



Rozprawa doktorska

**Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących
komórek nowotworowych o różnych fenotypach
epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi**

mgr Justyna Topa

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. Anna Żaczek

Promotor pomocniczy: dr hab. Aleksandra Markiewicz

Zakład Onkologii Translacyjnej
Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2024

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom,
które wspierały mnie na drodze prowadzącej
do powstania tej rozprawy doktorskiej*

*Dr hab. Aleksandrze Markiewicz,
za pokłady cierpliwości, wyrozumiałości, empatii i zaufania,
za inspirację i bycie wzorem Kobiety Nauki.*

*Prof. dr hab. Annie Żaczek,
za poświęcony czas i nieocenioną pomoc merytoryczną,
oraz możliwość rozwoju naukowego
w Zespole Zakładu Onkologii Translacyjnej.*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Onkologii Translacyjnej,
Zakładu Biologii Komórki i Immunologii,
Zakładu Enzymologii i Onkologii Molekularnej
oraz Centrum Analiz Biostatystycznych i Bioinformatycznych,
za codzienną życzliwość, przyjazną atmosferę w pracy
oraz pomoc w realizacji prac badawczych.*

*Alicji, Darii, Julii i Pawłowi,
za gotowość do wystuchania
i pomoc w chwilach zwątpienia.*

*Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję
moim Rodzicom oraz Siostrze Adriannie,
za utwierdzenie w słuszności podejmowanych decyzji
oraz wsparcie w realizacji planów i marzeń.*



Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały opisane w następujących artykułach naukowych:

- Markiewicz, A.*, **Topa, J.***, Nagel, A., Skokowski, J., Seroczyńska, B., Stokowy, T., Wełnicka-Jaśkiewicz, M., Żaczek, A.J. (2019) Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients. *Cancers* 11(1), 59. <https://doi.org/10.3390/cancers11010059> (IF 6.16, Q1, punkty MNiSW 200)

* - autorzy deklarują równy wkład w pracę

- **Topa, J.**, Grešner, P., Żaczek, A.J., Markiewicz, A. (2022) Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features—an unreachable target? *Cellular and Molecular Life Sciences* 79(2), 81. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04064-6> (IF 9.26, Q1, punkty MNiSW 140)
- **Topa, J.**, Żaczek, A. J., Markiewicz, A. (2024). Isolation of Viable Epithelial and Mesenchymal Circulating Tumor Cells from Breast Cancer Patients. In Gužvić, M. (eds.). *Single Cell Analysis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 2752, pp. 43-52). Humana, New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3621-3_3 (punkty MNiSW 70)

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są rezultatem badań przeprowadzonych w ramach następujących projektów:

- Poszukiwanie przyczyn agresywności komórek nowotworowych poza guzem pierwotnym – molekularna charakterystyka pojedynczych krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi (SONATA 11, 2016/21/D/NZ3/02629), kierownik projektu: dr Aleksandra Markiewicz
- Krążące komórki nowotworowe w medycynie spersonalizowanej – efektywna metoda izolacji, analizy na poziomie pojedynczych komórek i wykorzystania w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie (polsko-chiński konkurs bilateralny, WPC/33HESCAP/2019), kierownik projektu: prof. dr hab. Anna Żaczek

Spis treści

Streszczenie	1
Abstract	4
Wykaz stosowanych skrótów	6
1. Wstęp	12
1.1. Epidemiologia, etiologia, czynniki predysponujące i prognoza w raku piersi	12
1.2. Rola przemiany epithelialno-mezenchymalnej w kaskadzie metastatycznej	14
<i>Czynniki aktywujące przemianę epithelialno-mezenchymalną</i>	14
<i>Zmiany morfologiczne oraz utrata adhezji</i>	16
<i>Zwiększenie mobilności i inwazyjności</i>	16
<i>Przekroczenie bariery naczyń krwionośnych</i>	17
<i>Migracja i przetrwanie w krwiobiegu</i>	17
<i>Ekstrawazacja i kolonizacja niszy metastatycznej</i>	19
1.3. Znaczenie krążących komórek nowotworowych w raku piersi	21
<i>Wartość diagnostyczna i prognostyczna</i>	21
<i>Wybór metody leczenia oraz monitorowanie odpowiedzi na terapię</i>	22
<i>Heterogenność fenotypowa krążących komórek nowotworowych w raku piersi a znaczenie kliniczne</i>	23
1.4. Izolacja krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach EMT – metody, kryteria detekcji, ograniczenia	24
<i>Negatywna selekcja</i>	24
<i>Pozytywna selekcja zależna od markera</i>	24
<i>Selekcja w oparciu o właściwości fizyczne</i>	26
1.5. Analiza na poziomie pojedynczych komórek – zalety, wady, ograniczenia	27
2. Cele pracy	29
3. Dane i materiały	30
3.1. Charakterystyka grup badanych	30
<i>Grupa retrospektywna</i>	30
<i>Grupa prospektywna</i>	31
3.2. Dane molekularne	33
3.3. Materiały	34
4. Metody	41
<i>Analiza retrospektywna</i>	41
4.1. Klasyfikacja zagęszczonych frakcji krążących komórek nowotworowych od chorych na raka piersi	41
4.2. Analiza ekspresji genów w zagęszczonych frakcjach komórek nowotworowych	41
<i>Analiza prospektywna</i>	41
4.3. Hodowla komórkowa	41
4.4. Określenie wydajności technicznej oraz specyficzności metody izolacji i detekcji pojedynczych krążących komórek nowotworowych	42
4.5. Izolacja, detekcja i pobieranie pojedynczych krążących komórek nowotworowych z próbek klinicznych	44

4.6.	Odwrotna transkrypcja i preamplifikacja materiału z pojedynczych komórek techniką Smart-Seq2 _____	46
4.7.	Ocena jakości transkryptomu pojedynczych komórek _____	47
4.8.	Analiza ekspresji genów metodą qPCR w pojedynczych komórkach _____	48
4.9.	Przygotowanie bibliotek oraz sekwencjonowanie (RNA-Seq) pojedynczych komórek _____	49
4.10.	Analiza metod izolacji CTCs o różnych fenotypach EMT od chorych na raka piersi _____	50
4.11.	Analiza bioinformatyczna i statystyczna _____	51
5.	Wyniki _____	52
	<i>Analiza retrospektywna</i> _____	<i>52</i>
5.1.	Identyfikacja fenotypów EMT krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi _____	52
5.2.	Znaczenie kliniczne różnych fenotypów EMT w zagęszczonych frakcjach komórek nowotworowych u chorych na raka piersi _____	57
	<i>Analiza danych literaturowych dotyczących metod izolacji krążących komórek nowotworowych</i> _____	<i>59</i>
5.3.	Wydajność odzysku epitelialnych i mezenchymalnych komórek z linii komórkowych raka piersi w testach symulujących analizę próbek klinicznych _____	59
	<i>Analiza prospektywna</i> _____	<i>62</i>
5.4.	Wydajność techniczna metody izolacji i detekcji pojedynczych krążących komórek nowotworowych _____	62
5.5.	Heterogenność fenotypu EMT w krążących komórkach nowotworowych u chorych na raka piersi _____	63
5.6.	Liczba i fenotyp EMT krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi w zależności od ich charakterystyki kliniczno-patologicznej _____	66
5.7.	Transkryptomiczne profilowanie pojedynczych krążących komórek nowotworowych _____	70
6.	Dyskusja _____	78
	<i>Analiza retrospektywna</i> _____	<i>79</i>
	<i>Analiza metod izolacji krążących komórek nowotworowych</i> _____	<i>80</i>
	<i>Analiza prospektywna</i> _____	<i>81</i>
7.	Podsumowanie i wnioski _____	85
8.	Tabele uzupełniające _____	87
9.	Spis tabel _____	120
10.	Spis rycin _____	120
11.	Piśmiennictwo _____	122

Streszczenie

Rak piersi (ang. *breast cancer* – BC) jest najczęściej diagnozowanym typem nowotworu oraz wiodącą przyczyną zgonu kobiet z powodu nowotworu na świecie. Pomimo, że prognoza dla chorych na BC jest obiecująca, ściśle zależy od momentu diagnozy, a u chorych z przerzutami odległymi jest szczególnie niekorzystna.

Za powstawanie przerzutów odpowiedzialne są krążące komórki nowotworowe (ang. *circulating tumor cells* – CTCs), które po przekroczeniu bariery naczyń krwionośnych migrują w krwiobiegu i mogą kolonizować odległe narządy. CTCs stanowią zróżnicowaną populację komórek, która osiąga swoją heterogenność między innymi wskutek przemiany epithelialno-mezenchymalnej (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition* – EMT). W wyniku EMT komórki nowotworowe stają się bardziej mobilne i inwazyjne oraz zyskują cechy promujące ich przetrwanie w krwiobiegu i kolonizację odległych nisz, jednocześnie tracąc ekspresję epithelialnych markerów, która stanowi kryterium większości metod izolacji CTCs. Na wczesnym etapie kaskady metastatycznej liczba CTCs w krwiobiegu chorych na BC jest mała (1 - kilka CTCs w 7,5 mL próbce krwi) i stanowi niewielki odsetek komórek znajdujących się w krążeniu. Wobec tego, określenie heterogenności CTCs i poznanie biologicznych przyczyn ich agresywności wymaga zastosowania analizy na poziomie pojedynczej komórki.

W ramach pracy doktorskiej podjęto się określenia wartości klinicznej oraz charakterystyki biologicznej fenotypów EMT CTCs obecnych we krwi obwodowej chorych na BC.

W badaniu retrospektywnym przeanalizowano zagęszczone w CTCs frakcje krwi (ang. *CTCs-enriched blood fractions* – CTCs-EBFs) od 83 operacyjnych chorych na BC. Na podstawie poziomu ekspresji markerów komórek BC (*MGB1*, *HER2*), epithelialnych (*CK19*, *CDH1*) i mezenchymalnych (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*) zdefiniowano obecność i fenotyp CTCs w CTCs-EBFs, a następnie przeanalizowano ekspresję genów promujących agresywność (*CXCR4*, *PLAUR*), powstawanie macierzystego fenotypu (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*) oraz formowanie klastrów (*JUP*) i określono wpływ obecności CTCs o różnych fenotypach EMT na przeżycie oraz skorelowano ją z cechami kliniczno-patologicznymi. CTCs o fenotypach epithelialnym (eCTCs), epithelialno-mezenchymalnym (emCTCs) i mezenchymalnym (mCTCs) występowały u CTCs-pozytywnych chorych na BC w podobnym stosunku (odpowiednio 36,8%, 31,6%, 31,6%). mCTCs charakteryzowały się najbardziej agresywnym fenotypem (wyrażonym najwyższą ekspresją *CXCR4*, *PLAUR*, *CD44*, *NANOG* i *POU5F1*; $P < 0,05$, w porównaniu do eCTCs), a ich obecność korelowała z przerzutami do węzłów chłonnych ($P = 0,043$), większym rozmiarem guza ($P = 0,023$) oraz 7-krotnie wyższym ryzykiem zgonu w analizie wieloczynnikowej (95% CI 1.06–50.41, $P = 0,04$). Obecność emCTCs, charakteryzujących się potencjalnie największą

plastycznością i agresywnością, również korelowała z przerzutami do węzłów chłonnych ($P=0,043$) i większym rozmiarem guza ($P=0,023$), ale nie miała istotnej wartości prognostycznej.

Następnie, w oparciu o wyniki kompleksowego przeglądu i analizy statystycznej danych literaturowych opisujących stopień odzysku komórek BC w układzie modelowym oceniono, że metody izolacji oparte o negatywną selekcję komórek krwi i właściwości fizyczne pozwalają na bardziej wydajną izolację mCTCs niż CellSearch® (złoty standard izolacji CTCs), jednocześnie charakteryzując się nie gorszym niż CellSearch® odzyskiem eCTCs.

