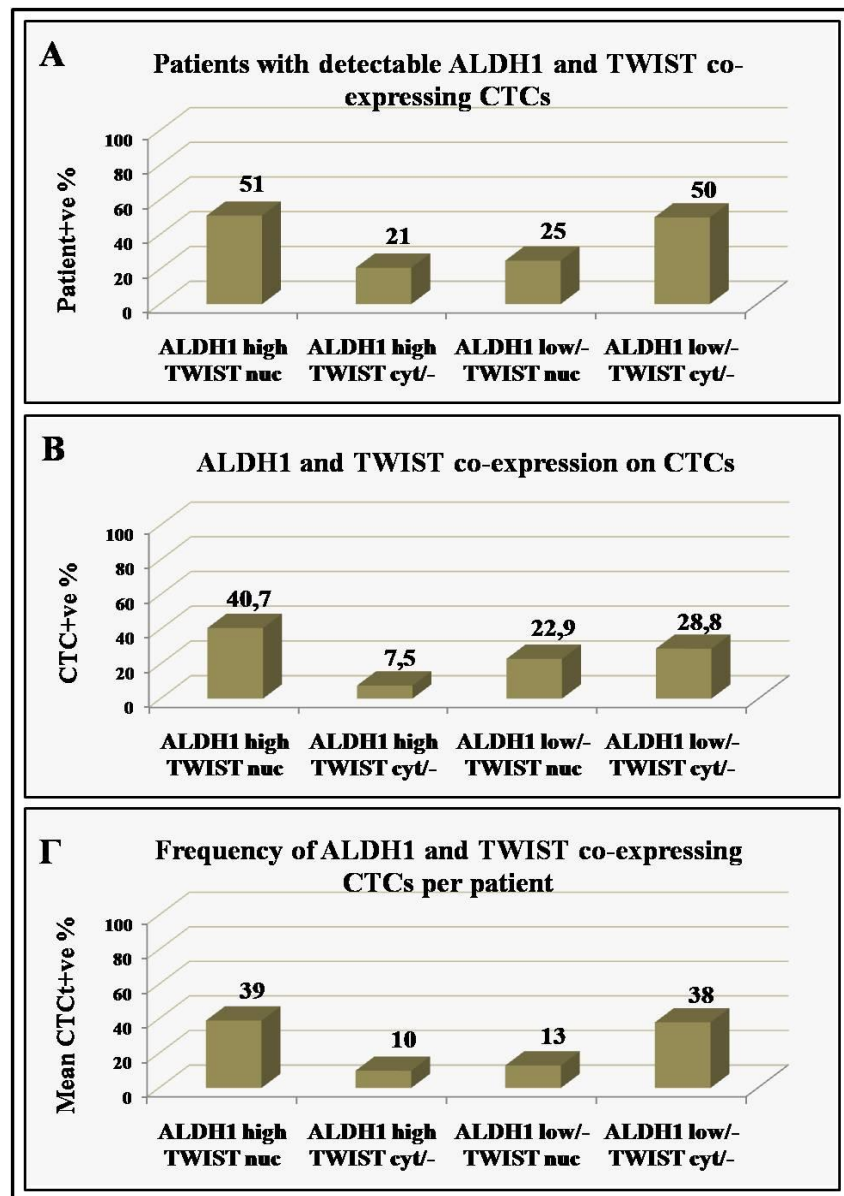


**Γράφημα 5.** Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση TWIST σε απομονωμένα μονοπύρρινα κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν την έναρξη χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. **A)** Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικό φαινότυπο. **B)** Ποσοστό ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ. **Γ)** Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή.

Διερευνώντας στη συνέχεια τη συνέκφραση των δύο δεικτών στα ΚΚΚ, ο επικρατέστερος φαινότυπος ήταν ο  $ALDH1^{high}/TWIST^{nuc}$ , ο οποίος ταυτοποιήθηκε στα ΚΚΚ στο 51% των ασθενών, αντιπροσωπεύοντας το 40,7% του συνόλου των ΚΚΚ, ενώ το μέσο ποσοστό των  $ALDH1^{high}/TWIST^{nuc}$  ΚΚΚ ανά ασθενή ήταν 39% (εύρος: 1 έως 100%). Ο δεύτερος συχνότερος φαινότυπος ήταν ο  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$ , ο οποίος ανιχνεύτηκε στο 50% των ασθενών και στο 28,8% των συνολικών ΚΚΚ, με μέσο ποσοστό  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{cyt/neg}$  ΚΚΚ ανά ασθενή: 38% (εύρος: 1 έως 100%). Οι υπόλοιποι φαινότυποι,  $ALDH1^{high}/TWIST^{cyt/neg}$  και  $ALDH1^{low/neg}/TWIST^{nuc}$  ανιχνεύτηκαν με μικρότερη συχνότητα, τόσο σε επίπεδο ασθενών, όσο και ΚΚΚ (Γράφημα 6). Η παρατηρούμενη συσχέτιση μεταξύ των φαινότυπων  $ALDH1^{high}$  και  $TWIST^{nuc}$ , καθώς επίσης και



μεταξύ των φαινότυπων  $ALDH1^{low/neg}$  και  $TWIST^{cyt/neg}$ , επιβεβαιώθηκε επιπλέον στατιστικά ( $p=0.000$  και  $p=0.000$ , αντιστοίχως).



Γράφημα 6. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με συνέκφραση ALDH1 και TWIST σε απομονωμένα μονοπύρηνα κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν την έναρξη χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. Α) Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους. Β) Ποσοστό ΚΚΚ με έκφραση κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ. Γ) Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή.

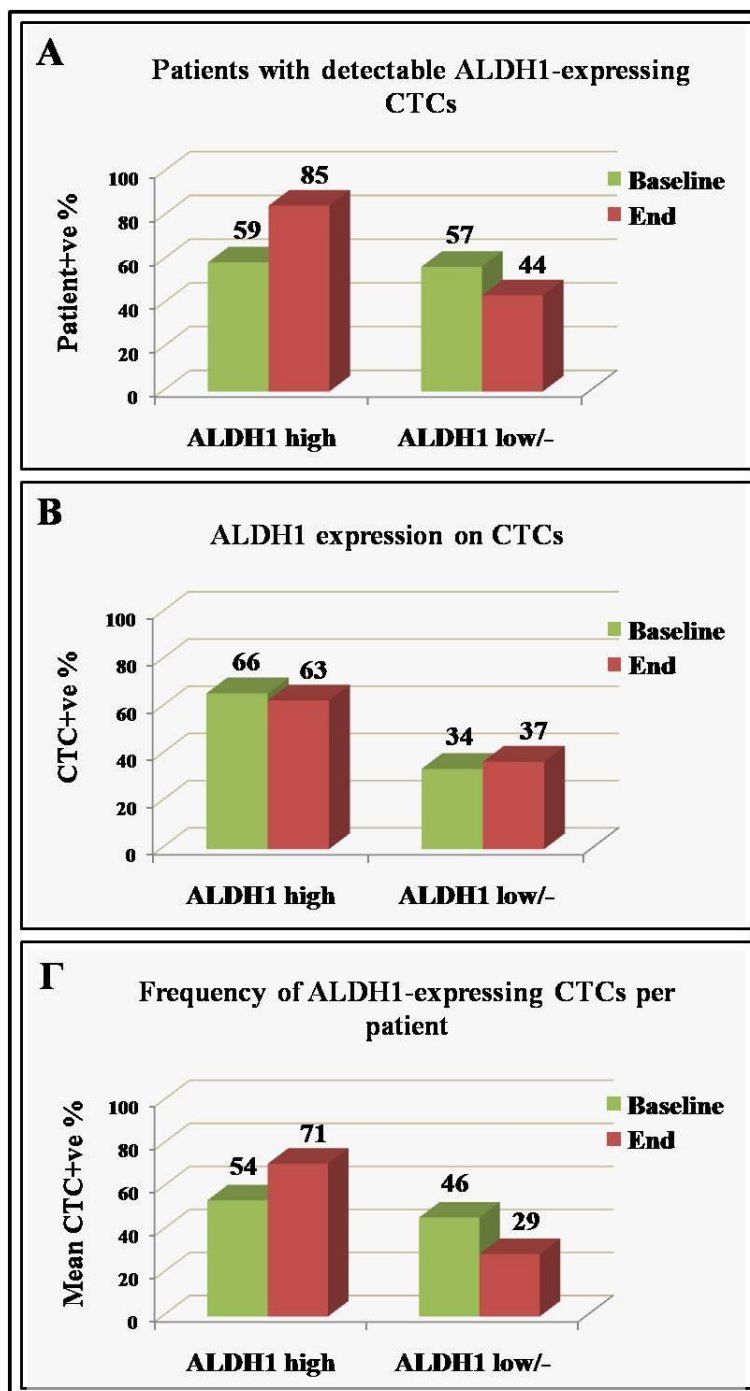
Εν συνεχεία, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της χημειοθεραπείας στο φαινοτυπικό προφίλ των ΚΚΚ, διερευνήθηκε η συχνότητα των παραπάνω φαινότυπων στους 39 ασθενείς που είχαν ανιχνεύσιμα ΚΚΚ και πριν και μετά τη θεραπεία. Όπως διαπιστώθηκε, το ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ αυξήθηκε έπειτα από τη χημειοθεραπεία από 59% σε 85%, όπως επίσης αυξήθηκε και το μέσο ποσοστό ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή από 54% σε 71% ( $p=0.084$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή σε επίπεδο ποσοστού ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ επί των συνολικών ΚΚΚ. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μείωση στο ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα ALDH1<sup>low/neg</sup> ΚΚΚ από 57% σε 44%, ενώ παράλληλα μειώθηκε και το μέσο ποσοστό των ALDH1<sup>low/neg</sup> ΚΚΚ ανά ασθενή από 46% σε 29% (Γράφημα 7).

Μελετώντας στη συνέχεια την επίδραση της χημειοθεραπείας στο φαινότυπο EMM των ΚΚΚ, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που εμφάνισαν TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ ήταν περισσότεροι μετά τη θεραπεία (87% έναντι 67%), με μία παράλληλη αύξηση του μέσου ποσοστού ΚΚΚ ανά ασθενή (69% έναντι 54%,  $p=0.098$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη συχνότητα των TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ επί του συνόλου των ΚΚΚ. Επίσης, μετά τη χημειοθεραπεία παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των ασθενών με ανιχνεύσιμα TWIST<sup>cyt/neg</sup> (54% έναντι 59%), καθώς επίσης και του μέσου ποσοστού ΚΚΚ ανά ασθενή (31% έναντι 46%) (Γράφημα 8).

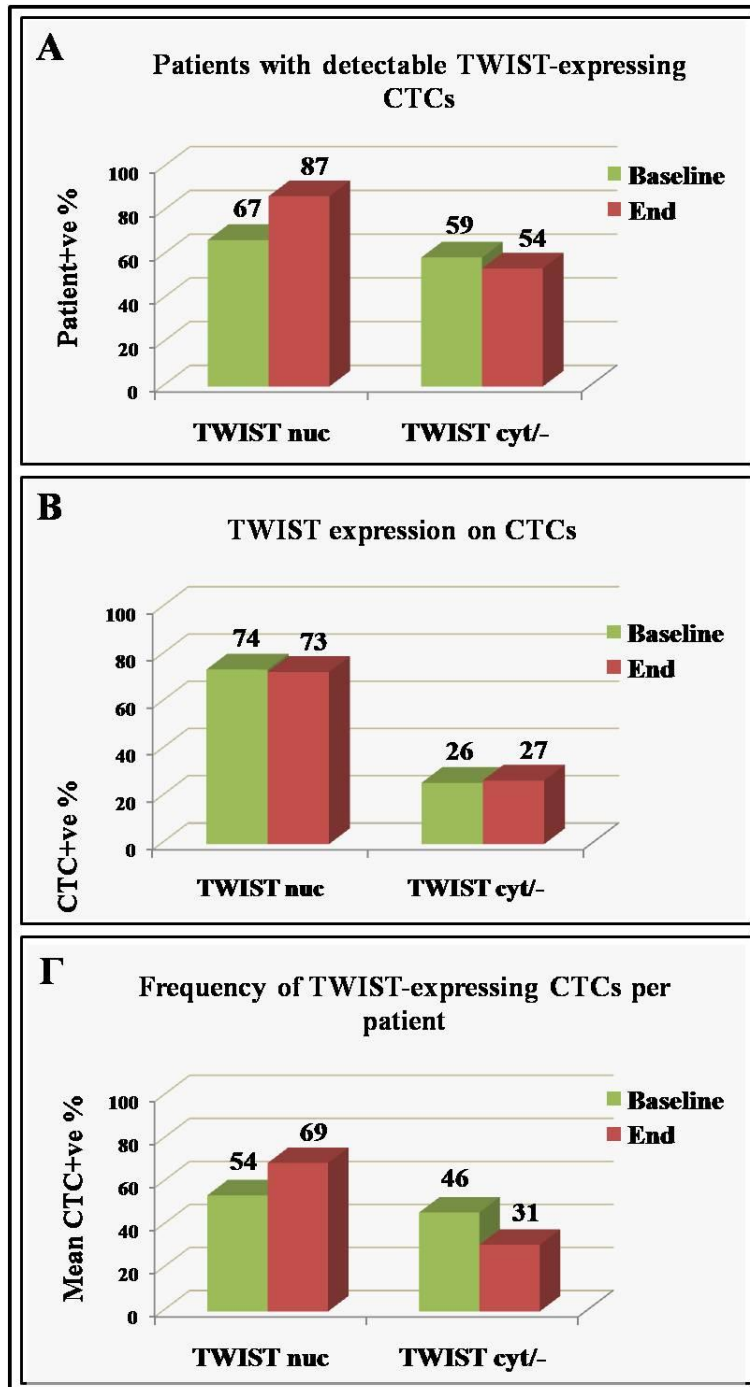
Σε επίπεδο συνέκφρασης των δύο δεικτών, η χημειοθεραπεία βρέθηκε να αυξάνει το ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ από 51% σε 80%, οδηγώντας επιπλέον σε σημαντική αύξηση του μέσου ποσοστού των ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> ΚΚΚ από 42% σε 61% ( $p=0.022$ ). Πρακτικά, δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη μεταβολή στη συχνότητα των υπόλοιπων φαινότυπων σε επίπεδο ασθενών ή ΚΚΚ (Γράφημα 9). Τέλος, σε συμφωνία με τα δεδομένα πριν τη χημειοθεραπεία, επιβεβαιώθηκε και στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ των φαινότυπων ALDH1<sup>high</sup> και TWIST<sup>nuc</sup> ( $p=0.000$ ), καθώς επίσης και μεταξύ των φαινότυπων ALDH1<sup>low/neg</sup> και TWIST<sup>cyt/neg</sup> ( $p=0.000$ ) στα ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν μετά τη χημειοθεραπεία.

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, παρόλο που η χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση ή και εξάλειψη των ΚΚΚ στην πλειοψηφία των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, οδήγησε παράλληλα σε εμπλουτισμό των ΚΚΚ με φαινότυπο ΚΒΚ (ALDH1<sup>high</sup>) και ενδιάμεσης EMM

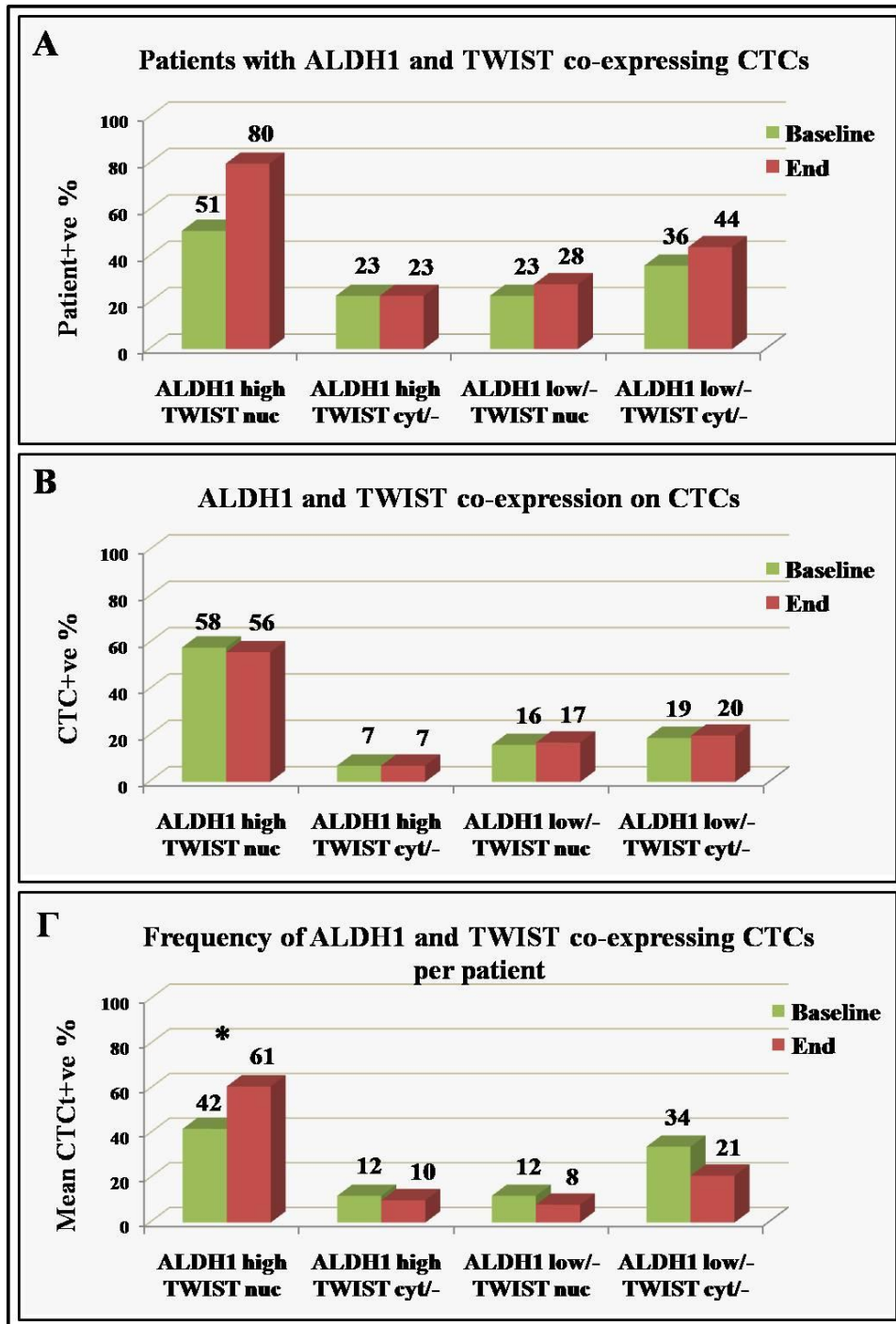
(TWIST<sup>nuc</sup>) και ακόμη περισσότερο των ΚΚΚ που έφεραν συγχρόνως τους δύο φαινότυπους (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>).



**Γράφημα 7.** Επίδραση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής στη συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση ALDH1 σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. **A)** Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους πριν την έναρξη (baseline) και μετά την ολοκλήρωση (end) της χημειοθεραπείας, *Chi-square test*. **B)** Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση του κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ πριν και μετά τη θεραπεία. **Γ)** Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή προ και μετά θεραπείας, *Wilcoxon Signed Ranks test*.



**Γράφημα 8.** Επίδραση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής στη συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με έκφραση TWIST σε απομονωμένα μονοπύρηνια κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. **A)** Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους πριν την έναρξη (baseline) και μετά την ολοκλήρωση (end) της χημειοθεραπείας, *Chi-square test*. **B)** Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση του κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ πριν και μετά τη θεραπεία. **Γ)** Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή προ και μετά θεραπείας, *Wilcoxon Signed Ranks test*.



**Γράφημα 9.** Επίδραση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής στη συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ με συνέκφραση ALDH1 και TWIST σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. **Α)** Ποσοστό ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ με διαφορετικούς φαινότυπους πριν την έναρξη (baseline) και μετά την ολοκλήρωση (end) της χημειοθεραπείας, *Chi-square test*. **Β)** Ποσοστό των ΚΚΚ με έκφραση του κάθε φαινότυπου επί του συνόλου των ΚΚΚ πριν και μετά τη θεραπεία. **Γ)** Μέσο ποσοστό των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανά ασθενή προ και μετά θεραπείας, *Wilcoxon Signed Ranks test*.

### **4.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΒΚ ΚΑΙ ΕΜΜ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ**

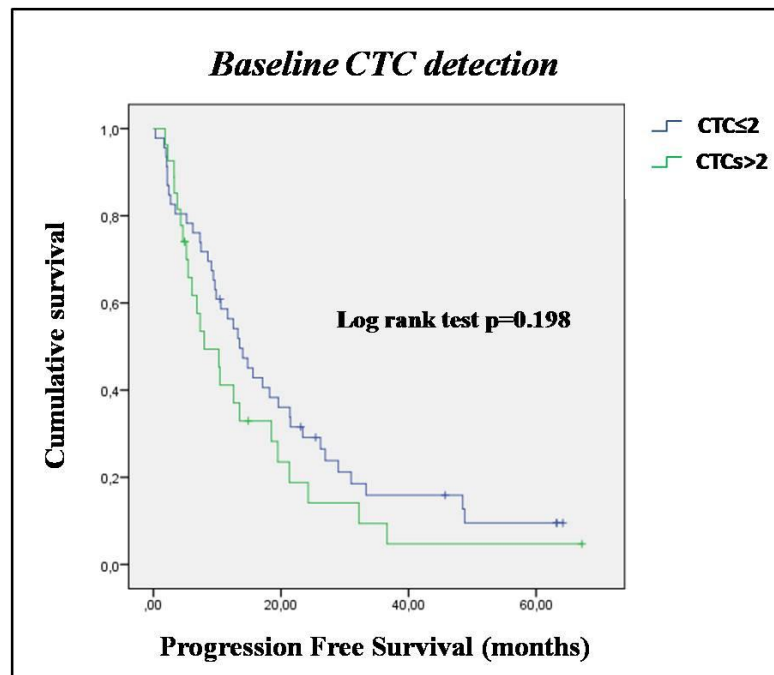
#### **4.3.1. Συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών**

Η ανάλυση των κλινικών δεδομένων για τους παραπάνω 72 ασθενείς με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, έδειξε ότι ο αριθμός των ΚΚΚ συσχετίστηκε αρνητικά με την ηλικία των ασθενών ( $p=0.019$ ) και ότι οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα δύο και άνω ΚΚΚ είχαν μικρότερη ηλικία ( $p=0.007$ ). Οι ασθενείς αυτοί είχαν επίσης τριπλά-αρνητικό υπότυπο πρωτοπαθούς όγκου ( $p=0.045$ ). Αντιθέτως, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Μελετώντας στη συνέχεια τη συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που τελικά σημείωσαν πρόοδο νόσου στο τέλος της χημειοθεραπείας είχαν αυξημένο αριθμό ανιχνεύσιμων ΚΚΚ, σε σχέση με εκείνους που ανταποκρίθηκαν ή είχαν σταθερή νόσο ( $p=0.040$ ). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε κατηγοριοποιώντας τους ασθενείς βάσει του διάμεσου αριθμού των 2 ΚΚΚ ανά ασθενή, όπου οι ασθενείς με περισσότερα των 2 ΚΚΚ σημείωσαν συχνότερα πρόοδο νόσου στο τέλος της χημειοθεραπείας ( $p=0.015$ ). Η ανίχνευση ΚΚΚ μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας επίσης συσχετίστηκε σημαντικά με πρόοδο της νόσου στο τέλος της χημειοθεραπείας ( $p=0.009$ ).

Όσον αφορά στην επιβίωση των ασθενών, οι καμπύλες Kaplan-Meier και η μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση Cox-regression έδειξαν ότι η ανίχνευση ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία δεν εμφάνισε κάποια συσχέτιση με το διάστημα έως την υποτροπή ή την ολική επιβίωση, εξετάζοντας είτε τον αριθμό των ΚΚΚ, είτε τη θετικότητα των ασθενών σε ΚΚΚ, έπειτα από κατηγοριοποίησή τους χρησιμοποιώντας διαφορετικά κατώφλια κυττάρων (1, 2, 3, 4 και 5 ΚΚΚ). Ωστόσο, εμφανής αν και όχι σημαντικός ( $p=0.198$ ) ήταν ο διαχωρισμός των ασθενών στην καμπύλη Kaplan-Meier για το διάστημα έως την υποτροπή, χρησιμοποιώντας ως κατώφλι το διάμεσο αριθμό των 2 ΚΚΚ (Εικόνα 7). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι

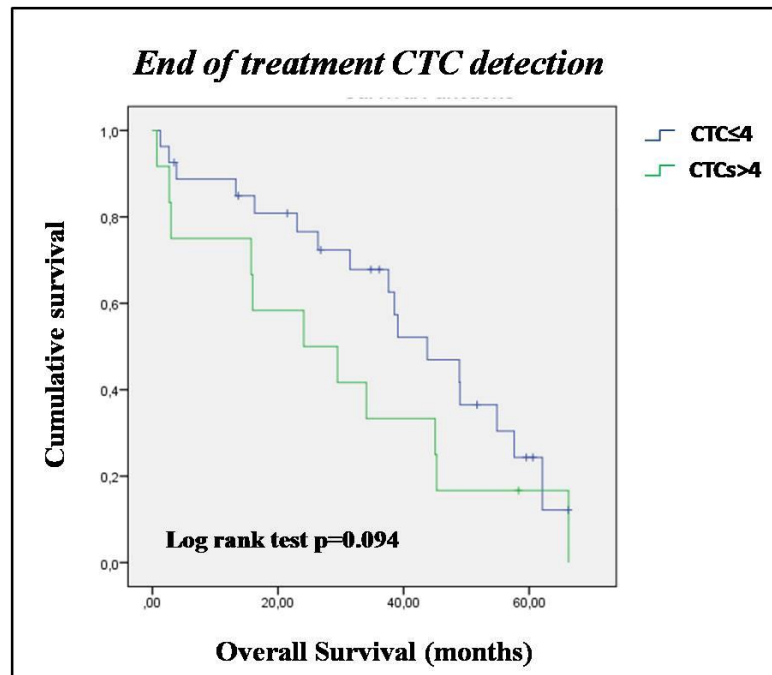
ασθενείς που είχαν ανιχνεύσιμα περισσότερα από 2 ΚΚΚ, είχαν επίσης συχνότερα επιβίωση μικρότερη της διατίας ( $p=0.015$ ). Στους ασθενείς αυτούς το φορτίο των ΚΚΚ ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερο, συγκριτικά με εκείνο των ασθενών με επιβίωση ίση ή μεγαλύτερη των δύο ετών (διάμεσος αριθμός ΚΚΚ ανά ασθενή: 3 έναντι 2,  $p=0.014$ ).



**Εικόνα 7.** Καμπύλη Kaplan-Meier για το διάστημα έως την υποτροπή των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε σχέση με την ανίχνευση ΚΚΚ πριν την έναρξη της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως κατώφλι το διάμεσο αριθμό των 2 ΚΚΚ ανά ασθενή. Η επιβίωση παρουσιάζεται σε μήνες.

Μελετώντας στη συνέχεια την προγνωστική αξία της ανίχνευσης ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση του αριθμού των ΚΚΚ ή της θετικότητας των ασθενών σε ΚΚΚ (με διαφορετικά κατώφλια: 1, 2, 3, 4 και 5 ΚΚΚ) με την επιβίωση. Η μεταβολή του αριθμού των ΚΚΚ με τη χημειοθεραπεία επίσης δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την επιβίωση. Ωστόσο, μικρή τάση για στατιστική σημαντικότητα ( $p=0.094$ ) παρατηρήθηκε μεταξύ της ανίχνευσης ΚΚΚ μετά τη

χημειοθεραπεία και του διαστήματος έως την υποτροπή, έπειτα από την κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει του διάμεσου αριθμού των 4 ΚΚΚ ανά ασθενή ως κατώφλι για την ανίχνευση ΚΚΚ (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8. Καμπύλη Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε σχέση με την ανίχνευση ΚΚΚ μετά την ολοκλήρωση της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών έγινε χρησιμοποιώντας ως κατώφλι το διάμεσο αριθμό των 4 ΚΚΚ ανά ασθενή. Η επιβίωση παρουσιάζεται σε μήνες.**

Επομένως, η παρουσία των ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού συσχετίστηκε με μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και συνολική επιβίωση μικρότερη της διαίτης. Η ανίχνευση ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία επίσης ήταν δείκτης μειωμένης ανταπόκρισης, εμφανίζοντας επιπλέον μικρή τάση για συσχέτιση με μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών.



