



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας ddPCR για την ευαίσθητη ανίχνευση των κλινικά σημαντικών μεταλλάξεων στο *ESR1* και συγκεκριμένα στο κωδικόνιο 380 (εξώνιο 5) και στα κωδικόνια 536, 537 και 538 (εξώνιο 8) σε cfDNA από δείγματα πλάσματος ασθενών με MBC. Επιπλέον στόχος μας ήταν η σύγκριση και αξιολόγηση του ποσοστού συμφωνίας των αποτελεσμάτων ανίχνευσης μεταλλάξεων στο *ESR1* με τη χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR και μέσω της καθιερωμένης εργαστηριακής πρακτικής αλληλούχισης NGS ως μέθοδο αναφοράς.

**Αποτελέσματα:** Από τα 20 δείγματα cfDNA που αναλύθηκαν, ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο *ESR1* σε 4 από αυτά (20%). Οι μεταλλάξεις στο *ESR1* που ανιχνεύτηκαν εντοπίζονται στο εξώνιο 8 και συγκεκριμένα 3 ασθενείς είχαν την μετάλλαξη Y537S και μια ασθενής την D538G. Στις υπόλοιπες 16 ασθενείς, δεν ανιχνεύτηκαν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ESR1* στο πλάσμα. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα ανάλυσης των μεταλλάξεων στο *ESR1* στα δείγματα πλάσματος μεταξύ ddPCR και NGS, παρουσιάζουν συμφωνία σε ποσοστό που φτάνει στο 100%.

**Συμπεράσματα:** Η χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR παρέχει ένα ιδανικό συνδυασμό ταχύτητας, ευαισθησίας και χαμηλού κόστους για την ανίχνευση και παρακολούθηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ESR1* στην κλινική πρακτική ρουτίνας.

## CONTACT

Σοφία Αγγελάκη MD, PhD  
Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας,  
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική  
Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό  
Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου  
Email: [aggelaki@uoi.gr](mailto:aggelaki@uoi.gr)  
Phone: 2810392438

# ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΨΗΦΙΑΚΗΣ PCR ΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ (ddPCR), ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *ESR1* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΡΜΟΝΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟ HER2-ΑΡΝΗΤΙΚΟ, ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ

Μιχαηλίδου Κλείτα<sup>1</sup>, Μπούκουρης Αριστείδης<sup>2</sup>, Κουτουλάκη Χαρά<sup>1</sup>, Δημαράς Παντελής<sup>2</sup>, Μαυρουδής Δημήτριος<sup>1,2</sup>, Αγγελάκη Σοφία<sup>1,2</sup>

1. Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης; 2. Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρόλο που η ΕΤ έχει βελτιώσει την πρόγνωση των ασθενών με HR+, HER2- καρκίνο μαστού, η **ανάπτυξη αντίστασης στην ενδοκρινική θεραπεία**, παραμένει μια σημαντική **θεραπευτική πρόκληση**.

Ένας βασικός μηχανισμός **επίκτητης αντίστασης στην ΕΤ** με αναστολείς της αρωμάτσης (AI), είναι η **ανάπτυξη ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο γονίδιο** που κωδικοποιεί τον υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα), ***ESR1***. Οι μεταλλάξεις στο *ESR1* εντοπίζονται στην περιοχή δέσμευσης των οιστρογόνων (προσδέτης), συνήθως σε **δύο hotspot θέσεις στα εξώνια 5 και 8**: κωδικόνιο 380 (εξώνιο 5) και κωδικόνια 536, 537 και 538 (εξώνιο 8). Οι μεταλλάξεις *ESR1* στον HR+ καρκίνο του μαστού εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά μετά από θεραπεία με AI και σπάνια ανιχνεύονται στον πρωτοπαθή όγκο.