W celu prospektywnej analizy pojedynczych CTCs niezależnie od ich fenotypu EMT, opracowano metodę ich izolacji i detekcji. CTCs od 104 operacyjnych chorych na BC oraz 12 chorych na BC, u których wystąpiły przerzuty odległe, wznowa miejscowa lub otrzymywały hormonoterapię, wyizolowano w oparciu o wirowanie w gradiencie gęstości i negatywną selekcję CD45-dodatnich komórek krwi. CTCs zidentyfikowano na podstawie obecności markerów epitelialnych (EpCAM, E-kadheryna) oraz mezenchymalnych (csVIM, MCAM)) w barwieniu immunofluorescencyjnym, a następnie pobrano mikromanipulacyjnie w celu dalszej analizy transkryptomicznej opartej o zmodyfikowany protokół Smart-Seq2. Opracowana metoda izolacji CTCs od chorych na BC charakteryzowała się podobnym stopniem odzysku komórek z linii komórkowych BC o fenotypie epitelialnym (58,4%) i mezenchymalnym (66,6%) oraz nie wpływała na jakość ich transkryptomu. CD45-/CD31-/DAPI-negatywne komórki od chorych na BC określono jako eCTCs (EpCAM-/E-kadheryna-pozytywne, csVIM-/MCAM-negatywne), mCTCs (EpCAM-/E-kadheryna-negatywne, csVIM-/MCAM-pozytywne) i emCTCs, w których markery epitelialne i mezenchymalne były koekspresjonowane. Pięćdziesiąt dwa procent (54/104) chorych na BC było CTCs-pozytywnych, spośród których u jednej trzeciej wykryto jednocześnie obecność CTCs o dwóch lub trzech fenotypach EMT. Więcej CTCs o jakimkolwiek fenotypie oraz w podziale na fenotypy EMT występowało u chorych z niekorzystną charakterystyką kliniczno-patologiczną, tj. z większymi (T2-4; jakiegokolwiek CTCs – $P=0,037$), mniej zróżnicowanymi (stopień złośliwości histologicznej 3) guzami (jakiegokolwiek CTCs – $P=0,006$), oraz z guzami ER-negatywnymi (jakiegokolwiek CTCs – $P=0,020$, eCTCs – $P=0,001$, mCTCs – $P=0,040$), PR-negatywnymi (eCTCs – $P=0,001$) i HER2-pozytywnymi (mCTCs – $P=0,024$). Analiza transkryptomiczna (RNA-Seq) pojedynczych komórek pobranych od chorych na BC wykazała, że w CTCs w porównaniu z komórkami normalnymi (ang. *normal cells* - NCs) mniej genów ulegało ekspresji. Geny, które miały obniżoną ekspresję w CTCs w porównaniu do NCs, są zaangażowane w procesy istotne dla transkrypcji i translacji, podczas gdy dwa geny o zwiększonej ekspresji są związane z hamowaniem translacji (*CYFIP1*) oraz ochroną komórek nowotworowych przed stresem komórkowym (*KDM3B*).

CTCs od chorych na BC charakteryzują się wysoką heterogennością u jednej chorej oraz pomiędzy chorymi. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na istotną rolę profilowania pojedynczych CTCs w klasyfikacji BC i prognozie.

Abstract

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed type of cancer and the leading cause of cancer-related death among women worldwide. Despite promising prognoses for BC patients, these depend strictly on the timing of the diagnosis; in patients with distant metastases, the prognosis is particularly poor.

Circulating tumor cells (CTCs) are responsible for the formation of metastases. After crossing the blood vessel barrier, they migrate through the bloodstream and can colonize distant organs. CTCs represent a diverse population of cells, achieving their heterogeneity, among other factors, through the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). As a result of EMT, cancer cells become more mobile and invasive, acquiring traits that promote their survival in the bloodstream and the colonization of distant niches, while simultaneously losing the expression of epithelial markers, which form the basis of most CTC isolation methods. At the early stage of the metastatic cascade, the number of CTCs in the bloodstream of BC patients is low (1 to a few CTCs in a 7.5 mL blood sample), constituting a small fraction of the cells present in the bloodstream. Therefore, determining the heterogeneity of CTCs and understanding the biological causes of their aggressiveness requires single-cell level analysis.

As the goal of the doctoral dissertation, the clinical value and biological characterization of CTCs with various EMT phenotypes present in the peripheral blood of BC patients were determined.

In a retrospective study, CTCs-enriched blood fractions (CTCs-EBFs) from 83 non-metastatic BC patients were analyzed. Based on the expression levels of BC cell (*MGB1*, *HER2*), epithelial (*CK19*, *CDH1*), and mesenchymal markers (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*), the presence and phenotype of CTCs in CTCs-EBFs were determined. Subsequently, the expression of genes promoting aggressiveness (*CXCR4*, *PLAUR*), the development of stem-like phenotypes (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*), and cluster formation (*JUP*) were analyzed. The impact of the presence of CTCs with different EMT phenotypes on survival was assessed and correlated with clinicopathological features. CTCs of epithelial (eCTCs), epithelial-mesenchymal (emCTCs), and mesenchymal (mCTCs) phenotypes were present in BC patients in similar proportions (36.8%, 31.6%, 31.6%, respectively). mCTCs were characterized by the most aggressive phenotype (expressed by the highest levels of *CXCR4*, *PLAUR*, *CD44*, *NANOG*, and *POU5F1*; $P < 0.05$ compared to eCTCs), and their presence correlated with lymph node metastases ($P = 0.043$), larger tumor size ($P = 0.023$), and a sevenfold higher risk of death in multivariate analysis (95% CI 1.06-50.41, $P = 0.04$). The presence of emCTCs, which potentially have the greatest plasticity

and aggressiveness, also correlated with lymph node involvement ($P=0.043$) and larger tumor size ($P=0.042$) but did not have significant prognostic value.

Subsequently, based on the results of a comprehensive review and statistical analysis of literature data describing the recovery rate of BC cell lines in a model system, it was assessed that isolation methods based on negative selection of blood cells and physical properties allow for more efficient isolation of mCTCs than CellSearch® (the golden standard for CTC isolation), while maintaining recovery rates of eCTCs comparable to CellSearch®.

A method for the prospective isolation and detection of single CTCs, regardless of their EMT phenotype, was developed. CTCs from 104 non-metastatic BC patients and 12 BC patients with distant metastases, local recurrence, or undergoing hormone therapy were isolated using density gradient centrifugation and negative selection of CD45-positive blood cells. CTCs were identified based on the presence of epithelial (EpCAM, E-cadherin) and mesenchymal markers (csVIM, MCAM) using immunofluorescent staining. Then, CTCs were collected by micromanipulation for further transcriptomic analysis based on a modified Smart-Seq2 protocol. The developed method for CTCs isolation demonstrated a similar recovery rate for epithelial (58.4%) and mesenchymal BC cell lines (66.6%) and did not affect the quality of their transcriptome. CD45-/CD31-/DAPI-negative cells from BC patients were classified as eCTCs (EpCAM-/E-cadherin-positive, csVIM-/MCAM-negative), mCTCs (EpCAM-/E-cadherin-negative, csVIM-/MCAM-positive), and emCTCs, in which epithelial and mesenchymal markers were co-expressed. Fifty-two percent (54/104) of BC patients were CTC-positive, with one-third of these patients exhibiting the presence of CTCs with two or three EMT phenotypes simultaneously. More total CTCs of any phenotype and CTCs of particular EMT phenotypes were found in patients with unfavorable clinicopathological characteristics, such as larger (T2 4; any CTCs – $P=0.037$), less differentiated tumors (histological grade 3; any CTCs – $P=0.006$), and tumors that were ER-negative (any CTCs – $P=0.020$, eCTCs – $P=0.001$, mCTCs – $P=0.040$), PR-negative (eCTCs – $P=0.001$), and HER2-positive (mCTCs – $P=0.024$). Transcriptomic analysis (RNA-Seq) of single cells collected from BC patients showed that less genes were expressed in CTCs compared to normal cells (NCs). The genes with reduced expression in CTCs compared to NCs are involved in processes crucial for transcription and translation, while two genes with increased expression are associated with the inhibition of translation (*CYFIP1*) and the protection of cancer cells from cellular stress (*KDM3B*).

CTCs from BC patients exhibit high heterogeneity both within a single patient and different patients. The results of the analyses indicate the significant role of single CTC profiling in BC classification and prognosis.

Wykaz stosowanych skrótów

95% CI	ang. <i>95% confidence intervals</i> , 95% przedział ufności
ACTB	ang. <i>actin beta</i> , aktyna beta
ALDH1	ang. <i>aldehyde dehydrogenase 1</i> , dehydrogenaza aldehydowa 1
ALDH1A1	ang. <i>aldehyde dehydrogenase 1 family member A1</i> , dehydrogenaza aldehydowa 1 A1, gen kodujący ALDH1
BB	ang. <i>blocking buffer</i> , bufor blokujący
BC	ang. <i>breast cancer</i> , rak piersi
BSA	ang. <i>bovine serum albumin</i> , albumina surowicy bydlęcej
CD133	ang. <i>cluster of differentiation 133</i> , cząsteczka różnicowania komórkowego 133
CD31	ang. <i>cluster of differentiation 31</i> , cząsteczka różnicowania komórkowego 31, marker komórek endotelialnych
CD44	ang. <i>cluster of differentiation 44</i> , cząsteczka różnicowania komórkowego 44
CD45	ang. <i>cluster of differentiation 45</i> , cząsteczka różnicowania komórkowego 45, marker komórek hematopoetycznych
CB	ang. <i>coating buffer</i> , bufor opłaszczający
CDH1	ang. <i>cadherin 1</i> , gen kodujący E-kadherynę (kadherynę 1)
CDH2	ang. <i>cadherin 2</i> , gen kodujący N-kadherynę (kadherynę 2)
CK19	ang. <i>cytokeratin 19</i> , cytokeratyna 19
csVIM	ang. <i>cell surface vimentin</i> , wimentyna powierzchniowa
CTCs	ang. <i>circulating tumor cells</i> , krążące komórki nowotworowe
CTCs-EBF	ang. <i>CTCs-enriched blood fraction</i> , frakcja krwi wzbogacona w CTCs
Cq	ang. <i>cycle of quantification</i> , cykl kwantyfikacji
CXCR4	ang. <i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i> , receptor chemokinowy o motywie C-X-C
CYFIP1	ang. <i>cytoplasmic FMR1 interacting protein 1</i> , białko cytoplazmatyczne 1 oddziałujące z FMR1
DAPI	ang. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i> , dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu
DEGs	ang. <i>differentially expressed genes</i> , geny ulegające zróżnicowanej ekspresji
DEP	ang. <i>dielectrophoresis</i> , dielektroforeza
DFS	ang. <i>disease-free survival</i> , czas wolny od choroby

DMEM	ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	ang. <i>deoxynucleotide triphosphates</i> , trifosforany deoksynukleotydów
DTCs	ang. <i>disseminating tumor cells</i> , rozsiane komórki nowotworowe
DTT	ang. <i>dithiothreitol</i> , ditiotreitól
ECAD	ang. <i>E-cadherin</i> , E-kadheryna
ECM	ang. <i>extracellular matrix</i> , macierz zewnątrzkomórkowa
eCTCs	ang. <i>epithelial CTCs</i> , CTCs o fenotypie epithelialnym
EDTA	ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kwas wersenowy
EEF1A1	ang. <i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i> , eukariotyczny czynnik elongacyjny 1 alfa 1
EGFR	ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
emCTCs	ang. <i>epithelial-mesenchymal CTCs</i> , CTCs o fenotypie epithelialno-mezenchymalnym
EMT	ang. <i>epithelial-to-mesenchymal transition</i> , przemiana epithelialno-mezenchymalna
EMT-TFs	ang. <i>EMT-inducing transcription factors</i> , czynniki transkrypcyjne indukujące EMT
EpCAM	ang. <i>epithelial cell adhesion molecule</i> , antygen adhezyjny komórek nabłonkowych
epiBCs	ang. <i>epithelial BC cells</i> , komórki BC o fenotypie epithelialnym
ER	ang. <i>estrogen receptor</i> , receptor estrogenowy
ERBB2	ang. <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i> , receptor kinazy tyrozynowej erb-b2, gen kodujący HER2
FBS	ang. <i>fetal bovine serum</i> , płodowa surowica bydłęca
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Agencja Żywności i Leków
FCMC	ang. <i>fluidic cell-microarray-chip</i>
FDR	ang. <i>false discovery rate</i> , oczekiwana proporcja błędów I rodzaju wśród wyników istotnych statystycznie
FMSA	ang. <i>flexible micro spring array</i>
G	ang. <i>grade</i> , stopień złośliwości histologicznej
GAPDH	ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GEDI	ang. <i>geometrically enhanced differential immunocapture (chip)</i>