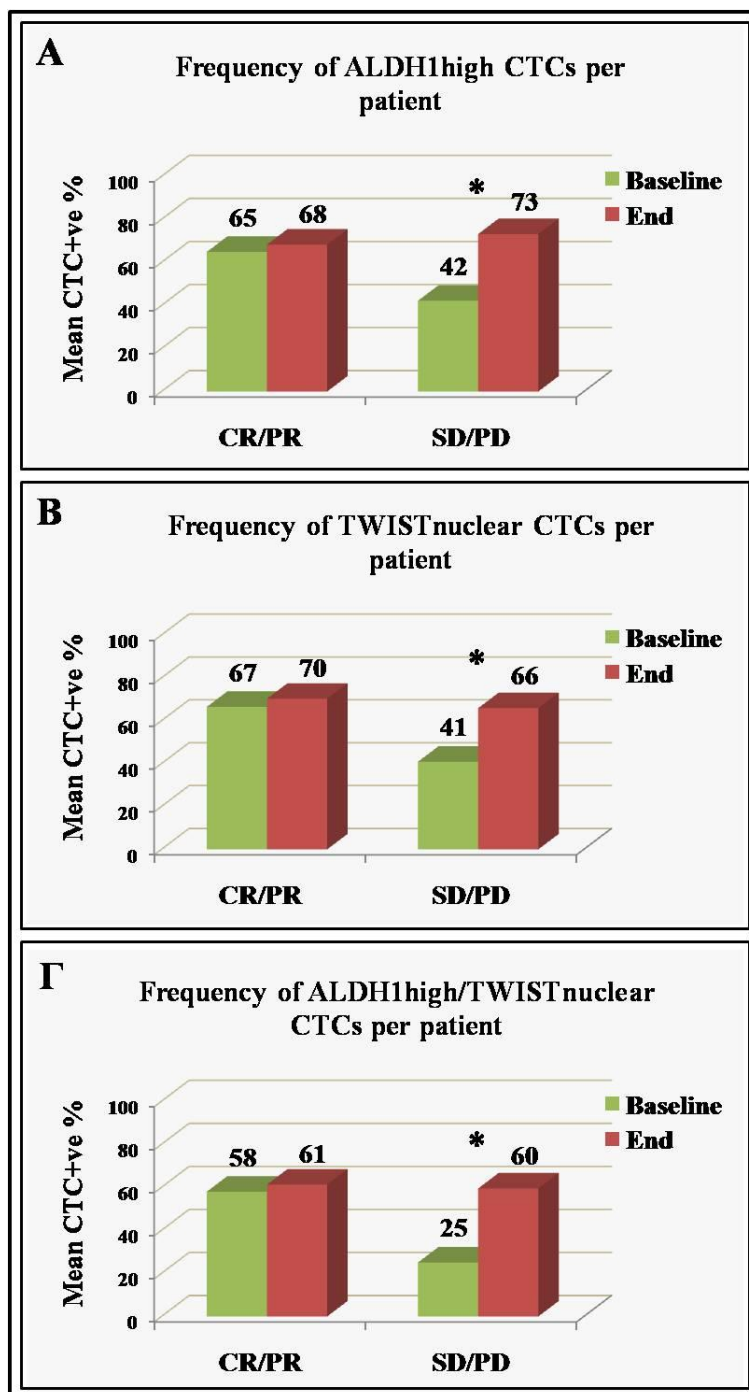
#### 4.3.2. Συσχέτιση της παρουσίας KKK με φαινότυπους KBK και EMM με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών

Μελετώντας αρχικά το φαινότυπο KBK των KKK πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, προέκυψε ότι η ανίχνευση ALDH1<sup>high</sup> KKK συσχετίστηκε με HER2 υπότυπο πρωτοπαθούς όγκου ( $p=0.012$ ). Επίσης, οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα ALDH1<sup>low/neg</sup> KKK εμφάνισαν κυρίως μη-σπλαχνικές μεταστάσεις ( $p=0.012$ ). Όσον αφορά στο φαινότυπο EMM των KKK, οι ασθενείς που εμφάνισαν κυρίως TWIST<sup>nuc</sup> KKK είχαν συχνότερα πνευμονικές μεταστάσεις ( $p=0.020$ ), ενώ η παρουσία των TWIST<sup>cyt/neg</sup> KKK δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με κάποιο από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Σχετικά με τη συνέκφραση των δύο φαινότυπων στα KKK, η μόνη συσχέτιση που βρέθηκε ήταν εκείνη μεταξύ της ανίχνευσης ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK και της ορμονοθετικότητας του πρωτοπαθούς όγκου σε ER ή/και PR υποδοχείς ( $p=0.020$ ). Διερευνώντας στη συνέχεια τις συσχετίσεις των φαινοτυπικά διαφορετικών KKK που ανιχνεύτηκαν μετά τη χημειοθεραπεία, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν οστικές μεταστάσεις εμφάνισαν κυρίως ALDH1<sup>high</sup> KKK ( $p=0.032$ ) και ειδικότερα ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK ( $p=0.045$ ). Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς με πολλαπλές μεταστάσεις (3 και άνω όργανα) είχαν ανιχνεύσιμα TWIST<sup>nuc</sup> KKK, ενώ στους περισσότερους ταυτοποιήθηκαν επίσης ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK ( $p=0.008$ ).

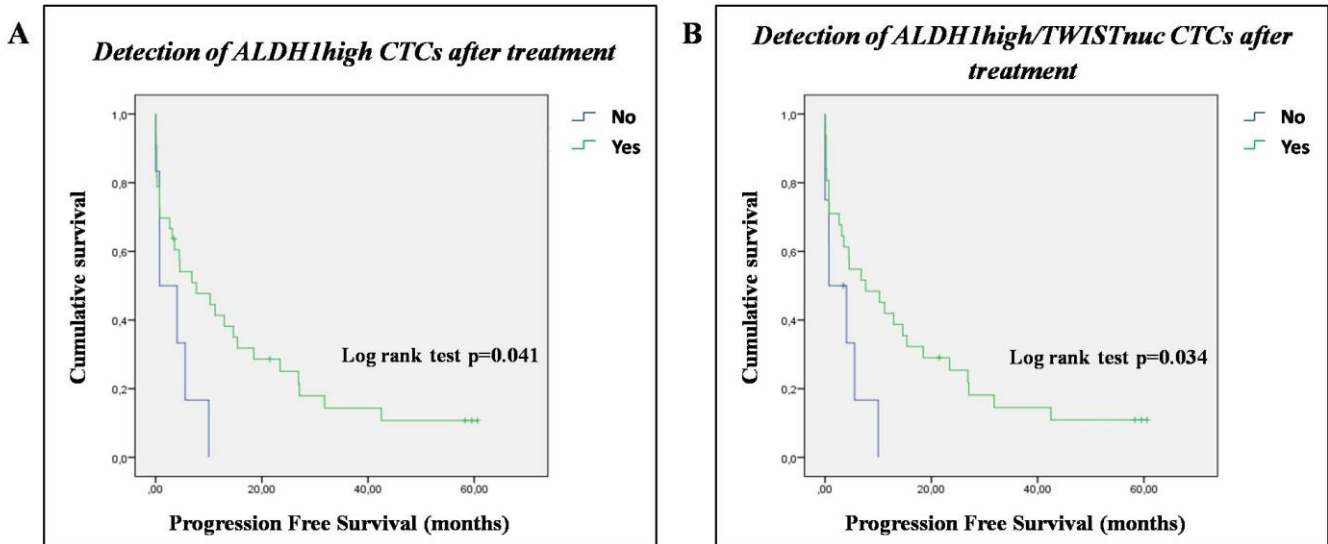
Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η συσχέτιση των φαινοτυπικά διαφορετικών KKK που ανιχνεύτηκαν πριν τη χημειοθεραπεία με την ανταπόκριση των ασθενών, όπου δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση κατά την πρώτη εκτίμηση. Ωστόσο, κατά την εκτίμηση στο τέλος της χημειοθεραπείας, η μερική ή πλήρης ανταπόκριση συσχετίστηκε με την παρουσία ALDH1<sup>high</sup> KKK ( $p=0.025$ ) και ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK ( $p=0.010$ ) πριν τη θεραπεία, ενώ αντιθέτως η σταθερή νόσος ή η πρόοδος νόσου συσχετίστηκε με την ανίχνευση ALDH1<sup>low/neg</sup> KKK ( $p=0.004$ ), TWIST<sup>cyt/neg</sup> KKK ( $p=0.007$ ) και ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> KKK ( $p=0.033$ ). Όσον αφορά το φαινότυπο των KKK που ανιχνεύτηκαν μετά τη χημειοθεραπεία, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με την ανταπόκριση στο τέλος της χημειοθεραπείας. Παρόλα αυτά, στους ασθενείς που εμφάνισαν σταθερή νόσο ή πρόοδο νόσου, η χημειοθεραπεία οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των ALDH1<sup>high</sup> KKK (73% έναντι 42%,  $p=0.034$ ), TWIST<sup>nuc</sup> KKK (66% έναντι 41%,  $p=0.031$ ) και κυρίως των

ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK (60% έναντι 25%,  $p=0.006$ ) ανά ασθενή, σε αντίθεση με εκείνους που ανταποκρίθηκαν πλήρως ή μερικώς, στους οποίους πρακτικά δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στη συχνότητα των παραπάνω φαινότυπων (Γράφημα 10).

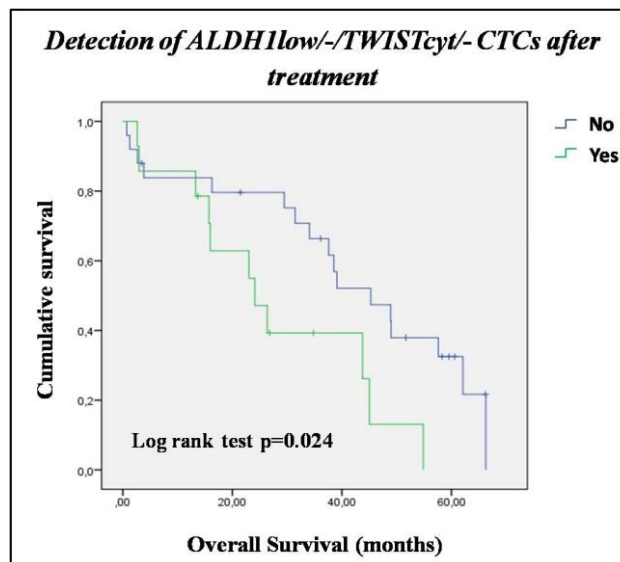
Τέλος, διερευνήθηκε η προγνωστική αξία των φαινοτυπικά διαφορετικών KKK πριν και μετά τη χημειοθεραπεία ως προς την επιβίωση. Όσον αφορά το φαινότυπο των KKK που ανιχνεύθηκαν πριν τη χημειοθεραπεία, δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση με το διάστημα έως την υποτροπή ή τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Παρόλα αυτά, όπως προέκυψε από τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, η παρουσία των ALDH1<sup>high</sup> KKK ή ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK μετά τη χημειοθεραπεία, συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση έως την υποτροπή ( $p=0.041$  και  $p=0.034$ , αντιστοίχως) (Εικόνα 9). Η μονοπαραγοντική ανάλυση Cox-regression έδειξε οριακή τάση για συσχέτιση της παρουσίας των ALDH1<sup>high</sup> KKK (HR: 0.404, 95%CI: 0.158-1.034,  $p=0.059$ ) και ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK (HR: 0.394, 95%CI: 0.160-0.972,  $p=0.043$ ) με μειωμένο κίνδυνο υποτροπής. Αντιθέτως, η παρουσία πρωτοπαθούς όγκου με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (HR: 6.269, 95%CI: 1.669-23.547,  $p=0.007$ ) και μεταστατικής νόσου στο ήπαρ (HR: 2.758, 95%CI: 1.274-5.971,  $p=0.010$ ) ήταν δείκτες αυξημένου κινδύνου υποτροπής. Η παρουσία τριπλά αρνητικού πρωτοπαθούς όγκου (HR: 5.945, 95% CI: 1.527-23.144,  $p=0.010$ ) και ηπατικών μεταστάσεων (HR: 2.756, 95%CI: 1.268-5.993,  $p=0.011$ ) ήταν οι μόνοι παράγοντες που συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με τον κίνδυνο υποτροπής κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση Cox-regression. Επιπλέον, η καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier έδειξε ότι η ανίχνευση των ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> KKK μετά τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση ( $p=0.024$ ) (Εικόνα 10). Η μονοπαραγοντική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι τόσο η παρουσία των ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> KKK (HR: 2.498, 95%CI: 1.100-5.674,  $p=0.029$ ), όσο και το ποσοστό τους επί του συνόλου των KKK (HR: 1.015, 95%CI: 1.002-1.028,  $p=0.026$ ), ήταν σημαντικοί δείκτες αυξημένου κινδύνου θανάτου. Η παρουσία τριπλά αρνητικού πρωτοπαθούς όγκου επίσης συσχετίστηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση (HR: 7.330, 95%CI: 1.950-27.552,  $p=0.003$ ), η οποία βρέθηκε να αποτελεί και το μόνο ανεξάρτητο αυξημένου κινδύνου θανάτου κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση (HR: 5.399, 95%CI: 1.408-20.694,  $p=0.014$ ).



Γράφημα 10. Επίδραση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής στη συχνότητα ανίχνευσης των ALDH1<sup>high</sup>, TWIST<sup>nuclear</sup> και ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuclear</sup> ΚΚΚ στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού με διαφορετική εκτίμηση της νόσου στο τέλος της θεραπείας. Μέσο ποσοστό των ΚΚΚ ανά ασθενή πριν (baseline) και μετά (end) τη χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με πλήρη ή μερική ανταπόκριση (CR/PR) και σε εκείνους με σταθερή νόσο ή πρόοδο νόσου (SD/PD), *Wilcoxon Signed Ranks test*. **A)** ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ, **B)** TWIST<sup>nuclear</sup> ΚΚΚ, **Γ)** ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuclear</sup> ΚΚΚ.



**Εικόνα 9.** Καμπύλη Kaplan-Meier για το διάστημα έως την υποτροπή των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε σχέση με το φαινότυπο των ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν μετά την ολοκλήρωση της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. **A)** Κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει παρουσίας ή απουσίας ΚΚΚ με φαινότυπο ALDH1<sup>high</sup>, **B)** Κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει παρουσίας ή απουσίας ΚΚΚ φαινότυπου ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>. Η επιβίωση παρουσιάζεται σε μήνες.



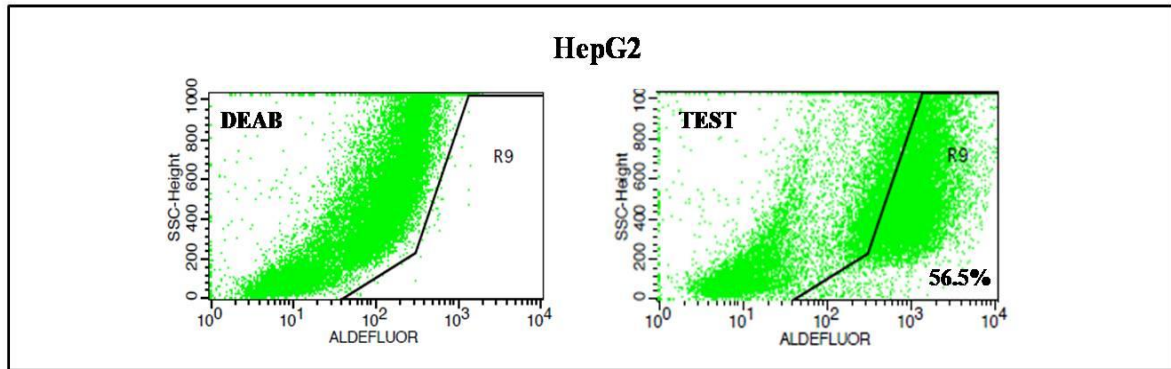
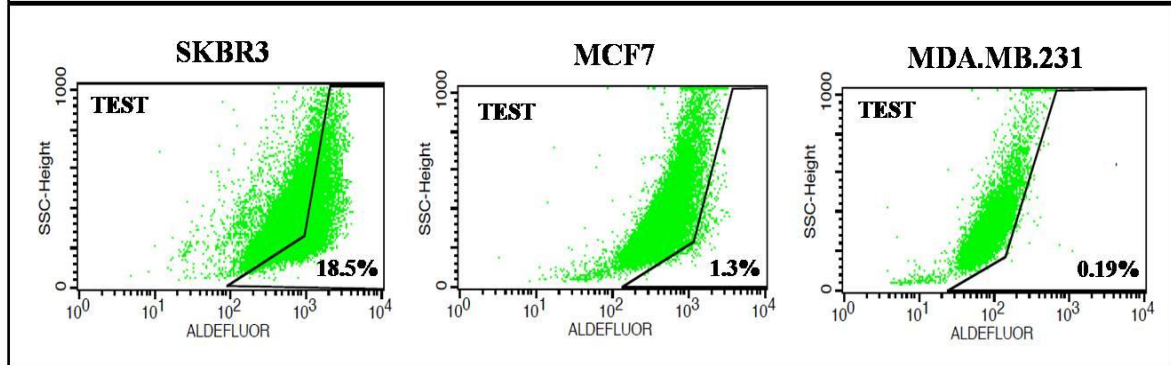
**Εικόνα 10.** Καμπύλη Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε σχέση με το φαινότυπο των ΚΚΚ μετά την ολοκλήρωση της πρώτης γραμμής χημειοθεραπείας. Κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει παρουσίας ή απουσίας ΚΚΚ με φαινότυπο ALDH1<sup>low/-</sup>/TWIST<sup>cyt/-</sup>. Η επιβίωση παρουσιάζεται σε μήνες.

Επομένως, οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στο τέλος της χημειοθεραπείας, ήταν εκείνοι στους οποίους η θεραπεία οδήγησε σε σημαντικό εμπλουτισμό των ΚΚΚ με φαινότυπους ΚΒΚ (ALDH1<sup>high</sup>) και ενδιάμεσης EMM (TWIST<sup>nuc</sup>) και κυρίως του υποπληθυσμού των ΚΚΚ που έφεραν παράλληλα τους δύο φαινότυπους (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>). Παρόλα αυτά, η παρουσία των ΚΚΚ με φαινότυπο ΚΒΚ ή συνέκφραση των φαινότυπων ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM πριν τη χημειοθεραπεία ήταν δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία, ενώ η ανίχνευσή τους μετά τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση έως την υποτροπή. Αντιθέτως, η παρουσία ΚΚΚ μη-βλαστικού και παράλληλα επιθηλιακού φαινότυπου (ALDH1<sup>low/-</sup>/TWIST<sup>cyt/-</sup>) μετά τη χημειοθεραπεία ήταν σημαντικός δείκτης μειωμένης συνολικής επιβίωσης.

#### **4.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ALDH ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ALDH1**

##### **4.4.1. Έλεγχος ενζυμικής ενεργότητας της ALDH σε καρκινικές σειρές μαστού**

Η ενεργότητα του ενζύμου της ALDH ελέγχθηκε μέσω της λειτουργικής δοκιμής ALDEFLUOR και τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, αρχικά στη σειρά ελέγχου HepG2 και ακολούθως στις τρεις αντιπροσωπευτικές καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Στην εικόνα 11 απεικονίζεται ενδεικτικά η ποσοστιαία ενεργότητα της ALDH ανά σειρά. Όπως διαπιστώθηκε έπειτα από μια σειρά πειραμάτων σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες των παραπάνω σειρών, το ποσοστό των κυττάρων με ενεργότητα ALDH διέφερε σημαντικά μεταξύ των ανακαλλιεργιών. Ειδικότερα, η μέση ποσοστιαία ενεργότητα στα κύτταρα HepG2 ήταν 65,42% ± 23,6%, με σταδιακή αύξηση του ποσοστού ανά διαδοχική ανακαλλιέργεια, από 15,35% σε 93,02% (Πίνακας 4). Μειωμένο και σημαντικά διαφοροποιημένο ήταν το ποσοστό της ενεργότητας ALDH στις τρεις σειρές μαστού, εντούτοις, συγκρίνοντας την ενεργότητα ανά αριθμό ανακαλλιέργειας, καθώς και τη μέση ενεργότητα ανά σειρά, το μεγαλύτερο ποσοστό ανιχνεύθηκε στα κύτταρα SKBR3 (12,78% ± 11,16%), έπειτα στα MCF7 (1,46% ± 0,84%) και τέλος στα MDA.MB.231 (0,85% ± 0,93%) (Πίνακας 4).

**A****B**

**Εικόνα 11.** Διερεύνηση της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH στη σειρά ελέγχου HepG2 και στις σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Προσδιορισμός του ποσοστού κυττάρων με υψηλή ενεργότητα ανά σειρά, μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR και της κυτταρομετρίας ροής. **A)** Έλεγχος της ενεργότητας ALDH στα κύτταρα HepG2 (TEST) και παράλληλα καταστολή της ενζυμικής αντίδρασης μέσω προσθήκης ειδικού αναστολέα (DEAB) ως αρνητικού μάρτυρα, **B)** Ανίχνευση της υψηλής ενεργότητας ALDH στις σειρές μαστού. Για κάθε σειρά χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι αρνητικοί μάρτυρες για την οριοθέτηση του υποπληθυσμού των κυττάρων με υψηλή ενεργότητα (δεν απεικονίζονται).

Ενεργότητα ALDH ανά σειρά	Υψηλή ενεργότητα ALDH (%)					
	Αριθμός ανακαλλιέργειας					
	<i>p6</i>	<i>p7</i>	<i>p8</i>	<i>p9</i>	<i>p10</i>	Mean ± SEM
<b>HepG2</b>	15.35	56.47	72.64	89.60	93.02	<b>65.42 ± 23.6</b>
<b>SKBR-3</b>	3.35	4.61	9.66	18.5	40.57	<b>12.78 ± 11.16</b>
<b>MCF-7</b>	0.30	1.33	0.85	3.55	1.28	<b>1.46 ± 0.84</b>
<b>MDA.MB.231</b>	0.04	0.00	1.76	2.25	0.19	<b>0.85 ± 0.93</b>

**Πίνακας 4.** Διερεύνηση της υψηλής ενζυμικής ενεργότητας της ALDH στη σειρά ελέγχου HepG2 και στις σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Ποσοστό κυττάρων με υψηλή ενεργότητα ανά διαδοχική ανακαλλιέργεια ανά σειρά. Η ανίχνευση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR με κυτταρομετρία ροής. *p*=*passage*: αριθμός ανακαλλιέργειας, *Mean*: μέση τιμή, *SEM*=*Standard error of mean*: τυπική απόκλιση μέσης τιμής

Επομένως ο υποπληθυσμός των κυττάρων με υψηλή ενεργότητα της ALDH ανιχνεύτηκε αποτελεσματικά σε όλες τις καρκινικές σειρές μαστού με διαφορετικό μοριακό υπότυπο, ωστόσο αντιπροσώπευε ένα διαφορετικό ποσοστό κυττάρων στην κάθε σειρά.

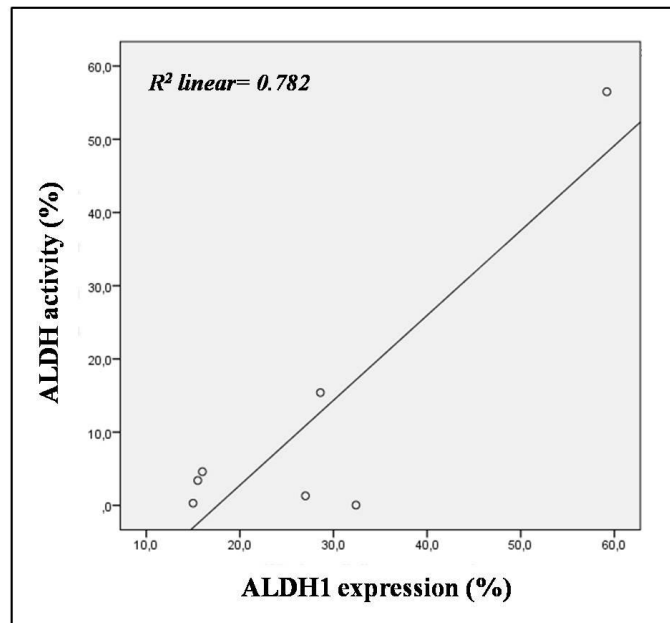
#### **4.4.2. Σύγκριση των επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας ALDH και πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 στις σειρές μαστού**

Η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της ενεργότητας του ενζύμου ALDH και της έκφρασης της ALDH1 σε επίπεδο πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα της HepG2 σειράς ελέγχου και των τριών σειρών μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή ALDEFLUOR σε κύτταρα από δύο διαδοχικές ανακαλλιέργειες και στα ίδια κύτταρα πραγματοποιήθηκε παράλληλα ανοσοφθορισμός και ποσοτικοποίηση της έκφρασης ALDH1 μέσω του συστήματος ARIOL, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Ειδικότερα, η ένταση φθορισμού καταμετρήθηκε σε 1.000 κύτταρα ανά σειρά, έπειτα από τυχαία παρατήρηση 20 διαφορετικών οπτικών πεδίων.

Σε όλες τις σειρές ταυτοποιήθηκαν τόσο κύτταρα με υψηλή ενεργότητα ALDH, όσο και κύτταρα με υψηλή έκφραση ALDH1. Παρόλα αυτά, μόνο στα κύτταρα ελέγχου HepG2 παρατηρήθηκε ομοιότητα στο ποσοστό κυττάρων που αντιπροσώπευαν οι δύο αυτοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί (Πίνακας 5). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση στις καρκινικές σειρές μαστού, στο σύνολο των οποίων η έκφραση ήταν αρκετά αυξημένη σε σχέση με την ενεργότητα ( $p=0.432$ ). Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των δύο μεταβλητών ( $R^2=0.782$ ).

Κυτταρική σειρά	HepG2		SKBR-3		MCF7		MDA.MB.231
<i>Αρ. Ανακαλλιέργειας</i>	<i>p6</i>	<i>p7</i>	<i>p6</i>	<i>p7</i>	<i>p6</i>	<i>p7</i>	<i>p6</i>
Υψηλή ενεργότητα ALDH	15.4	56.5	3.4	4.6	0.3	1.3	0.04
Υψηλή έκφραση ALDH1	28.6	59.2	15.5	16	15	27	32.4

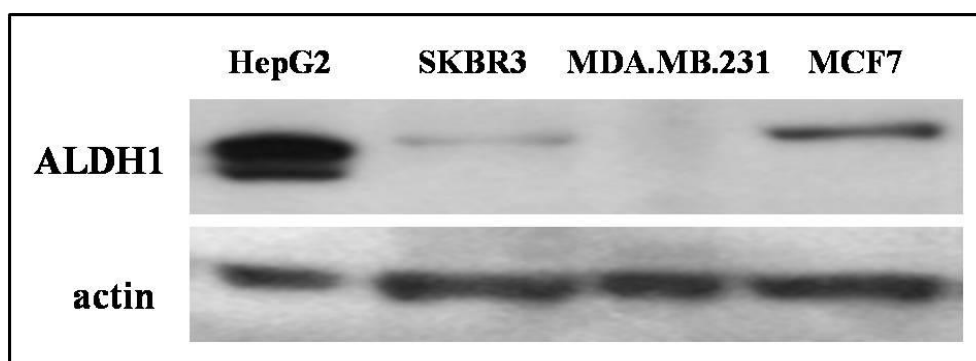
**Πίνακας 5.** Σύγκριση μεταξύ υψηλής ενζυμικής ενεργότητας ALDH και υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 στη σειρά ελέγχου HepG2 και στις σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Ποσοστό κυττάρων με υψηλή ενεργότητα και υψηλή έκφραση ανά διαδοχική ανακαλλιέργεια ανά σειρά. Η ανίχνευση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR με κυτταρομετρία ροής, ενώ η υψηλή έκφραση ταυτοποιήθηκε έπειτα από ανοσοφθορισμό και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω του συστήματος ARIOL. *p=passage: αριθμός ανακαλλιέργειας*



**Εικόνα 12.** Σύγκριση μεταξύ ενζυμικής ενεργότητας ALDH και πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 στις σειρές HepG2, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231. Ποσοστό κυττάρων με υψηλή ενεργότητα ALDH έναντι ποσοστού κυττάρων με υψηλή έκφραση ALDH1 ανά σειρά, *Linear regression*. Η ανίχνευση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR με κυτταρομετρία ροής, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίστηκε έπειτα από ανοσοφθορισμό και ποσοτικοποίηση με το σύστημα ARIOL.



Στη συνέχεια, διερευνήθηκε περαιτέρω η συσχέτιση μεταξύ ενεργότητας ALDH και έκφρασης ALDH1 στις παραπάνω σειρές, πραγματοποιώντας τη δοκιμή ALDEFLUOR και παράλληλα τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης, με ένα διαφορετικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ALDH1, κατάλληλο για τη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα, προηγήθηκε συγχρονισμός της καλλιέργειας όλων των κυττάρων (αριθμός ανακαλλιέργειας: 7). Η υψηλή ενεργότητα της ALDH ταυτοποιήθηκε κυρίως στα κύτταρα ελέγχου HepG2, σε ένα ποσοστό 59,4% των κυττάρων, ενώ στις σειρές μαστού η ενεργότητα ήταν πολύ μειωμένη και συγκεκριμένα ανιχνεύτηκε στο 1,58%, 1,31% και 0,78% των SKBR3, MDA.MB.231 και MCF7 κυττάρων, αντιστοίχως. Παρατηρώντας αντίστοιχα την έκφραση της ALDH1 και έπειτα από ποσοτικοποίηση της έντασης μέσω κατάλληλου λογισμικού (Volume analysis Report), βρέθηκε ότι ισχυρή έκφραση ανιχνεύτηκε μόνο στα HepG2 (44,9), ενώ στις σειρές μαστού ανιχνεύτηκε μία μέτριας έντασης ζώνη στα MCF7 (17,9), μία αχνή στα SKBR3 (7,5) και σχεδόν καθόλου στα MDA.MB.231 (6,5) (Εικόνα 13). Η παρατηρούμενη έλλειψη συσχέτισης μεταξύ έκφρασης και ενεργότητας επιβεβαιώθηκε και στατιστικά ( $p=0.600$ ).



**Εικόνα 13.** Ανίχνευση της έκφρασης ALDH1 στη σειρά ελέγχου HepG2 και στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, μέσω ανοσοαποτύπωσης. Δείγμα ολικών πρωτεϊνών από την κάθε σειρά (50mg) αποτυπώθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στην οποία ακολούθησε επώαση με αντισώματα έναντι των μορίων ALDH1 (55 kDa) και της β-ακτίνης (42 kDa) ως μάρτυρας συγκέντρωσης πρωτεΐνης και ανίχνευσή τους μέσω των ενζύμων HRP.

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, στη σειρά ελέγχου HepG2 διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH και της πρωτεϊνικής έκφρασης της ALDH1, τόσο μέσω ποσοτικοποίησης των επιπέδων της έκφρασής της μέσω του συστήματος ARIOL, όσο και μέσω ανοσοαποτύπωσης. Παρόλα αυτά, η ενεργότητα ALDH δεν συσχετίστηκε με την έκφραση ALDH1 σε καμία από τις σειρές μαστού που μελετήθηκαν, στο σύνολο των οποίων η έκφραση ήταν αυξημένη συγκριτικά με την ποσοστιαία ενεργότητα.