Οι ***ESR1* σωματικές μεταλλάξεις ενεργοποιούν τον ER με τρόπο ανεξάρτητο από τον προσδέτη** και επομένως **προτείνεται αλλαγή θεραπείας (π.χ. με εκλεκτικούς αποικοδομητές του υποδοχέα οιστρογόνων (SERDs; Elacestrant))** για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *ESR1* στην **υγρή βιοψία (πλάσμα)**. Σημαντικό είναι ότι οι ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού και με ανιχνεύσιμες **μεταλλάξεις *ESR1*** στο πλάσμα και ειδικότερά στο κυκλοφορούν DNA του όγκου (ctDNA) παρουσιάζουν **σημαντικά βελτιωμένη επιβίωση** χωρίς εξέλιξη της νόσου με την **Elacestrant σε σύγκριση με την τυπική ΕΤ**.

## ΣΚΟΠΟΣ

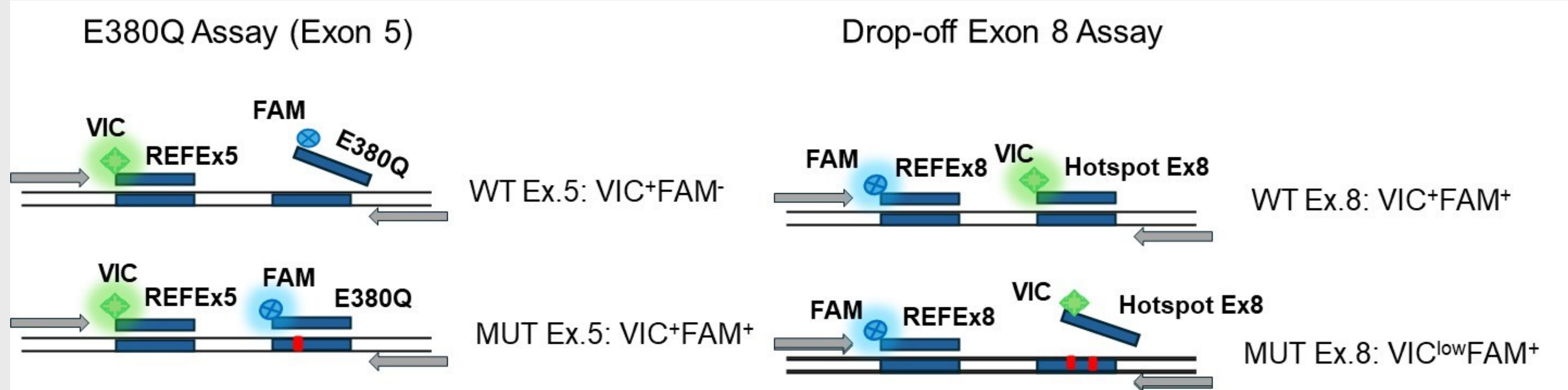
**Α) Ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας ddPCR** για την ευαίσθητη ανίχνευση των **κλινικά σημαντικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *ESR1*** και συγκεκριμένα στο κωδικόνιο 380 και στα κωδικόνια 536, 537 και 538 σε cfDNA από δείγματα πλάσματος ER+ HER2-αρνητικών μεταστατικών ασθενών με καρκίνο του μαστού κατά την εξέλιξη της νόσου σε ΕΤ. Αξιολόγηση των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection) της μεθόδου, για κάθε μετάλλαξη που θα μελετάται.

**Β) Να εκτιμηθούν τα ποσοστά συμφωνίας** των αποτελεσμάτων ανίχνευσης μεταλλάξεων στο ***ESR1* με τη χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR** και μέσω της καθιερωμένης εργαστηριακής **πρακτικής αλληλούχισης NGS** ως μέθοδο **αναφοράς**