HER2	ang. <i>human epidermal growth factor receptor type 2</i> , ludzki naskórkowy czynnik wzrostu typu 2
HER2+ BC	ang. <i>HER2-enriched</i> , HER2-pozytywny BC
HIF-1α	ang. <i>hypoxia-inducible factor 1α</i> , czynnik indukowany hipoksją 1 α
HR	ang. <i>hazard ratio</i> , hazard względny
ILs	ang. <i>interleukins</i> , interleukiny
ISET	ang. <i>isolation by size of tumor</i>
JUP	ang. <i>junction plakoglobin</i> , gen kodujący plakoglobinę
KDM3B	ang. <i>lysine demethylase 3B</i> , demetylaza lizyny 3B
KRT19	ang. <i>keratin 19</i> , gen kodujący cytokeratynę 19
KRTs	ang. <i>keratins</i> , keratyny
lum A BC	ang. <i>luminal A BC</i> , luminalny A BC
lum B BC	ang. <i>luminal B BC</i> , luminalny B BC
MAPK	ang. <i>mitogen-activated protein kinases signaling pathway</i> , ścieżka sygnalizacyjna kinaz białkowych aktywowanych mitogenami
mCTCs	ang. <i>mesenchymal CTCs</i> , CTCs o fenotypie mezenchymalnym
MCA	ang. <i>microcavity array</i>
MCAM	ang. <i>melanoma cell adhesion molecule</i> , czynnik adhezyjny komórek czerniaka
mesBCs	ang. <i>mesenchymal BC cells</i> , komórki BC o fenotypie mezenchymalnym
MET	ang. <i>mesenchymal-to-epithelial transition</i> , przemiana mezenchymalno-epitelialna
MGB1	ang. <i>mammaglobin 1</i> , mammaglobina 1 (mammaglobina A)
MINDEC	ang. <i>multi-marker immunomagnetic negative depletion enrichment of CTCs</i>
MUC1	ang. <i>mucin 1</i> , mucyna 1
NANOG	ang. <i>NANOG homeobox</i> , homeokaseta NANOG
NCs	ang. <i>normal cells</i> , komórki normalne
NCAD	ang. <i>N-cadherin</i> , N-kadheryna
neg	ang. <i>negative</i> , (status) negatywny
NF-κB	ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B
Notch	ang. <i>Notch signaling pathway</i> , ścieżka sygnalizacyjna Notch

OCLN	ang. <i>occludin</i> , okludyna
OCT-4	ang. <i>octamer-binding transcription factor 4</i> , czynnik transkrypcyjny 4 wiążący sekwencję oktamerową
OS	ang. <i>overall survival</i> , czas całkowitego przeżycia
P	ang. <i>P-value</i> , prawdopodobieństwo testowe (wartość P)
PAI1	ang. <i>plasminogen activator inhibitor 1</i> , inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PBMCs	ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS	ang. <i>phosphate-buffered saline</i> , sól fizjologiczna buforowana fosforanami
pCTCs	ang. <i>potential CTCs</i> , potencjalne CTCs
PECAM1	ang. <i>platelet and endothelial cell adhesion molecule</i> , antygen adhezyjny płytek i komórek endotelialnych, gen kodujący CD31
PFS	ang. <i>progression-free survival</i> , czas wolny od progresji
PI3K/AKT	ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT serine/threonine kinase signaling pathway</i> , ścieżka sygnalizacyjna 3-kinazy fosfatydyloinozytolu/ kinazy serynowo/treoninowej AKT
PLAUR	ang. <i>plasminogen activator urokinase receptor</i> , gen kodujący uPAR
PLS3	ang. <i>plastin 3</i> , plastyna 3
PKGB	ang. <i>plakoglobin</i> , plakoglobina
PLTs	ang. <i>platelets</i> , płytki krwi
pNCs	ang. <i>potential NCs</i> , potencjalne NCs
POU5F1	ang. <i>POU domain class 5 homeobox 1</i> , homeokaseta 1 klasy 5 o domenie POU, gen kodujący OCT-4
pos	ang. <i>positive</i> , (status) pozytywny
PR	ang. <i>progesterone receptor</i> , receptor progesteronowy
PROM1	ang. <i>prominin 1</i> , prominina 1, gen kodujący CD133
PTPRC	ang. <i>protein tyrosine phosphatase receptor type C</i> , gen kodujący receptor tyrozynowej fosfatazy białkowej typu C - CD45
pz	ang. <i>base pair</i> , pary zasad (miara wielkości produktu PCR)
qPCR	ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> , ilościowy PCR
refGs	ang. <i>reference genes</i> , geny referencyjne
RBCs	ang. <i>red blood cells</i> , czerwone krwinki (erytrocyty)

ROS	ang. <i>reactive oxygen species</i> , reaktywne formy tlenu
RPLs	ang. <i>ribosomal protein L</i> , duże podjednostki rybosomów
RPSs	ang. <i>ribosomal protein S</i> , małe podjednostki rybosomów
RR	ang. <i>recovery rate</i> , stopień odzysku
RT	ang. <i>reverse transcription</i> , odwrotna transkrypcja
rVAR2	ang. <i>recombinant glycosaminoglycan-binding malaria protein VAR2CSA</i>
SB	ang. <i>staining buffer</i> , bufor do barwienia
SCGB2A2	ang. <i>secretoglobin family 2A member 2</i> , sekretoglobina 2A2, gen kodujący MGB1
SD	ang. <i>standard deviation</i> , odchylenie standardowe
SERPINE1	ang. <i>serine proteinase inhibitor family E member 1</i> , inhibitor proteiny serynowej E1, gen kodujący PAI1
SNAI1/2	ang. <i>Snail family transcriptional repressor1/2</i> , repressor transkrypcyjny 1/2 z rodziny Snail
taSSAW	ang. <i>tilted-angle standing surface acoustic waves</i>
tCTCs	ang. <i>true CTCs</i> , prawdziwe CTCs
TEM	ang. <i>transendothelial migration</i> , migracja transendotelialna
TGF-β	ang. <i>transforming growth factor β</i> , transformujący czynnik wzrostu β
TNBC	ang. <i>triple negative BC</i> , potrójnie-ujemny BC
tNCs	ang. <i>true NCs</i> , prawdziwe NCs
TNF-α	ang. <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów α
Tris	ang. <i>2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol</i> , 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol)
TROP2	ang. <i>trophoblast cell surface antigen 2</i> , antygen powierzchniowy trofoblastu 2
TSO	ang. <i>template-switching oligos</i> , oligonukleotydy umożliwiające przełączenie matrycy
TWIST1	ang. <i>Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1</i> , czynnik transkrypcyjny 1 z rodziny Twist o motywie helisa-pętla-helisa
uPAR	ang. <i>urokinase plasminogen activator surface receptor</i> , receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

VIM	ang. <i>vimentin</i> , wimentyna
Wnt/β-CAT	ang. <i>WNT proto-oncogene/ β-catenin signaling pathway</i> , ścieżka sygnalizacyjna Wnt/ β -katenina
YWHAZ	ang. <i>tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i> , białko zeta aktywujące 3-monooksygenazę tyrozynową/ 5-monooksygenazę tryptofanową

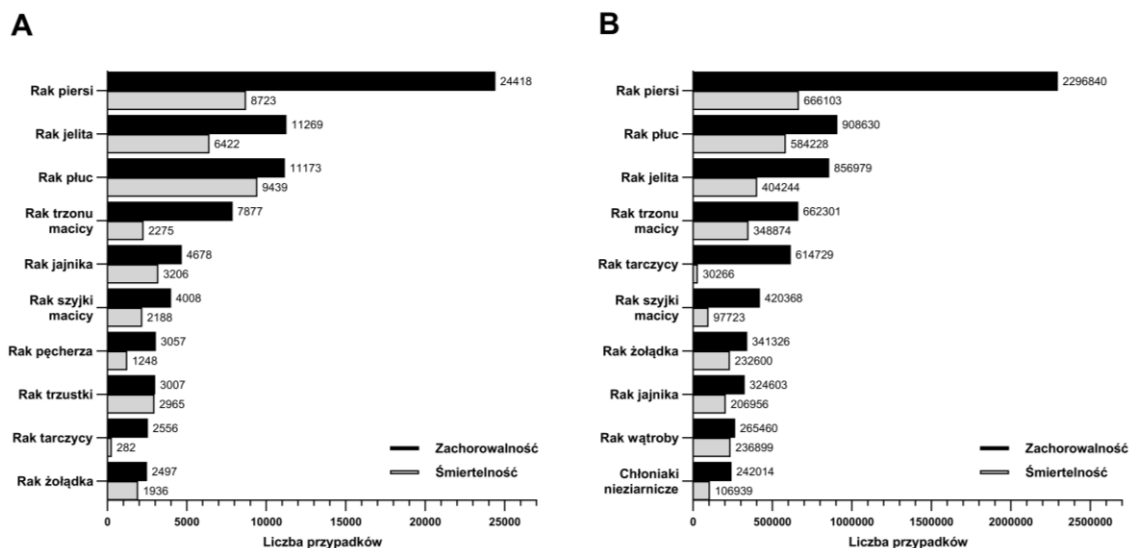
1. Wstęp

1.1. Epidemiologia, etiologia, czynniki predysponujące i prognoza w raku piersi

Rak piersi (ang. *breast cancer* – BC) jest najczęściej diagnozowanym typem nowotworu u kobiet w Polsce (24 418 przypadków w 2022 roku; **Ryc. 1A**) i na świecie (2 296 840 przypadków; **Ryc. 1B**), gdzie jednocześnie jest wiodącą przyczyną zgonów z powodu nowotworu (666 103 zgonów na świecie w 2022 roku; **Ryc. 1B**) – w 2022 roku odnotowane zgony chorych na BC stanowiły aż 15,4% wszystkich zgonów spowodowanych nowotworem [1]. W przypadku Polski, BC jest drugim najczęstszym powodem zgonu kobiet z powodu nowotworu (8 723 chorych na BC – 16,1% zgonów z powodu nowotworu w 2022 roku; **Ryc. 1A**) [1]. Szacuje się, że blisko jedna na dziesięć kobiet w Polsce zostanie dotknięta tą chorobą w ciągu życia [1]. Zgodnie z przewidywaniami Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer* – IARC), w ciągu najbliższego ćwierćwiecza (do 2050 roku) liczba zachorowań na BC na świecie wzrośnie z 2 296 840 do 3 553 037 (o 54,7%), zaś liczba zgonów – z 666 103 do 1 138 155 (o 70,9%) [2]. Zachorowalność na BC rokrocznie rośnie zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się, choć odnotowuje się znaczne zróżnicowanie pomiędzy regionami [2]. Sama częstość występowania BC i liczba spowodowanych nim zgonów różni się w zależności od regionu geograficznego [1] oraz w różnym stopniu dotyka kobiety wywodzące się z różnych grup etnicznych i społecznych [3-5], co niepodważalnie jest związane z dostępem do opieki medycznej oraz programów przesiewowych [6-8].

Najistotniejszym czynnikiem korelującym z ryzykiem zachorowania na BC jest wiek; najczęściej chorują kobiety w okresie post menopauzalnym, powyżej 50. roku życia [1]. Wśród czynników przyczyniających się do rozwoju BC należy wyróżnić ekspozycję na estrogen, która jest wydłużona/ zwiększona w przypadku wczesnego pokwitania, późnej menopauzy lub stosowania hormonalnej terapii zastępczej [9-11]. Jednocześnie, w etiologii BC podkreśla się znaczenie czynników reprodukcyjnych; minimum jedna ciąża, wczesny wiek pierwszej ciąży oraz karmienie piersią korelują z mniejszym ryzykiem zachorowania na BC [12, 13].

Do czynników predysponujących do zachorowanie na BC należy także zaliczyć występowanie mutacji w genach kodujących białka istotne dla mechanizmów naprawy DNA, wzrostu i proliferacji oraz apoptozy (m.in. *BRCA1/2* – ang. *breast cancer gene 1/2*, *PALB2* – ang. *partner and localizer of BRCA2*, *TP53* – ang. *tumor protein 53*, *PTEN* – ang. *phosphatase and tensin homolog*) [14-19], jednakże oprócz podłoża genetycznego do rozwoju BC mogą przyczynić się też czynniki środowiskowe, takie jak ekspozycja na wybrane substancje chemiczne i promieniowanie jonizujące [20-22] oraz styl życia (np. używki, dieta, niski poziom aktywności fizycznej) [23-27].



Rycina 1. (A) Liczba zachorowań na nowotwory i zgonów z powodu nowotworów wśród kobiet w 2022 roku w Polsce i (B) na świecie [1].

Prognoza dla chorych na BC jest zróżnicowana i zależy od wielu czynników, w tym typu molekularnego definiowanego na podstawie ekspresji receptora estrogenowego (ang. *estrogen receptor* – ER), receptora progesteronowego (ang. *progesterone receptor* – PR) i receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (ang. *human epidermal growth factor receptor type 2* – HER2), oraz potencjału proliferacyjnego guza (mierzonego odsetkiem Ki67-pozytywnych komórek nowotworowych). Najdłuższy czas całkowitego przeżycia (ang. *overall survival* – OS) odnotowuje się u chorych na luminalnego A (ang. *luminal A* – lum A; ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-negatywny, Ki67<14% i luminalnego B (ang. *luminal B* – lum B; ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-negatywny, Ki67≥14%, albo ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-pozytywny, jakiegokolwiek Ki67) BC, zaś prognoza jest najmniej korzystna, gdy status receptorów hormonów i HER2 jest negatywny (potrójnie ujemny BC; ang. *triple-negative BC* – TNBC) [28-30]. Prognoza jest także silnie związana z momentem wykrycia choroby; w zaawansowanym BC (stadium IV), gdzie obserwuje się przerzuty do odległych narządów (szczególnie do mózgu), rokowanie jest zawsze mniej korzystne [31, 32], a cel leczenia często koncentruje się na kontroli objawów, utrzymaniu jakości życia i opóźnieniu postępu choroby [33].