#### **4.5. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ALDH ΣΤΑ ΚΚΚ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ALDH1**

##### **4.5.1. Ασθενείς**

Στη μελέτη εντάχθηκαν ενδεικτικά εννέα ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, οι οποίοι είχαν πολλές μεταστάσεις και είχαν λάβει πολλαπλές γραμμές θεραπείας, προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα της παρουσίας υψηλού φορτίου ΚΚΚ στο δείγμα τους.

##### **4.5.2. Ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης της ενζυμικής ενεργότητας της ALDH στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού**

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας και ειδικότητας των αντισωμάτων EpCAM και CD45 σε κύτταρα των σειρών HepG2, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, καθώς και σε απομονωμένα PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών (Πίνακας 6). Όπως διαπιστώθηκε, έκφραση EpCAM ανιχνεύτηκε στο σύνολο σχεδόν των κυττάρων σε όλες τις καρκινικές σειρές (μέσο ποσοστό θετικών κυττάρων: 96,87% έως 99,02%), με εξαίρεση τη μεσεγγυματική σειρά MDA.MB.231, στην οποία όπως ήταν αναμενόμενο ανιχνεύτηκε στα μισά περίπου κύτταρα (49,21%). Στους υγιείς αιμοδότες, αντιθέτως, μη-ειδική έκφραση EpCAM παρατηρήθηκε σε ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων (0,05%), ωστόσο το σύνολο των κυττάρων τους ήταν

θετικό στην έκφραση CD45 (97,57%). Μη-ειδική έκφραση CD45 ανιχνεύτηκε επίσης σε ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων σε όλες τις καρκινικές σειρές (0,12% έως 0,56%). Επιπλέον, διερευνήθηκε η υψηλή ενεργότητα της ALDH στα PBMCs των φυσιολογικών αιμοδοτών, όπου και ανιχνεύθηκε σε ένα μέσο ποσοστό 0,04% των κυττάρων, με διακύμανση από 0% έως 0,08%.

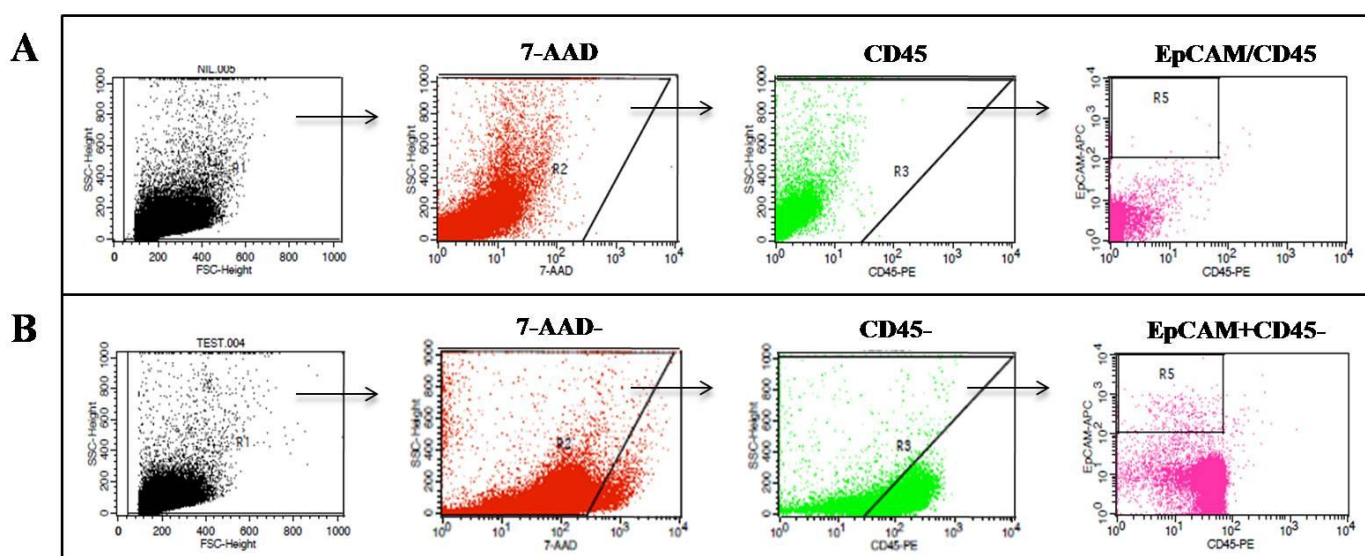
<i>Έκφραση σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα</i>	<b>Έκφραση (Mean % ± SEM)</b>	
	<b>ErCAM</b>	<b>CD45</b>
<b>HepG2</b>	<b>96.87 ± 1.83</b>	<b>0.17 ± 0.13</b>
<b>SKBR-3</b>	<b>99.02 ± 0.34</b>	<b>0.44 ± 0.43</b>
<b>MCF-7</b>	<b>98.65 ± 0.75</b>	<b>0.56 ± 0.52</b>
<b>MDA.MB.231</b>	<b>49.21 ± 17.34</b>	<b>0.12 ± 0.16</b>
<b>PBMCs</b>	<b>0.05 ± 0.02</b>	<b>97.57 ± 1.03</b>

**Πίνακας 6.** Έλεγχος της έκφρασης ErCAM και CD45 στις σειρές HepG2, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231 και σε απομονωμένα PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών. Ποσοστό κυττάρων με έκφραση ErCAM και CD45. Πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι ErCAM συνδεδεμένου με APC (allophycocyanin) και CD45 συνδεδεμένου με PE (phycoerythrin) και ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. *Mean: μέση τιμή, SEM=Standard error of mean: τυπική απόκλιση μέσης τιμής*

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με στόχο την ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος και τον προσδιορισμό της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις καρκινικών κυττάρων από τις σειρές HepG2, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, σε απομονωμένα PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών. Ειδικότερα, για κάθε σειρά πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των 10, 100, 1.000 και 10.000 καρκινικών κυττάρων ανά 10<sup>6</sup> PBMCs. Η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει

της έκφρασης EpCAM, σε συνδυασμό με την απουσία έκφρασης CD45, ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχθηκε μέσω της απουσίας έκφρασης 7-AAD.

Λόγω του περιορισμού της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής κατά την ανίχνευση σπάνιων κυτταρικών υποπληθυσμών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ακολουθήθηκαν και αξιολογήθηκαν διαφορετικές στρατηγικές οριοθέτησης. Η βέλτιστη ευαισθησία και ειδικότητα παρατηρήθηκε έπειτα από την οριοθέτηση αρχικά των ζωντανών κυττάρων (7-ADD-αρνητικών), έπειτα των CD45-αρνητικών και οριοθέτηση ξανά των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων (Εικόνα 14). Ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε όλες τις σειρές και σε όλες τις διαφορετικές αραιώσεις, αποδεικνύοντας την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, η μέση απόδοση στο σύνολο των σειρών στις μικρές αραιώσεις των 10.000 και 1.000 κυττάρων ανά  $10^6$  PBMCs ήταν 47% και 90%, αντιστοίχως (Πίνακας 7). Αντιθέτως, η ειδικότητα της μεθόδου ήταν χαμηλή στις μεγαλύτερες αραιώσεις των 100 και κυρίως των 10 κυττάρων ανά  $10^6$  PBMCs, όπου παρατηρήθηκε υπερεκτίμηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων (απόδοση > 150%). Παρόλα αυτά, σε καμία σειρά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του αναμενόμενου και του παρατηρούμενου αριθμού κυττάρων ( $p > 0.05$ ).



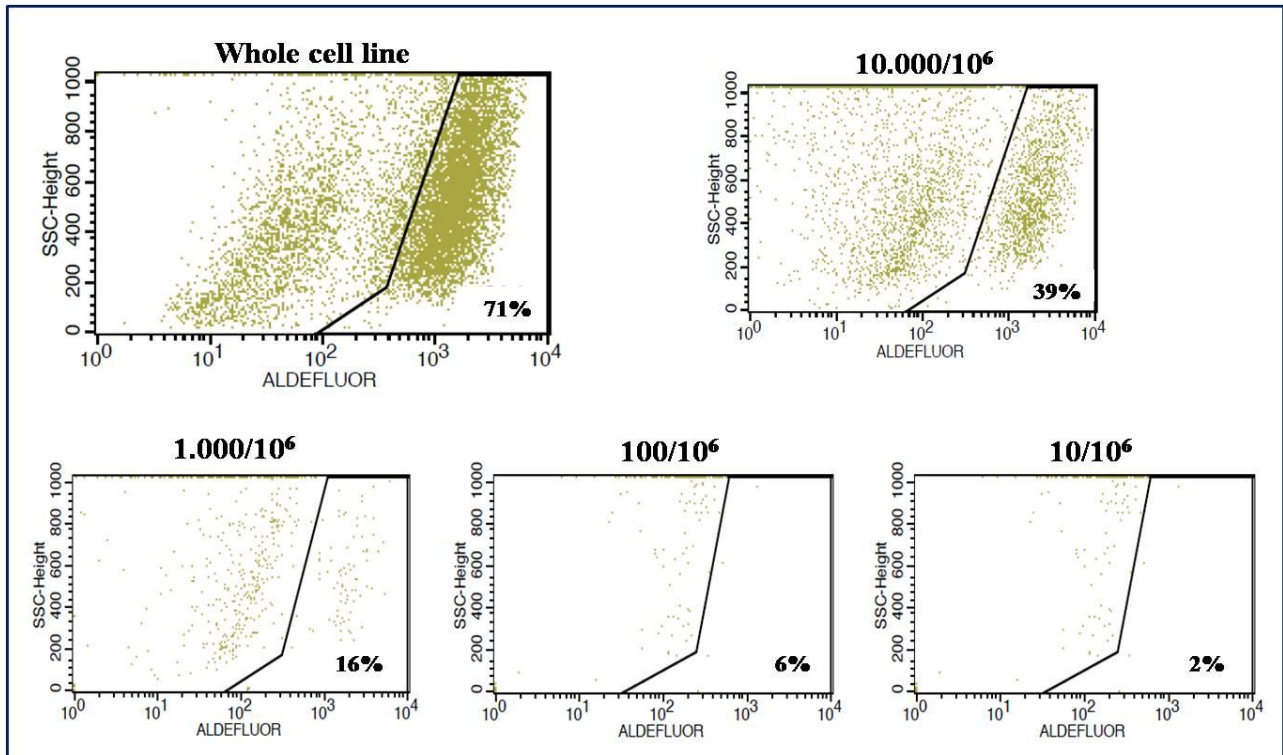
**Εικόνα 14.** Στρατηγική οριοθέτησης για την ταυτοποίηση του υποπληθυσμού των καρκινικών κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος μέσω κυτταρομετρίας ροής. **A)** Αρνητικός μάρτυρας, δείγμα κυττάρων όπου δεν πραγματοποιήθηκε επώαση με κάποιο αντίσωμα. **B)** Η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει της έκφρασης EpCAM και της απουσίας έκφρασης CD45, έπειτα από οριοθέτηση των ζωντανών κυττάρων (7-ADD-αρνητικών), έπειτα των CD45-αρνητικών και τέλος των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων.

Απόδοση ανά αραιώση καρκινικών κυττάρων ανά 10 <sup>6</sup> PBMCs	Απόδοση (Mean % ± SEM)				
	HepG2	SKBR3	MCF7	MDA.MB.231	Όλες οι σειρές
10.000/10 <sup>6</sup>	68 ± 20	71 ± 19	19 ± 3	29 ± 4	47 ± 9
1.000/10 <sup>6</sup>	90 ± 9	49 ± 9	137 ± 78	106 ± 52	90 ± 16
100/10 <sup>6</sup>	227 ± 34	158 ± 48	362 ± 286	459 ± 229	275 ± 63
10/10 <sup>6</sup>	1.195 ± 376	820 ± 320	867 ± 333	3.000 ± 1.200	1.427 ± 465

Πίνακας 7. Έλεγχος της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων από τις σειρές HepG2, SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, αναμεμιγμένων σε διαφορετικές αραιώσεις με απομονωμένα PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών. Ποσοστό απόδοσης ανά αραιώση ανά καρκινική σειρά. Η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει έκφρασης EpCAM και απουσίας έκφρασης CD45, έπειτα από ανοσοφθορισμό με αντισώματα έναντι EpCAM συνδεδεμένου με APC (allophycocyanin) και CD45 συνδεδεμένου με PE (phycoerythrin) και ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. *Mean*: μέση τιμή, *SEM*=Standard error of mean: τυπική απόκλιση μέσης τιμής

Επιπλέον, η υψηλή ενεργότητα της ALDH ανιχνεύθηκε με μεγάλη ευαισθησία στο σύνολο των διαδοχικών αραιώσεων των HepG2 κυττάρων. Παρόλα αυτά, αυξάνοντας την αραιώση των καρκινικών κυττάρων, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση του ποσοστού των κυττάρων με ενεργότητα ALDH. Ειδικότερα, το ποσοστό ενεργότητας μειώθηκε από 71% στα μη-αναμεμιγμένα HepG2 κύτταρα, σε 39%, 16%, 6% και 2% στις αραιώσεις των 10.000, 1.000, 100 και 10 καρκινικών κυττάρων ανά 10<sup>6</sup> PBMCs, αντιστοίχως, με αντίστοιχη απόδοση 54,9%, 22,5%, 0,08% και 0,03% (Εικόνα 15).

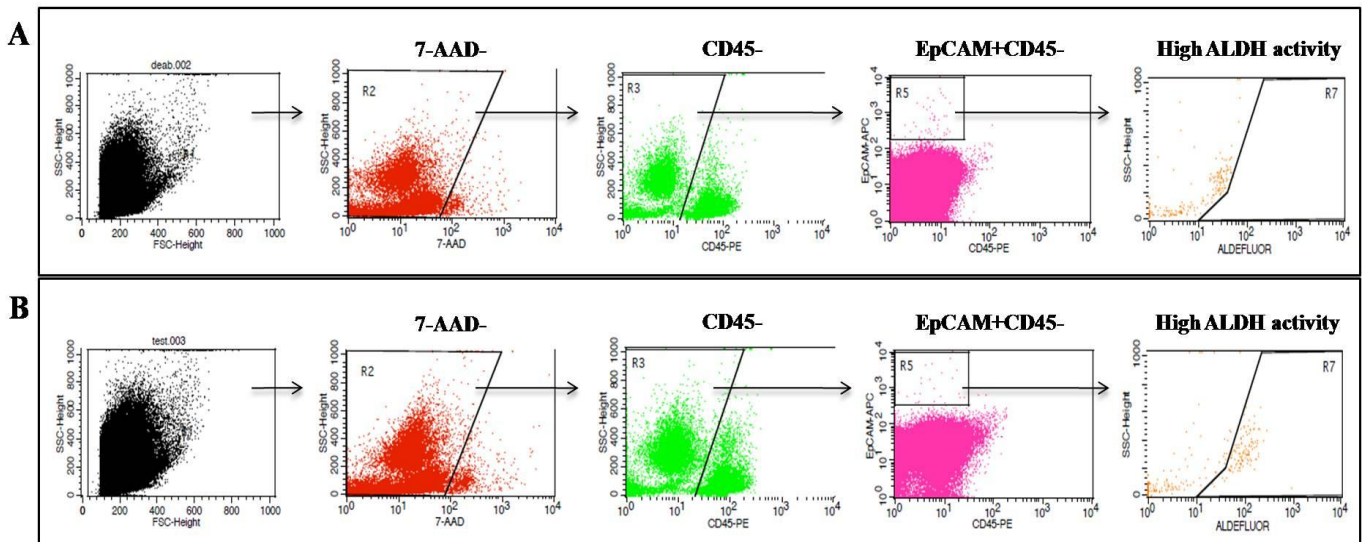
Επομένως όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση της ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, αποδείχθηκε κατάλληλη για εφαρμογή σε ασθενείς με αυξημένο φορτίο ΚΚΚ.



**Εικόνα 15.** Έλεγχος της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου ανίχνευσης της υψηλής ενζυμικής ενεργότητας της ALDH στα καρκινικά κύτταρα ελέγχου HepG2, έπειτα από διαδοχική αραιώσή τους σε απομονωμένα PBMCs φυσιολογικών αιμοδοτών. Ποσοστό ενεργότητας ανά αραιώση. Η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει έκφρασης EpCAM και απουσίας έκφρασης CD45, ενώ η ενεργότητα ελέγχθηκε μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR με κυτταρομετρία ροής.

#### 4.5.3. Συγκριτική μελέτη της συχνότητας των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH και υψηλή έκφραση ALDH1 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε δείγμα αίματος εννέα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH. Στην εικόνα 16 απεικονίζεται ενδεικτικά σε ένα ασθενή η υψηλή ενεργότητα ALDH στα ΚΚΚ. Στους ίδιους ασθενείς διερευνήθηκε παράλληλα η παρουσία ΚΚΚ με υψηλή έκφραση ALDH1, μέσω ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι των EpCAM, ALDH1 και CD45 και ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης της ALDH1 μέσω του συστήματος ARIOL, όπως περιγράφηκε νωρίτερα.



**Εικόνα 16.** Ανίχνευση της υψηλής ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ ενός ασθενή με μεταστατικό καρκίνο μαστού, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Έπειτα από την οριοθέτηση των ζωντανών κυττάρων βάσει απουσίας έκφρασης του 7-AAD, τα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύτηκαν βάσει της έκφρασης EpCAM και της απουσίας έκφρασης CD45. **A)** Αρνητικός μάρτυρας για την οριοθέτηση του υποπληθυσμού με ενεργότητα ALDH, δείγμα στο οποίο έχει προηγηθεί προσθήκη του αναστολέα της ενζυμικής αντίδρασης DEAB. **B)** Προσδιορισμός της υψηλής ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ του ασθενή.

Μέσω κυτταρομετρίας ροής, ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν σε 8 από τους 9 ασθενείς (88,9%), με ένα συνολικό αριθμό 1.022 ΚΚΚ και μέσο αριθμό 114 ΚΚΚ ανά ασθενή (εύρος: 0 έως 444). Μειωμένη ήταν η συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω του συστήματος ARIOL, όπου ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν σε 7 από τους 9 ασθενείς (77,8%), με ένα συνολικό αριθμό 144 ΚΚΚ και μέσο αριθμό 16 ΚΚΚ ανά ασθενή (εύρος: 0-123), παρόλα αυτά η ανίχνευση ΚΚΚ με τις δύο μεθόδους βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά ( $p=0.037$ ) (Πίνακας 8).

Επιπλέον, ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH ταυτοποιήθηκαν σε 7 από τους 9 ασθενείς (77,8%) μέσω κυτταρομετρίας ροής, με συνολικό αριθμό 91 ΚΚΚ και μέσο αριθμό 10 ΚΚΚ ανά ασθενή (εύρος: 0 έως 37). Αντίστοιχα, ΚΚΚ με υψηλή έκφραση ALDH1 (ALDH1<sup>high</sup>) ταυτοποιήθηκαν σε 5 από τους 9 ασθενείς (55,6%) μέσω ARIOL, με συνολικό αριθμό 127 ΚΚΚ και μέσο αριθμό 14 ΚΚΚ (εύρος: 0-120). Η συσχέτιση μεταξύ των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH και υψηλή έκφραση ALDH1 ήταν επίσης σημαντική ( $p=0.014$ ) (Πίνακας 8).

Παρόλα αυτά, τα ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH αντιπροσώπευαν μικρότερο ποσοστό κυττάρων από ότι εκείνα με υψηλή έκφραση ALDH1 (8,9% έναντι 88,2% επί του συνόλου των ΚΚΚ, αντιστοίχως). Επίσης, το μέσο ποσοστό των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH ανά ασθενή ήταν 11,5% (εύρος: 0 έως 48,1%), έναντι του 49,7% (εύρος: 0 έως 100%) των ΚΚΚ με υψηλή έκφραση ALDH1 (Πίνακας 8).

Ανίχνευση ΚΚΚ ανά ασθενή (1*10 <sup>6</sup> PBMCs)	EpCAM+CD45- ΚΚΚ (N)		ALDH high EpCAM+CD45- ΚΚΚ (N)		ALDH high EpCAM+CD45- ΚΚΚ (%)	
	FACS	ARIOL	FACS	ARIOL	FACS	ARIOL
1	77	4	37	2	48,1	50
2	136	123	11	120	8,1	97,6
3	444	4	10	2	2,3	50
4	91	2	16	2	17,6	100
5	102	2	6	1	5,9	50
6	114	5	10	0	8,8	0
7	0	0	0	0	-	-
8	1	0	0	0	0	-
9	57	4	1	0	1,8	0
<b>Συνολικός αριθμός</b>	<b>1.022</b>	<b>144</b>	<b>91</b>	<b>127</b>		
<b>Mean ± SEM</b>	<b>114 ± 79</b>	<b>16 ± 24</b>	<b>10 ± 7</b>	<b>14 ± 24</b>	<b>11.5 ± 10,6</b>	<b>57,9 ± 27,2</b>
Συσχέτιση	<i>p</i> =0.037		<i>p</i> =0.014		<i>p</i> =0.354	

**Πίνακας 8. Σύγκριση μεταξύ υψηλής ενζυμικής ενεργότητας ALDH και υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1 στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού.** Αριθμός των συνολικών ΚΚΚ και αριθμός και ποσοστό των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH ή έκφραση ALDH1, ανά δείγμα ασθενή (1\*10<sup>6</sup> PBMCs), Spearman's rho analysis. Η ανίχνευση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR με FACS (κυτταρομετρία ροής), ενώ η υψηλή έκφραση ταυτοποιήθηκε έπειτα από ανοσοφθορισμό και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω του συστήματος ARIOL. Η ταυτοποίηση των ΚΚΚ και με τις δύο μεθόδους βασίστηκε στην ανίχνευση EpCAM και στην απουσία έκφρασης CD45. *Mean*: μέση τιμή, *SEM*=Standard error of mean: τοπική απόκλιση μέσης τιμής



Τέλος, προκειμένου να εκτιμηθεί η ενεργότητα ALDH στον υποπληθυσμό των ΚΚΚ που έχουν υποστεί πλήρη απώλεια της έκφρασης του EpCAM, η ενεργότητα ALDH διερευνήθηκε στα αρνητικά στην έκφραση CD45 κύτταρα, ανεξάρτητα από την έκφραση του EpCAM. Όπως διαπιστώθηκε, ο αριθμός των ενζυμικά ενεργών CD45-αρνητικών κυττάρων ήταν αρκετά αυξημένος σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων (Πίνακας 9).

<i>Κύτταρα ανά ασθενή (1*10<sup>6</sup> PBMCs)</i>	<b>ALDH high CD45- κύτταρα (N)</b>	<b>ALDH high EpCAM+CD45- ΚΚΚ (N)</b>
<b>1</b>	56	37
<b>2</b>	698	11
<b>3</b>	1.385	10
<b>4</b>	761	16
<b>5</b>	2.531	6
<b>6</b>	1.327	10
<b>7</b>	32	0
<b>8</b>	1.004	0
<b>9</b>	81	1
<b>Συνολικός αριθμός</b>	<b>7.875</b>	<b>91</b>
<b>Mean ± SEM</b>	<b>875 ± 271</b>	<b>10 ± 7</b>

**Πίνακας 9.** Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας ALDH σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Αριθμός κυττάρων με υψηλή ενεργότητα ALDH στο σύνολο των CD45-αρνητικών κυττάρων και στα EpCAM-θετικά/CD45-αρνητικά κύτταρα ανά δείγμα ασθενή (1\*10<sup>6</sup> PBMCs). Η ενεργότητα ALDH ανιχνεύτηκε στους παραπάνω πληθυσμούς με κυτταρομετρία ροής μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR και ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι των EpCAM και CD45. *Mean: μέση τιμή, SEM=Standard error of mean: τυπική απόκλιση μέσης τιμής*

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω ευρήματα στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν μέσω ARIOL και

κυτταρομετρίας ροής. Ο αριθμός των ΚΚΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH επίσης συσχετίστηκε σημαντικά με τον αριθμό των ΚΚΚ με υψηλή έκφραση ALDH1, αν και η ποσοστιαία έκφραση ήταν συχνότερη σε επίπεδο θετικών ΚΚΚ ανά ασθενή. Τέλος, μέσω της κυτταρομετρίας ροής ήταν δυνατή η περαιτέρω ταυτοποίηση του υποπληθυσμού των κυττάρων με απουσία έκφρασης CD45 και υψηλή ενεργότητα ALDH, η συχνότητα του οποίου βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη στους παραπάνω ασθενείς.

# **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η δημιουργία δευτεροπαθών μεταστάσεων αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας των ασθενών με καρκίνο [2;57] και επομένως η αντιμετώπισή της αποτελεί σημαντική πρόκληση στην κλινική πράξη. Εδώ και αρκετά χρόνια έχειδειχθεί ότι οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αναπτύσσονται από τους πληθυσμούς των καρκινικών κυττάρων που ανιχνεύονται στο μυελό των οστών και στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών, γνωστά ως ΔΚΚ και ΚΚΚ, αντιστοίχως [4;5]. Πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια από πολλές ερευνητικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένης της δικής μας, έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των κυτταρικών αυτών πληθυσμών αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη επιβίωση των ασθενών με καρκίνο μαστού [6-8;53;252;255]. Στην κλινική πράξη έχει επικρατήσει η μελέτη των ΚΚΚ, καθώς η συλλογή περιφερικού αίματος αποτελεί μία πιο απλή και λιγότερο επεμβατική μέθοδο, συγκριτικά με τη λήψη δείγματος μυελού. Πέραν της προγνωστικής σημασίας της ταυτοποίησης των ΚΚΚ ως προς την επιβίωση, σε πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι η παρουσία τους αποτελεί σημαντικό δείκτη έλλειψης ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [9;335], με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε εξέλιξη μεγάλες κλινικές μελέτες που διερευνούν το πιθανό όφελος από αλλαγή της θεραπείας στις περιπτώσεις που τα ΚΚΚ εμφανίζουν αντοχή στη χορηγούμενη θεραπεία [339]. Παρόλα αυτά, το προφίλ και η συμπεριφορά των ΚΚΚ παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια, καθώς έχει βρεθεί ότι συχνά φέρουν χαρακτηριστικά διαφορετικά από εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου και της μετάστασης [260], ετερογένεια η οποία συχνά έχει αναφερθεί και μεταξύ των ΚΚΚ που ανιχνεύονται στον ίδιο ασθενή [10]. Επομένως, ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών θα μπορούσε να αναδείξει εκείνα που φέρουν χαρακτηριστικά επιθετικότητας και αντίστασης στη θεραπεία, συμβάλλοντας στην ακριβέστερη εκτίμηση της νόσου [12]. Μία επίσης σημαντική εφαρμογή της μελέτης των ΚΚΚ είναι ο χαρακτηρισμός τους ως προς την έκφραση μορίων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους θεραπείας. Στα πλαίσια αυτά, έχει πράγματιδειχθεί ότι είναι δυνατή η στόχευση των ΚΚΚ με θεραπείες έναντι μορίων που φέρουν τα ίδια τα ΚΚΚ, ανεξάρτητα από το μοριακό προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου [14;257]. Η αποτελεσματική στόχευση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική αντιμετώπισης της ανάπτυξης μεταστάσεων, η οποία θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικό όφελος στην επιβίωση των ασθενών με καρκίνο μαστού. Επομένως, τα ΚΚΚ θεωρούνται ως μια «υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου», η οποία είναι δυνατόν

να προσδιορίσει τον αριθμό και το προφίλ των ΚΚΚ οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή της μετέπειτα παρακολούθησης των ασθενών, συμβάλλοντας σε αποτελεσματικότερες στρατηγικές αντιμετώπισης της νόσου τους [13;256].

Για τους παραπάνω λόγους, μία σειρά από μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί και ολοένα αναπτύσσονται καινούριες τα τελευταία χρόνια, με στόχο την ανίχνευση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των ΚΚΚ [376]. Η υψηλή ετερογένεια αυτών των κυττάρων, καθώς και η ιδιαίτερα μικρή συχνότητά τους μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, αποτελούν δύο πολύ σημαντικούς περιορισμούς για την αποτελεσματική ανίχνευσή τους με ευαισθησία και ειδικότητα. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι εμπλουτισμού των δειγμάτων σε ΚΚΚ, οι οποίες εφαρμόζονται πριν την ταυτοποίησή τους, καθώς επίσης και μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται σε μία σειρά από χαρακτηριστικά και ιδιότητες που διαφέρουν μεταξύ των ΚΚΚ και των αιμοποιητικών κυττάρων. Γενικά, οι μέθοδοι εμπλουτισμού βασίζονται είτε σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η ικανότητα παραμόρφωσης των ΚΚΚ, είτε σε βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η έκφραση ορισμένων μορίων, ενώ αντίστοιχα οι μέθοδοι ανίχνευσης κατηγοριοποιούνται ως κυτταρομετρικές ή μοριακές, ανάλογα με το αν ανιχνεύουν τα ίδια τα κύτταρα ή νουκλεϊκά οξέα τους [17]. Η ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι μεγάλη, καθώς η κάθε μία εμφανίζει διαφορετικούς περιορισμούς [319;320]. Πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο στοχεύουν στην ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση και απομόνωση των ΚΚΚ με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, καθαρότητα και απόδοση και παράλληλα με κόστος που να επιτρέπει την κλινική εφαρμογή τους σε επίπεδο ρουτίνας [308;321].