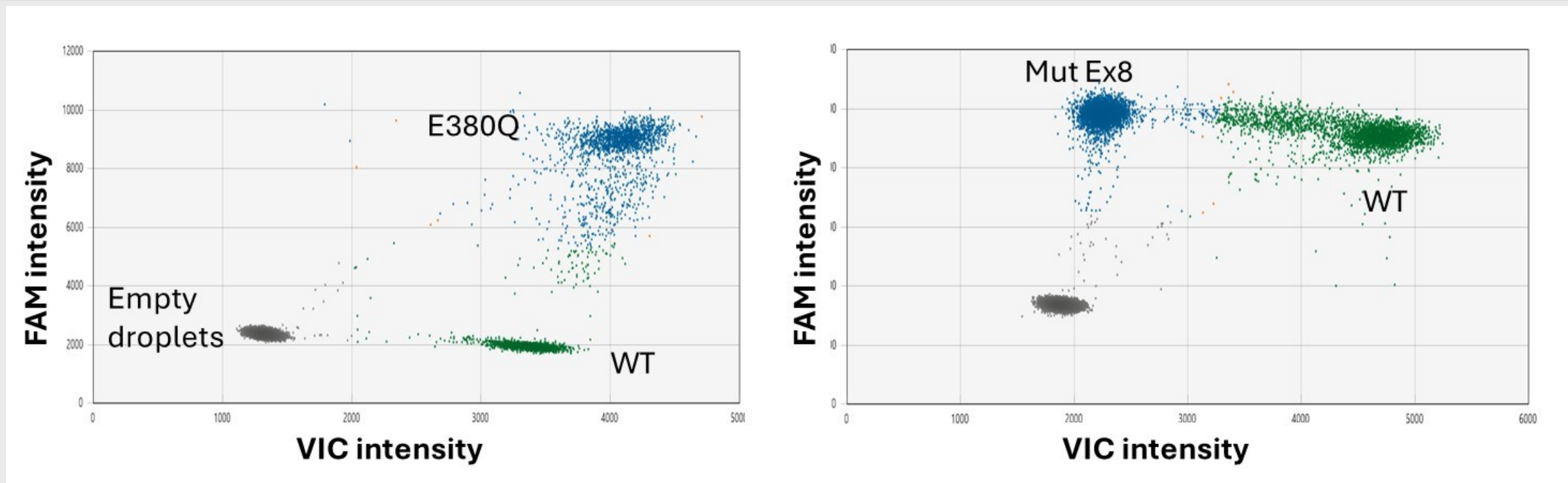
## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Συλλογή βιολογικών δειγμάτων ασθενών:** Δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν από 20 ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο μαστού ER+/HER2- μετά από υποτροπή σε προηγούμενη θεραπεία. Οι ασθενείς παρακολουθούνται στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ). Κάθε δείγμα, κατά τη συλλογή, διαμοιράζεται σε δύο φιαλίδια, ένα για ανάλυση των μεταλλάξεων του *ESR1* με την αναπτυχθείσα ddPCR και ένα με την μέθοδο NGS. **Ανάλυση σωματικών μεταλλάξεων *ESR1* με ddPCR:** Για τα δείγματα που αναλύθηκαν με την ddPCR, έγινε αρχικά απομόνωση cfDNA από 2 mL πλάσματος με τη χρήση ειδικού kit αντιδραστηρίων. Σχεδιάστηκαν δοκιμασίες ddPCR και συγκεκριμένα, για τη μετάλλαξη στο εξώνιο 5, σχεδιάστηκε ένας ανιχνευτής TaqMan επισημασμένος με FAM ειδικός για τη μετάλλαξη E380Q στο εξώνιο 5 και ένας ανιχνευτής αναφοράς επισημασμένος με VIC που καλύπτει μια παρακείμενη αναλλοίωτη περιοχή. Για τις μεταλλάξεις στο εξώνιο 8, έχει σχεδιαστεί μια drop-off ddPCR δοκιμασία με τη χρήση ενός ανιχνευτή επισημασμένου με VIC που είναι συμπληρωματικός ως προς την WT αλληλουχία που περιλαμβάνει τις hotspot μεταλλάξεις στο εξώνιο 8 και με ένα ανιχνευτή αναφοράς επισημασμένο με FAM που καλύπτει την παρακείμενη αναλλοίωτη περιοχή. **Σύγκριση μεθόδων ανάλυσης:** Θα αξιολογηθεί η συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων (ddPCR έναντι NGS). Μια τρίτη μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων για τα οποία δεν θα υπάρχει συμφωνία μεταξύ της ddPCR και της μεθόδου αναφοράς NGS.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