Warto podkreślić, że prognoza w BC jest złożona, a indywidualna ocena powinna być dokładnie przeprowadzana przez lekarza onkologa. Chore na BC otrzymują różne formy leczenia w zależności od cech ich przypadku, a współczesne metody diagnostyki i terapii znacznie wydłużyły OS i poprawiły komfort chorych na BC [34, 35].

1.2. Rola przemiany epitelialno-mezenchymalnej w kaskadzie metastatycznej

Jednym z mechanizmów, który może odpowiadać za nabycie przez komórki BC cech kluczowych dla przerzutowania jest przemiana epitelialno-mezenchymalna (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition* – EMT) [36-39]. EMT jest fizjologicznym procesem istotnym w rozwoju embrionalnym i przebudowie tkanek, podczas którego komórki epitelialne tracą polarność oraz połączenia z sąsiadującymi komórkami i podłożem, jednocześnie nabywając bardziej mobilny fenotyp [37, 38]. Podczas embriogenezy EMT ma kluczowe znaczenie w procesach gastrulacji, formowania cewy nerwowej oraz powstawania tkanek i narządów z listków zarodkowych, zaś w tkankach dojrzałego organizmu jest aktywowany w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki i stan zapalny [38, 40-42]. W procesie gojenia ran EMT indukuje migrację komórek nabłonkowych do miejsca uszkodzenia w celu regeneracji i odbudowy tkanki [37, 40]. Powstałe w wyniku EMT komórki mezenchymalne mogą różnicować się w fibroblasty, miofibroblasty i komórki śródbłonna, biorące udział w kluczowych dla rekonstrukcji tkanek procesach – angiogenezie, zwłóknieniu i tworzeniu blizn [43-45].

Aktywacja EMT w warunkach patologicznych przyczynia się do zwiększenia mobilności i inwazyjności komórek nowotworowych, ułatwiając im odłączenie się od guza pierwotnego, penetrację sąsiadujących tkanek, pokonanie bariery naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz kolonizację odległych nisz (**Ryc. 2**) [36, 46, 47].

Czynniki aktywujące przemianę epitelialno-mezenchymalną

Aktywacja EMT w guzie pierwotnym jest kompleksowym procesem obejmującym wzajemne oddziaływanie różnych ścieżek sygnalizacyjnych, sygnałów środowiskowych i zmian epigenetycznych [36, 48-70].

Głównymi regulatorami EMT są geny kodujące czynniki transkrypcyjne (ang. *EMT-inducing transcription factors* – EMT-TFs): SNAI1/2 (ang. *Snail family transcriptional repressor 1/2*, repressor transkrypcyjny 1/2 z rodziny Snail) [51, 56, 62, 71], TWIST1 (ang. *Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1*, czynnik transkrypcyjny 1 z rodziny Twist o motywie helisa-pętla-helisa) [51, 63, 71-75], ZEB1/2 (ang. *zinc finger E-box binding homeobox 1/2*) [51, 71]. Ich ekspresja jest regulowana na drodze wielu ścieżek transdukcji sygnału, między innymi JAK/STAT (ang. *Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*) [52, 53], Notch (ang. *Notch signaling pathway*, ścieżka sygnalizacyjna Notch) [54-56], PI3K/AKT (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT serine/threonine kinase signaling pathway*, ścieżka sygnalizacyjna 3-kinazy fosfatydyloinozytolu/ kinazy serynowo/treoninowej AKT) [57, 58], mTOR (ang. *mechanistic target of rapamycin pathway*) [59, 60], MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases signaling pathway*,

ścieżka sygnalizacyjna kinaz białkowych aktywowanych mitogenami) [61], Wnt/ β -CAT (ang. *WNT proto-oncogene/ β -catenin signaling pathway*, ścieżka sygnalizacyjna Wnt/ β -katenina) [63, 64], AMPK (ang. *AMP-activated kinase signaling pathway*) [76], oraz regulowanych przez TGF- β (ang. *transforming growth factor β* – transformujący czynnik wzrostu β) [61, 65, 66] i na drodze aktywacji NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B) [53, 62, 67, 75].

Największą grupę induktorów EMT stanowią czynniki zewnątrzkomórkowe, między innymi TGF- β [77, 78], naskórkowy czynnik wzrostu [78, 79], czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* – TNF- α) [75], interleukiny (ang. *interleukins* – ILs; np. IL-6, IL-8) [80-82], wydzielane przez komórki znajdujące się w mikrośrodowisku guza [83, 84] lub przez same komórki nowotworowe [85]. EMT może także zostać zaindukowana w odpowiedzi na zwiększoną sztywność i skład macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* – ECM), które aktywują sygnalizację zależną od integryn, prowadząc do zwiększenia ekspresji EMT-TFs i zaburzenia adhezji, ale też reorganizacji cytoszkieletu i nabycia mobilności [86-91].

EMT może być zaindukowane wskutek hipoksji, której doświadczają komórki nowotworowe występujące w ubogo unaczynionych częściach guza. Wskutek redukcji poziomu tlenu dochodzi do stabilizacji czynnika indukowanego hipoksją 1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α* – HIF-1 α), co wpływa na ekspresję EMT-TFs [92-95] oraz innych genów zaangażowanych w proliferację, przetrwanie i inwazyjność komórek nowotworowych [96]. Do aktywacji HIF-1 α może dojść także niezależnie od hipoksji na drodze sygnalizacji NF- κ B [97], TGF- β [98], PI3K/AKT [99] i Wnt/ β -CAT [100]. W warunkach normoksji do stabilizacji HIF-1 α może dojść poprzez działanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS) [101], które są wydzielane wskutek intensywnie zachodzących procesów metabolicznych i stresu oksydacyjnego [102-104]. Ogółem, ROS pełnią istotną rolę w nowotworzeniu; o ile ich wysoki poziom działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe, to niski poziom ROS stymuluje ich proliferację i przetrwanie [102-104]. ROS indukują także EMT poprzez NF- κ B-zależną indukcję ekspresji SNAI1 [62].

Warto również podkreślić istotną rolę zmian epigenetycznych w indukcji EMT; metylacja DNA, modyfikacje histonów i mikroRNA wyciszają ekspresję genów epitelialnych i aktywują ekspresję markerów mezenchymalnych, prowadząc do promowania mezenchymalnego fenotypu [70, 105-108].

Zmiany morfologiczne oraz utrata adhezji

Wskutek EMT w komórkach nowotworowych BC dochodzi do zaburzenia poziomu białek cytoszkieletu; ekspresja charakterystycznych dla komórek epitelialnych keratyn (ang. *keratins* – KRTs, m.in. KRT-18, -19, -7, -8) ulega obniżeniu, a w filamentach pośrednich zwiększa się udział wimentyny (ang. *vimentin* – VIM), co promuje mobilność komórki [110-112]. Indukowana jest także rearanżacja filamentów aktynowych, co prowadzi do formowania bogatych w aktywne struktur takich jak lamellipodia i filopodia, a w konsekwencji do zwiększenia zdolności do migracji [110, 112, 113]. Komórki nowotworowe tracą także kontakt z sąsiadującymi komórkami i podłożem w wyniku zaburzonej ekspresji białek budujących połączenia zwierające; zmniejszona ekspresja epitelialnej E-kadheryny (ang. *E-cadherin* – ECAD) i zwiększona ekspresja mezenchymalnej N-kadheryny (ang. *N-cadherin* – NCAD) koreluje z bardziej mobilnym fenotypem komórek [114-119]. Dochodzi także do zmian w strukturach połączeń zamykających i desmosomów oraz indukowanego przez TGF- β obniżenia ekspresji okludyny (ang. *occludin* – OCLN), co skutkuje zaburzeniem integralności nabłonka [120]. Powyższe zmiany prowadzące do zwiększenia mobilności komórek nowotworowych, są wyrażone poprzez zmiany morfologiczne – zaburzoną polarność oraz zmianę kształtu na bardziej obły, wydłużony, wrzecionowaty [121, 122].

Zwiększenie mobilności i inwazyjności

Komórki nowotworowe oraz komórki stromy (miofibroblasty, fibroblasty, komórki endotelialne, makrofagi) wykazują ekspresję aktywatorów plazminogenu, głównie typu urokinazowego i tkankowego, które konwertują plazminogen do plazminy, proteazy serynowej degradującej białka ECM [123-126]. Plazmina z kolei promuje nabywanie przez komórki nowotworowe agresywnych mezenchymalnych cech oraz aktywuje metaloproteinazy [127], które degradują białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak kolagen, syndekan, fibronektyna czy laminina [128-131]. Wskutek działania plazminy dochodzi także do uwolnienia zgromadzonych w ECM czynników wzrostu (np. TGF- β , czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik wzrostu hepatocytów, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF)) i cytokin, istotnych w procesie aktywacji EMT wskutek sygnalizacji parakrynej [132-134]. Wydzielane chemokiny i czynniki wzrostu pełnią także rolę chemoatraktanta komórek nowotworowych w kierunku naczyń limfatycznych i krwionośnych [135, 136]. Komórki nowotworowe wskutek EMT ekspresjują z kolei receptory chemokin, w tym receptor chemokinowy 4 o motywie C-X-C (ang. *C-X-C motif chemokine receptor 4* – CXCR4), które pozwalają na odbieranie sygnałów promujących ich chemotaksję [137, 138].

Powyżej wymienione mechanizmy promują penetrację ECM i pobliskich tkanek przez komórki nowotworowe, co jest istotnym elementem procesu przerzutowania.

Przekroczenie bariery naczyń krwionośnych

Intrawazacja komórek nowotworowych jest krytycznym elementem kaskady metastatycznej, podczas którego dochodzi do przekroczenia przez nie bariery naczyń limfatycznych i krwionośnych (**Ryc. 2**). Aktywna intrawazacja jest ułatwiona dzięki zmianom w komórkach nowotworowych, które zaszły podczas EMT, ale może także zachodzić w sposób pasywny [139]. Teoria pasywnej intrawazacji jest wspierana przez fakt, że proliferująca masa guza wywiera stres mechaniczny na naczynia krwionośne [140], oraz że wskutek urazu lub masażu guza pierwotnego dochodzi do zwiększonego uwalniania komórek nowotworowych do krwiobiegu [141].

Większość komórek nowotworowych pokonuje barierę naczyń krwionośnych na drodze migracji parakomórkowej, która zakłada ich przedostawanie się przez uprzednio zdegradowane połączenia międzykomórkowe [142], ale niektóre źródła literaturowe opisują migrację komórek nowotworowych przez ciało komórek endotelialnych (migracja transkomórkowa) [143]. W pobliżu wcześniej istniejących, bądź powstałych wskutek angiogenezy ścian naczyń krwionośnych komórki nowotworowe poprzez adhezję oddziałują z komórkami endotelialnymi, i w wyniku migracji transendotelialnej (ang. *transendothelial migration* – TEM), penetracji błony podstawnej endotelium i warstwy pericytów wkraczają do środowiska krwionośnego [144, 145]. Proces intrawazacji jest dodatkowo wspierany przez czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe oraz komórki stromy, które powodują zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych [146-149].

Znajdujące się w krwiobiegu komórki nowotworowe, określane jako krążące komórki nowotworowe (ang. *circulating tumor cells* – CTCs), mogą migrować do odległych tkanek i organów, stanowiąc źródło nowych ognisk metastatycznych.

Migracja i przetrwanie w krwiobiegu

Układ krwionośny jest dla CTCs zupełnie nowym, obcym środowiskiem, w którym są narażone na zróżnicowane czynniki stresowe. CTCs doświadczają stresów fizycznych, takich jak naprężenia ścinające i turbulencje, co może prowadzić do mechanicznych uszkodzeń i fragmentacji tych komórek [150, 151]. Wśród cech, które promują przetrwanie CTCs są te, które nabyły w drodze EMT– zwiększona deformowalność oraz odporność na *anoikis*, śmierć komórkową, która wywoływana jest brakiem kontaktu z podłożem [151-153]. CTCs nabywają

cechy charakterystyczne dla komórek macierzystych, w tym zdolność do samoodnowy, która zwiększa ich potencjał metastatyczny [63, 74, 154, 155].