Παρόλο που η ανίχνευση των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με καρκίνο μαστού αναμφισβήτητα έχει κλινική σημασία, εντούτοις δεν εμφανίζουν όλα τα ΚΚΚ το ίδιο μεταστατικό δυναμικό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ασθενείς που δεν αναπτύσσουν μεταστάσεις, παρά την θετικότητά τους σε ΚΚΚ [312]. Η αναζήτηση των διαφορετικών χαρακτηριστικών τους οδηγεί ολοένα και περισσότερο στην αποσαφήνιση της συμπεριφοράς και του ρόλου τους στην ανάπτυξη μεταστάσεων [15]. Η δημιουργία της μετάστασης θεωρείται ως μία πολύπλοκη και αναποτελεσματική διαδικασία, η οποία προϋποθέτει ότι τα εμπλεκόμενα καρκινικά κύτταρα φέρουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά προκειμένου να ολοκληρώσουν

επιτυχώς όλα τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας [98]. Ο φαινότυπος KBK αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που έχει βρεθεί να προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα αυξημένο μεταστατικό δυναμικό [33;163;164]. Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν ότι τα KBK που μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας έπειτα από την EMM του φαινότυπού τους είναι εκείνα τα κύτταρα που αναπτύσσουν τις μεταστάσεις [377]. Οι βλαστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων έχουν συσχετιστεί άμεσα με την EMM διαδικασία, η οποία έχει βρεθεί όχι μόνο να ενισχύει τη μεταναστευτική τους ικανότητα, αλλά επιπλέον ενέχεται στη ρύθμιση της ικανότητας αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης των KBK [29;161;198]. Είναι ευρέως γνωστό ότι η EMM συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων μέσω μιας σειράς μοριακών αλλαγών και ότι αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη διείσδυσή τους μέσω του πρωτοπαθούς όγκου, την ενδαγγείωση και τη μετανάστευση μέσω της κυκλοφορίας, την εξαγγείωση και την ακόλουθη διείσδυσή τους στο νέο όργανο [19]. Επομένως, τα χαρακτηριστικά KBK και EMM πιστεύεται ότι κατέχουν σημαντική θέση στη βιολογία των ΚΚΚ. Επιπλέον, τόσο τα KBK, όσο και τα καρκινικά κύτταρα που υφίστανται την EMM εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη αντίσταση στην ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία [100;208;209], ενώ η ταυτοποίησή τους στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με καρκίνο μαστού έχει συσχετιστεί με μείωση του διαστήματος έως την υποτροπή και της συνολικής επιβίωσης [25;36;178;378]. Επομένως, η ταυτοποίηση ΚΚΚ με χαρακτήρες KBK και EMM θα μπορούσε ενδεχομένως να προσφέρει σημαντική πληροφορία για την ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση των ασθενών. Πράγματι, αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει την έκφραση σημαντικών δεικτών KBK και EMM στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού [278;362], εντούτοις η προγνωστική σημασία της ανίχνευσής τους έχει επιβεβαιωθεί σε λίγες μελέτες, στις οποίες αξιολογήθηκε μικρό δείγμα ασθενών [44;367;371;375]. Επιπλέον, λείπουν μελέτες που να περιγράφουν τη συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών KBK και EMM στα ΚΚΚ των ασθενών σε επίπεδο κυττάρου, καθώς επίσης και μεταφραστικές μελέτες σε μεγάλες και καλά καθορισμένες ομάδες ασθενών.

Στον καρκίνο του μαστού, η ταυτοποίηση των KBK έχει βρεθεί ότι επιτυγχάνεται αποτελεσματικά μέσω της ανίχνευσης του φαινοτυπικού προφίλ CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-low</sup> και της υψηλής ενεργότητας του ενζύμου ALDH, καθώς επίσης και της πρωτεϊνικής

έκφρασης της ALDH1 και ειδικότερα του ισοένζυμου ALDH1A1 [34;37]. Ένας σημαντικός περιορισμός κατά τη μελέτη των δεικτών KBK στα ΚΚΚ, είναι η παράλληλη έκφρασή τους στα αιμοποιητικά κύτταρα και επομένως είναι σημαντικό η εκτίμησή τους να πραγματοποιείται σε επίπεδο κυττάρου και όχι σε ένα εμπλουτισμένο σε ΚΚΚ δείγμα κυττάρων. Έτσι, αξιολογώντας παράλληλα στο ίδιο κύτταρο δείκτες για ΚΚΚ και KBK, διασφαλίζεται ότι η παρατηρούμενη έκφραση των βλαστικών δεικτών αφορά πράγματι τα ΚΚΚ και όχι τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος. Στα πλαίσια αυτά, η ομάδα μας ανέπτυξε μία μεθοδολογία ανοσοφθορισμού για το χαρακτηρισμό μιας σειράς δεικτών KBK στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού σε επίπεδο ενός κυττάρου. Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και η ανίχνευση των ΚΚΚ έγινε μέσω των μορίων CK 8, 18 και 19, ενώ ως βλαστικοί δείκτες εκτιμήθηκαν οι ALDH1A1, CD44 και CD24 [42]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η συχνότητα των ΚΚΚ με φαινότυπο KBK ήταν πράγματι συχνή στη μεταστατική νόσο, ωστόσο η έκφραση των παραπάνω δεικτών στα ΚΚΚ εμφάνισε σημαντική ετερογένεια ακόμη και σε επίπεδο του ίδιου ασθενή. Εν συνεχεία το 2011, η ομάδα μας ανέπτυξε μία νέα μεθοδολογία για τη διερεύνηση του φαινότυπου EMM των ΚΚΚ σε ασθενείς με καρκίνο μαστού [43]. Όπως ισχύει και για τους βλαστικούς δείκτες, η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών ανιχνεύεται και στα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, το οποίο επιπλέον έχει ως συνέπεια ότι δεν είναι δυνατή η ανίχνευση των πλήρως μεσεγχυματικών ΚΚΚ με μεθόδους που βασίζουν την ταυτοποίηση των ΚΚΚ στην έκφραση επιθηλιακών μορίων. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός της συνέκφρασης επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών επιτρέπει την ταυτοποίηση των ΚΚΚ που φέρουν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο EMM. Για τους παραπάνω λόγους, αναπτύχθηκε μία μεθοδολογία για τη διερεύνηση της συνέκφρασης επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών σε επίπεδο ενός ΚΚΚ. Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και μέσω ανοσομαγνητικής απομόνωσης με τη χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του CD45. Ακολούθως εκτιμήθηκε η έκφραση των CK 8, 18 και 19 και CD45, παράλληλα με την έκφραση της βιμεντίνης και του μεταγραφικού παράγοντα TWIST, μέσω πειραμάτων διπλού και τριπλού ανοσοφθορισμού. Η βιμεντίνη και ο TWIST θεωρούνται ως δύο καλά μελετημένοι και ισχυροί δείκτες EMM σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μαστού [22;24]. Από την παραπάνω μελέτη προέκυψε ότι τα ΚΚΚ των ασθενών,

τόσο με πρώιμο, όσο και μεταστατικό καρκίνο μαστού, συχνά εμφανίζουν έναν φαινότυπο ενδιάμεσης EMM, εκφράζοντας παράλληλα κυτταροκερατίνες και βιμεντίνη ή/και TWIST. Ωστόσο, η συχνότητα ανίχνευσης του συγκεκριμένου υποπληθυσμού KKK ήταν σημαντικά αυξημένη στη μεταστατική, συγκριτικά με την πρώιμη νόσο, στην οποία το προφίλ έκφρασης των παραπάνω EMM δεικτών εμφάνισε μεγαλύτερη ετερογένεια σε επίπεδο ασθενή. Επομένως, η μελέτη αυτή πρόσφερε σημαντικές ενδείξεις ότι τα KKK με ενδιάμεσο φαινότυπο EMM πιθανά επιλέγονται και τελικά επικρατούν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στη μεταστατική διαδικασία.

Ακολούθως, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία, με στόχο την εκτίμηση της συνέκφρασης δύο δεικτών KBK και EMM στα KKK ασθενών με καρκίνο μαστού σε επίπεδο κυττάρου. Η αξιολόγηση των δεικτών KBK και EMM σε επίπεδο μονήρων κυττάρων αφενός έχει το πλεονέκτημα της ειδικής ανίχνευσής τους στον πληθυσμό των KKK, αφετέρου επιτρέπει τη σύγχρονη ταυτοποίησή τους στο ίδιο κύτταρο, προσφέροντας ισχυρές ενδείξεις για την πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους. Ο εμπλουτισμός των KKK πραγματοποιήθηκε μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, ενώ η ταυτοποίηση των KKK πραγματοποιήθηκε ελέγχοντας την έκφραση των CK 8, 18 και 19, τα οποία χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς την έκφραση του δείκτη KBK, ALDH1A1 και του δείκτη EMM, TWIST, μέσω πειραμάτων τριπλού ανοσοφθορισμού. Η επιλογή των συγκεκριμένων δεικτών έγινε κυρίως βάσει της υψηλής ειδικότητας με την οποία έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα με χαρακτήρα KBK και EMM [37;379]. Καθώς τα KKK αποτελούν έναν εξαιρετικά σπάνιο πληθυσμό κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, ένας μικρός αριθμός KKK είναι τελικά διαθέσιμος προς περαιτέρω φαινοτυπική ανάλυση με τις συνήθεις διαθέσιμες τεχνικές. Επιπλέον έχει πολλές φορές δειχθεί η ιδιαίτερα υψηλή ετερογένειά τους ακόμη και σε επίπεδο του ίδιου ασθενή [10]. Για τους λόγους αυτούς, όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια προτείνουν ότι κατά τη μελέτη των KKK δεν αρκεί απλώς η ανίχνευση της έκφρασης των διαφόρων μορίων, αλλά απαιτείται μία εκτενέστερη ποιοτική και ποσοτική φαινοτυπική μελέτη της έκφρασής τους [256;380]. Σε επίπεδο πρωτοπαθούς όγκου επίσης είναι γνωστό ότι η ποσότητα μίας πρωτεΐνης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των κυττάρων και ότι η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν μεταφράζεται σε διαφορετική κλινική σημασία, όπως για παράδειγμα ισχύει



για την υψηλή έκφραση του υποδοχέα HER2 [55]. Επιπλέον, η δράση μίας πρωτεΐνης είναι δυνατόν να επηρεάζεται ανάλογα με την υποκυττάρια εντόπισή της, όπως για παράδειγμα έχει δειχθεί ο ρόλος των μορίων PTEN και β-catenin κατά την ανίχνευσή τους στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων [381;382], ενώ υπάρχουν μόρια στα οποία παίζει σημαντικό ρόλο τόσο η κυτταρική τους εντόπιση, όσο και τα επίπεδα της έκφρασής τους, όπως ισχύει για τον υποδοχέα ER [383;384] Το γεγονός ότι το διαφορετικό προφίλ έκφρασης πολλών μορίων στους όγκους παρουσιάζει διαφορετική σημασία ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών, ενισχύει ακόμη περισσότερο την ανάγκη του εκτενούς φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των διαφόρων δεικτών στα ΚΚΚ. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε μία προσπάθεια προσδιορισμού των διαφορετικών προφίλ έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα ΚΚΚ των ασθενών. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε τόσο η CLSM μικροσκοπία, όσο και η ημι-αυτοματοποιημένη μικροσκοπία ARIOL, ενώ η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος ARIOL.

Η έκφραση της ALDH1 διερευνήθηκε αρχικά στην καρκινική σειρά ελέγχου HepG2, όπου διαπιστώθηκε ότι το πρότυπο της έκφρασής της διέφερε σημαντικά μεταξύ των κυττάρων. Ειδικότερα, ήταν εμφανής η διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, η οποία διαχωρίστηκε σε υψηλή (ALDH1<sup>high</sup>) και χαμηλή έκφραση (ALDH1<sup>low</sup>) ή απουσία έκφρασης (ALDH1<sup>neg</sup>). Καθώς υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η υψηλή έκφραση ALDH1 σχετίζεται με την υψηλή ενζυμική ενεργότητα της ALDH, η οποία θεωρείται ως ο πλέον κατάλληλος δείκτης απομόνωσης των KBK [38], στην παρούσα μελέτη ως KBK ορίστηκε ο φαινότυπος υψηλής έκφρασης ALDH1. Μελέτες σε διάφορους τύπους κακοήθειας έχουν επίσης δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης της ALDH1A1 διαφέρουν μεταξύ των κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου και ότι η υψηλή έκφρασή της σχετίζεται με χειρότερη έκβαση των ασθενών [385-387]. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της ALDH1, μέσω καταμέτρησης της έντασης φθορισμού σε καθένα από τους τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων μέσω του συστήματος ARIOL. Η έκφραση της ALDH1 διερευνήθηκε επίσης στις καρκινικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, οι οποίες είναι αντιπροσωπευτικές των τριών κύριων υπότυπων του καρκίνου μαστού HER2-θετικού, ορμονο-θετικού και τριπλά αρνητικού, αντιστοίχως. Η έκφρασή της ανιχνεύτηκε σε όλες τις σειρές, ωστόσο σε

συμφωνία με τη σειρά ελέγχου, τα επίπεδα έκφρασής της διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κυττάρων της κάθε σειράς, τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με το ανώτερο και κατώτερο κατώφλι έντασης που προέκυψε στη σειρά ελέγχου. Τα παραπάνω πειράματα επιβεβαίωσαν την αντικειμενικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου, υποδεικνύοντας την καταλληλότητά της για εφαρμογή στα ΚΚΚ των ασθενών ανεξάρτητα από το μοριακό υπότυπο του πρωτοπαθούς τους όγκου. Αντίστοιχα, το προφίλ έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα TWIST διερευνήθηκε αρχικά στη σειρά ελέγχου HeLa και ακολούθως στις τρεις σειρές μαστού, μέσω της CLSM μικροσκοπίας και της μικροσκοπίας ARIOL. Παρά το γεγονός ότι έκφραση του TWIST ανιχνεύτηκε σε όλες τις σειρές, η υποκυττάρια εντόπισή του διέφερε μεταξύ των κυττάρων κάθε σειράς. Ειδικότερα, ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί με πυρηνική (TWIST<sup>nuc</sup>) ή κυτταροπλασματική (TWIST<sup>cyt</sup>) εντόπιση TWIST, καθώς επίσης και κύτταρα με πλήρη απουσία της έκφρασής του (TWIST<sup>neg</sup>). Ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST εμφανίζει μία χαρακτηριστική δομή, γνωστή ως επικράτεια bHLH, μέσω της οποίας προσδένεται στο DNA και συγκεκριμένα σε αλληλουχίες E-box του υποκινητή των μορίων που ρυθμίζει μεταγραφικά, όπως είναι οι E- και N-cadherin. Επομένως η πυρηνική εντόπισή του αποτελεί προϋπόθεση για τη δράση του ως μεταγραφικού επαγωγέα της EMM [46;388]. Στην παρούσα λοιπόν μελέτη, ο φαινότυπος EMM ορίστηκε βάσει της πυρηνικής έκφρασης του TWIST. Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η πυρηνική έκφραση του TWIST στον πρωτοπαθή όγκο σχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό [389;390].

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε η μεθοδολογία για την ανάλυση της έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα ΚΚΚ των ασθενών με καρκίνο μαστού. Μέσω μίας σειράς πειραμάτων ελέγχου σε δείγματα από υγιείς αιμοδότες και σε καρκινικά κύτταρα HepG2 και HeLa αναμειγμένα με απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών, διαπιστώθηκε η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητας της μεθόδου. Ακολούθως, διερευνήθηκε το πρότυπο της έκφρασης των δύο δεικτών στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού. Προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή συμβολή των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ στη μεταστατική εξέλιξη της νόσου, αξιολογήθηκε η έκφραση των δύο δεικτών στα ΚΚΚ 80 ασθενών με πρώιμο και 50 με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Οι δύο δείκτες ανιχνεύτηκαν στα ΚΚΚ στο σύνολο σχεδόν των ασθενών που μελετήθηκαν, ωστόσο το προφίλ της έκφρασής τους

ήταν σαφώς διαφοροποιημένο μεταξύ της πρώιμης και μεταστατικής νόσου. Ειδικότερα, η έκφραση της ALDH1 στα ΚΚΚ στο μεταστατικό στάδιο ήταν κυρίως υψηλή (ALDH1<sup>high</sup>), ενώ στο πρώιμο στάδιο είτε ήταν χαμηλή είτε απουσίαζε (ALDH1<sup>low/neg</sup>). Επιπλέον, η υποκυττάρια εντόπιση του TWIST στη μεταστατική νόσο ήταν συχνότερη στον πυρήνα των ΚΚΚ (TWIST<sup>nuc</sup>), σε αντίθεση με την πρώιμη νόσο όπου ανιχνεύτηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα ή απουσίαζε πλήρως (TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Παρόλο που και στα δύο κλινικά στάδια διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια του φαινοτυπικού προφίλ των ΚΚΚ ακόμη και σε επίπεδο ασθενή, τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και στατιστικά, τόσο σε επίπεδο ασθενών, όσο και σε επίπεδο συνόλου ΚΚΚ και συχνότητας ΚΚΚ ανά ασθενή. Η μικρότερη συχνότητα ανίχνευσης των ALDH1<sup>high</sup> ΚΚΚ στη μεταστατική νόσο που περιγράφηκε στην προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας, οφείλεται πιθανά στο ότι ο αριθμός των ασθενών ήταν σημαντικά μικρότερος και η μεθοδολογία ποσοτικοποίησης της έκφρασης της ALDH1 ήταν διαφορετική [42]. Όσον αφορά στην έκφραση του TWIST, παρατηρήθηκε συμφωνία με τα ευρήματα της προηγούμενης μελέτης μας, ωστόσο η μελέτη αυτή προσφέρει επιπλέον πληροφορία όσον αφορά στην κυτταρική του εντόπιση στα ΚΚΚ [43]. Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι τα ΚΚΚ με φαινότυπο KBK, καθώς επίσης και εκείνα με χαρακτήρα ενδιάμεσης EMM, επιλέγονται σημαντικά κατά την εξέλιξη της νόσου, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στη μεταστατική διαδικασία. Πράγματι, η EMM είναι μία δυναμική διαδικασία, κατά την οποία ο φαινότυπος των κυττάρων μεταβάλλεται σταδιακά από πλήρως επιθηλιακό σε ενδιάμεσο EMM και τελικά σε πλήρως EMM και σύμφωνα με προκλινικές μελέτες, τα καρκινικά κύτταρα με την πλέον ενισχυμένη επιθετικότητα είναι εκείνα που φέρουν τον ενδιάμεσο και όχι τον πλήρη χαρακτήρα EMM [130;391]. Αντίστοιχα, ο βλαστικός φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων έχει πολλές φορές δειχθεί ότι αυξάνει το μεταστατικό τους δυναμικό [166]. Επιπλέον, τα παραπάνω ευρήματα συγκλίνουν με δεδομένα που προκύπτουν από τη σύγκριση προηγούμενων μελετών, σύμφωνα με τα οποία η έκφραση δεικτών KBK και EMM στα ΚΚΚ είναι συχνότερη σε ασθενείς με μεταστατικό, παρά πρώιμο καρκίνο μαστού [44;278]. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη πρόσφερε νέα και σημαντικά δεδομένα σχετικά με το πώς μεταβάλλεται δυναμικά το πρότυπο της έκφρασης των φαινότυπων KBK και EMM στα ΚΚΚ κατά την εξέλιξη της νόσου, υπογραμμίζοντας επιπλέον τη σημασία της περαιτέρω φαινοτυπικής ανάλυσης των ΚΚΚ.

Όσον αφορά στην παράλληλη αξιολόγηση των δύο δεικτών στα ΚΚΚ, ο φαινότυπος ΚΒΚ βρέθηκε να συσχετίζεται και να ανιχνεύεται παράλληλα με το φαινότυπο ενδιάμεσης EMM (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>) στο ίδιο κύτταρο στη συντριπτική πλειοψηφία των ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν στη μεταστατική νόσο, ενώ αντιθέτως στην πρόιμη νόσο ανιχνεύτηκαν κυρίως ΚΚΚ μη-βλαστικού και παράλληλα επιθηλιακού φαινότυπου (ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup>). Παρόλο που και άλλες μελέτες έχουν δείξει σε επίπεδο mRNA ότι την παράλληλη έκφραση της ALDH1 και του TWIST στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού [278;363;370], η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι οι δύο δείκτες ταυτοποιούνται συγχρόνως στο ίδιο κύτταρο, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τη συσχέτιση μεταξύ τους. Επιπλέον, τα παραπάνω ευρήματα προσφέρουν νέες και ισχυρές ενδείξεις ότι τα ΚΚΚ που φέρουν παράλληλα τους χαρακτήρες ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>) εμπλουτίζονται ακόμη περισσότερο κατά τη μεταστατική εξέλιξη της νόσου και ενδεχομένως συνιστούν τον πλέον επιθετικό υποπληθυσμό ΚΚΚ. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με μία σειρά από προκλινικές μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των ΚΒΚ και των καρκινικών κυττάρων σε EMM και πώς η ταυτόχρονη παρουσία των δύο χαρακτηριστικών αυξάνει ακόμη περισσότερο το μεταστατικό τους δυναμικό [139;199;246]. Για τους συγκεκριμένους δείκτες ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST1 ενισχύει την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων σε σειρές μαστού, αυξάνοντας τόσο την έκφραση της ALDH1, όσο και την ενζυμική ενεργότητα της ALDH [195;392]. Ωστόσο, μία αντιφατική μελέτη στον καρκίνο του μαστού έδειξε ότι τα CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-</sup> ΚΒΚ έχουν κυρίως μεσεγχυματικό φαινότυπο, ενώ αντιθέτως τα ΚΒΚ με υψηλή ενεργότητα ALDH είναι περισσότερο επιθηλιακά [207]. Παρόλα αυτά, προκλινικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων είναι επίσης μία δυναμική και αντιστρέψιμη διαδικασία, κατά την οποία η ισορροπία μεταξύ βλαστικών και διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων ρυθμίζεται μέσω της δυναμικής εναλλαγής μεταξύ EMM και MET [161;202]. Μάλιστα, σε μία μελέτη δείχθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα με ενδιάμεσο EMM φαινότυπο είχαν σημαντικά αυξημένη πιθανότητα να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες σε σχέση με τα αμιγώς μεσεγχυματικά κύτταρα [205]. Η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι το πρότυπο της έκφρασης των δύο δεικτών στα ΚΚΚ δεν διαφέρει απλώς μεταξύ των δύο κλινικών σταδίων, αλλά επιπλέον μεταβάλλεται

παράλληλα. Η διαπίστωση αυτή αφενός αντικατοπτρίζει τη δυναμική εναλλαγή των φαινότυπων KBK και EMM στα KKK όσο η νόσος εξελίσσεται, αφετέρου προσφέρει ισχυρές ενδείξεις ότι η ισορροπία της βλαστικότητας των KKK θα μπορούσε να ρυθμίζεται μέσω της δυναμικής εναλλαγής μεταξύ EMM και MET.

Επιπλέον, πληθώρα μελετών σε πολλούς τύπου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, έχουν δείξει ότι η έκφραση τόσο της ALDH1, όσο και του TWIST στον πρωτοπαθή όγκο, αποτελεί σημαντικό δείκτη έλλειψης ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και μειωμένης επιβίωσης των ασθενών [25;37;393-396]. Ως εκ τούτου, διερευνήθηκε η ανθεκτικότητα των KKK με τα διαφορετικά προφίλ έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα. Για το σκοπό αυτό, η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό 154 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, λίγο πριν την έναρξη και αμέσως μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. Όπως διαπιστώθηκε, η συχνότητα των KKK με φαινότυπους ALDH1<sup>high</sup>, TWIST<sup>nuc</sup> και ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> πριν τη χημειοθεραπεία, ήταν μειωμένη συγκριτικά με τα προηγούμενα ευρήματα στους ασθενείς μεταστατικού σταδίου, παρατήρηση η οποία πιθανόν οφείλεται στο ότι είχε ελεγχθεί ένας σημαντικά μικρότερος αριθμός ασθενών. Όσον αφορά στην επίδραση της χημειοθεραπείας, στην πλειοψηφία των ασθενών διαπιστώθηκε αποτελεσματική μείωση ή εξάλειψη των KKK. Εντούτοις, η χημειοθεραπεία οδήγησε παράλληλα σε μικρή αύξηση της συχνότητας των KKK με φαινότυπους ALDH1<sup>high</sup> και TWIST<sup>nuc</sup>, ενώ μεγαλύτερη και στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση των ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> KKK. Επομένως, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι η χημειοθεραπεία εμπλουτίζει σημαντικά τον υποπληθυσμό των KKK που εκφράζουν ταυτόχρονα τους φαινότυπους KBK και EMM. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζουν την αυξημένη αντίσταση των KBK και των καρκινικών κυττάρων σε EMM στη χημειοθεραπεία [185]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με μία πρόσφατη προκλινική μελέτη στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με μοντέλα ποντικών, τα κύτταρα που επιβιώνουν της χημειοθεραπείας και οδηγούν στο σχηματισμό μεταστατικών όγκων, εμφανίζουν αποκλειστικά φαινότυπο EMM και όχι KBK [397]. Ωστόσο σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, ο εμπλουτισμός των χαρακτηριστικών KBK ή EMM έπειτα από χημειοθεραπεία έχει δείχθει και σε επίπεδο KKK και ΔKK ασθενών με καρκίνο μαστού [44;369]. Παρόλα αυτά, η παρούσα μελέτη πρόσφερε σημαντικές

ενδείξεις ότι η αντίσταση των ΚΚΚ στη χημειοθεραπεία ενισχύεται περαιτέρω από τη σύγχρονη παρουσία και των δύο χαρακτηριστικών σε επίπεδο κυττάρου, συμπληρώνοντας την προηγούμενη παρατήρηση ότι ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός ΚΚΚ αναδεικνύεται ως εκείνος με την πλέον σημαντική συμμετοχή στη μεταστατική διαδικασία.

Ενδιαφέροντα συμπεράσματα προέκυψαν επίσης από τη συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ πριν και μετά τη χημειοθεραπεία, ανεξάρτητα από το φαινοτυπικό τους προφίλ ως προς τους χαρακτήρες ΚΒΚ και ΕΜΜ, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών. Οι ασθενείς με τριπλά αρνητικούς όγκους είχαν περισσότερα ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τη χειρότερη έκβαση των ασθενών που φέρουν το συγκεκριμένο μοριακό υπότυπο. Επιπλέον, ο αριθμός των ΚΚΚ, τόσο πριν, όσο και μετά τη χημειοθεραπεία, συσχετίστηκε με την πρόοδο νόσου στο τέλος της χημειοθεραπείας, ενώ η ανίχνευσή τους πριν τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε επίσης με συνολική επιβίωση των ασθενών μικρότερη της διαίτης. Η κλινική σημασία της ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού έχει πολλές φορές δειχθεί μέσω της μεθοδολογίας CellSearch και μοριακών μεθόδων [6;331], ωστόσο η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά με τη χρήση κυτταρομετρικών μεθόδων και ειδικότερα της μικροσκοπίας ARIOL, ότι η ανίχνευση ΚΚΚ σχετίζεται με έλλειψη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών.

Όσον αφορά στη συσχέτιση της παρουσίας των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ πριν και μετά τη χημειοθεραπεία με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, η ανίχνευση ΚΚΚ με φαινότυπο ΚΒΚ (ALDH1<sup>high</sup>) πριν τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με τον HER2 υπότυπο του πρωτοπαθούς όγκου, παρατήρηση η οποία συμπίπτει με πληθώρα μελετών που δείχνουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υποδοχέα HER2 και της ALDH1 [154;155]. Επιπλέον, η ανίχνευση ΚΚΚ με ενδιάμεσο φαινότυπο ΕΜΜ (TWIST<sup>nu</sup>) σχετίστηκε με την παρουσία πνευμονικών μεταστάσεων, σε συμφωνία με μία πρόσφατη προκλινική μελέτη στον καρκίνο του μαστού, όπου βρέθηκε ότι ο υποπληθυσμός των ΚΚΚ με χαρακτήρα παράλληλα ΕΜΜ και ΚΒΚ είχε την ικανότητα να αναπτύσσει μεταστάσεις στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο των ζώων [374]. Όσον αφορά τα ΚΚΚ που ανιχνεύτηκαν μετά τη χημειοθεραπεία και ενδεχομένως αποτελούν ένα χημειοανθεκτικό πληθυσμό κυττάρων, βρέθηκε ότι η παρουσία ΚΚΚ με χαρακτήρα ΚΒΚ συσχετίστηκε με την

παρουσία οστικών μεταστάσεων, διαπίστωση η οποία έρχεται επίσης σε συμφωνία με μία άλλη μελέτη, στην οποία τα ΚΚΚ με βλαστικό φαινότυπο ήταν εκείνα που ανέπτυσσαν στα ζώα οστικές μεταξύ άλλων μεταστάσεις [375].

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία και την ανταπόκριση κατά την πρώτη εκτίμηση, εντούτοις η παρουσία ΚΚΚ με χαρακτήρα ΚΒΚ ή με διπλό φαινότυπο ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM συσχετίστηκε με μερική ή πλήρη ανταπόκριση κατά την εκτίμηση στο τέλος της χημειοθεραπείας. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα της παρούσας μελέτης, τα οποία προτείνουν ότι ο πληθυσμός των ΚΚΚ που φέρει χαρακτηριστικά ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM συμμετέχει στη μεταστατική διαδικασία και εμφανίζει αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να δοθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι στη συγκεκριμένη ανάλυση εντάχθηκαν αποκλειστικά οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία και οι οποίοι επομένως αποτελούν έναν πληθυσμό ασθενών με κακή πρόγνωση. Τα παραπάνω ευρήματα ενδεχομένως να ήταν περισσότερο αξιόπιστα συμπεριλαμβάνοντας την κλινική πληροφορία των ασθενών που δεν εμφάνισαν ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία, η συλλογή της οποίας βρίσκεται σε εξέλιξη. Όσον αφορά στην ανίχνευση των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση με την ανταπόκριση, εντούτοις σημαντική ήταν η διαπίστωση ότι η χημειοθεραπεία οδήγησε σε σημαντική αύξηση των ΚΚΚ που έφεραν είτε έναν από τους δύο είτε και τους δύο φαινότυπους ΚΒΚ και EMM, αποκλειστικά στους ασθενείς που εμφάνισαν σταθερή νόσο ή πρόοδο νόσου στο τέλος της θεραπείας. Αντιθέτως σε εκείνους που ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία πλήρως ή μερικώς, πρακτικά δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στη συχνότητα των φαινότυπων ΚΒΚ και EMM κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα ευρήματα μίας ακόμη μελέτης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, όπου η χημειοθεραπεία φάνηκε να εμπλουτίζει τα μεσεγχυματικά ΚΚΚ αποκλειστικά στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν [368].