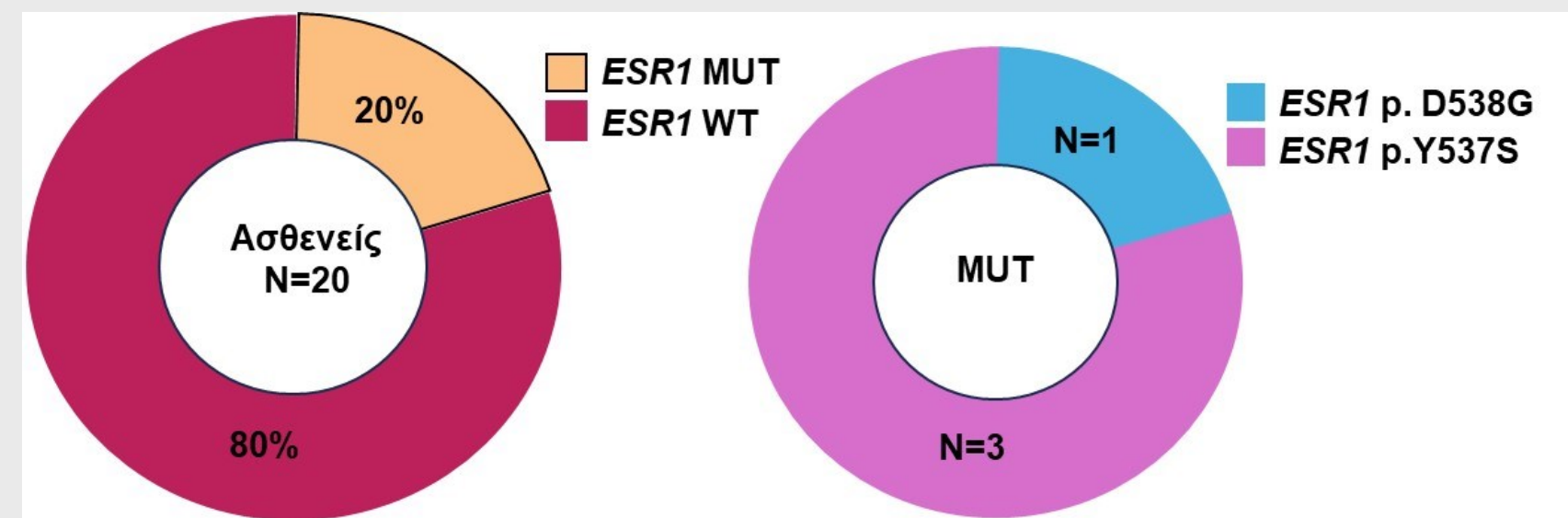
**Εικόνα 1.** Σχεδιασμός δοκιμασίας για τα εξώνια 5 και 8 του *ESR1*. Α. Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται η δοκιμασία για την ανίχνευση της E380Q στο εξώνιο 5: τα αλληλόμορφα άγριου τύπου παράγουν σήμα μόνο από τον ανιχνευτή αναφοράς (VIC+), ενώ τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα E380Q παράγουν διπλό θετικό σήμα (VIC+/FAM+). Β. Στο δεξί μέρος της εικόνας φαίνεται η δοκιμασία drop-off Ex8 ανιχνεύει τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις hotspot που βρίσκονται στο εξώνιο 8. Τα αλληλόμορφα άγριου τύπου παράγουν σήμα τόσο από τους ανιχνευτές αναφοράς όσο και από τους ανιχνευτές drop-off (FAM+/VIC+), ενώ τα αλληλόμορφα με μεταβολές στα κωδικόνια 536-538 παράγουν ένα σήμα μόνο από τον ανιχνευτή αναφοράς (FAM+).