CTCs mogą angażować wiele mechanizmów, aby unikać kontroli układu immunologicznego i zniszczenia wskutek bezpośredniego lub pośredniego działania leukocytów [156-159]. Komórka nowotworowa może zmieniać wzór ekspresji i różnorodności peptydów prezentowanych na powierzchni, poprzez obniżenie ekspresji podjednostek immunoproteasomu oraz białek biorących udział w transporcie i prezentacji antygenów [156]. Stanowi to kamuflaż maskujący CTCs i uniemożliwiający ich rozpoznanie przez limfocyty T cytotoksyczne. Dodatkowo, poprzez zwiększenie ekspresji białek wchodzących w interakcję z białkami punktów kontrolnych układu immunologicznego (np. PD-L1/2 – ang. *programmed death receptor 1/2 ligand*), CTCs zapobiegają aktywacji limfocytów T, co indukuje ich wyczerpanie i supresję odpowiedzi antynowotworowej [158].

Poprzez formowanie klastrów z innymi CTCs, komórkami układu immunologicznego i endotelium oraz płytkami krwi (ang. *platelets* – PLTs), CTCs zapewniają sobie ochronę przed uszkodzeniem i fragmentacją wskutek działania sił spowodowanych przepływem krwi w naczyniach, a także działaniem komórek układu immunologicznego [160-163]. PLTs biorą udział w transporcie białek głównego układu zgodności tkankowej na powierzchnię CTCs, upodabniając je w ten sposób do nietransformowanych nowotworowo komórek i chroniąc przed komórkami układu immunologicznego [164]. TGF- β i VEGF wydzielane przez aktywowane PLTs, odpowiednio wpływają na zmniejszenie ekspresji immunoreceptora NKG2D (ang. *natural killer group 2D receptor*) komórek NK, hamując ich aktywność [165], oraz zapobiegają dojrzewaniu komórek dendrytycznych, które prezentują antygeny komórkom układu immunologicznego [166]. Wydzielane przez PLTs TGF- β , płytkopochodny czynnik wzrostu i tromboksan A2 aktywują pro-przeżyciowe ścieżki sygnalizacyjne (PI3K/AKT, MAPK, Wnt/ β -CAT, Notch, TGF- β , NF- κ B) oraz zwiększają ekspresję anti-apoptycznych białek Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma-2*) i Bcl-xL (ang. *B-cell lymphoma-extra large*), co promuje ich przetrwanie [167-171].

Jako uboczne produkty przemiany materii CTCs produkują ROS, co może indukować stres oksydacyjny i uszkodzenie komponentów komórki [172]. W celu ochrony przed ROS CTCs uruchamiają szereg mechanizmów enzymatycznych; zwiększają ekspresję dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, które neutralizują ROS [173]. W przypadku uszkodzenia DNA przez ROS, komórka aktywuje mechanizmy naprawy DNA, takie jak naprawa przez wycinanie zasad i nukleotydów, umożliwiając zachowanie integralności genomu i zapobiegając akumulacji mutacji [174]. Z drugiej strony, ROS mogą promować karcynogenezę poprzez aktywację protoonkogenów i inaktywację genów supresorowych [175].

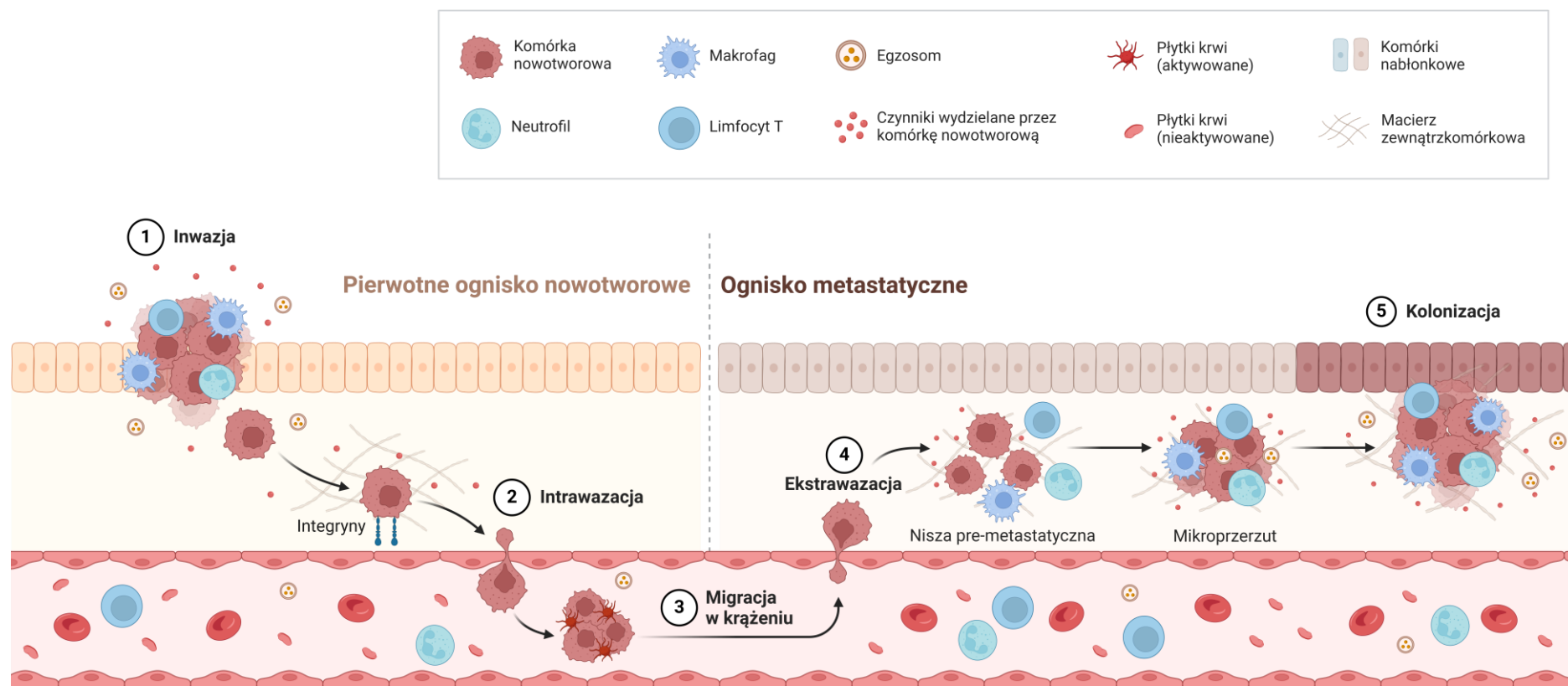
W celu zmniejszenia produkcji ROS, komórka nowotworowa może modyfikować swój metabolizm i ograniczać zdobywanie energii na drodze fosforylacji oksydacyjnej na poczet glikolizy [176, 177].

Z uwagi na mnogość czynników stresowych wpływających na CTCs w układzie krwionośnym, jedynie niewielki odsetek CTCs przetrwa w tych niesprzyjających warunkach i dotrze do narządów odległych, gdzie czekają na nie kolejne wyzwania związane z przystosowaniem do nowego środowiska.

Ekstrawazacja i kolonizacja niszy metastatycznej

Większość danych literaturowych wskazuje, że ekstrawazacja CTCs zachodzi w sposób aktywny i jest napędzana przez różne czynniki molekularne i mechanizmy komórkowe, które umożliwiają CTCs przekraczanie bariery śródbłonkowej i inwazję odległych tkanek [178]. Ekstrawazację CTCs często porównuje się do TEM leukocytów, która jest aktywnym procesem angażującym cząsteczki adhezyjne, chemokiny i różne mechanizmy molekularne [179]. Klastry CTCs charakteryzują się zwiększonym potencjałem przerzutowym w porównaniu z pojedynczymi CTCs, potencjalnie ze względu na ich zwiększoną zdolność do zatrzymywania się w naczyniach włosowatych [180]. Ekspresowane w sklastrowanych CTCs mucyna 1 (ang. *mucin 1* – MUC1) i cząsteczka różnicowania komórkowego 44 (ang. *cluster of differentiation 44* – CD44) nie tylko promują ich agregację [180, 181], ale też pełnią istotną rolę w przyleganiu do śródbłonka naczyniowego oraz TEM [182-184]. Niemniej, zatrzymywanie CTCs w naczyniach jest złożonym procesem, na który wpływają takie czynniki, jak odkształcalność komórek, potencjał adhezyjny i lokalny przepływ krwi [185].

Sygnalizacja chemokinowa pełni istotną rolę w procesie migracji CTCs w pobliże niszy metastatycznej i przyleganie do sąsiadujących z nią naczyń krwionośnych. Chemokina 12 o motywie C-X-C (ang. *C-X-C motif chemokine 12* – CXCL12) wydzielana przez komórki stromy w odległych narządach pełni rolę chemoatraktanta CTCs ekspresujących CXCR4 i receptor chemokinowy 7 o motywie C-X-C (ang. *C-X-C motif chemokine receptor 7* – CXCR7), a także stymuluje ich TEM [186, 187]. CTCs ekspresują dodatkowo cząsteczki adhezyjne definiujące ich zdolność do przylegania do endotelium: NCAD [188], integryny [189, 190] oraz ligandy selektyn [182-184, 191, 192]. Dodatkowo, cytokiny wydzielane przez CTCs stymulują wydzielanie TNF- α przez makrofagi, co skutkuje indukcją ekspresji selektyn na powierzchni komórek endotelialnych [193].



Rycina 2. Elementy kaskady metastatycznej (inwazja, intrawazacja, migracja w krążeniu, ekstrawazacja, kolonizacja) prowadzące do rozsiewu nowotworu [109].

Po zatrzymaniu w krwiobiegu i adhezji do śródbłonna, CTCs pokonują barierę naczyń krwionośnych na drodze migracji para- lub transkomórkowej. TEM CTCs jest ułatwiona dzięki rozluźnieniu połączeń międzykomórkowych na drodze ścieżek transdukcji sygnału aktywowanych przez TGF- β i VEGF [194, 195] oraz zwiększonej mobilności i inwazyjności CTCs nabytych wskutek EMT [59, 82, 112, 178, 196], ale także deformowalności, przy czym w trakcie migracji pomiędzy komórkami endotelium najpierw odkształca się cytoplazma CTCs, a następnie jądro komórkowe [197].

Rozsiane komórki nowotworowe (ang. *disseminating tumor cells* – DTCs) początkowo aktywnie przebudowują niszę metastatyczną poprzez bezpośrednią produkcję czynników zewnątrzkomórkowych lub rekrutację komórek stromy, wpierających przygotowanie ogniska metastatycznego [198-203]. Wydzielane białka wpływają na modyfikację składu macierzy zewnątrzkomórkowej [203-205], aktywują proprzeżyciowe ścieżki sygnalizacyjne [206-208], indukują adhezję [209] i angiogenezę [210, 211] oraz hamują odpowiedź immunologiczną [212-215].

Dane literaturowe wskazują także na zdolność DTCs do przechodzenia w stan uśpienia [216], co potwierdza obecność nieproliferujących DTCs występujących w organach, w których zazwyczaj dochodzi do rozwoju przerzutów [217, 218]. Mechanizmy przechodzenia DTCs w stan spoczynku są ubogo poznane, jednak źródła literaturowe wskazują na rolę warunków stresowych, których komórki nowotworowe doświadczają na różnych etapach kaskady metastatycznej lub wpływu stromy [219-223].

Podczas gdy EMT promuje rozprzestrzenianie CTCs w krwiobiegu i ekstrawazację, przemiana mezenchymalno – epitelialna (ang. *mesenchymal-to-epithelial transition*, MET) pozwala na przywrócenie epitelialnego fenotypu, pożądanego podczas kolonizacji miejsca przerzutu [224-226]. MET indukuje nabycie adhezyjności, zdolności do proliferacji oraz interakcji z komponentami niszy metastatycznej [224, 227], wobec czego (czasowa) niezdolność DTCs do zmiany fenotypu może przyczynić się do ich uśpienia.

1.3. Znaczenie krążących komórek nowotworowych w raku piersi

Wartość diagnostyczna i prognostyczna

Metody obrazowe, takie jak tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny, są użytecznymi narzędziami pozwalającymi na detekcję ognisk nowotworowych, ale charakteryzują się ograniczoną czułością i dokładnością [228]. Literatura wskazuje na korelację pomiędzy obecnością CTCs a stopniem zaawansowania choroby we wczesnym BC, jednak ich użyteczność diagnostyczna nadal budzi kontrowersje.