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης δεν προέκυψε στατιστική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των ΚΚΚ με τα διάφορα πρότυπα έκφρασης πριν τη χημειοθεραπεία και της επιβίωσης των ασθενών. Παρόλα αυτά, η παρουσία των ΚΚΚ με χαρακτήρα ΚΒΚ ή με σύγχρονη έκφραση των φαινότυπων ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMM μετά τη χημειοθεραπεία ήταν δείκτης αυξημένου διαστήματος έως την υποτροπή, ενώ η

ανίχνευση των ΚΚΚ τα οποία παρουσίαζαν μη-βλαστικό επιθηλιακό χαρακτήρα, ήταν σημαντικός δείκτης μειωμένης συνολικής επιβίωσης. Τα ευρήματα αυτά είναι σαφώς αντικρουόμενα με τα προηγούμενα δεδομένα της παρούσας μελέτης, καθώς και με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών έως σήμερα δεν έχει δειχθεί συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ με χαρακτηριστικά ΚΒΚ ή και ΕΜΜ με την επιβίωση των ασθενών [45;278;362-364;369;370]. Εντούτοις, σύμφωνα με κάποιες πρόσφατες μελέτες, η ανίχνευση των παραπάνω κυτταρικών πληθυσμών πράγματι παρουσιάζει προγνωστική αξία ως προς την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, αν και στο σύνολό τους οι μελέτες αυτές συμπεριέλαβαν μικρούς αριθμούς ασθενών. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η ανίχνευση ΚΚΚ με ενδιάμεσο φαινότυπο ΕΜΜ έπειτα από μεγα-χημειοθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων ήταν δείκτης μειωμένου διαστήματος έως την υποτροπή [371]. Παρομοίως, έχει βρεθεί ότι η συνέκφραση CK και δεικτών ΕΜΜ στα ΚΚΚ ήταν ισχυρότερος δείκτης μειωμένης επιβίωσης έως την υποτροπή, σε σχέση με την έκφραση αποκλειστικά της CK [367]. Σε μία άλλη μελέτη ωστόσο βρέθηκε ότι η ταυτοποίηση ΚΚΚ που εκφράζουν αποκλειστικά δείκτες ΚΒΚ και όχι ΕΜΜ, ήταν σημαντικός δείκτης μειωμένης συνολικής επιβίωσης [375]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η παρουσία ΚΚΚ με φαινότυπο ΚΒΚ και εκείνων που φέρουν παράλληλα χαρακτήρες ΚΒΚ και ενδιάμεσης ΕΜΜ μετά τη χημειοθεραπεία συσχετίζεται με αυξημένη επιβίωση. Το στατιστικό λάθος μάλλον αποτελεί την πλέον πιθανή εξήγηση, λαμβάνοντας υπόψη το ιδιαίτερα μικρό δείγμα των 39 ασθενών με ανιχνεύσιμα ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία, καθώς επίσης και το μικρό ποσοστό (13-20%) των ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν οι συγκεκριμένοι πληθυσμοί ΚΚΚ. Σημαντικός περιορισμός προκύπτει επίσης από το γεγονός ότι η παρούσα ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους ασθενείς που «εξ ορισμού» αποτελούν μία ομάδα ασθενών με κακή πρόγνωση, καθώς είχαν ανιχνεύσιμα ΚΚΚ τόσο πριν, όσο και μετά τη χημειοθεραπεία. Η συμπληρωματική εκτίμηση της κλινικής πορείας των ασθενών που δεν είχαν ΚΚΚ πριν τη χημειοθεραπεία, καθώς επίσης και η περαιτέρω διερεύνηση της παρουσίας και του φαινότυπου των ΚΚΚ μετά τη χημειοθεραπεία στους συγκεκριμένους ασθενείς, θα συμβάλλει σημαντικά στην αποσαφήνιση της προγνωστικής τους αξίας.



Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν τα ΚΚΚ που ανιχνεύονται σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και εμφανίζουν υψηλή έκφραση της ALDH1, φέρουν και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ΚΒΚ. Ως δείκτης λειτουργικότητας ΚΒΚ χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της ALDH, η οποία έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζει με μεγάλη ειδικότητα και αποτελεσματικότητα τα κύτταρα με ιδιότητες ΚΒΚ [36;37;47]. Αρχικά, η ενζυμική ενεργότητα της ALDH διερευνήθηκε με κυτταρομετρία ροής μέσω της δοκιμής ALDEFLUOR στην κυτταρική σειρά ελέγχου HepG και τις τρεις αντιπροσωπευτικές σειρές μαστού SKBR3, MCF7 και MDA.MB.231, όπου ανιχνεύθηκε στο σύνολο των σειρών. Παρόλα αυτά το ποσοστό ενεργότητας διέφερε μεταξύ των σειρών και ειδικότερα ήταν μεγαλύτερο στα HepG2 κύτταρα, μικρότερο στα SKBR3, ακόμη μικρότερο στα MCF7, ενώ στα MDA.MB.231 ήταν σχεδόν μηδενικό. Παραδόξως, σε όλες τις σειρές παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση της ποσοστιαίας ενεργότητας της ALDH στα κύτταρα που απομονώθηκαν από διαδοχικές ανακαλλιέργειες και ειδικότερα διαπιστώθηκε ότι η αύξηση του ποσοστού ενεργότητας στην κάθε σειρά ήταν αναλογική του αυξανόμενου αριθμού ανακαλλιέργειας. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως αποτελεί την εξήγηση για τη μεγάλη ετερογένεια που προκύπτει από τη βιβλιογραφία όσον αφορά στο ποσοστό ενεργότητας ALDH στις διάφορες σειρές μαστού [38;47]. Στις παραπάνω σειρές διερευνήθηκε στη συνέχεια η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής ενεργότητας ALDH και της υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ALDH1, σύμφωνα με τη μεθοδολογία ποσοτικοποίησης μέσω ARIOL. Η ενεργότητα ALDH βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της ALDH1 στα κύτταρα ελέγχου HepG2, επιβεβαιώνοντας ότι μέσω της παραπάνω μεθοδολογίας ταυτοποιείται πράγματι ο ενζυμικά ενεργός πληθυσμός κυττάρων. Παρόλα αυτά, πραγματοποιώντας την παραπάνω σύγκριση στις τρεις σειρές μαστού, βρέθηκε ότι το ποσοστό των κυττάρων με υψηλή έκφραση ALDH1 ήταν μεγαλύτερο από ότι εκείνων με υψηλή ενεργότητα ALDH, παρατήρηση η οποία πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των σειρών. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή συσχέτιση της ενεργότητας με την έκφραση, ακολούθησαν συγκριτικά πειράματα δοκιμής ALDEFLUOR και ανοσοαποτύπωσης, όπου σε συμφωνία με τα παραπάνω, η ενεργότητα ALDH συσχετίστηκε με την έκφραση ALDH1 αποκλειστικά στη σειρά ελέγχου HepG2. Επομένως, από την παρούσα μελέτη υποδεικνύεται ότι η ALDH1 που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα μαστού δεν είναι πάντοτε ενζυμικά ενεργή. Πράγματι, η ALDH αποτελείται από 19 διαφορετικά ισόενζυμα, τα οποία έχει βρεθεί

ότι δεν εμφανίζουν όλα ενζυμική ενεργότητα [39]. Συγκεκριμένα για την ισομορφή ALDH1A1 που αξιολογήθηκε στην παρούσα μελέτη και στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών έως σήμερα [44;47;398-400], τα δεδομένα της βιβλιογραφίας εμφανίζονται αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο μελέτες που υποστηρίζουν ότι η έκφραση της ισομορφής ALDH1A1 στις καρκινικές σειρές μαστού και τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με καρκίνο μαστού σχετίζεται με την ενζυμική ενεργότητα ALDH [37;38]. Αντιθέτως, σε μία μελέτη όπου διερευνήθηκε μέσω πολλαπλών μεθοδολογιών η πρωτεϊνική έκφραση των 19 ισοένζυμων της ALDH και η πιθανή συσχέτισή τους με την ενζυμική ενεργότητα σε καρκινικές σειρές μαστού, αλλά και πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους μαστού, διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της ALDH οφείλεται κυρίως στην ισομορφή ALDH1A3 και όχι στην ALDH1A1 [401]. Σε συμφωνία με τη μελέτη αυτή, από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει ότι δεν εκφράζουν όλα τα καρκινικά κύτταρα μαστού μία ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη ALDH1, καθώς το ποσοστό της υψηλής έκφρασης ALDH1 ήταν μεγαλύτερο από εκείνο της υψηλής ενεργότητας ALDH. Επομένως, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω του συστήματος ARIOL επιτρέπει την ταυτοποίηση του κυτταρικού πληθυσμού που εκφράζει την ενζυμικά ενεργή ALDH1, ωστόσο παράλληλα ανιχνεύει και τα κύτταρα στα οποία η ALDH1 δεν εμφανίζει ενεργότητα. Τα δεδομένα που προέκυψαν στα κύτταρα ελέγχου HepG2 επιβεβαιώνουν ότι μέσω της παραπάνω μεθοδολογίας δεν πραγματοποιείται απώλεια του ενζυμικά ενεργού πληθυσμού κυττάρων.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της υψηλής έκφρασης ALDH1 με την ενεργότητα ALDH σε επίπεδο ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού. Για την ανάπτυξη της μεθόδου ανίχνευσης της ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ μέσω κυτταρομετρίας ροής, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των καρκινικών κυττάρων HepG2 και των τριών σειρών μαστού σε απομονωμένα μονοπύρηνια κύτταρα αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών και ακολούθησε η ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων μέσω ανίχνευσης της έκφρασης των μορίων EpCAM και CD45. Η επιλογή του EpCAM έναντι της CK έγινε καθώς η δοκιμή ALDEFUOR επιτρέπει τη σύγχρονη ταυτοποίηση επιφανειακών και όχι ενδοκυττάρων μορίων. Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψε ότι η ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων ήταν δυνατή με υψηλή ευαισθησία, εντούτοις στις μεγάλες αραιώσεις των 100 και ακόμη περισσότερο των 10 κυττάρων ανά  $10^6$  αιμοποιητικών κυττάρων

παρατηρήθηκε υπερεκτίμηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων. Η μειωμένη απόδοση της μεθόδου και η υπερεκτίμηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων σε υψηλές αραιώσεις έχει περιγραφεί και σε άλλες μελέτες ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω κυτταρομετρίας ροής [402]. Επιπλέον, παρόλο που η ενεργότητα της ALDH ανιχνεύτηκε στα καρκινικά κύτταρα ελέγχου στο σύνολο των διαδοχικών αραιώσεων, η απόδοσή της μειώθηκε σημαντικά και αναλογικά με την αυξανόμενη αραιώση των κυττάρων. Επομένως, τα πειράματα ελέγχου έδειξαν ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε ενδείκνυται για ασθενείς με υψηλό φορτίο ΚΚΚ. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε στη συνέχεια ένα μικρό δείγμα εννέα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, οι οποίοι εμφάνιζαν πολλαπλές μεταστάσεις και είχαν λάβει πάνω από δύο γραμμές χημειοθεραπείας. Στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκε παράλληλα έλεγχος της υψηλής ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ μέσω κυτταρομετρίας ροής και της υψηλής έκφρασης ALDH1 στα ΚΚΚ μέσω της μικροσκοπίας ARIOL. Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, ενώ στον πληθυσμό των κυττάρων που ακολούθησε ανοσοφθορισμός και παρατήρηση μέσω μικροσκοπίας, πραγματοποιήθηκε επιπλέον εμπλουτισμός των ΚΚΚ μέσω αρνητικής ανοσομαγνητικής απομόνωσης με σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα έναντι του CD45. Προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση του ίδιου υποπληθυσμού ΚΚΚ με τις δύο μεθόδους, η ανίχνευση των ΚΚΚ μέσω του ARIOL πραγματοποιήθηκε μέσω τριπλού ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των EpCAM, CD45 και ALDH1, όπου τα επίπεδα έκφρασης της ALDH1 ποσοτικοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Όσον αφορά στο συνολικό πληθυσμό των ΚΚΚ, με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής ανιχνεύτηκαν περισσότερα κύτταρα από ότι μέσω της μικροσκοπίας ARIOL, παρόλα αυτά προέκυψε σημαντική συσχέτιση του αριθμού των ΚΚΚ μεταξύ των δύο μεθόδων. Επιπλέον, η ποσοστιαία έκφραση της ALDH1 ήταν αυξημένη σε σχέση με την ενεργότητα της ALDH σε επίπεδο ΚΚΚ, εντούτοις η συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ΚΚΚ με υψηλή ALDH ενεργότητα και εκείνων με υψηλή ALDH1 έκφραση ήταν επίσης σημαντική. Η ενεργότητα ALDH έχει ανιχνευτεί στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού σε δύο ακόμη μελέτες [370;371]. Παρόλα αυτά, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι η έκφραση της ALDH1 στα ΚΚΚ των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού σχετίζεται θετικά με την ενεργότητα του ενζύμου, επιβεβαιώνοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω ARIOL ταυτοποιεί πράγματι έναν πληθυσμό ΚΚΚ με δραστηριότητα ΚΒΚ. Στη συνέχεια,

διερευνήθηκε η ενεργότητα της ALDH στο σύνολο των κυττάρων που ήταν αρνητικά στην έκφραση του CD45, ανεξάρτητα από την έκφραση του EpCAM, στα οποία επομένως συμπεριλαμβάνεται μεταξύ άλλων και ο υποπληθυσμός των KKK που στα πλαίσια της EMM δεν εκφράζουν EpCAM. Όπως διαπιστώθηκε, ο αριθμός των CD45-αρνητικών κυττάρων με ενεργότητα ALDH ήταν αυξημένος σε σχέση με τον αριθμό των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων, παρατήρηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό HER2-θετικό καρκίνο μαστού, όπου η ενεργότητα της ALDH ήταν αυξημένη στα διπλά αρνητικά για EpCAM και CD45 κύτταρα και επιπλέον συσχετίστηκε με την έκφραση δεικτών EMM που ανιχνεύτηκαν μέσω RT-PCR [370]. Ο χαρακτηρισμός δεικτών KBK στα KKK με φαινότυπο πλήρους EMM δεν είναι δυνατή μέσω της μικροσκοπίας ARIOL και των κλασικών μεθόδων ανίχνευσης KKK, αφενός επειδή η ανίχνευση των KKK πραγματοποιείται βάσει της έκφρασης επιθηλιακών δεικτών και αφετέρου επειδή οι δείκτες KBK εκφράζονται παράλληλα και στα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος. Επομένως η παραπάνω προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση του πληθυσμού των KKK σε πλήρη EMM και παράλληλα λειτουργικό χαρακτήρα KBK.

Συνοψίζοντας, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε μία εκτενής φαινοτυπική μελέτη των KKK ασθενών με καρκίνο μαστού ως προς την παρουσία χαρακτηριστικών KBK και ενδιάμεσης EMM. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία ανοσοφθορισμού μέσω της μικροσκοπίας ARIOL, η οποία επέτρεψε την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση της συνέκφρασης δύο σημαντικών και καλά μελετημένων δεικτών KBK και EMM, της ALDH1 και του TWIST, αντιστοίχως, σε μονήρη KKK. Οι δύο δείκτες βρέθηκε ότι εκφράζονταν συγχρόνως στα KKK, επιβεβαιώνοντας για πρώτη φορά τη συσχέτιση των χαρακτηριστικών KBK και ενδιάμεσης EMM στα KKK σε επίπεδο κυττάρου. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι το προφίλ της έκφρασής τους ήταν διαφοροποιημένο μεταξύ των KKK που ανιχνεύθηκαν στο πρώιμο και μεταστατικό στάδιο και ότι η διαφοροποίηση της έκφρασής τους συνέβαινε παράλληλα κατά τη μεταστατική εξέλιξη της νόσου, επιβεβαιώνοντας αφενός τη δυναμική της εξέλιξης των χαρακτηριστικών KBK και EMM και αφετέρου τη συμμετοχή των KKK με φαινότυπους KBK και ενδιάμεσης EMM στη μεταστατική διαδικασία. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα KKK που έφεραν παράλληλα τα χαρακτηριστικά KBK και

ενδιάμεσης EMM είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στα συνήθη χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ότι η έλλειψη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με τον εμπλουτισμό του συγκεκριμένου υποπληθυσμού KKK. Η παρουσία των KKK με φαινότυπο KBK και EMM συσχετίστηκε επίσης με την παρουσία μεταστάσεων σε συγκεκριμένα όργανα, όπως τα οστά και τους πνεύμονες. Τα αντικρουόμενα δεδομένα που προέκυψαν όσον αφορά στην προγνωστική αξία της ανίχνευσης των KKK με χαρακτήρες KBK και ενδιάμεσης EMM ως προς την επιβίωση των ασθενών, οφείλονται πιθανά σε στατιστικό λάθος. Σε εξέλιξη βρίσκονται η αξιολόγηση όλων των παραπάνω ασθενών μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας και η εκτίμηση της κλινικής τους πορείας, οι οποίες αναμένεται να συμβάλλουν στην αποσαφήνιση της προγνωστικής σημασίας της παρουσίας των συγκεκριμένων υποπληθυσμών KKK ως προς την επιβίωση των ασθενών. Τέλος, διερευνήθηκε η δραστηριότητα του χαρακτήρα KBK των KKK ασθενών με καρκίνο μαστού μέσω κατάλληλης λειτουργικής δοκιμής, επιβεβαιώνοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μέσω του ARIOL ταυτοποιεί έναν ενεργό υποπληθυσμό KKK με λειτουργικά χαρακτηριστικά KBK.

Επομένως, η παρούσα μελέτη πρόσφερε μία νέα μεθοδολογία για την ταυτοποίηση ενός επιθετικού υποπληθυσμού KKK σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και επιπλέον πρόσθεσε σημαντική πληροφορία σχετικά με τη συμπεριφορά και το ρόλο αυτών των κυττάρων στη μεταστατική εξέλιξη της νόσου. Η διαπίστωση ότι τα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα όχι μόνον δε στοχεύουν, αλλά επιπλέον εμπλουτίζουν το συγκεκριμένο πληθυσμό KKK, επιβεβαιώνει την αυξημένη ανθεκτικότητά τους και υποδεικνύει ότι οι ασθενείς που φέρουν τα επιθετικά αυτά KKK θα μπορούσαν ενδεχομένως να επωφεληθούν από θεραπείες που στοχεύουν ειδικά τα κύτταρα με χαρακτήρες KBK και EMM. Επομένως, με την παρούσα μελέτη αφενός αναδείχθηκε η σημασία της φαινοτυπικής ανάλυσης των KKK για την αποσαφήνιση του ρόλου τους στη μεταστατική διαδικασία και αφετέρου ταυτοποιήθηκε μία υποομάδα ασθενών με έλλειψη ανταπόκρισης στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα, στους οποίους ενδεχομένως μία εναλλακτική προσέγγιση με νέες στοχεύουσες θεραπείες θα πρόσφερε σημαντικό κλινικό όφελος. Η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των KKK με χαρακτήρες KBK και ενδιάμεσης EMM ως προς την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού μένει να διερευνηθεί περαιτέρω.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1 Lacroix M: **Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells.** *Endocr Relat Cancer* 2006;**13**:1033-1067.
- 2 Gupta GP, Massagué J: **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 2006;**127**:679-695.
- 3 Paterlini-Brechot P: **Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions.** *Cancer Lett* 2007;**253**:180-204.
- 4 Pantel K, Brakenhoff RH: **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:448-456.
- 5 Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: **Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.** *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:329-340.
- 6 Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Bozionelou V, Pallis A, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulas V: **Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer.** *Br J Cancer* 2012;**106**:1917-1925.
- 7 Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Sfakiotaki G, Papadatos-Pastos D, Kalmanti L, Kafousi M, Stathopoulos E, Kakolyris S, Mavroudis D, Georgoulas V: **Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer.** *Ann Oncol* 2007;**18**:1623-1631.
- 8 Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K: **Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2012;**18**:5701-5710.
- 9 Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, Rao SB, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone AM, Isaacs C: **Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009;**27**:5153-5159.
- 10 Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, Telli ML, Advani RH, Carlson RW, Mollick JA, Sheth S, Kurian AW, Ford JM, Stockdale FE, Quake SR, Pease RF, Mindrinos MN, Bhanot G, Dairkee SH, Davis RW, Jeffrey SS: **Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines.** *PLoS One* 2012;**7**:e33788.
- 11 van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM: **Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use.** *Cancer Res* 2011;**71**:5955-5960.
- 12 Kaiser J: *Medicine.* **Cancer's circulation problem.** *Science* 2010;**327**:1072-1074.

- 13 Alix-Panabieres C, Pantel K: **Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.** Clin Chem 2013;**59**:110-118.
- 14 Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D: **Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study.** Ann Oncol 2012;**23**:1744-1750.
- 15 Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabieres C, Pantel K: **Molecular mechanisms of metastasis.** J Surg Oncol 2011;**103**:508-517.
- 16 Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C: **Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers.** Nat Rev Clin Oncol 2014;**11**:129-144.
- 17 Broersen LH, van Pelt GW, Tollenaar RA, Mesker WE: **Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer.** Cell Oncol (Dordr ) 2014;**37**:9-15.
- 18 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** Cell 2009;**139**:871-890.
- 19 Vincent-Salomon A, Thiery JP: **Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development.** Breast Cancer Res 2003;**5**:101-106.
- 20 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T: **Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.** Proc Natl Acad Sci U S A 2001;**98**:10356-10361.
- 21 Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, McCormick F, Stampfer M, Abularach S, Gelmann EP: **Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells.** Cancer Res 1989;**49**:4258-4263.
- 22 Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** Nat Rev Mol Cell Biol 2006;**7**:131-142.
- 23 Kang Y, Massagué J: **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.** Cell 2004;**118**:277-279.
- 24 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** Cell 2004;**117**:927-939.



- 25 Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG: **Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer.** *Ann Surg Oncol* 2005;**12**:488-496.
- 26 Yang J, Mani SA, Weinberg RA: **Exploring a new twist on tumor metastasis.** *Cancer Res* 2006;**66**:4549-4552.
- 27 Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M: **Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer.** *Cancer Biol Ther* 2013;**14**:13-19.
- 28 Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A: **Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition.** *PLoS One* 2008;**3**:e2888.
- 29 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA: **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell* 2008;**133**:704-715.
- 30 Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ: **Applying the principles of stem-cell biology to cancer.** *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:895-902.
- 31 Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP: **Cancer stem cells--old concepts, new insights.** *Cell Death Differ* 2008;**15**:947-958.
- 32 Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.** *Cell Res* 2007;**17**:3-14.
- 33 Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang YF, Bachmann MH, Shimono Y, Dalerba P, Adorno M, Lobo N, Bueno J, Dirbas FM, Goswami S, Somlo G, Condeelis J, Contag CH, Gambhir SS, Clarke MF: **Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:18115-18120.
- 34 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:3983-3988.
- 35 Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG: **Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties.** *Cancer Res* 2005;**65**:5506-5511.
- 36 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens

- P, Wicha MS: **Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer.** Clin Cancer Res 2010;**16**:45-55.
- 37 Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G: **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.** Cell Stem Cell 2007;**1**:555-567.
- 38 Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L: **Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers.** PLoS One 2010;**5**(4):e10277.
- 39 Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW: **Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform.** Cell Cycle 2011;**10**:1378-1384.
- 40 Croker AK, Allan AL: **Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells.** Breast Cancer Res Treat 2012;**133**:75-87.
- 41 Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, Sherlock G, Lewicki J, Shedden K, Clarke MF: **The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells.** N Engl J Med 2007;**356**:217-226.
- 42 Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, Georgoulas V: **Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer.** Cancer Lett 2010;**288**:99-106.
- 43 Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S: **Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients.** Breast Cancer Res 2011;**13**:R59.
- 44 Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: **Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients.** Breast Cancer Res 2009;**11**:R46.
- 45 Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P: **Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients.** Breast Cancer Res Treat 2011;**130**:449-455.

- 46 Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL: **N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1**. *Cancer Res* 2006;**66**:3365-3369.
- 47 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS: **Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature**. *Cancer Res* 2009;**69**:1302-1313.
- 48 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008**. *Int J Cancer* 2010;**127**:2893-2917.
- 49 Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK: **Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program**. *Oncologist* 2007;**12**:20-37.
- 50 Parkin DM: **Global cancer statistics in the year 2000**. *Lancet Oncol* 2001;**2**:533-43.
- 51 <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/>
- 52 Edge SB, Compton CC: **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM**. *Ann Surg Oncol* 2010;**17**:1471-1474.
- 53 Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, Manso L, Zamarchi R, de Lascoiti AF, De Mattos-Arruda L, Ignatiadis M, Lebofsky R, van Laere SJ, Meier-Stiegen F, Sandri MT, Vidal-Martinez J, Politaki E, Consoli F, Bottini A, Diaz-Rubio E, Krell J, Dawson SJ, Raimondi C, Rutten A, Janni W, Munzone E, Caranana V, Agelaki S, Almici C, Dirix L, Solomayer EF, Zorzino L, Johannes H, Reis-Filho JS, Pantel K, Pierga JY, Michiels S: **Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data**. *Lancet Oncol* 2014;**15**:406-414.
- 54 Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S: **American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer**. *J Oncol Pract* 2010;**6**:195-197.
- 55 Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: **Molecular portraits of human breast tumours**. *Nature* 2000;**406**:747-52.

- 56 Kawalec P, Lopuch S, Mikrut A: **Effectiveness of Targeted Therapy in Patients With Previously Untreated Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Clin Breast Cancer 2014; pii: S1526-8209:(14)00226-2.
- 57 Sporn MB: **The war on cancer.** Lancet 1996;**347**:1377-81.
- 58 Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M: **Angiogenesis in cancer.** Vasc Health Risk Manag 2006;**2**:213-219.
- 59 Friedl P, Wolf K: **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.** Nat Rev Cancer 2003;**3**:362-374.
- 60 Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE: **A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor.** Cancer Res 2000;**60**:2504-11.
- 61 Swartz MA, Skobe M: **Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis.** Microsc Res Tech 2001;**55**:92-9.
- 62 Howard EW, Leung SC, Yuen HF, Chua CW, Lee DT, Chan KW, Wang X, Wong YC: **Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer.** Clin Exp Metastasis 2008;**25**:497-508.
- 63 Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN: **Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets.** Cancer Res 1999;**59**:1295-1300.
- 64 Hong B, Zu Y: **Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends.** Theranostics 2013;**3**:377-394.
- 65 Weis SM, Cheresh DA: **Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability.** Nature 2005;**437**:497-504.
- 66 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;**6**:100-102.
- 67 Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noel A, Foidart JM, Birembaut P, Polette M, Gilles C: **A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer.** Oncogene 2012;**31**:3741-3753.
- 68 Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR, Pantel K: **Heterogeneous**

- proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A 2002;**99**:2246-2251.
- 69 Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF: **Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis.** Cancer Res 2009;**69**:7135-7139.
- 70 Hart IR, Fidler IJ: **Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma.** Cancer Res 1980;**40**:2281-7.
- 71 Paget S: **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** 1889. Cancer Metastasis Rev 1989;**8**:98-101.
- 72 Uehara H, Kim SJ, Karashima T, Shepherd DL, Fan D, Tsan R, Killion JJ, Logothetis C, Mathew P, Fidler IJ: **Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases.** J Natl Cancer Inst 2003;**95**:458-470.
- 73 Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** Nat Rev Cancer 2002;**2**:563-572.
- 74 Rabbani SA, Mazar AP: **Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes.** Cancer Metastasis Rev 2007;**26**:663-674.
- 75 Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R, Groom AC: **Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy.** Cancer Metastasis Rev 1995;**14**:279-301.
- 76 Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC: **Clinical targets for anti-metastasis therapy.** Adv Cancer Res 2000;**79**:91-121.
- 77 Fidler IJ: **Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis.** Surg Oncol Clin N Am 2001;**10**:257-269.
- 78 Radinsky R: **Molecular mechanisms for organ-specific colon carcinoma metastasis.** Eur J Cancer 1995;**31A**:1091-1095.
- 79 Kaplan RN, Psaila B, Lyden D: **Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond.** Cancer Metastasis Rev 2006;**25**:521-529.
- 80 Chambers AF, Matrisian LM: **Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.** J Natl Cancer Inst 1997;**89**:1260-1270.

- 81 Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A: **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.** *Nature* 2001;**410**:50-56.
- 82 Mundy GR: **Mechanisms of bone metastasis.** *Cancer* 1997;**80**:1546-1556.
- 83 Orr FW, Wang HH: **Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis.** *Surg Oncol Clin N Am* 2001;**10**:357-35x.
- 84 Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, Wilson SM, Nadkarni KV, Groom AC, Chambers AF: **Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases.** *Cancer Res* 2002;**62**:887-891.
- 85 Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW: **Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field.** *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:1717-1730.
- 86 Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL: **The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006;**12**:1157-1167.
- 87 Weinberg RA: **The many faces of tumor dormancy.** *APMIS* 2008;**116**:548-551.
- 88 Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmuller G, Klein CA: **Systemic spread is an early step in breast cancer.** *Cancer Cell* 2008;**13**:58-68.
- 89 Klein CA: **Parallel progression of primary tumours and metastases.** *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:302-312.
- 90 Fidler IJ: **The organ microenvironment and cancer metastasis.** *Differentiation* 2002;**70**:498-505.
- 91 Mehlen P, Puisieux A: **Metastasis: a question of life or death.** *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:449-458.
- 92 Poste G, Fidler IJ: **The pathogenesis of cancer metastasis.** *Nature* 1980;**283**:139-146.
- 93 Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC: **Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.** *Am J Pathol* 1998;**153**:865-873.
- 94 Fidler IJ: **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine.** *J Natl Cancer Inst* 1970;**45**:773-782.