**Εικόνα 2.** Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται το αποτέλεσμα της ddPCR για το εξώνιο 5 και στο δεξί μέρος της εικόνας το αποτέλεσμα της ddPCR για το εξώνιο 8

| ddPCR     | NGS    |           |       |
|-----------|--------|-----------|-------|
|           | Mutant | Wild-type | Total |
| Mutant    | 4      | 0         | 4     |
| Wild-Type | 0      | 16        | 16    |
| Total     | 4      | 16        | 20    |

**Πίνακας 1.** Υπήρχε συμφωνία στο 100% των δειγμάτων μεταξύ της ddPCR και της αλληλούχισης NGS. Σε 4 δείγματα πλάσματος ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *ESR1*. Στα υπόλοιπα 16 δείγματα πλάσματος δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο *ESR1*.



**Εικόνα 3.** Οι μεταλλάξεις του *ESR1* βρέθηκαν στο 20% των ασθενών που ελέγχθηκαν. Η συχνότητα ανίχνευσης είναι η αναμενόμενη για τον πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις του εξωνίου 8 είναι οι πιο συχνές και συγκεκριμένα η p.Y537S ανιχνεύτηκε σε 3 από τα 4 μεταλλαγμένα δείγματα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

✓ Από τα 20 δείγματα cfDNA που αναλύθηκαν, ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο *ESR1* σε 4 από αυτά (20%)

✓ Οι μεταλλάξεις στο *ESR1* που ανιχνεύτηκαν εντοπίζονται στο εξώνιο 8 και συγκεκριμένα 3 ασθενείς είχαν την μετάλλαξη Y537S και μια ασθενής την D538G

✓ Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα ανάλυσης των μεταλλάξεων στο *ESR1* στα δείγματα πλάσματος μεταξύ ddPCR και NGS, παρουσιάζουν συμφωνία σε ποσοστό που φτάνει στο 100%.

✓ Η χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR παρέχει ένα ιδανικό συνδυασμό ταχύτητας, ευαισθησίας και χαμηλού κόστους για την ανίχνευση και παρακολούθηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ESR1* στην κλινική πρακτική ρουτίνας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Callens, C.; Bidard, F.C.; et al. Real-Time Detection of ESR1 Mutation in Blood by Droplet Digital PCR in the PADA-1 Trial: Feasibility and Cross-Validation with NGS. Anal Chem 2022, 94, 6297-6303, doi:10.1021/acs.analchem.2c00446. 2. Jeannot, E.; et al. A single droplet digital PCR for ESR1 activating mutations detection in plasma. Oncogene 2020, 39, 2987-2995, doi:10.1038/s41388-020-1174-y. 3. Gezer, U.; Bronkhorst, A.J.; Holdenrieder, S. The Clinical Utility of Droplet Digital PCR for Profiling Circulating Tumor DNA in Breast Cancer Patients. Diagnostics (Basel) 2022, 12, doi:10.3390/diagnostics12123042. 4. Olmedillas-Lopez, S.; Olivera-Salazar, R.; Garcia-Arranz, M.; Garcia-Olmo, D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review. Mol Diagn Ther 2022, 26, 61-87, doi:10.1007/s40291-021-00562-2. 5. Rausch, C.; Rothenberg-Thurley, M.; Buerger, S.A.; et al. Double Drop-Off Droplet Digital PCR: A Novel, Versatile Tool for Mutation Screening and Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia Using Cellular or Cell-Free DNA. J Mol Diagn 2021, 23, 975-985, doi:10.1016/j.jmoldx.2021.05.001.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μέρος της έρευνας έλαβε χρηματοδότηση από την Εταιρεία Παθολόγων Ογκολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ) στα πλαίσια των ερευνητικών προγραμμάτων 2023. Ευχαριστούμε επίσης την Εταιρεία Στήριξης Αντικαρκινικής Έρευνας.