Badania potwierdzają obecność CTCs u chorych na wczesnego BC – odpowiednio 41% i 47% chorych z małymi guzami (T1) i węzłami chłonnymi wolnymi od przerzutów było CTCs-pozytywnych [229], zaś w innej grupie chorych CTCs wykryto zarówno u chorych z wolnymi (21%) jak i zajęтыми węzłami chłonnymi (24%) [230]. Metaanaliza wykonana na grupie 3173 operacyjnych chorych na BC wskazuje jednak na częstszą obecność CTCs u chorych z większymi i mniej zróżnicowanymi guzami oraz zajęтыми węzłami chłonnymi [231].

Obecność CTCs w krążeniu chorych na BC wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby i niekorzystną prognozą, jednak większość badań koncentruje się na chorych przerzutowych [232-236]. Niemniej, dane literaturowe wskazują również na znaczenie prognostyczne CTCs w operacyjnym BC – CTCs-pozytywne chore charakteryzują się istotnie krótszym OS [157, 231, 237], czasem wolnym od choroby (ang. *disease-free survival* – DFS) [157, 231], czasem wolnym od przerzutów odległych [231, 237] oraz większym ryzykiem wystąpienia wznowy miejscowej [237].

Wybór metody leczenia oraz monitorowanie odpowiedzi na terapię

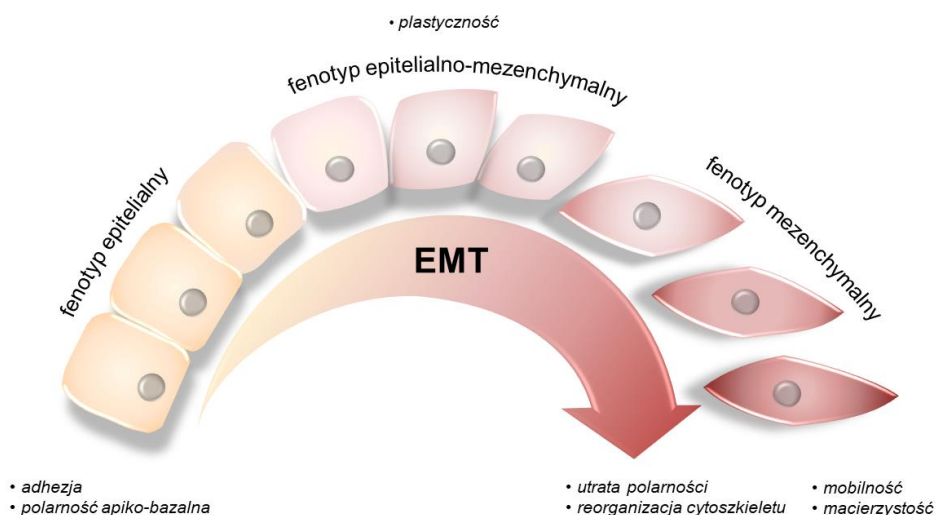
Monitorowanie obecności i liczby CTCs u chorych na BC potencjalnie pozwala na dobór terapii oraz określenie skuteczności leczenia, jednak nadal nie ustalono konsensusu w kwestii zastosowania tego narzędzia w praktyce klinicznej. Użyteczność obecności CTCs (≥ 5 CTCs/7,5 mL krwi) jako parametru pozwalającego na dobór terapii została udowodniona dotychczas jedynie u chorych na ER- i/lub PR-pozytywnego/ HER2-negatywnego zaawansowanego BC. W przeprowadzonym badaniu klinicznym trzeciej fazy chore na BC, u których decyzja terapeutyczna została podjęta na podstawie obecności CTCs charakteryzowała się nie krótszym czasem wolnym od progresji (ang. *progression-free survival* – PFS) niż chore, u których leczenie zostało zaproponowane na podstawie obowiązujących kryteriów klinicznych [238].

Dodatkowo, monitorowanie liczby CTCs w trakcie leczenia umożliwia oszacowanie odpowiedzi na wczesnym etapie, oraz w razie konieczności modyfikację strategii terapeutycznej w celu uzyskania optymalnych efektów. W badaniu Wang i in. (2020) mniej CTCs wykrytych metodą CellSearch® oraz dłuższy OS odnotowano u chorych po interwencji chirurgicznej w porównaniu z chorymi leczonymi trastuzumabem [239]. Praca Shliakhtunou (2021) opisuje z kolei, że zmiana terapii (na taksany, bądź włączenie gemcytabiny) w oparciu o obecność CTCs skutkowało wydłużeniem 5-letniego DFS i OS [240].

Heterogenność fenotypowa krążących komórek nowotworowych w raku piersi

a znaczenie kliniczne

CTCs nie tworzą jednorodnej populacji; różnią się pod względem agresywności, macierzystości, zdolności tworzenia klastrów, immunogenności i potencjału do unikania kontroli układu immunologicznego. Ta heterogenność może być spowodowana aktywacją EMT, która powszechnie jest postrzegana jako proces powodujący kompletną transformację ze stanu epitelialnego do mezenchymalnego [49, 241]. Wskutek częściowej EMT powstają CTCs o całym spektrum fenotypów (**Ryc. 3**), charakteryzujących się różnymi właściwościami, które przekładają się na ich plastyczność [39, 49, 241-244]. Dane literaturowe wskazują, że komórki nowotworowe, w których doszło do częściowej aktywacji EMT, charakteryzują się zwiększoną zdolnością do adaptacji, umożliwiającą im zmianę fenotypu na epitelialny lub mezenchymalny w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [245, 246].



Rycina 3. Spektrum fenotypów CTCs powstających wskutek EMT wraz z wybranymi cechami charakterystycznymi: fenotyp epitelialny – adhezja, polarność, fenotyp epitelialno-mezenchymalny – plastyczność, fenotyp mezenchymalny – utrata polarności, reorganizacja cytoszkieletu, mobilność, macierzystość.

Heterogenność CTCs pod względem fenotypu EMT przekłada się także na ich odmienną wartość prognostyczną i rokowniczą. CTCs o epitelialnym fenotypie dominują u chorych, u których wystąpiła wznowa miejscowa, zaś u chorych z przerzutami odległymi odnotowuje się obecność CTCs o wszystkich fenotypach EMT [247]. Chore, u których wykryto tylko epitelialne CTCs (ang. *epithelial CTCs* – eCTCs) charakteryzują się dłuższym OS w porównaniu z chorymi, u których wykryto mezenchymalne CTCs (ang. *mesenchymal CTCs* – mCTCs) [248]. Z kolei obecność epitelialno-mezenchymalnych CTCs (ang. *epithelial-mesenchymal CTCs* – emCTCs) w operacyjnym i przerzutowym BC jest związana z krótszym PFS i OS [249, 250]. W HER2+ BC (ang. *HER2-enriched BC*, HER2-pozytywny BC) i TNBC obserwuje się większy odsetek emCTCs

i mCTCs niż w przypadku lum A/B BC [243, 247]. Ponadto, więcej emCTC i mCTCs obserwuje się u chorych na BC z przerzutami odległymi niż ze wznową miejscową [247]. Jednoczesna obecność emCTCs i mCTCs u przerzutowych chorych na BC wskazuje na najbardziej agresywną i inwazyjną charakterystykę nowotworu oraz jest związana z krótszym PFS [251]. U chorych mCTCs-dodatnich obserwuje się z kolei bardziej agresywny fenotyp guza pierwotnego [252], większe ryzyko wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych [248] i narządów odległych [47] oraz krótszy PFS [251, 253], DFS [254, 255] i OS [254, 256]. Zwiększona agresywność mCTCs może być spowodowana ich wysokim stopniem zaawansowania EMT oraz nabyciu cech komórek macierzystych, które zwiększają potencjał przerzutowy.

1.4. Izolacja krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach EMT – metody, kryteria detekcji, ograniczenia

Negatywna selekcja

Negatywna selekcja często stanowi wstępny krok w protokołach izolacji CTCs zależnej od ekspresji markerów [160, 244, 257-259]. Większość metod bazujących na negatywnej selekcji opiera się na wykorzystaniu magnetycznych nanocząsteczek opłaszczonych przeciwciałami wykrywającymi CD45 (ang. *cluster of differentiation 45*, cząsteczka różnicowania komórkowego 45) – powszechny marker komórek hematopoetycznych (m.in. Miltenyi anti-CD45 beads, Dynal anti-CD45 beads [260], Dynabeads™ CD45 [261]). Niektóre protokoły uwzględniają użycie przeciwciał skierowanych przeciwko białkom specyficznym dla danych subpopulacji komórek krwi, takim jak markery granulocytarne CD66b (np. ^{neg}CTC-μChip [262]) i CD15 (^{neg}CTC-iChip [263]), marker limfocytów B CD19 (MINDEC – ang. *multi-marker immunomagnetic negative depletion enrichment of CTCs* [264]) oraz marker endotelialny CD34, co zmniejsza prawdopodobieństwo fałszywej identyfikacji komórek krwi lub śródbłonna jako CTCs oraz zwiększa specyficzność metody [262, 263, 265]. Negatywna selekcja charakteryzuje się wysoką przepustowością, ale nie gwarantuje uzyskania frakcji komórkowej o wysokiej czystości z powodu niskiej/ braku ekspresji specyficznym markerów na powierzchni wychwytywanych komórek [248, 266]. Co więcej, CTCs mogą zostać utracone w trakcie negatywnej selekcji wskutek ich przypadkowego schwywania przez komórki krwi migrujące w kierunku magnesu [267].

Pozytywna selekcja zależna od markera

Możliwość izolacji komórek nowotworowych o różnych fenotypach EMT jest ściśle zależna od markera, na którym bazuje selekcja. Z powodu braku specyficznego markera powierzchniowego komórek mezenchymalnych, większość metod opierających się o pozytywną selekcję bazuje na markerach komórek epitelialnych [268-270]. Najbardziej rozpowszechnioną

metodą izolacji CTCs bazującą na pozytywnej selekcji w oparciu o marker epitelialny jest CellSearch® – jedna z metod zaakceptowanych przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration* – FDA), używana w praktyce klinicznej [271-274]. Pomimo, że ta metoda izoluje CTCs w oparciu o obecność antygenu adhezyjnego komórek nabłonkowych (ang. *epithelial cell adhesion molecule* – EpCAM) na ich powierzchni, to nadal pozwala na wykrycie CTCs ekspresujących mezenchymalne markery [257, 275]. Z uwagi na fakt, że wskutek EMT CTCs tracą ekspresję epitelialnych markerów, takich jak EpCAM i ECAD, metody pozytywnej selekcji nie mogą być jednak uznawane za złoty standard izolacji CTCs, które przeszły EMT [275, 276]. Oparcie selekcji o dodatkowe markery stanowi jednak szansę na izolację bardziej mezenchymalnych CTCs. Zmodyfikowana metoda CellSearch®, bazująca na dodatkowym użyciu przeciwciał wykrywających ekspresowany w EpCAM-negatywnych liniach komórkowych BC [265] antygen adhezyjny komórek czerniaka (ang. *melanoma cell adhesion molecule* – MCAM), cechuje się lepszą czułością i umożliwia wykrycie agresywnej, EpCAM-negatywnej populacji CTCs u chorych na BC [277]. Z kolei oznaczenie liczby CTCs z zastosowaniem przeciwciał wykrywających wimentynę powierzchniową (ang. *cell surface vimentin* – csVIM), która pojawia się na powierzchni komórek nowotworowych przechodzących EMT wskutek stabilizacji ufosforylowanej formy tego białka [278, 279], umożliwia zróżnicowanie przerzutowych chorych na BC pod względem odpowiedzi na leczenie [258]. Wśród metod, które opierają pozytywną selekcję na podstawie obecności EpCAM i innych markerów można wyróżnić Liquid Biopsy® (HER2 i antygen powierzchniowy trofoblastu 2 (ang. *trophoblast cell surface antigen 2* – TROP2) [280]), OncoCEE™ (HER2, MUC1, receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor* – EGFR), receptor folianu 1, TROP2, protoonkogen c-MET, NCAD, CD318, mezenchymalny marker komórek macierzystych [281, 282]), NP^{-HB}CTC-Chip (HER2, EGFR [283]). Część metod bazuje także na ekspresji pojedynczych alternatywnych markerów, takich jak HER2 (np. GEDI (ang. *geometrically enhanced differential immunocapture*) Chip [284]) czy onkopłodowy siarczan chondroityny (rVAR2 (ang. *recombinant glycosaminoglycan-binding malaria protein VAR2CSA*)-coated magnetic beads [285]). Kryterium wykorzystywanym w pozytywnej selekcji może być też aktywność enzymów w komórkach nowotworowych (np. telomerazy – Telomescan [286]) lub obecności transkryptów (np. VIM i fibronektyny-1 – NanoFlares [287]).