- 95 Weiss L: **Metastatic inefficiency**. *Adv Cancer Res* 1990;**54**:159-211.
- 96 Fidler IJ, Talmadge JE: **Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell**. *Cancer Res* 1986;**46**:5167-5171.
- 97 Heppner GH: **Tumor heterogeneity**. *Cancer Res* 1984;**44**:2259-2265.
- 98 Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA: **General mechanisms of metastasis**. *Cancer* 1997;**80**:1529-1537.
- 99 Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF: **Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth**. *Cancer Res* 2008;**68**:10377-10386.
- 100 Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC: **Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy**. *J Natl Cancer Inst* 2008;**100**:672-679.
- 101 Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition**. *J Clin Invest* 2009;**119**:1420-1428.
- 102 Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S: **Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma**. *Gastroenterology* 2005;**129**:1375-1383.
- 103 Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P: **Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness**. *Cancer Res* 2010;**70**:6945-6956.
- 104 Tauler J, Zudaire E, Liu H, Shih J, Mulshine JL: **hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines**. *Cancer Res* 2010;**70**:7137-7147.
- 105 Zeisberg M, Neilson EG: **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions**. *J Clin Invest* 2009;**119**:1429-1437.
- 106 Harris TJ, Tepass U: **Adherens junctions: from molecules to morphogenesis**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:502-514.
- 107 Peinado H, Olmeda D, Cano A: **Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?** *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:415-428.

- 108 Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A: **TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein.** *Oncogene* 2010;**29**:3173-3184.
- 109 Castanon I, Baylies MK: **A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function.** *Gene* 2002;**287**:11-22.
- 110 Massague J, Wotton D: **Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.** *EMBO J* 2000;**19**:1745-1754.
- 111 Lehembre F, Yilmaz M, Wicki A, Schomber T, Strittmatter K, Ziegler D, Kren A, Went P, Derksen PW, Berns A, Jonkers J, Christofori G: **NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin.** *EMBO J* 2008;**27**:2603-2615.
- 112 Yilmaz M, Christofori G: **Mechanisms of motility in metastasizing cells.** *Mol Cancer Res* 2010;**8**:629-642.
- 113 Satelli A, Li S: **Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.** *Cell Mol Life Sci* 2011;**68**:3033-3046.
- 114 McInroy L, Maatta A: **Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**360**:109-114.
- 115 Lv B, Yang X, Lv S, Wang L, Fan K, Shi R, Wang F, Song H, Ma X, Tan X, Xu K, Xie J, Wang G, Feng M, Zhang L: **CXCR4 Signaling Induced Epithelial-Mesenchymal Transition by PI3K/AKT and ERK Pathways in Glioblastoma.** *Mol Neurobiol* 2014; [Epub ahead of print]
- 116 Nieto MA: **Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells.** *Science* 2013;**342**:1234850.
- 117 Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG: **The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis.** *Cancer Res* 2003;**63**:3386-3394.
- 118 Warzecha CC, Carstens RP: **Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT).** *Semin Cancer Biol* 2012;**22**:417-427.
- 119 Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M: **Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas.** *Int J Oncol* 2003;**22**:891-898.
- 120 De WO, Pauwels P, De CB, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G: **Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front.** *Histochem Cell Biol* 2008;**130**:481-494.



- 121 Nguyen QD, De WO, Bruyneel E, Hendrix A, Xie WZ, Lombet A, Leibl M, Mareel M, Gieseler F, Bracke M, Gespach C: **Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment.** *Oncogene* 2005;**24**:8240-8251.
- 122 Yang MH, Wu KJ: **TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development.** *Cell Cycle* 2008;**7**:2090-2096.
- 123 Singh R, Mo YY: **Role of microRNAs in breast cancer.** *Cancer Biol Ther* 2013;**14**:201-212.
- 124 Brabletz S, Brabletz T: **The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?** *EMBO Rep* 2010;**11**:670-677.
- 125 Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:442-454.
- 126 Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K: **Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells.** *Clin Cancer Res* 2005;**11**:8006-8014.
- 127 Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K: **Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies.** *Cancer Metastasis Rev* 2012;**31**:673-687.
- 128 Christiansen JJ, Rajasekaran AK: **Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis.** *Cancer Res* 2006;**66**:8319-8326.
- 129 Lu M, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Ben-Jacob E: **MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:18144-18149.
- 130 Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AH, Chung VY, Chu YS, Matsumura N, Lai HC, Lee YF, Sim WJ, Chai C, Pietschmann E, Mori S, Low JJ, Choolani M, Thiery JP: **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;**4**:e915.
- 131 Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de FC, Puisieux A: **Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence.** *Cancer Cell* 2008;**14**:79-89.

- 132 Barrallo-Gimeno A, Nieto MA: **The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.** *Development* 2005;**132**:3151-3161.
- 133 Valdes F, Alvarez AM, Locascio A, Vega S, Herrera B, Fernandez M, Benito M, Nieto MA, Fabregat I: **The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes.** *Mol Cancer Res* 2002;**1**:68-78.
- 134 Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong WC, Kato M, Prevost-Blondel A, Thiery JP, Abastado JP: **Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor.** *PLoS Biol* 2011;**9**:e1001162.
- 135 Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y: **Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells.** *Cancer Cell* 2009;**15**:195-206.
- 136 Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Terauchi M, Yamamoto E, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F: **Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome.** *Ann Oncol* 2008;**19**:81-85.
- 137 Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA: **Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells.** *Stem Cells* 2009;**27**:2059-2068.
- 138 Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X: **Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells.** *Int J Cancer* 2007;**120**:1891-1898.
- 139 May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA: **Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression.** *Breast Cancer Res* 2011;**13**:202.
- 140 Tobin NP, Sims AH, Lundgren KL, Lehn S, Landberg G: **Cyclin D1, Id1 and EMT in breast cancer.** *BMC Cancer* 2011;**11**:417.
- 141 Visvader JE, Lindeman GJ: **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.** *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:755-768.
- 142 Li Y, Laterra J: **Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes?** *Cancer Res* 2012;**72**:576-580.
- 143 Bonnet D, Dick JE: **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** *Nat Med* 1997;**3**:730-737.

- 144 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ: **Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells.** *Cancer Res* 2005;**65**:10946-10951.
- 145 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di VA, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De MR: **Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population.** *Cell Death Differ* 2008;**15**:504-514.
- 146 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE: **A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.** *Nature* 2007;**445**:106-110.
- 147 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: **Identification of human brain tumour initiating cells.** *Nature* 2004;**432**:396-401.
- 148 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H: **Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**351**:820-824.
- 149 Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS: **In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells.** *Genes Dev* 2003;**17**:1253-1270.
- 150 Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Mazrou A, Barhoush E, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K, Adra CN: **Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers.** *BMC Cancer* 2013;**13**:289.
- 151 Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH: **Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy.** *Curr Protoc Pharmacol* 2013;**14**:Unit-14.25.
- 152 Prud'homme GJ: **Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies.** *Curr Pharm Des* 2012;**18**:2838-2849.
- 153 Dontu G, Liu S, Wicha MS: **Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment.** *Stem Cell Rev* 2005;**1**:207-213.
- 154 Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF, Quraishi AA, Ignatoski KW, Daignault S, Davis A, Hall CL, Palanisamy N, Heath AN, Tawakkol N, Luther TK, Clouthier SG, Chadwick WA, Day ML, Kleer CG, Thomas DG, Hayes DF, Korkaya H, Wicha MS: **HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab.** *Cancer Res* 2013;**73**:1635-1646.

- 155 Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS: **HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion.** *Oncogene* 2008;**27**:6120-6130.
- 156 Rossi DJ, Weissman IL: **Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal.** *Cell* 2006;**125**:229-231.
- 157 Li Y, Bu G: **LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis.** *Future Oncol* 2005;**1**:673-681.
- 158 Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS: **Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells.** *Breast Cancer Res* 2004;**6**:R605-R615.
- 159 Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS: **Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells.** *Cancer Res* 2006;**66**:6063-6071.
- 160 Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytarchou C, Hirsch HA, Tschlis PN, Struhl K: **Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells.** *Mol Cell* 2010;**39**:761-772.
- 161 Polyak K, Weinberg RA: **Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.** *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:265-273.
- 162 Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, Nowrouzi A, Herbst F, Zavidij O, Abel U, Arens A, Weichert W, Brand K, Koch M, Weitz J, Schmidt M, von KC, Glimm H: **Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases.** *Cell Stem Cell* 2011;**9**:357-365.
- 163 Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H: **CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis.** *Breast Cancer Res* 2006;**8**:R59.
- 164 Pandit TS, Kennette W, Mackenzie L, Zhang G, Al-Katib W, Andrews J, Vantyghem SA, Ormond DG, Allan AL, Rodenhiser DI, Chambers AF, Tuck AB: **Lymphatic metastasis of breast cancer cells is associated with differential gene expression profiles that predict cancer stem cell-like properties and the ability to survive, establish and grow in a foreign environment.** *Int J Oncol* 2009;**35**:297-308.
- 165 Croker AK, Allan AL: **Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease.** *J Cell Mol Med* 2008;**12**:374-390.
- 166 Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL: **High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability.** *J Cell Mol Med* 2009;**13**:2236-2252.

- 167 Barriere G, Tartary M, Rigaud M: **Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells.** ISRN Oncol 2012;2012:382010.
- 168 Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W: **Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer.** Pathol Int 2012;62:112-119.
- 169 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T: **Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.** Nat Rev Cancer 2005;5:744-749.
- 170 Shen R, Ye Y, Chen L, Yan Q, Barsky SH, Gao JX: **Precancerous stem cells can serve as tumor vasculogenic progenitors.** PLoS One 2008;3:e1652.
- 171 Bussolati B, Grange C, Sapino A, Camussi G: **Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells.** J Cell Mol Med 2009;13:309-319.
- 172 Domen J, Gandy KL, Weissman IL: **Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation.** Blood 1998;91:2272-2282.
- 173 Peters R, Leyvraz S, Perey L: **Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors.** Blood 1998;92:2041-2052.
- 174 Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Kroghmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD: **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.** Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:15665-15670.
- 175 Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE: **Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes.** Cancer Res 1999;59:8-13.
- 176 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK: **A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells.** Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14228-14233.
- 177 Kawabata S, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Nakatomi K, Tsurutani J, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Sugahara K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S: **Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer.** Clin Cancer Res 2003;9:3052-3057.
- 178 Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS,

- Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K: **Molecular definition of breast tumor heterogeneity**. *Cancer Cell* 2007;**11**:259-273.
- 179 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL: **Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application**. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:759-806.
- 180 Deka J, Wiedemann N, Anderle P, Murphy-Seiler F, Bultinck J, Eyckerman S, Stehle JC, Andre S, Vilain N, Zilian O, Robine S, Delorenzi M, Basler K, Aguet M: **Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas**. *Cancer Res* 2010;**70**:6619-6628.
- 181 Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, Huelsken J: **Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling**. *Nature* 2008;**452**:650-653.
- 182 Moustakas A, Heldin CH: **Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression**. *Cancer Sci* 2007;**98**:1512-1520.
- 183 Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prevost G, Zimmer A, Ouelaa R, Bracke M, De WO, Gespach C: **Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers**. *Drug Resist Updat* 2008;**11**:123-151.
- 184 Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M: **The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion**. *Stem Cell Rev* 2007;**3**:18-29.
- 185 Singh A, Settleman J: **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer**. *Oncogene* 2010;**29**:4741-4751.
- 186 Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC: **Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:13820-13825.
- 187 Robson EJ, Khaled WT, Abell K, Watson CJ: **Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines**. *Differentiation* 2006;**74**:254-264.
- 188 Liao MJ, Zhang CC, Zhou B, Zimonjic DB, Mani SA, Kaba M, Gifford A, Reinhardt F, Popescu NC, Guo W, Eaton EN, Lodish HF, Weinberg RA: **Enrichment of a population of mammary**

**gland cells that form mammospheres and have in vivo repopulating activity.** *Cancer Res* 2007;**67**:8131-8138.

- 189** Stingl J, Caldas C: **Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis.** *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:791-799.
- 190** Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwanning G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA: **Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:10069-10074.
- 191** Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J: **Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype.** *Cancer Res* 2008;**68**:989-997.
- 192** Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, Grabau D, Ferno M, Borg A, Hegardt C: **The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype is enriched in basal-like breast tumors.** *Breast Cancer Res* 2008;**10**:R53.
- 193** Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ: **Stemming resistance to HER-2 targeted therapy.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;**14**:55-66.
- 194** Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB: **Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics.** *Cancer Res* 2009;**69**:4116-4124.
- 195** Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V: **Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression.** *Neoplasia* 2009;**11**:1318-1328.
- 196** Wright MH, Robles AI, Herschkowitz JI, Hollingshead MG, Anver MR, Perou CM, Varticovski L: **Molecular analysis reveals heterogeneity of mouse mammary tumors conditionally mutant for Brca1.** *Mol Cancer* 2008;**7**:29.
- 197** Ansieau S: **EMT in breast cancer stem cell generation.** *Cancer Lett* 2013;**338**:63-68.
- 198** Battula VL, Evans KW, Hollier BG, Shi Y, Marini FC, Ayyanan A, Wang RY, Brisken C, Guerra R, Andreeff M, Mani SA: **Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 2010;**28**:1435-1445.

- 199 Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, Tzeng CH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ: **Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition.** Nat Cell Biol 2010;**12**:982-992.
- 200 Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur HA, Brunton VG, Morton J, Sansom O, Schuler J, Stemmler MP, Herzberger C, Hopt U, Keck T, Brabletz S, Brabletz T: **The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs.** Nat Cell Biol 2009;**11**:1487-1495.
- 201 Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, Shibue T, Tischler V, Reinhardt F, Itzkovitz S, Noske A, Zurrer-Hardi U, Bell G, Tam WL, Mani SA, van OA, Weinberg RA: **Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state.** Cell 2012;**148**:1015-1028.
- 202 Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA: **Cancer stem cells: mirage or reality?** Nat Med 2009;**15**:1010-1012.
- 203 Vermeulen L, de Sousa e Melo, Richel DJ, Medema JP: **The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities.** Lancet Oncol 2012;**13**:e83-e89.
- 204 Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, D'Alessio AC, Young RA, Weinberg RA: **Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity.** Cell 2013;**154**:61-74.
- 205 Jolly MK, Huang B, Lu M, Mani SA, Levine H, Ben-Jacob E: **Towards elucidating the connection between epithelial-mesenchymal transitions and stemness.** J R Soc Interface 2014;**11**:20140962.
- 206 Ombrato L, Malanchi I: **The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation.** Crit Rev Oncog 2014;**19**:349-361.
- 207 Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, Wicha MS: **Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts.** Stem Cell Reports 2014;**2**:78-91.
- 208 Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, Stanbridge EJ, Lee EY: **Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors.** Cancer Res 2008;**68**:3243-3250.



- 209 Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: **Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers.** Clin Cancer Res 2009;**15**:4234-4241.
- 210 Aalaoui-Jamali M, Bijian K, Batist G: **Emerging drug discovery approaches for selective targeting of "precursor" metastatic breast cancer cells: highlights and perspectives.** Am J Transl Res 2011;**3**:434-444.
- 211 Liu H, Zhang HW, Sun XF, Guo XH, He YN, Cui SD, Fan QX: **Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties.** Chin Med J (Engl ) 2013;**126**:3030-3034.
- 212 Liu Y, Zhang X, Liu J, Hou G, Zhang S, Zhang J: **Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study.** Tumour Biol 2014;**35**:1275-1286.
- 213 Zhang X, Zhang S, Liu Y, Liu J, Ma Y, Zhu Y, Zhang J: **Effects of the combination of RAD001 and docetaxel on breast cancer stem cells.** Eur J Cancer 2012;**48**:1581-1592.
- 214 Zhu Y, Zhang X, Liu Y, Zhang S, Liu J, Ma Y, Zhang J: **Antitumor effect of the mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab on human breast cancer stem cells in vitro and in vivo.** Tumour Biol 2012;**33**:1349-1362.
- 215 Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, Pritchard KI, Lebrun F, Ito Y, Noguchi S, Perez A, Rugo HS, Deleu I, Burris HA, III, Provencher L, Neven P, Gnant M, Shtivelband M, Wu C, Fan J, Feng W, Taran T, Baselga J: **Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2dagger.** Ann Oncol 2014;**25**:2357-2362.
- 216 Kondratyev M, Kreso A, Hallett RM, Girgis-Gabardo A, Barcelon ME, Ilieva D, Ware C, Majumder PK, Hassell JA: **Gamma-secretase inhibitors target tumor-initiating cells in a mouse model of ERBB2 breast cancer.** Oncogene 2012;**31**:93-103.
- 217 Rasul S, Balasubramanian R, Filipovic A, Slade MJ, Yague E, Coombes RC: **Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells.** Br J Cancer 2009;**100**:1879-1888.
- 218 Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, Butowski N, Groves MD, Kesari S, Freedman SJ, Blackman S, Watters J, Loboda A, Podtelezchnikov A, Lunceford J, Chen C, Giannotti M, Hing J, Beckman R, Lorusso P: **Phase I pharmacologic and pharmacodynamic**

**study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors.** *J Clin Oncol* 2012;**30**:2307-2313.

- 219 Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, Nuovo G, Li X, Shapiro CL, Majumder S: **Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway.** *Cancer Res* 2012;**72**:5048-5059.
- 220 Al-Hussaini H, Subramanyam D, Reedijk M, Sridhar SS: **Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer.** *Mol Cancer Ther* 2011;**10**:9-15.
- 221 Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AM, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, Hassell JA: **Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer.** *PLoS One* 2012;**7**:e33976.
- 222 Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML: **Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy.** *Nature* 2008;**455**:1205-1209.
- 223 Shimo T, Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Kozuka Y, Moriya T, Sonoo H: **Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells.** *Breast Cancer* 2014;**21**:75-85.
- 224 Bhat-Nakshatri P, Goswami CP, Badve S, Sledge GW, Jr., Nakshatri H: **Identification of FDA-approved drugs targeting breast cancer stem cells along with biomarkers of sensitivity.** *Sci Rep* 2013;**3**:2530.
- 225 Bryan M, Pulte ED, Toomey KC, Pliner L, Pavlick AC, Saunders T, Wiedner R: **A pilot phase II trial of all-trans retinoic acid (Vesanoid) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer.** *Invest New Drugs* 2011;**29**:1482-1487.
- 226 Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES: **Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening.** *Cell* 2009;**138**:645-659.
- 227 Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K: **Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission.** *Cancer Res* 2009;**69**:7507-7511.
- 228 Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, Asaga T, Minami H, Yamamoto N, Aogi K, Ikeda T, Ohashi Y, Sato W, Tsuruo T: **Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007;**25**:411-417.

- 229 Zhang Y, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q: **The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles.** *Biomaterials* 2012;**33**:679-691.
- 230 Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R: **Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia.** *Clin Cancer Res* 2001;**7**:1490-1496.
- 231 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE: **Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells.** *Nat Med* 2006;**12**:1167-1174.
- 232 Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gearing DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB: **Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2009;**5**:31-42.
- 233 Waldron NN, Kaufman DS, Oh S, Inde Z, Hexum MK, Ohlfest JR, Vallera DA: **Targeting tumor-initiating cancer cells with dCD133KDEL shows impressive tumor reductions in a xenotransplant model of human head and neck cancer.** *Mol Cancer Ther* 2011;**10**:1829-1838.
- 234 Melton C, Judson RL, Belloch R: **Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells.** *Nature* 2010;**463**:621-626.
- 235 Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholak HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, Clouthier SG, Wicha MS: **Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population.** *Mol Cell* 2012;**47**:570-584.
- 236 Bilancia D, Rosati G, Dinota A, Germano D, Romano R, Manzione L: **Lapatinib in breast cancer.** *Ann Oncol* 2007;**18**:vi26-vi30.
- 237 Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, Wicinski J, Cabaud O, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D, Guan JL, Dontu G, Wicha MS: **CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts.** *J Clin Invest* 2010;**120**:485-497.
- 238 Singh JK, Farnie G, Bundred NJ, Simoes BM, Shergill A, Landberg G, Howell SJ, Clarke RB: **Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms.** *Clin Cancer Res* 2013;**19**:643-656.

- 239 Chen YL, Lv J, Ye XL, Sun MY, Xu Q, Liu CH, Min LH, Li HP, Liu P, Ding X: **Sorafenib inhibits transforming growth factor beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes.** *Hepatology* 2011;**53**:1708-1718.
- 240 Steinestel J, Cronauer MV, Muller J, Al GA, Skowronek P, Arndt A, Kraft K, Schrader M, Schrader AJ, Steinestel K: **Overexpression of p16(INK4a) in urothelial carcinoma in situ is a marker for MAPK-mediated epithelial-mesenchymal transition but is not related to human papillomavirus infection.** *PLoS One* 2013;**8**:e65189.
- 241 Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, Bedja D, Bisht S, Alvarez H, Koorstra JB, Habbe N, Karikari C, Mullendore M, Gabrielson KL, Sharma R, Matsui W, Maitra A: **An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer.** *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:2725-2735.
- 242 Pelaez-Garcia A, Barderas R, Torres S, Hernandez-Varas P, Teixido J, Bonilla F, de Herreros AG, Casal JI: **FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer.** *PLoS One* 2013;**8**:e63695.
- 243 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK: **Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells.** *Cancer Res* 2008;**68**:2391-2399.
- 244 Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ, Alvarez H, Maitra A: **The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target.** *Cancer Biol Ther* 2009;**8**:618-626.
- 245 Park CY, Kim DK, Sheen YY: **EW-7203, a novel small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor/activin receptor-like kinase-5, blocks TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells.** *Cancer Sci* 2011;**102**:1889-1896.
- 246 Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Del BS, Martin-Castillo B, Menendez JA: **Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status.** *Cell Cycle* 2010;**9**:3807-3814.
- 247 Shankar S, Nall D, Tang SN, Meeker D, Passarini J, Sharma J, Srivastava RK: **Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition.** *PLoS One* 2011;**6**:e16530.

- 248 Ashworth TR: **A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death.** *Aus Med J* 1869;**14**:146-9.
- 249 Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TW, Lorenz R, Tesch H, Fasching PA, Fehm T, Schneeweiss A, Lichtenegger W, Beckmann MW, Friese K, Pantel K, Janni W: **Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients.** *J Natl Cancer Inst* 2014;**106**:dju066.
- 250 Alix-Panabieres C, Pantel K: **Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.** *Clin Chem* 2013;**59**:110-118.
- 251 Norton L, Massague J: **Is cancer a disease of self-seeding?** *Nat Med* 2006;**12**:875-878.
- 252 Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, Kontopodis E, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulis V: **Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer.** *Br J Cancer* 2009;**101**:589-597.
- 253 Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de CP, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelenat H: **Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004;**10**:1392-1400.
- 254 Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S, Juckstock J, Jeschke U, Sommer H, Friese K, Janni W, Rack B: **Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;**139**:1055-1062.
- 255 Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K: **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005;**353**:793-802.
- 256 Ignatiadis M, Rothe F, Chaboteaux C, Durbecq V, Rouas G, Criscitiello C, Metallo J, Kheddoumi N, Singhal SK, Michiels S, Veys I, Rossari J, Larsimont D, Carly B, Pestrin M, Bessi S, Buxant F, Liebens F, Piccart M, Sotiriou C: **HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer.** *PLoS One* 2011;**6**:e15624.
- 257 Lianidou ES, Markou A, Strati A: **Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment.** *Cancer Metastasis Rev* 2012;**31**:663-671.

- 258 Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C: **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** *N Engl J Med* 2012;**366**:883-892.
- 259 Fehm T, Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K: **Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance.** *Breast Cancer Res* 2008;10 Suppl 1:S1.
- 260 Amir E, Clemons M, Purdie CA, Miller N, Quinlan P, Geddie W, Coleman RE, Freedman OC, Jordan LB, Thompson AM: **Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies.** *Cancer Treat Rev* 2012;**38**:708-714.
- 261 Wong NS, Kahn HJ, Zhang L, Oldfield S, Yang LY, Marks A, Trudeau ME: **Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2006;**99**:63-69.
- 262 Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Janne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE: **A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells.** *Anticancer Res* 2011;**31**:427-441.
- 263 Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P: **Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells.** *Am J Pathol* 2000;**156**:57-63.
- 264 Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ, Tai YC: **Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells.** *J Chromatogr A* 2007;**1162**:154-161.
- 265 Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR: **Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood.** *Cytometry* 2002;**49**:150-158.
- 266 Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR: **Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation.** *Recent Results Cancer Res* 2003;**162**:149-155.

- 267 Woelfle U, Breit E, Zafrakas K, Otte M, Schubert F, Muller V, Izbicki JR, Loning T, Pantel K: **Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients.** *J Immunol Methods* 2005;**300**:136-145.
- 268 Galanzha EI, Zharov VP: **Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo.** *Cancers (Basel)* 2013;**5**:1691-1738.
- 269 Zhang Z, Xu J, Hong B, Chen X: **The effects of 3D channel geometry on CTC passing pressure-towards deformability-based cancer cell separation.** *Lab Chip* 2014;**14**:2576-2584.
- 270 Moon HS, Kwon K, Kim SI, Han H, Sohn J, Lee S, Jung HI: **Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP).** *Lab Chip* 2011;**11**:1118-1125.
- 271 Alazzam A, Stiharu I, Bhat R, Meguerditchian AN: **Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis.** *Electrophoresis* 2011;**32**:1327-1336.
- 272 Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, Davis DW: **ApoStream(), a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood.** *Biomicrofluidics* 2012;**6**:24133.
- 273 Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S: **Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.** *Hum Pathol* 2004;**35**:122-128.
- 274 Failli A, Legitimo A, Migheli F, Coppede F, Mathers JC, Spisni R, Miccoli P, Migliore L, Consolini R: **Efficacy and feasibility of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) immunomagnetic cell sorter for studies of DNA methylation in colorectal cancer.** *Int J Mol Sci* 2014;**15**:44-57.
- 275 Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H, Ida A: **Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer.** *Int J Cancer* 2000;**89**:337-344.
- 276 Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K: **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system.** *Clin Cancer Res* 2007;**13**:920-928.

- 277 Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlaeger C, Goebel S, Melchior A, Heynemann H, Fornara P, Taubert H: **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;**18**:2190-2194.
- 278 Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T: **Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells.** *Breast Cancer Res* 2012;**14**:R15.
- 279 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M: **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature* 2007;**450**:1235-1239.
- 280 Naume B, Borgen E, Tossvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM: **Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method.** *Cytotherapy* 2004;**6**:244-252.
- 281 Kroes R, Williams GM, Weisburger JH: **Early appearance of serum -fetoprotein during hepatocarcinogenesis as a function of age of rats and extent of treatment with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene.** *Cancer Res* 1972;**32**:1526-1532.
- 282 Shi W, Paproski RJ, Moore R, Zemp R: **Detection of circulating tumor cells using targeted surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and magnetic enrichment.** *J Biomed Opt* 2014;**19**:056014.
- 283 Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA: **Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells.** *J Natl Cancer Inst* 2009;**101**:61-66.
- 284 Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, Frohman MA, Golightly MG, Madajewicz S, Chen WT: **Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients.** *Int J Cancer* 2010;**126**:669-683.
- 285 Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, Martel JM, Kojic N, Smith K, Chen PI, Yang J, Hwang H, Morgan B, Trautwein J, Barber TA, Stott SL, Maheswaran S, Kapur R, Haber DA, Toner M: **Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples.** *Nat Protoc* 2014;**9**:694-710.



- 286 Hannemann J, Meyer-Staeckling S, Kemming D, Alpers I, Joosse SA, Pospisil H, Kurtz S, Gorndt J, Puschel K, Riethdorf S, Pantel K, Brandt B: **Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells**. PLoS One 2011;**6**:e26362.
- 287 Peeters DJ, De LB, Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Rothe F, Ignatiadis M, Sieuwerts AM, Lambrechts D, Rutten A, van Dam PA, Pauwels P, Peeters M, Vermeulen PB, Dirix LY: **Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting**. Br J Cancer 2013;**108**:1358-1367.
- 288 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF: **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer**. N Engl J Med 2004;**351**:781-791.
- 289 Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, Stournaras C: **Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells**. Mol Med 2007;**13**:79-88.
- 290 Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukarakaki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, Georgoulas V, Mavroudis D, Agelaki S: **Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients**. Breast Cancer Res 2009;**11**:R84.
- 291 Spiliotaki M, Mavroudis D, Kapranou K, Markomanolaki H, Kallergi G, Koinis F, Kalbakis K, Georgoulas V, Agelaki S: **Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy**. Breast Cancer Res 2014;**16**:485.
- 292 Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF: **Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients**. Breast Cancer Res 2008;**10**:R69.
- 293 Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus N, Kuhn P, Bruce RH, Nieva J: **High speed detection of circulating tumor cells**. Biosens Bioelectron 2006;**21**:1893-1899.
- 294 Balic M, Williams A, Dandachi N, Cote RJ: **Micrometastasis: detection methods and clinical importance**. Cancer Biomark 2010;**9**:397-419.