Selekcja w oparciu o właściwości fizyczne

Metody z tej grupy można podzielić na bazujące na (i) wielkości i odkształcalności komórek, (ii) ich przewodności elektrycznej, oraz (iii) szybkości poruszania się pod wpływem siły akustycznej.

CTCs charakteryzują się większą średnicą w porównaniu do większości komórek znajdujących się w krwiobiegu, co stanowi solidny fundament oparcia izolacji CTCs o tą cechę morfologiczną. Jednakże, komórki z tych dwóch populacji cechują się zakresami średnicy mogącymi nachodzić na siebie, co z jednej strony wymusza zastosowanie dodatkowego kryterium w celu wyeliminowania komórek fałszywie zidentyfikowanych jako CTCs (np. monocytów lub komórek endotelialnych), ale stwarza prawdopodobieństwo utraty subpopulacji CTCs o małej średnicy, które również są użyteczne klinicznie [288]. Wśród metod separujących CTCs na podstawie ich wielkości wyróżnia się głównie filtrację przez mikroporowatą membranę (pory o średnicy 6-9 μm , m.in. Canpatrol™ CTC assay [289], ScreenCell® [290, 291], ISET – ang. *isolation by size of tumor cells* [292]). Wiele tego typu platform wymaga wcześniejszego utrwalenia komórek, co ogranicza ich dalszą analizę transkryptomyczną, a także wzbogacenie krwi we frakcję bogatą w CTCs z uwagi na niską przepustowość metody spowodowaną zatykaniem porów przez komórki [292]. Drugi z tych problemów został częściowo zredukowany w przypadku metod bazujących na mikrofiltracji przepływowej [293] (m. in. Parsortix™ Cell Separation System [294], VyCAP [295], CelSee PREP 400™ [296], FCMC (ang. *fluidic cell-microarray-chip*) [297], FMSA (ang. *flexible micro spring array*) [288], MCA (ang. *microcavity array*) [298], 3D hexagonal array [299], CD-PRIME™ [290], VTX-1 Liquid Biopsy System [300], spiralne urządzenia mikrofluidowe (ang. *2/8-loop spiral microfluidic device*) [301, 302]), które oprócz różnicy w wielkości wykorzystują mniejszą odkształcalność CTCs utykających w kanałach urządzenia. Niemniej, uzyskanie wysokiej przepustowości oraz odzysku, a także żywotności komórek może być utrudnione z powodu wysokiego ciśnienia, na które narażone są komórki przepływające w zawieszynie oraz ich przedłużonej adhezji do filtra [293]. Nie ma jednak potrzeby zagęszczania próbki krwi i utrwalania komórek, a szybka procedura umożliwia izolację komórek o transkryptomie dobrej jakości [303-305].

Cechy morfologiczne i biofizyczne, które różnią CTCs i komórki, dla których krew stanowi fizjologiczne środowisko, determinują ich przewodność elektryczną, która jest kryterium izolacji w metodach bazujących na dielektroforezie (ang. *dielectrophoresis* – DEP) [306-310]. W przypadku metod izolacji CTCs bazujących na DEP (np. ApoStream® [311]) nie ma możliwości utrwalenia komórek, gdyż podczas tego procesu dochodzi do zmian w przepuszczalności błony komórkowej, co utrudnia rozróżnienie CTCs i komórek krwi od komórek krwi na podstawie

ich przewodności elektrycznej [306]. W praktyce, CTCs są oddzielane poprzez przyciąganie do dodatnio naładowanej elektrody, zaś leukocyty przepływają dalej w kanałach urządzenia mikroprzepływowego [311, 312].

Wielkość i właściwości fizyczne komórek wpływają także na prędkość migracji komórek w polu akustycznym [313, 314]. Metody bazujące na tej właściwości (np. taSSAW – ang. *tilted-angle standing surface acoustic waves* [315], czipy akustoforetyczne [316, 317]) charakteryzują się brakiem wpływu na żywotność, jakość, fenotyp i genotyp izolowanych komórek [314-316], co umożliwia przeprowadzenie dalszych, bardziej szczegółowych analiz. Pomimo, że w przypadku niektórych platform akustoforetycznych możliwa jest jednoczesna separacja komórek nowotworowych i komórek krwi oraz zagęszczenie frakcji uzyskanych CTCs, to tak jak w przypadku wszystkich metod akustoforetycznych charakteryzują one się niską przepustowością [317].

1.5. Analiza na poziomie pojedynczych komórek – zalety, wady, ograniczenia

Heterogenność CTCs jest odpowiedzialna za ich różnorodność fenotypową i leży u podstawy molekularnych mechanizmów ewolucji nowotworu [318, 319], przerzutowania [320] oraz odpowiedzi i oporności na terapię [321]. Poznanie przyczyn zróżnicowanej agresywności CTCs o różnych fenotypach EMT wymaga zastosowania technik umożliwiających analizę CTCs na poziomie pojedynczej komórki, a nie masy komórek, jak to czyniono dotychczas. Pomimo, że pierwsze analizy całego transkryptomu pojedynczych komórek wykonano przeszło 30 lat temu [322, 323], to wysokoprzepustowe profilowanie z użyciem sekwencjonowania nowej generacji wykonano dopiero na początku drugiej dekady XXI wieku [324-326]. Opracowania tego protokołu stworzyło podstawy dynamicznego rozwoju analiz na poziomie pojedynczej komórki oraz pozwoliło na kompleksowy wgląd w charakterystykę komórek nowotworowych i określenie ich wartości klinicznej.

Transkryptomyczne profilowanie CTCs umożliwia wgląd w heterogenność fenotypową klonów charakteryzujących się największą agresywnością, odpornością mechaniczną oraz opornością na leczenie. W wyniku takich wysokoprzepustowych analiz zidentyfikowano rzadkie subpopulacje CTCs o rozbieżnej sygnaturze ekspresji genów pod względem EMT, macierzystości, mechanizmów naprawy DNA, sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz interakcji z komórkami układu immunologicznego [327]. Detekcja klastrow CTCs z komórkami krwi i ich analiza na poziomie pojedynczej komórki pozwoliła na identyfikację CTCs współpracujących z neutrofilami, które wskutek zmian w cyklu komórkowego charakteryzują się istotnie większym potencjałem metastatycznym i korelują z krótszym PFS [160, 161].

Detekcja oraz profilowanie pojedynczych CTCs w trakcie terapii stanowi także narzędzie do monitorowania lekooporności oraz identyfikacji molekularnych mechanizmów leżących u jej podstaw. Wskutek sekwencjonowania egzomu pojedynczych CTCs i sparowanych próbek guza pobranych podczas biopsji od chorych z przerzutowym ER-dodatnim BC zidentyfikowano mutacje *de novo* w genie kodującym ER, co wskazywało na powstanie klonów opornych na hormonoterapię [328-330]. Z kolei analiza transkryptomyczna pojedynczych CTCs od chorych ER-dodatnich/HER2-ujemnych wskazała na obecność populacji CTCs pozytywnych i negatywnych pod względem ekspresji genu kodującego HER2, przy czym frakcja HER2-dodatnich CTCs zwiększała się wraz z postępem choroby. Co więcej, HER2-negatywne CTCs charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w naprawę DNA i aktywację ścieżki Notch, co wskazuje na ich oporność na chemioterapię, ale wrażliwość na leczenie celowane w Notch. Potwierdza to wagę analizy heterogenności CTCs, które mogą wykazywać różną wrażliwość na terapię oraz prowadzić do progresji choroby [331, 332].

Spśród czynników limitujących analizę transkryptomyczną CTCs na poziomie pojedynczej komórki na szczególną uwagę zasługuje niewielka ilość RNA (10 pg) zawarta w komórce. Z tego względu, przygotowanie biblioteki cDNA wymaga dostatecznego namnożenia materiału, przy jednoczesnej kontroli, aby zakończyć ten proces przed osiągnięciem logarytmicznego tempa wzrostu ilości transkryptów [333]. Do metod używanych obecnie do tworzenia bibliotek z pojedynczych komórek zalicza się Smart-Seq oraz jego ulepszoną wersję Smart-Seq2 [333], CEL-Seq [326], CEL-Seq2 [334], Quartz-Seq [335] i STRT-Seq [325]. Każda z tych metod jest jednak obciążona błędami; rzadko przepisywane są pełne sekwencje transkryptów, a te o najniższej ekspresji mogą być tracone [336].

2. Cele pracy

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej jest określenie wartości klinicznej oraz charakterystyki biologicznej fenotypów CTCs obecnych we krwi obwodowej chorych na BC. Do celów szczegółowych należą:

- (i) retrospektywna analiza fenotypów EMT, markerów inwazyjności, macierzystości i formowania klastrów w CTCs zebranych z zagęszczonej frakcji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs) od chorych na BC oraz określenie ich wartości klinicznej,
- (ii) przegląd opisanych w literaturze metod izolacji CTCs o różnych fenotypach EMT oraz analiza statystyczna opublikowanych danych w celu porównania metod oraz wyboru wysokoprzepustowej metody do izolacji pojedynczych CTCs w całym spektrum fenotypów EMT z krwi chorych na BC,
- (iii) w badaniu prospektywnym – opracowanie i optymalizacja metody izolacji pojedynczych CTCs o różnych fenotypach EMT, pozwalającej na ich charakterystykę transkryptomyczną,
- (iv) oznaczenie liczby CTCs, ich fenotypów EMT i stopnia heterogenności, skorelowanie tych parametrów z danymi kliniczno-patologicznymi, a także określenie znaczenia biologicznego CTCs o cechach mezenchymalnych w celu poszukiwania nowych celów i strategii terapeutycznych.

3. Dane i materiały

3.1. Charakterystyka grup badanych

Grupa retrospektywna

W badaniu retrospektywnym wykorzystano dane kliniczno-patologiczne pochodzące od 83 chorych na operacyjnego, zrazikowego BC w stadium I-III, które nie były leczone przed pobraniem krwi obwodowej, oraz dane molekularne będące wynikiem analizy frakcji krwi obwodowej wzbogaconych w CTCs (ang. *CTCs-enriched blood fractions* – CTCs-EBFs) [248]. Chore były leczone w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym w okresie od kwietnia 2011 do maja 2013. Jako kontrole wykorzystano dane molekularne pochodzące z analizy próbek krwi 22 ochotniczek, które nie chorowały na nowotwór w przeszłości. Mediana wieku chorych na BC wynosiła 61,9 lat (zakres 39,1 – 82,6 lat), zaś mediana wieku zdrowych ochotniczek – 50,2 lat (zakres 21 – 74,1 lat). Wszystkie chore oraz zdrowe ochotniczki wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu, które otrzymało zgodę Komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (NKEBN/30/2010). Charakterystyka kliniczno-patologiczna chorych z grupy retrospektywnej jest przedstawiona w **Tabeli 1**.

Stopień zaawansowania klinicznego (ang. *clinical TNM* – cTNM) i patologicznego (ang. *pathological TNM* – pTNM) określono według obowiązującej klasyfikacji TNM [337]. Stopień złośliwości histologicznej (ang. *grade* – G) oceniono na podstawie zmodyfikowanej klasyfikacji Bloom'a i Richardson'a. Status ER i PR oceniono immunohistochemicznie zgodnie z klasyfikacją Allreda z punktem odcięcia 3 jako wynik pozytywny. Pozytywny status HER2 określono jako wynik 3+ w immunohistochemii lub pozytywny wynik fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Podtypy molekularne określono zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Konsensusu Ekspertów z St. Gallen (2011): lum A BC – ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-negatywny, Ki67<14%, lum B BC – ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-negatywny, Ki67≥14% albo ER-pozytywny i/lub PR-pozytywny, HER2-pozytywny, jakiegokolwiek Ki67, HER2+ BC – ER-negatywny, PR-negatywny, HER2-negatywny, jakiegokolwiek Ki67, TNBC – ER-negatywny, PR--negatywny, HER2-negatywny, jakiegokolwiek Ki67 [28].

Tabela 1. Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy chorych na BC analizowanej retrospektywnie.