- 295 Gao X, Yang L, Petros JA, Marshall FF, Simons JW, Nie S: **In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots.** *Curr Opin Biotechnol* 2005;**16**:63-72.
- 296 Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Hoffken K: **Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer.** *Clin Chem Lab Med* 2005;**43**:617-627.
- 297 Scholtens TM, Schreuder F, Ligthart ST, Swennenhuis JF, Tibbe AG, Greve J, Terstappen LW: **CellTracks TDI: an image cytometer for cell characterization.** *Cytometry A* 2011;**79**:203-213.
- 298 Wang N, Shi L, Li H, Hu Y, Du W, Liu W, Zheng J, Huang S, Qu X: **Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation.** *Tumour Biol* 2012;**33**:561-569.
- 299 Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz W, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lucke K: **A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire.** *Int J Oncol* 2012;**41**:1241-1250.
- 300 Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA, Lynch TJ: **The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients.** *J Thorac Oncol* 2009;**4**:281-283.
- 301 Horak D, Svobodova Z, Autebert J, Coudert B, Plichta Z, Kralovec K, Bilkova Z, Viovy JL: **Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: application to the capture of epithelial cancer cells.** *J Biomed Mater Res A* 2013;**101**:23-32.
- 302 Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, Ionescu-Zanetti C: **Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay.** *Transl Oncol* 2013;**6**:528-538.
- 303 Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenberg SM, Shah AM, Smas ME, Korir GK, Floyd FP, Jr., Gilman AJ, Lord JB, Winokur D, Springer S, Irimia D, Nagrath S, Sequist LV, Lee RJ, Isselbacher KJ, Maheswaran S, Haber DA, Toner M: **Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:18392-18397.
- 304 Riahi R, Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, Handique K, Godsey J, Wang Y: **A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer.** *Int J Oncol* 2014;**44**:1870-1878.

- 305 Alix-Panabieres C: **EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients.** Recent Results Cancer Res 2012;**195**:69-76.
- 306 Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC: **Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction.** Cancer Res 1994;**54**:2986-2990.
- 307 Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D: **Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers.** Trends Mol Med 2006;**12**:130-139.
- 308 Gerges N, Rak J, Jabado N: **New technologies for the detection of circulating tumour cells.** Br Med Bull 2010;**94**:49-64.
- 309 Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE: **Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction.** Lancet 1991;**338**:1227-1229.
- 310 Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D: **Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer.** Clin Cancer Res 2008;**14**:2593-2600.
- 311 Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, Stathopoulos EN, Chlouverakis G, Lianidou E, Kakolyris S, Georgoulas V, Mavroudis D: **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.** J Clin Oncol 2009;**27**:2177-2184.
- 312 Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulas V, Mavroudis D: **Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients.** J Clin Oncol 2006;**24**:3756-3762.
- 313 Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM: Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: **implications for a role of MUC1 in normal immune regulation.** Cancer Res 1998;**58**:4079-4081.
- 314 Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES: **Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system.** Clin Cancer Res 2003;**9**:5145-5151.

- 315 Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES: **A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer.** *Int J Cancer* 2006;**119**:1654-1659.
- 316 Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, Parisi C, Lianidou ES: **Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2013;**15**:R20.
- 317 Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M: **Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system.** *Int J Cancer* 2012;**130**:1590-1597.
- 318 Payne RE, Wang F, Su N, Krell J, Zebrowski A, Yague E, Ma XJ, Luo Y, Coombes RC: **Viable circulating tumour cell detection using multiplex RNA in situ hybridisation predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients.** *Br J Cancer* 2012;**106**:1790-1797.
- 319 Van dA, I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prove A, Maes H, Huget P, van DP, Vermeulen PB, Dirix LY: **Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer.** *Br J Cancer* 2010;**102**:276-284.
- 320 Muller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Fehm T: **Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System and AdnaTest Breast in metastatic breast cancer patients: the DETECT study.** *Breast Cancer Res* 2012;**14**:R118.
- 321 Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JS, Liu MC, McCormack R, Mikulski S, Nagahara L, Pantel K, Pearson-White S, Punnoose EA, Roadcap LT, Schade AE, Scher HI, Sigman CC, Kelloff GJ: **Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use.** *J Transl Med* 2012;**10**:138.
- 322 Mikulova V, Cabinakova M, Janatkova I, Mestek O, Zima T, Tesarova P: **Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy.** *Scand J Clin Lab Invest* 2014;**74**:132-142.

- 323 Rack B, Bock C, Andergassen U, Doisneau-Sixou S: **Hormone receptor status, erbB2 expression and cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells in breast cancer patients.** *Histol Histopathol* 2012;**27**:855-864.
- 324 Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V: **Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance.** *J Clin Oncol* 2002;**20**:3404-3412.
- 325 Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos EN, Stathopoulou A, Lianidou E, Chlouverakis G, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D: **Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007;**25**:5194-5202.
- 326 Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, Agelaki S, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D: **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse.** *Breast Cancer Res* 2011;**13**:R60.
- 327 Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de CP, Marty M, Pierga JY: **Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer.** *Ann Oncol* 2010;**21**:729-733.
- 328 Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de CP, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M: **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial.** *Clin Cancer Res* 2008;**14**:7004-7010.
- 329 Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I, Hilfrich J, Holms F, Tesch H, Eidtmann H, Untch M, von MG, Pantel K: **Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.** *Clin Cancer Res* 2010;**16**:2634-2645.
- 330 Serrano MJ, Rovira PS, Martinez-Zubiaurre I, Rodriguez MD, Fernandez M, Lorente JA: **Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy.** *Exp Ther Med* 2012;**4**:43-48.

- 331 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF: **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** N Engl J Med 2004;**351**:781-791.
- 332 Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT: **Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications.** Ann Oncol 2008;**19**:891-897.
- 333 Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: **Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies.** Breast Cancer Res Treat 2009;**115**:581-590.
- 334 Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW: **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** Clin Cancer Res 2006;**12**:4218-4224.
- 335 Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC: **Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques.** J Clin Oncol 2000;**18**:1432-1439.
- 336 Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF: **Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.** Clin Cancer Res 2006;**12**:6403-6409.
- 337 Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW: **Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.** J Clin Oncol 2005;**23**:1420-1430.
- 338 Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Dieras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C, Bidard FC: **High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients.** Ann Oncol 2012;**23**:618-624.
- 339 Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, Tejwani S, Schott AF, O'Rourke MA, Lew DL, Doyle GV, Gralow JR, Livingston RB, Hayes DF:

**Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500.** J Clin Oncol 2014;**32**:3483-3489.

- 340** Bidard FC, Mathiot C, Degeorges A, Etienne-Grimaldi MC, Delva R, Pivot X, Veyret C, Bergougnoux L, de CP, Milano G, Pierga JY: **Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy.** Ann Oncol 2010;**21**:1765-1771.
- 341** Giordano A, Giuliano M, De LM, Arpino G, Jackson S, Handy BC, Ueno NT, Andreopoulou E, Alvarez RH, Valero V, De PS, Hortobagyi GN, Reuben JM, Cristofanilli M: **Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy.** Ann Oncol 2012;**23**:1144-1150.
- 342** Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, De GU, Meigs M, Handy BC, Ueno NT, Alvarez RH, De LM, De PS, Valero V, Hortobagyi GN, Reuben JM, Cristofanilli M: **Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment.** Breast Cancer Res 2011;**13**:R67.
- 343** Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: **Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells.** Breast Cancer Res 2009;**11**:R59.
- 344** Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Lattrich C, Lohberg CR, Solomayer E, Rack B, Riethdorf S, Klein C, Schindlbeck C, Brocker K, Kasimir-Bauer S, Wallwiener D, Pantel K: **HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial.** Breast Cancer Res Treat 2010;**124**:403-412.
- 345** Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh HB, Liu X, Yang L, Krivacic R, Bruce RH: **Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology.** Breast Cancer Res Treat 2011;**128**:155-163.
- 346** Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabieres C, Janni W, Messina C, Paoletti C, Muller V, Hayes DF, Piccart M, Pierga JY: **Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials.** Cancer Metastasis Rev 2013;**32**:179-188.
- 347** Bidard FC, Pierga JY, Soria JC, Thierry JP: **Translating metastasis-related biomarkers to the clinic--progress and pitfalls.** Nat Rev Clin Oncol 2013;**10**:169-179.

- 348 Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulas V: **Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2008;**10**:R80.
- 349 Kalykaki A, Agelaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulas V: **Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;**73**:685-693.
- 350 Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, Georgoulas V, Mavroudis D, Agelaki S: **Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2009;**11**:R84.
- 351 Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Lane N, Wang J, Uhr J: **uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:17361-17365.
- 352 Chen Q, Massague J: **Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis.** *Clin Cancer Res* 2012;**18**:5520-5525.
- 353 Wu QD, Wang JH, Condrón C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP: **Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;**280**:C814-C822.
- 354 Roberts WG, Whalen PM, Soderstrom E, Moraski G, Lyssikatos JP, Wang HF, Cooper B, Baker DA, Savage D, Dalvie D, Atherton JA, Ralston S, Szewc R, Kath JC, Lin J, Soderstrom C, Tkalcevic G, Cohen BD, Pollack V, Barth W, Hungerford W, Ung E: **Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451.** *Cancer Res* 2005;**65**:957-966.
- 355 Simon M, Stefan N, Pluckthun A, Zangemeister-Wittke U: **Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy.** *Expert Opin Drug Deliv* 2013;**10**:451-468.
- 356 Baumann K, Pfisterer J, Wimberger P, Burchardi N, Kurzeder C, du BA, Loibl S, Sehouli J, Huober J, Schmalfeldt B, Vergote I, Luck HJ, Wagner U: **Intraperitoneal treatment with the trifunctional bispecific antibody Catumaxomab in patients with platinum-resistant epithelial ovarian cancer: a phase IIa study of the AGO Study Group.** *Gynecol Oncol* 2011;**123**:27-32.
- 357 Kallergi G, Konstantinidis G, Markomanolaki H, Papadaki MA, Mavroudis D, Stournaras C, Georgoulas V, Agelaki S: **Apoptotic circulating tumor cells in early and metastatic breast cancer patients.** *Mol Cancer Ther* 2013;**12**:1886-1895.



- 358 Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Janicke F, Pantel K: **Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** Clin Cancer Res 2005;**11**:3678-3685.
- 359 Wan L, Pantel K, Kang Y: **Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic.** Nat Med 2013;**19**:1450-1464.
- 360 Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ: **Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype.** Clin Cancer Res 2006;**12**:5615-5621.
- 361 Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmuller G, Pantel K: **Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases.** Cancer Res 1999;**59**:241-248.
- 362 Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, Herold CI, Marcom PK, George DJ, Garcia-Blanco MA: **Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers.** Mol Cancer Res 2011;**9**:997-1007.
- 363 Barriere G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M: **Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis.** BMC Cancer 2012;**12**:114.
- 364 Barriere G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M: **Mesenchymal characterization: alternative to simple CTC detection in two clinical trials.** Anticancer Res 2012;**32**:3363-3369.
- 365 Gazzaniga P, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gianni W, Frati L, Agliano AM: **Chemoresistance profile of circulating tumor cells: toward a clinical benefit?** Int J Cancer 2008;**123**:1730-1732.
- 366 Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E, Gandini O, Vincenzi B, Saltarelli R, Chiapparino E, Spremberg F, Cristofanilli M, Frati L, Agliano AM, Gazzaniga P: **Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization.** Ann Oncol 2011;**22**:86-92.
- 367 Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C, Petracca A, Gandini O, Vincenzi B, Naso G, Agliano AM, Cortesi E, Gazzaniga P: **Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal.** J Cell Mol Med 2011;**15**:1066-1070.

- 368 Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S: **Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition.** *Science* 2013;**339**:580-584.
- 369 Reuben JM, Lee BN, Gao H, Cohen EN, Mego M, Giordano A, Wang X, Lodhi A, Krishnamurthy S, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Woodward WA: **Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44(+)CD24lo cancer stem cell phenotype.** *Eur J Cancer* 2011;**47**:1527-1536.
- 370 Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, Tin S, De LM, Parker CA, Alvarez RH, Valero V, Ueno NT, De PS, Mani SA, Esteva FJ, Cristofanilli M, Reuben JM: **Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer.** *Mol Cancer Ther* 2012;**11**:2526-2534.
- 371 Mego M, Gao H, Lee BN, Cohen EN, Tin S, Giordano A, Wu Q, Liu P, Nieto Y, Champlin RE, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Ueno NT, Reuben JM: **Prognostic Value of EMT-Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients Undergoing High-Dose Chemotherapy with Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *J Cancer* 2012;**3**:369-380.
- 372 Lowes LE, Hedley BD, Keeney M, Allan AL: **User-defined protein marker assay development for characterization of circulating tumor cells using the CellSearch(R) system.** *Cytometry A* 2012;**81**:983-995.
- 373 Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de VJ, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA: **Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR.** *Breast Cancer Res Treat* 2009;**118**:455-468.
- 374 Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo J, Yin W, Kumar D, Goodman JC, Groves MD, Marchetti D: **The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis.** *Sci Transl Med* 2013;**5**:180ra48.
- 375 Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bauerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Hofner T, Sprick M, Scharpf M, Marme F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A: **Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay.** *Nat Biotechnol* 2013;**31**:539-544.

- 376 Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C: **Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers**. Nat Rev Clin Oncol 2014;**11**:129-144.
- 377 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T: **Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression**. Nat Rev Cancer 2005;**5**:744-749.
- 378 Tobin NP, Sims AH, Lundgren KL, Lehn S, Landberg G: **Cyclin D1, Id1 and EMT in breast cancer**. BMC Cancer 2011;**11**:417.
- 379 Kang Y, Massague J: **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis**. Cell 2004;**118**:277-279.
- 380 Yoon HJ, Kim TH, Zhang Z, Azizi E, Pham TM, Paoletti C, Lin J, Ramnath N, Wicha MS, Hayes DF, Simeone DM, Nagrath S: **Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets**. Nat Nanotechnol 2013;**8**:735-741.
- 381 Planchon SM, Waite KA, Eng C: **The nuclear affairs of PTEN**. J Cell Sci 2008;**121**:249-253.
- 382 Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC: **Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression**. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**:4262-4266.
- 383 Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R: **Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer**. Oncogene 2001;**20**:8109-8115.
- 384 O'Brate A, Giannakakou P: **The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?** Drug Resist Updat 2003;**6**:313-322.
- 385 Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F: **ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome**. Lab Invest 2010;**90**:234-244.
- 386 Neumeister V, Rimm D: **Is ALDH1 a good method for definition of breast cancer stem cells?** Breast Cancer Res Treat 2010;**123**:109-111.
- 387 Su Y, Qiu Q, Zhang X, Jiang Z, Leng Q, Liu Z, Stass SA, Jiang F.: **Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer**. [Cancer](#) Epidemiol Biomarkers Prev 2010;**19**:327-337.
- 388 Schwoebel ED, Moore MS: **The control of gene expression by regulated nuclear transport**. Essays Biochem 2000;**36**:105-113.

- 389 Gong T, Xue Z, Tang S, Zheng X, Xu G, Gao L, Zhao G, Hong L, Tang G, Zhang H, Wang R, Jiang Y, Fan D: **Nuclear expression of Twist promotes lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2012;**13**:606-613.
- 390 Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW: **Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer.** *Histopathology* 2007;**50**:648-658.
- 391 Lu M, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Ben-Jacob E: **MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:18144-18149.
- 392 Li J, Zhou BP: **Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters.** *BMC Cancer* 2011;**11**:49.
- 393 Yang J, Mani SA, Weinberg RA: **Exploring a new twist on tumor metastasis.** *Cancer Res* 2006;**66**:4549-4552.
- 394 Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Tanimoto A: **Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer.** *Histopathology* 2011;**59**:776-780.
- 395 Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, Souda M, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Rai Y, Tanimoto A: **Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study.** *Histopathology* 2011;**58**:608-616.
- 396 Avoranta ST, Korkeila EA, Ristamaki RH, Syrjanen KJ, Carpen OM, Pyrhonen SO, Sundstrom JT: **ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer.** *Hum Pathol* 2013;**44**:966-974.
- 397 Hegde GV, de la Cruz C, Eastham-Anderson J, Zheng Y, Sweet-Cordero EA, Jackson EL: **Residual tumor cells that drive disease relapse after chemotherapy do not have enhanced tumor initiating capacity.** *PLoS One* 2012;**7**:e45647.
- 398 Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S: **Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression.** *Cancer Sci* 2009;**100**:1062-1068.

- 399** Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL: **In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis.** Am J Pathol 2010;**176**:2131-2138.
- 400** Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, Badve S: **Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment.** Breast Cancer Res Treat 2010;**123**:97-108.
- 401** Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW: **Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis.** Stem Cells 2011;**29**:32-45.
- 402** Takao M, Takeda K: **Enumeration, characterization, and collection of intact circulating tumor cells by cross contamination-free flow cytometry.** Cytometry A 2011;**79**:107-117.

## Πίνακας Συντμήσεων

ΔΚΚ	Διεσπαρμένα Καρκινικά Κύτταρα
EMM	Επιθηλιο-Μεσεγγυματική Μετάβαση
ΚΒΚ	Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα
ΚΚΚ	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
MEM	Μεσεγγυματο-Επιθηλιακή Μετάβαση
7-AAD	7-aminoactinomycin D
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
CK	Cytokeratin
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
Dapi	4', 6-doamidino-2-phenylindole
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
HeLa	Henrietta Lacks
HepG2	Human Liver Hepatocellular Carcinoma
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
SEM	Standard Error of Mean

**Δημοσίευση στα πλαίσια της  
διδακτορικής διατριβής**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer

Maria A Papadaki<sup>1†</sup>, Galatea Kallergi<sup>1\*†</sup>, Zafeiris Zafeiriou<sup>1,2</sup>, Lefteris Manouras<sup>1</sup>, Panayiotis A Theodoropoulos<sup>3</sup>, Dimitris Mavroudis<sup>1,2</sup>, Vassilis Georgoulas<sup>1,2</sup> and Sofia Agelaki<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** The detection of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood (PB) of patients with breast cancer predicts poor clinical outcome. Cancer cells with stemness and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) features display enhanced malignant and metastatic potential. A new methodology was developed in order to investigate the co-expression of a stemness and an EMT marker (ALDH1 and TWIST, respectively) on single CTCs of patients with early and metastatic breast cancer.

**Methods:** Triple immunofluorescence using anti-pancytokeratin (A45-B/B3), anti-ALDH1 and anti-TWIST antibodies was performed in cytopspins prepared from hepatocellular carcinoma HepG2 cells and SKBR-3, MCF-7 and MDA-MB.231 breast cancer cell lines. Evaluation of ALDH1 expression levels (high, low or absent) and TWIST subcellular localization (nuclear, cytoplasmic or absent) was performed using the ARIOL system. Cytopspins prepared from peripheral blood of patients with early (n = 80) and metastatic (n = 50) breast cancer were analyzed for CTC detection (based on pan-cytokeratin expression and cytomorphological criteria) and characterized according to ALDH1 and TWIST.

**Results:** CTCs were detected in 13 (16%) and 25 (50%) patients with early and metastatic disease, respectively. High ALDH1 expression (ALDH1<sup>high</sup>) and nuclear TWIST localization (TWIST<sup>nu</sup>) on CTCs was confirmed in more patients with metastatic than early breast cancer (80% vs. 30.8%, respectively; p = 0.009). In early disease, ALDH1<sup>low/neg</sup> CTCs (p = 0.006) and TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs (p = 0.040) were mainly observed. Regarding co-expression of these markers, ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nu</sup> CTCs were more frequently evident in the metastatic setting (76% vs. 15.4% of patients, p = 0.001; 61.5% vs. 12.9% of total CTCs), whereas in early disease ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were mainly detected (61.5% vs. 20% of patients, p = 0.078; 41.9% vs. 7.7% of total CTCs).

**Conclusions:** A new assay is provided for the evaluation of ALDH1 and TWIST co-expression at the single CTC-level in patients with breast cancer. A differential expression pattern for these markers was observed both in early and metastatic disease. CTCs expressing high ALDH1, along with nuclear TWIST were more frequently detected in patients with metastatic breast cancer, suggesting that these cells may prevail during disease progression.

\* Correspondence: [kalergi@med.uoc.gr](mailto:kalergi@med.uoc.gr)

†Equal contributors

<sup>1</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, GR-71110 Heraklion, Crete, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Circulating tumor cells (CTCs) have been identified in peripheral blood (PB) of patients with breast cancer and their presence has been associated with poor disease outcome [1-4]. It has been suggested that CTCs are extremely heterogeneous and that they include the population of cells giving rise to overt metastases [5]. Therefore further characterization of CTCs at the single cell level would be of utmost importance in order to understand their individual biologic role.

Several studies in many tumor types, including breast cancer, reported that there is a subset of cells with stemness properties, named cancer stem cells (CSCs). These cells are proposed to display enhanced malignant and metastatic potential [6-8]. Tumor cells with increased activity of the detoxifying enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) are considered as putative breast CSCs, due to their self-renewal capacity as shown by serial passages in Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency (NOD/SCID) mice and their ability to regenerate the cellular heterogeneity of the initial tumor [9]. Ginstier et al., showed a correlation between ALDH activity and ALDH1 expression in breast cancer cells [10]. Moreover, the expression of ALDH1 in primary tumors has been associated with poor prognosis in patients with breast cancer [10-12]. We, among others, have recently reported that CTCs expressing ALDH1 are detectable in patients with metastatic breast cancer, suggesting that this "stemness phenotype" could be related to metastases formation [13,14].

There is growing evidence suggesting that both tumor growth and metastatic dissemination take place through a phenotypic modulation known as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process by which tumor cells lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal phenotype [15,16]. TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor has been proposed among others as a putative biomarker for EMT [17,18]. A positive association between the expression of TWIST in primary tumors and the risk for recurrence and poor survival has been shown in breast cancer [19-21]. Moreover, we have recently reported that TWIST expressing CTCs are frequently observed in patients with breast cancer [22,23], suggesting that cancer cells might undergo EMT during vessel invasion, circulation and migration to metastatic sites.

Recent studies have shown a direct link between CSCs and EMT in breast cancer, suggesting that EMT generates cancer cells with stem cell-like traits [24-26]. Co-expression of stem cell and EMT markers at the mRNA expression level has been shown on CTCs of breast cancer patients [27,28]; however, this has not been demonstrated on single CTCs as yet. Taking into account the considerable heterogeneity of CTCs, the presence of

both stemness and EMT characteristics on individual CTCs could distinguish a population of cells with enhanced metastatic potential.

In the present study we developed a new methodology using the ARIOL system, in order to evaluate the protein expression pattern of a putative stemness (ALDH1) and an EMT (TWIST) marker on CTCs of early and metastatic breast cancer patients. We aimed to investigate the co-expression of these markers at the single CTC-level and to evaluate the incidence of distinct CTC subpopulations in early and metastatic disease.

## Methods

### Patient samples

Peripheral blood (10 ml) was obtained from patients with early (n = 80) and metastatic (n = 50) breast cancer, before the initiation of adjuvant and first-line chemotherapy, respectively. In order to avoid contamination with epithelial cells derived from the skin, blood was obtained at the middle of vein puncture, after the first 5 ml were discarded. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cytopins were prepared and stored until use. In the current study, prospectively collected cytopins were analyzed. Peripheral blood was also obtained from healthy blood donors (n = 20). All patients and healthy volunteers gave their written informed consent to participate in the study, which has been approved by the Ethics and Scientific Committees of the University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece.

### Cytospin preparation

PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient (d = 1,077 gr/mol) centrifugation at 1.800 rpm for 30 min. PBMCs were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 1.600 rpm for 10 min. Aliquots of 250.000 cells were cyto-centrifuged at 2.000 rpm for 2 min on glass slides. Air-dried cytopins were stored at -80°C.

### Cell cultures

All cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The HepG2 (human liver hepatocellular carcinoma), MCF-7 and MDA.MB.231 cells were cultured in high glucose GlutaMAX<sup>(tm)</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO-BRL Co, MD, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL) and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO-BRL). MCF-7 cell culture medium was additionally supplemented with 0.28% insulin. SKBR-3 cells were cultured in high glucose GlutaMAX<sup>(tm)</sup> McCoys5A medium (GIBCO-BRL) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>- 95% air at 37°C. Subcultivation of all cell lines was performed using

0.25% trypsin and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (GIBCO-BRL).

#### **Immunofluorescence assay**

PBMCs' cytopsin preparations were triple-stained with pan-cytokeratin, ALDH1 and TWIST. Cytokeratin-positive cells were detected using the A45-B/B3 anti-mouse antibody (recognizing the CK8, CK18 and CK19; Micromet, Munich, Germany). PBMCs' cytopsin preparations were also double-stained with pan-cytokeratin and CD45 (common leukocyte antigen), in order to exclude possible ectopic expression of cytokeratins in hematopoietic cells, as previously described [29,30]. As proposed by Meng et al. [31], the cytomorphological criteria of high nuclear to cytoplasmic ratio and size larger than white blood cells, were also employed in order to characterize a cytokeratin-positive cell as a CTC.

PBMCs' cytopsin preparations were fixed with 3% (v/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS for 30 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature (RT). After an overnight blocking with PBS supplemented with 1% Bovine Serum A (BSA) at 4°C, cells were double-stained for pan-cytokeratin/CD45 or triple-stained for pan-cytokeratin/ALDH1/TWIST. The incubation time for all primary and secondary antibodies was 1 h and 45 min, respectively. Zenon technology (FITC-conjugated IgG1 antibody) (Molecular Probes, Invitrogen) was used for the detection of pan-cytokeratin (A45-B/B3 anti-mouse antibody). CD45 was detected using an anti-rabbit antibody (Santa Cruz, CA, USA) labelled with Alexa 555 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); ALDH1 was detected using an anti-mouse antibody (Abcam, Cambridge, UK) labelled with Alexa 555 (Molecular Probes); TWIST was detected using an anti-rabbit antibody (Abcam) labelled with Alexa 633 (Molecular Probes). Cells were post-fixed with 3% (v/v) PFA in PBS for 15 min at RT. Dapi-antifade reagent (Invitrogen) was finally added to each sample for cell nuclear staining.

A total of 500,000 PBMCs per patient were analyzed using the ARIOL system CTCs software (Genetix, UK) as previously described [22]. Results are referred to patients with detectable CTCs only and are expressed as number of CTCs/500,000 PBMCs.

#### **Evaluation of sensitivity and specificity of CTC detection**

The sensitivity of CTC detection using the current methodology was evaluated by two separate approaches; MCF-7, SKBR-3 and MDA.MB.231 breast cancer cells were spiked into separate aliquots of 10 ml peripheral blood obtained from ten healthy female blood donors, at a concentration of 1, 10 and 100 cells per ml. Furthermore, MCF-7 cells were spiked into separate aliquots of  $1 \times 10^6$  PBMCs from healthy volunteers, at a concentration

of 1, 10 and 100 cells per  $1 \times 10^6$  PBMCs. All samples were processed as previously described for patients' samples.

To determine the specificity of CTC detection, peripheral blood was obtained from ten healthy donors and samples were also processed as described above. Furthermore, cytopsin preparations of HepG2 cells spiked into healthy donors' PBMCs (100/250,000 PBMCs) were used as positive and negative controls in order to evaluate the specificity of all antibodies. Negative controls were prepared by omitting the corresponding primary antibody and adding the secondary IgG isotype antibody.

#### **Evaluation of ALDH1 and TWIST expression in cancer cell lines using the ARIOL system**

Cytopsin preparations from all cell lines were triple stained with anti-pancytokeratin, anti-ALDH1 and anti-TWIST antibodies and analyzed with the ARIOL system. Positive and negative controls for each antibody were also prepared.

HepG2 cell line was used as positive control for ALDH1 expression, as proposed by the manufacturer. A differential expression of ALDH1, varying from absent to high was evident among these cells. In order to define the cut-offs between high, low and absent ALDH1 expression, 50 randomly selected microscope vision fields were analyzed and a total of 1,500 cells presenting high, low or no ALDH1 expression (500 cells each) were measured by the ARIOL system. Measurements represent the exposure time required for the detection of ALDH1 fluorescent signal. Using the resulting cut-offs, ALDH1 expression was further evaluated in three representative human breast cancer cell lines: SKBR-3, MCF-7 and MDA.MB.231 (Table 1).

HepG2 cells were also used as positive control for TWIST expression, since they co-expressed ALDH1 and TWIST. A differential TWIST subcellular localization in nucleus and/or cytoplasm could be observed. In this study, TWIST was characterized as cytoplasmic when localized exclusively in the cytoplasm, and as nuclear when localized in the nucleus, regardless of its colocalization in the cytoplasm. Evaluation of TWIST expression was subsequently performed in SKBR-3, MCF-7 and MDA.MB.231.

#### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 20. Chi-square test was used to compare the frequency of CTC phenotypes among early and metastatic breast cancer patients. Mann Whitney test was used to compare the incidence of CTCs with different phenotypes per patient between early and metastatic disease. Spearman's rho analysis was used to investigate the correlation between specific phenotypes among

**Table 1 Quantification of ALDH1 expression levels in cancer cell lines using the ARIOL system**

ALDH1 expression levels	HepG2		SKBR3		MCF7		MDA.MB.231	
	Range	Median ± SE <sup>a</sup>	Range	Median ± SE <sup>a</sup>	Range	Median ± SE <sup>a</sup>	Range	Median ± SE <sup>a</sup>
High	5 – 25	15 ± 0.25	10 – 25	15 ± 0.23	20 – 25	20 ± 0.11	15 – 25	20 ± 0.18
Low	30 – 55	45 ± 0.30	35 – 55	45 ± 0.29	35 – 55	45 ± 0.29	30 – 55	45 ± 0.29
Negative	60 – 90	70 ± 0.30	60 – 90	80 ± 0.39	60 – 90	75 ± 0.29	60 – 100	80 ± 0.46

<sup>a</sup>SE: standard error.

CTCs. P values were considered statistically significant at the 0.05 level.

## Results

### Sensitivity and specificity of CTC detection

Spiking of breast cancer cell lines into whole blood obtained from healthy donors, revealed that the recovery rates of MCF-7 cells were 53%, 21% and 19% for the dilutions of 1, 10 and 100 cells per ml, respectively. The corresponding values were 27%, 19% and 20% for SKBR-3 and 21%, 21% and 31% for MDA.MB.231 cells.

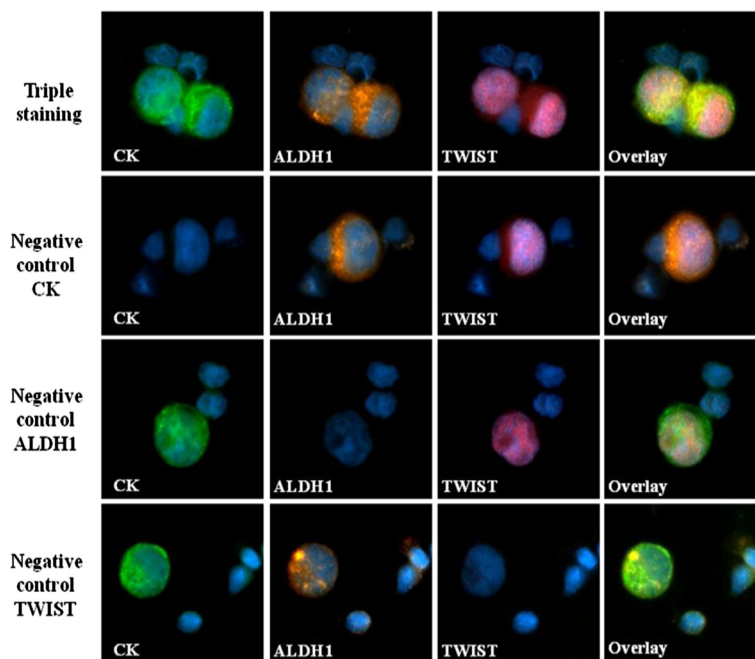
Spiking of MCF-7 cells into PBMCs showed recovery rates of 80% for the dilution of 1 cell per 1\*10<sup>6</sup> PBMCs and 100% for the dilutions 10 and 100 cells per 1\*10<sup>6</sup> PBMCs.

No cytokeratin-positive cells could be detected in PBMCs' cytopspins from healthy donors; however, expression of both ALDH1 and TWIST could be identified among PBMCs in all samples analyzed.

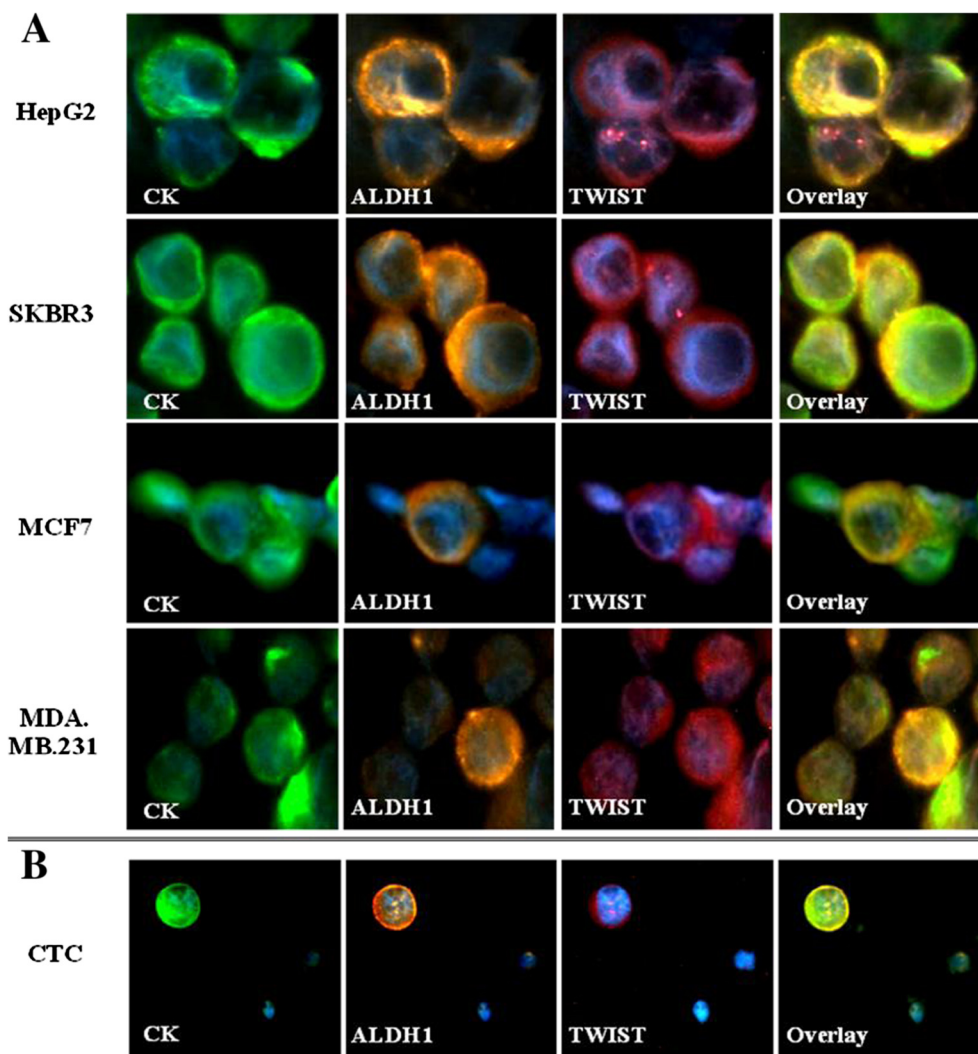
Evaluation of cytopspins from HepG2 cells spiked into PBMCs, prepared as positive and negative controls, showed high specificity for all the antibodies used in the current assay (Figure 1). Spiked HepG2 were included as controls in each separate immunofluorescence experiment performed for patient samples.

### Definition of high and low ALDH1 expression levels and characterization of TWIST sub-cellular localization in cancer cell lines

HepG2 cell line was used as control for the evaluation of ALDH1 expression levels. High ALDH1 expression was evident in the great majority of HepG2 cells; however cells presenting low or absent ALDH1 expression were also observed (Figure 2A, Additional file 1A). Measurements (exposure time) for high ALDH1 expression levels ranged from 5 to 25 (median: 15 ± 0.25), while low ALDH1 expression levels ranged from 30 to 55 (median:



**Figure 1 Control experiments for the specificity of Cytokeratin, ALDH1 and TWIST antibodies in HepG2 cells spiked in PBMCs, ARIOL system.** Triple immunofluorescence was performed in cytopspin preparations of HepG2 cells spiked in PBMCs from healthy blood donors, using anti-Cytokeratin (green), anti-ALDH1 (orange) and anti-TWIST (pink) antibodies. Negative controls were prepared for each primary antibody, by omitting the corresponding primary antibody and adding the secondary IgG isotype antibody. Cell nuclei were stained with Dapi (blue), ARIOL system (x400).



**Figure 2** Co-expression of Cytokeratin, ALDH1 and TWIST in cancer cell lines and a single CTC detected in a breast cancer patient, ARIOL system. Triple immunofluorescence was performed in cytospin preparations using anti-CK (green), anti-ALDH1 (orange) and anti-TWIST (pink) antibodies. Cell nuclei were stained with Dapi (blue). **A**) HepG2 control cells and three representative breast cancer cell lines, ARIOL system (x400). **B**) A CTC (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> phenotype) detected in a metastatic breast cancer patient, ARIOL system (x200).

45 ± 0.30). Hence, high ALDH1 expression (ALDH1<sup>high</sup>) was defined at measurements of 25 or lower, whereas low ALDH1 expression (ALDH1<sup>low</sup>) was defined at measurements between 30 to 55. The absence of ALDH1 expression (ALDH1<sup>neg</sup>) was also evaluated by the use of negative controls, at measurements of 60 and higher (range: 60–90, median: 70 ± 0.30). The range of the measurements and the median values with standard error (SE) within the ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> and ALDH1<sup>neg</sup> cell populations are presented in Table 1.

Using the above cut-off points, ALDH1 expression was subsequently evaluated in three human breast cancer cell lines: SKBR-3, MCF-7 and MDA.MB.231, representative of the three breast cancer subtypes: HER2-positive (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), luminal

and basal-like, respectively. ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> and ALDH1<sup>neg</sup> cells were detected in all cell lines, with a clear distinction between high, low and absent ALDH1 expression levels (Figure 2A, Additional file 1A). Comparable median values of measurements within the three subpopulations (ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> and ALDH1<sup>neg</sup>) were confirmed across HepG2 cells and the three breast cancer cell lines (Table 1).

HepG2 cells were also used as control for the characterization of TWIST expression. TWIST was localized in the nucleus (TWIST<sup>nuc</sup>) in the majority of HepG2 cells; however cells with cytoplasmic TWIST expression (TWIST<sup>cyt</sup>) and cells lacking TWIST expression (TWIST<sup>neg</sup>) were also observed. TWIST<sup>nuc</sup>, TWIST<sup>cyt</sup> and TWIST<sup>neg</sup> cells were also detected in all breast

**Table 2 Incidence of CTC phenotypes according to differential expression patterns of ALDH1 and TWIST in patients with early and metastatic breast cancer**

CTC phenotypes	Patients (%)			Percentage of CTCs per patient (mean; range)			CTCs (%)	
	Early	Metastatic	<i>p</i> value	Early	Metastatic	<i>p</i> value	Early	Metastatic
ALDH1 high	30.8	80.0	0.009	23 (0–100)	75 (0–100)	0.001	38.7	83.5
ALDH1 low/neg	92.3	32.0	0.006	77 (0–100)	25 (0–100)	0.001	61.3	16.5
TWIST nuc	30.8	80.0	0.009	29 (0–100)	73 (0–100)	0.006	32.3	70.3
TWIST cyt/neg	76.9	40.0	0.040	71 (0–100)	27 (0–100)	0.006	67.7	29.7

Chi-square test (Continuity Correction) and Mann Whitney test were used. Only patients with detectable CTCs were included; early setting: 13 patients and 31 CTCs; metastatic setting: 25 patients and 91 CTCs.

cancer cell lines (Figure 2A, Additional file 1B). Co-expression of ALDH1 and TWIST was also confirmed in all cell lines.

#### Expression of ALDH1 and TWIST in CTCs of patients with early breast cancer

CTCs were detected in 13 out of 80 (16.3%) patients, with a total of 31 CTCs identified [median No. CTCs/patient: 1 (range: 1–6)].

#### ALDH1 expression

ALDH1-expressing CTCs were detected in all but one patient; however CTCs with high ALDH1 expression (ALDH1<sup>high</sup>) were observed in 30.8% of patients, whereas 92.3% had detectable CTCs with low or absent ALDH1 (ALDH1<sup>low/neg</sup>) (Table 2). Exclusively ALDH1<sup>high</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup> CTCs were identified in 15.4% and 69.2% of patients, respectively. Regarding the distribution of phenotypes at the CTC level, ALDH1<sup>high</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup> expression was observed in 38.7% and 61.3% of total CTCs, respectively.

#### TWIST expression

TWIST-expressing CTCs were identified in all but one patient; in 30.8% of patients CTCs with nuclear TWIST localization (TWIST<sup>nuc</sup>) were observed, while 76.9% harvested CTCs with cytoplasmic or absent TWIST expression (TWIST<sup>cyt/neg</sup>) (Table 2). Exclusively TWIST<sup>nuc</sup> and TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were detected in 23.1% and 69.2% of patients, respectively. Furthermore, the phenotypes

TWIST<sup>nuc</sup> and TWIST<sup>cyt/neg</sup> were identified in 32.3% and 67.7% of total CTCs, respectively.

#### ALDH1 and TWIST co-expression

Four different phenotypes could be distinguished according to the co-expression of ALDH1 and TWIST at the single CTC level (Table 3). ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTCs were detected in 15.4% of patients, whereas in 61.5% ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were identified. There were no patients presenting exclusively ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTCs, while 53.8% of patients had exclusively ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs. Moreover, ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> phenotypes were expressed in 12.9% and 41.9% of total CTCs. The frequency of the two other phenotypes (ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>nuc</sup>) among patients and CTCs is also shown in Table 3.

A heterogeneous distribution of specific CTC phenotypes in individual patients was observed as shown in Tables 2 and 3, by the differential mean percentages of CTC subpopulations per patient. This variability is further depicted in Table 4 demonstrating the incidence of different CTC phenotypes in index patients with early disease.

#### Expression of ALDH1 and TWIST in CTCs of patients with metastatic breast cancer

The presence of CTCs was documented in 25 out of 50 (50%) patients, with a total of 91 CTCs detected [median No. CTCs/patient: 2 (range: 1–21)].

**Table 3 Incidence of CTC phenotypes according to the co-expression of ALDH1 and TWIST on single CTCs of patients with early and metastatic breast cancer**

CTC phenotypes	Patients (%)			Percentage of CTCs per patient (mean; range)			CTCs (%)	
	Early	Metastatic	<i>p</i> value	Early	Metastatic	<i>p</i> value	Early	Metastatic
ALDH1high / TWISTnuc	15.4	76.0	0.001	6 (0–50)	64 (0–100)	0.000	12.9	61.5
ALDH1high / TWISTcyt/neg	23.1	24.0	1.000	17 (0–100)	11 (0–100)	0.746	25.8	22.0
ALDH1low/neg / TWISTnuc	30.8	12.0	0.330	23 (0–100)	8 (0–100)	0.152	19.4	8.8
ALDH1low/neg / TWISTcyt/neg	61.5	20.0	0.078	54 (0–100)	16 (0–100)	0.026	41.9	7.7

Chi-square test (Continuity Correction) and Mann Whitney test were used. Only patients with detectable CTCs were included; early setting: 13 patients and 31 CTCs; metastatic setting: 25 patients and 91 CTCs.

**Table 4 Distribution of CTC phenotypes according to ALDH1 and TWIST co-expression in index patients with early and metastatic breast cancer**

Patients	ALDH1 <sup>high</sup> /TWIST <sup>nuc</sup>	ALDH1 <sup>high</sup> /TWIST <sup>cyt/neg</sup>	ALDH1 <sup>low/neg</sup> /TWIST <sup>nuc</sup>	ALDH1 <sup>low/neg</sup> /TWIST <sup>cyt/neg</sup>	
Early	Total CTC No	CTC No (%)	CTC No (%)	CTC No (%)	CTC No (%)
1	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
2	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)
3	3	1 (33.3)	0 (0)	2 (66.7)	0 (0)
4	6	3 (50)	1 (16.7)	2 (33.3)	0 (0)
5	6	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
<b>Metastatic</b>					
1	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)
3	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
4	3	1 (20)	2 (80)	0 (0)	0 (0)
5	21	5 (23.8)	14 (66.7)	0 (0)	2 (9.5)
6	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
7	11	3 (27.2)	2 (18.2)	6 (54.5)	0 (0)

#### ALDH1 expression

ALDH1-expressing CTCs were evident in all patients; however, ALDH1<sup>high</sup> CTCs were detected in 80% of patients ( $p = 0.009$ , compared to early disease), whereas ALDH1<sup>low/neg</sup> CTCs were observed in 32% ( $p = 0.006$ ) (Table 2). Exclusively ALDH1<sup>high</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup> CTCs were detected in 68% and 20% of patients ( $p = 0.006$  and  $p = 0.009$ , respectively, compared to early patients). Moreover, ALDH1<sup>high</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup> was identified in 83.5% and 16.5% of total CTCs, respectively.

#### TWIST expression

TWIST-expressing CTCs were also detected in all patients; however TWIST<sup>nuc</sup> CTCs were identified in 80% of patients, while TWIST<sup>cyt/neg</sup> were observed in 40% ( $p = 0.009$  and  $p = 0.040$ , compared to early disease) (Table 2). Exclusively TWIST<sup>nuc</sup> and TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were detected in 64% ( $p = 0.040$ ) and 20% ( $p = 0.009$ ) of patients. Furthermore, the phenotypes TWIST<sup>nuc</sup> and TWIST<sup>cyt/neg</sup> were observed in 70.3% and 29.7% of total CTCs, respectively.

#### ALDH1 and TWIST co-expression

Evaluation of ALDH1 and TWIST co-expression on single CTCs showed that 76% of patients harvested ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTCs ( $p = 0.001$ , compared to early patients), whereas 20% had detectable ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs ( $p = 0.078$ ) (Table 3). Exclusively ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were detected in 56% ( $p = 0.002$ ) and 16% ( $p = 0.078$ ) of patients, respectively. In the CTC level, the phenotypes ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> were confirmed in 61.5% and 7.7% of total CTCs,

respectively. The incidence of ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> and ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTCs was similar to early disease (Table 3). As shown for early disease, distinct CTC phenotypes could be observed in individual metastatic patients (Tables 3 and 4). An ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTC is depicted in Figure 2B.

Finally, a positive correlation between ALDH1<sup>high</sup> and TWIST<sup>nuc</sup> expression was confirmed on CTCs of metastatic patients ( $p = 0.001$ , Spearman's rho analysis), whereas ALDH1<sup>low/neg</sup> was associated with TWIST<sup>cyt/neg</sup> ( $p = 0.001$ ).

#### Discussion

CTCs are considered to be the active source of metastatic spread; however only a few of these cells are capable of forming metastatic deposits in distant organs. Indeed, although the presence of CTCs in patients with breast cancer has been associated with poor prognosis [2,4], many patients do not relapse even when CTCs are detected in their blood. Thus, besides detection, further phenotypic characterization of these cells might provide additional information for their metastatic potential.

Metastasis is a complex multistep cascade of events and cancer cells need to be highly equipped in order to fulfill the metastatic process. CSCs are suggested to have the ability to self-renew and regenerate the tumor [8]. Moreover, EMT has been linked to cancer progression and acquisition of stem cell-like properties [32]. Thus, CTCs co-expressing stem cell and EMT markers could be actively involved in tumor progression. We have reported that the stemness markers CD44/CD24 and ALDH1 are expressed in CTCs of patients with metastatic breast cancer [14]. Moreover, we have recently

shown that the EMT markers TWIST and Vimentin were frequently expressed on CTCs of patients with early and metastatic breast cancer [22]. In this study, we developed a new methodology to investigate the expression pattern of ALDH1 and TWIST on CTCs of breast cancer patients and to evaluate their co-expression at the single CTC level.

The expression of ALDH1 in primary tumors has been associated with poor patient outcome in several cancers, including breast cancer [10,12,33]. Moreover, differential ALDH1 expression levels have been demonstrated and a positive correlation has been suggested between high ALDH1 and worse clinical outcome [34-36]. High ALDH1 protein expression has also been associated with high ALDH enzymatic activity, a putative marker for CSCs [37]. Accordingly, in the present immunofluorescence assay, a quantitative analysis of ALDH1 expression levels by the use of the ARIOL system software was employed [22].

With the provided quantification method, a clear distinction between high and low ALDH1 expression was demonstrated in HepG2 control cell line. The evaluation of ALDH1 expression in three breast cancer cell lines representative of HER2-positive, luminal and basal-like subtypes, further confirmed the presence of ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> and ALDH1<sup>neg</sup> cells within each cell line. The comparable range and median expression values of each cell subpopulation among all cell lines verified the objectivity of ALDH1 quantification irrespectively of the specific breast cancer subtype and allowed its application on patient samples.

Interestingly, although ALDH1-expressing CTCs were identified in almost all CTC-positive patients, the pattern of ALDH1 expression differed among CTCs in both clinical settings. Moreover, ALDH1<sup>high</sup> CTCs were more frequently observed in metastatic patients, whereas ALDH1<sup>low/neg</sup> CTCs were mainly detected in patients with early disease. This observation suggests that ALDH1<sup>high</sup> CTCs predominate during disease progression and leads to the assumption that CTCs bearing stemness characteristics may have an active role in the metastatic process. We have previously reported a lower frequency of ALDH1<sup>high</sup> CTCs in patients with metastatic breast cancer, which could be explained by the lower number of patients included in that study, as well as by the different methodologies used for the titration of ALDH1 expression [14].

TWIST is a transcription factor with a pivotal role in EMT induction, both in normal and cancer cells [38]. The expression of TWIST in breast tumors has been correlated to increased metastatic potential and poor survival [19]. In the present study, we further analyzed the subcellular localization of TWIST on CTCs, since efficient nuclear localization is essential for a protein to

operate as an activator and/or repressor of transcription of target genes [39]. Furthermore, Yuen et al. showed that nuclear TWIST localization predicted the metastatic potential of prostate tumors [40], whereas in esophageal squamous cell carcinoma, it was associated with lymph node metastasis [41]. The data presented in the current study are in agreement with our previously reported results showing that TWIST is expressed in the majority of CTCs derived from patients with breast cancer [22]. Here we further show that CTCs present a differential TWIST subcellular localization pattern. In addition, we demonstrate that TWIST<sup>nuc</sup> CTCs were more frequently detected in metastatic patients, while in early disease TWIST<sup>cyt/neg</sup> CTCs were mainly observed. This observation suggests that TWIST localization may be related with functional cellular properties during the different stages of the disease. It could be hypothesized that TWIST<sup>nuc</sup> CTCs are undergoing EMT and selected during disease progression. In accordance, a recent study showed that CTCs of breast cancer patients exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition and that the presence of CTCs in EMT state was associated with disease progression [42].

Previous studies have also reported the expression of ALDH1 and TWIST on CTCs of early and metastatic breast cancer patients [27,43], though at a lower frequency. This could be attributed to methodological differences, since the *AdnaTest* used in these studies analyzes mRNA expression in CTC-positive blood samples, whereas in the current assay protein expression on single CTCs is evaluated.

Using the present assay, four different CTC phenotypes were identified according to the simultaneous evaluation of both markers. An interesting finding was the considerable inter- and intra-patient heterogeneity regarding the frequency of distinct CTC subpopulations either in the early or the metastatic disease setting. Moreover, a differential distribution of phenotypes was evident comparing the two groups of patients; ALDH1<sup>high</sup>/TWIST<sup>nuc</sup> CTCs were more prominent among metastatic patients, whereas the ALDH1<sup>low/neg</sup>/TWIST<sup>cyt/neg</sup> phenotype predominated in patients with early disease. The finding that ALDH1<sup>high</sup> and TWIST<sup>nuc</sup> phenotypes were mainly co-expressed in the same CTC, as well as their positive correlation shown in metastatic disease, further supports the hypothesis of a link between stemness and EMT characteristics on cancer cells. [44,45]. This is also in agreement with recent studies showing that overexpression of TWIST induces ALDH1 expression in cell lines [46,47].

In the current study, CTCs bearing high ALDH1 expression, along with nuclear TWIST localization, are not proven to be cancer stem cells undergoing EMT. Further experiments with functional assays would be required to

validate their stemness and EMT properties. Nevertheless, this is beyond the scope of the current report which aimed in the evaluation of previously suggested stemness and EMT markers on single CTCs. The higher prevalence of these markers in metastatic breast cancer patients suggests that they could possibly distinguish a subpopulation of CTCs with aggressive biological properties. Therefore, phenotypic characterization of CTCs according to the expression of ALDH1 and TWIST merits further evaluation in a larger cohort of patients, in order to investigate the clinical significance of the above findings.

## Conclusions

The current study provides a new methodology for the evaluation of ALDH1 and TWIST co-expression on single CTCs of patients with breast cancer. Using this assay, distinct CTC phenotypes, according to ALDH1 expression levels and TWIST subcellular localization, were designated in patients with early and metastatic breast cancer. The higher incidence of CTCs bearing putative stem cell and EMT traits in metastatic disease, suggests that these characteristics may prevail on CTCs during disease progression. A correlation between stemness and EMT features was further confirmed on single CTCs.

## Additional file

**Additional file 1: Expression of ALDH1 and TWIST in cancer cell lines, ARIOL system.** Single immunofluorescence was performed in cytospin preparations from HepG2 control cells and three breast cancer cell lines, ARIOL system (x400). The different phenotypes according to the expression pattern of ALDH1 and TWIST are shown indicatively in MCF7 cells. A) ALDH1<sup>high</sup>, ALDH1<sup>low</sup> and ALDH1<sup>neg</sup> cells were observed within all cell lines, by staining with anti-ALDH1 antibody (orange). B) TWIST<sup>nuc</sup>, TWIST<sup>cyt</sup> and TWIST<sup>neg</sup> cells were detected within each cell line, using an anti-TWIST antibody (pink). Cell nuclei were stained with Dapi (blue).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MAP developed the methodology and performed the acquisition, analysis and interpretation of data. She also performed the cell cultures, the immunofluorescence experiments and drafted the manuscript. GK participated in study design and coordination, development of the methodology and data interpretation and was involved in drafting the manuscript. ZZ helped to draft the manuscript. LM performed the cytospin preparations of patients' samples. PAT participated in the design of the study and data interpretation and helped in drafting the manuscript. DM and VG provided general support, participated in study design and data interpretation and were involved in drafting the manuscript. SA conceived the study, participated in study coordination and data interpretation, supervised the study and was involved in drafting the manuscript. All the authors gave their final approval of the version to be published.

## Acknowledgements

The present work was funded by SYNERGASIA 2009 PROGRAMME. This Programme is co-funded by the European Regional Development Fund and National Resources (General Secretariat of Research and Technology in Greece), Project code: Onco-Seed diagnostics. This work was also funded by

a Post graduate Scholarship from the School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, GR-71110 Heraklion, Crete, Greece. <sup>2</sup>Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion, GR-71110 Heraklion, Crete, Greece. <sup>3</sup>Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Crete, GR-71110 Heraklion, Crete, Greece.

Received: 19 September 2013 Accepted: 29 August 2014

Published: 3 September 2014

## References

1. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarnieri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, Dawood S, Reuben JM, Kau SW, Lara JM, Krishnamurthy S, Ueno NT, Hortobagyi GN, Valero V: **Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden.** *Clin Breast Cancer* 2007, **7**:471–479.
2. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, Stathopoulos EN, Chlouverakis G, Lianidou E, Kakolyris S, Georgoulas V, Mavroudis D: **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:2177–2184.
3. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Dieras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X, Pierga JY: **Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells 11.** *Ann Oncol* 2008, **19**:496–500.
4. Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Bozionelou V, Pallis A, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulas V: **Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer.** *Br J Cancer* 2012, **106**:1917–1925.
5. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, ix-Panabieres C, Pantel K: **Molecular mechanisms of metastasis.** *J Surg Oncol* 2011, **103**:508–517.
6. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL: **High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability.** *J Cell Mol Med* 2008, **13**:2236–2252.
7. Lohberger B, Rinner B, Stuehl N, Absenger M, Liegl-Atzwanger B, Walzer SM, Windhager R, Leithner A: **Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma 5.** *PLoS One* 2012, **7**:e43664.
8. Al-Hajj M, Wicha MS, Ito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3983–3988.
9. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS: **Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature.** *Cancer Res* 2009, **69**:1302–1313.
10. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G: **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:555–567.
11. Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Tanimoto A: **Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer.** *Histopathology* 2011, **59**:776–780.
12. Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, Souda M, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Rai Y, Tanimoto A: **Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study.** *Histopathology* 2011, **58**:608–616.
13. Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E, Gandini O, Vincenzi B, Saltarelli R, Chiapparino E, Spremberg F, Cristofanilli M, Frati L, Aglianò AM, Gazzaniga P: **Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization.** *Ann Oncol* 2011, **22**:86–92.
14. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridakis Z, Mavroudis D, Georgoulas V: **Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer.** *Cancer Lett* 2010, **288**:99–106.



15. Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009, **9**:265–273.
16. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K: Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005, **11**:8006–8014.
17. Zeisberg M, Neilson EG: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009, **119**:1429–1437.
18. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis 1.** *Cell* 2004, **117**:927–939.
19. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG: **Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer.** *Ann Surg Oncol* 2005, **12**:488–496.
20. Yang J, Mani SA, Weinberg RA: **Exploring a new twist on tumor metastasis.** *Cancer Res* 2006, **66**:4549–4552.
21. Watson MA, Ylagan LR, Trinkaus KM, Gillanders WE, Naughton MJ, Weilbaecher KN, Fleming TP, Aft RL: **Isolation and molecular profiling of bone marrow micrometastases identifies TWIST1 as a marker of early tumor relapse in breast cancer patients 1.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:5001–5009.
22. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S: **Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells of early and metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**:R59.
23. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou E: **Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR 2.** *BMC Cancer* 2011, **11**:422.
24. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA: **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells 16.** *Cell* 2008, **133**:704–715.
25. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schmitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K: **Molecular definition of breast tumor heterogeneity4.** *Cancer Cell* 2007, **11**:259–273.
26. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A: **Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition.** *PLoS One* 2008, **3**:e2888.
27. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: **Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**:R46.
28. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P: **Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **130**:449–455.
29. Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, Stourmaras C: **Phosphorylation of FAK, PI-3 K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells.** *Mol Med* 2007, **13**:79–88.
30. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, Georgoulas V, Mavroudis D, Agelaki S: **Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**:R84.
31. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW: **Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:8152–8162.
32. Hollier BG, Evans K, Mani SA: **The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009, **14**:29–43.
33. Avoranta ST, Korkeila EA, Ristamaki RH, Syrjanen KJ, Carpen OM, Pyrhonen SO, Sundstrom JT: **ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer.** *Hum Pathol* 2013, **44**:966–974.
34. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL: **In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis.** *Am J Pathol* 2010, **176**:2131–2138.
35. Su Y, Qiu Q, Zhang X, Jiang Z, Leng Q, Liu Z, Stass SA, Jiang F: **Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**:327–337.
36. Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F: **ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome.** *Lab Invest* 2010, **90**:234–244.
37. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L: **Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers.** *PLoS One* 2010, **5**:e10277.
38. Kang Y, Massague J: **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis 1.** *Cell* 2004, **118**:277–279.
39. Schwobbel ED, Moore MS: **The control of gene expression by regulated nuclear transport.** *Essays Biochem* 2000, **36**:105–113.
40. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW: **Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer.** *Histopathology* 2007, **50**:648–658.
41. Gong T, Xue Z, Tang S, Zheng X, Xu G, Gao L, Zhao G, Hong L, Tang G, Zhang H, Wang R, Jiang Y, Fan D: **Nuclear expression of Twist promotes lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2012, **13**:606–613.
42. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Conannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S: **Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition.** *Science* 2013, **339**:580–584.
43. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T: **Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**:R15.
44. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Cufi S, Del BS, Martin-Castillo B, Menendez JA: **Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status 7.** *Cell Cycle* 2010, **9**:3807–3814.
45. Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, Tzeng CH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ: **Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:982–992.
46. Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Domek J, Kato Y, van der Groep P, Artemov D, Kowalski J, Carraway H, van Diest P, Raman V: **Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor-alpha 16.** *Oncogene* 2012, **31**:3223–3234.
47. Li J, Zhou BP: **Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters.** *BMC Cancer* 2011, **11**:49.

doi:10.1186/1471-2407-14-651

**Cite this article as:** Papadaki et al.: Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2014 **14**:651.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