Cecha	Status	n	%
Wiek	<50 lat	18	21,7
	≥50 lat	65	78,3
pT (wielkość guza)	pT1	39	47,0
	pT2	38	45,8
	pT3	3	3,6
	pT4	2	2,4
	brak danych	1	1,2
pN (obecność przerzutów do węzłów chłonnych)	pN ^{neg}	41	49,4
	pN ^{pos}	42	50,6
G (stopień złośliwości histologicznej)	G1	12	14,5
	G2	43	51,8
	G3	28	33,7
Status ER	ER ^{neg}	17	20,5
	ER ^{pos}	66	79,5
Status PR	PR ^{neg}	18	21,7
	PR ^{pos}	65	78,3
Status HER2	HER2 ^{neg}	61	73,5
	HER2 ^{pos}	20	24,1
	brak danych	2	2,4

ER – receptor estrogenowy (ang. *estrogen receptor*), PR – receptor progesteronowy (ang. *progesterone receptor*), HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu typu 2 (ang. *human epidermal growth factor receptor type 2*), neg – status negatywny (ang. *negative*), pos – status pozytywny (ang. *positive*)

Grupa prospektywna

Do badania prospektywnego wykorzystano próbki krwi obwodowej od 116 chorych na BC przyjętych do Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym od maja 2019 do października 2020 oraz do Gdyńskiego Centrum Onkologii przy Szpitalu Morskim im. Polskiego Czerwonego Krzyża od lutego 2020 do maja 2021. Sto cztery chore były operacyjne i nie otrzymywały leczenia przed pobraniem próbki, 2 chore otrzymywały hormonoterapię, a u 10 wykryto przerzuty odległe lub wznowę miejscową. Mediana wieku chorych wynosiła 60 lat (zakres 25 – 85 lat). Dane kliniczno-patologiczne chorych z grupy prospektywnej są podsumowane w **Tabeli 2**.

Do określenia parametrów technicznych metody izolacji CTCs wykorzystano 6 próbek krwi od zdrowych ochotniczek bez historii choroby nowotworowej. Mediana ich wieku wynosiła 29 lat (zakres 28-48 lat). Wszystkie chore oraz zdrowe ochotniczki wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniu, które otrzymało zgody komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (NKBBN/433/2017 i NKBBN/748/2019-2020).

Tabela 2. Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy chorych na BC analizowanej prospektywnie.

Cecha	Status	Chore operacyjne		Chore przerzutowe/ ze wznową/ po hormonoterapii	
		n	%	n	%
Wiek	<50 lat	24	23,1	1	8,3
	≥50 lat	79	75,9	11	91,7
	brak danych	1	1,0	0	0,0
cT (wielkość guza)	cT1	68	65,4	1	8,3
	cT2	26	25,0	1	8,3
	cT3	3	2,9	1	8,3
	cT4	4	3,8	0	0,0
	brak danych	3	2,9	9	75,0
cN (obecność przerzutów do węzłów chłonnych)	cN ^{neg}	81	77,9	0	0,0
	cN ^{pos}	20	19,2	3	25,0
	brak danych	3	2,9	9	75,0
M (obecność przerzutów odległych)	M0	104	100,0	4	33,3
	M1	0	0,0	8	66,7
	Brak danych	0	0,0	0	0,0
G (stopień złośliwości histologicznej)	G1	26	25,0	0	0,0
	G2	51	49,0	7	58,4
	G3	24	23,1	1	8,3
	brak danych	3	2,9	4	33,3
Status ER	ER ^{neg}	12	11,5	1	8,3
	ER ^{pos}	91	87,5	10	83,4
	brak danych	1	1,0	1	8,3
Status PR	PR ^{neg}	20	19,2	4	33,3
	PR ^{pos}	82	78,9	7	58,4
	brak danych	2	1,9	1	8,3
Status HER2	HER2 ^{neg}	89	85,6	9	75,0
	HER2 ^{pos}	10	9,6	3	25,0
	brak danych	5	4,8	0	0,0

ER – receptor estrogenowy (ang. *estrogen receptor*), PR – receptor progesteronowy (ang. *progesterone receptor*),
HER2 – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu typu 2 (ang. *human epidermal growth factor receptor type 2*)

3.2. Dane molekularne

W analizie retrospektywnej wykorzystano dane molekularne pozyskane we wcześniejszych badaniach zespołu [248, 256]: wyniki analizy ekspresji genów w CTCs-EBFs od chorych na BC i zdrowych ochotniczek.

Dysponowano danymi z ekspresji genów kodujących:

- (i) markery komórek BC – mammaglobinę 1 (ang. *mammaglobin 1* – MGB1, kodowaną przez gen *SCGB2A2* – ang. *secretoglobin family 2A member 2*, *sekretoglobina 2 A2*) i HER2 (kodowany przez gen *ERBB2* – ang. *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*),
- (ii) marker komórek o fenotypie epitelialnym – cytokeratynę 19 (ang. *cytokeratin 19* – CK19, kodowaną przez gen *KRT19* – ang. *keratin 19*, keratyna 19),
- (iii) marker komórek o fenotypie mezenchymalnym – VIM,
- (iv) markery związane z inwazyjnością – CXCR4 i uPAR (ang. *urokinase plasminogen activator surface receptor*, receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, kodowany przez gen *PLAUR* – ang. *plasminogen activator*, *urokinase receptor*),
- (v) oraz marker komórek hematopoetycznych CD45 (kodowany przez gen *PTPRC* – ang. *protein tyrosine phosphatase receptor type C*, receptor tyrozynowej fosfatazy białkowej typu C) w celu kontroli zanieczyszczenia CTCs-EBFs leukocytami.

Skorzystano także z danych dotyczących ekspresji genów badanych w próbkach preamplifikowanych (opisano szczegółowo w rozdziale 4.2), kodujących:

- (i) epitelialną ECAD, (kodowaną przez gen *CDH1* – ang. *cadherin 1*),
- (ii) mezenchymalne NCAD (kodowana przez gen *CDH2* – ang. *cadherin 2*) i plastynę 3 (ang. *plastin 3* – PLS3),
- (iii) markery macierzystości – CD44, NANOG (ang. *NANOG homeobox*, homeokaseta NANOG), ALDH1 (ang. *aldehyde dehydrogenase 1*, dehydrogenaza aldehydowa 1, kodowana przez gen *ALDH1A1* – ang. *aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*, dehydrogenaza aldehydowa 1 A1), OCT-4 (ang. *octamer-binding transcription factor 4*, czynnik transkrypcyjny 4 wiążący sekwencję oktamerową, kodowany przez gen *POU5F1* – ang. *POU domain class 5 homeobox 1*, homeokaseta 1 klasy 5 o domenie POU), CD133 (ang. *cluster of differentiation 133*, cząsteczka różnicowania komórkowego 133, kodowana przez gen *PROM1* – ang. *prominin 1*, prominina 1),
- (iv) oraz marker tworzenia klastrów – plakoglobinę (ang. *plakoglobin* – PKGB, kodowaną przez gen *JUP* – ang. *junction plakoglobin*).

3.3. Materiały

Linie komórkowe

- MCF-7 (ATCC, nr kat. HTB-22) – ludzka linia komórkowa lum A BC
- MDA-MB-231 (ATCC, nr kat. HTB-26) – ludzka linia komórkowa TNBC
- SK-BR-3 (ATCC, nr kat. HTB-30) – ludzka linia komórkowe HER2+ BC

Pożywki i dodatki do pożywek stosowane w hodowli komórkowej

- Pożywka DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; VWR®, nr kat. VWRC392-0414)
- Surowica płodowa krwi bydlęcej (ang. *fetal bovine serum* – FBS; Gibco, nr kat. 10270-106)
- Penicylina/streptomycyna (Gene DireX, nr kat. CC502-0100)

Imne odczynniki stosowane w hodowli komórkowej

- Trypsyna (Sigma Aldrich, nr kat. 59418C)
- Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate-buffered saline* – PBS; Sigma Aldrich, nr kat. P4417)

Znaczniki

- Hoechst 33342 (Invitrogen™, nr kat. H3570)
- Dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride* – DAPI; Sigma Aldrich, nr kat. MBD0015)

Przeciwciała

- Anty-EpCAM (klon VU1D9, skoniugowane z Alexa Fluor® 488; Cell Signalling Technology, nr kat. 5198)
- Anty-ECAD (klon 67A4, skoniugowane z Alexa Fluor® 488; Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-21791)
- Anty-MCAM (klon P1H12, skoniugowane z Alexa Fluor® 594; Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-18837)
- Anty-csVIM (klon WM-59, skoniugowane z Super Bright 436; eBioscience, nr kat. 62-0319-42)
- Anty-CD31 (ang. *cluster of differentiation 31* – cząsteczka różnicowania komórkowego 31, marker komórek endotelialnych; klon 84-1, skoniugowane z Texas Red; Abnova, nr kat. H00007431-MTf08)

- Anty-CD45 (klon REA747, skoniugowane z VioBlue®; Miltenyi Biotec, nr kat. 130-110-637)

Bufory i roztwory

- Bufor opłaszczający (ang. *coating buffer* – CB); 2 mM kwas wersenowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA; Sigma Aldrich, nr kat. 03695), 1% FBS w 1x PBS
- Bufor blokujący (ang. *blocking buffer* – BB; 50 mM glicyny (Sigma Aldrich, nr kat. 50046), 5% albuminy surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin* – BSA; Sigma Aldrich, nr kat. 810533) w 1x PBS
- Bufor do barwienia (ang. *staining buffer* – SB; 10 mM glicyny, 1% BSA w 1x PBS)

Inne odczynniki wykorzystane do metod pozyskania CTCs-EBFs oraz pojedynczych CTCs

- Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich, nr kat. 10771)
- Dynabeads™ CD45 (Invitrogen™, nr kat. 11153D)

Odczynniki i startery do analizy ekspresji genów

- PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix for qPCR (Applied Biosystems™, nr kat. A25777)
- Startery (Merck; sekwencje starterów przedstawiono w **Tabeli 3**)

Odczynniki i akcesoria użyte do metody Smart-Seq2

- Rekombinowany inhibitor RNazy (Recombinant RNase Inhibitor, 40 U/μL; Takara, nr kat. 2313A)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, nr kat. T9284)
- Oligonukleotydy przyłączające się do ogona poliadenylowego mRNA – oligo-dT₃₀VN (10 μM, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'; Biomers)
- Bufor Tris (ang. *2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol* – 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol)-EDTA (Thermo Scientific Chemicals, nr kat. J75793.AE)
- Mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów (ang. *deoxynucleotide triphosphates* – dNTPs; Fermentas, nr kat. R0192)
- SuperScript II reverse transcriptase (200 U/μL, Invitrogen™, nr kat. 18064-014)
- Superscript II first-strand buffer (5x, Invitrogen™, nr kat. 18064-014)

- Ditiotreitól (ang. *dithiothreitol* – DTT; 100 mM, Invitrogen™, nr kat. 18064-014)
- Betaina (5 M; Sigma Aldrich, nr kat. 61962)
- MgCl₂ (1 M; Sigma Aldrich, nr kat. M8266)
- Oligonukleotydz umożliwiający przełączenie matrycy (ang. *template-switching oligos* – TSO; 100 μM, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G-3'; Exiqon)
- Woda wolna od nukleaz (VWR® Chemicals, nr kat. 733-2573)
- KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x; KAPA Biosystems, nr kat. KK2601)
- Startery do preamplifikacji – ISPCR primers (10 μM; 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; Biomers)
- Ampure XP beads (Beckman Coulter, nr kat. A63881)
- Alkohol etylowy 99,8% (Warchem, nr kat. 37701),
- Bufor do elucji (10 mM Tris-Cl, pH 8,5; Qiagen, nr kat. 19086)

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych do ilościowego PCR (ang. quantitative PCR – qPCR).

Gen	Starter prawy (5' → 3')	Starter lewy (5' → 3')	Wielkość produktu [pz]
<i>ACTB</i>	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	205
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTGGTATCGTGGAAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	101
<i>YWHAZ</i>	TGTAGGAGCCCGTAGGTCATC	GTGAAGCATTGGGGATCAAGA	179
<i>CDH1</i>	TTGGAGAGACACTGCCAACTG	AGCAACTGGAGAACCATTGTCTG	151
<i>EpCAM</i>	GCTGGAATTGTTGTGCTGGTTA	AAGATGTCTTCGTCCCACGC	189
<i>VIM</i>	CGAGGAGAGCAGGATTTCCTC	CGTGATGCTGAGAAGTTCGT	170
<i>SERPINE1</i>	CTGGTTCTGCCAAGTTCCTC	CCACTCTCGTTCACCTCGAT	179
<i>PLS3</i>	TTCTCCCTGGTTGGCATTGG	GGAGCTGATCGTCTTGTCCTTA	228
<i>PTPRC</i>	CATGGTTCCACATTCGAGCAAT	CTTTTCTGGGGCACCAAGTG	181
<i>PECAM1</i>	GTCCTGATGCCGTGGAAAG	CTCGGAACATGGATGCCTTC	107

pz – pary zasad; *ACTB* – ang. *actin beta*, aktyna beta; *GAPDH* – ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; *YWHAZ* – ang. *tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*, białko zeta aktywujące 3-monooksygenazę tyrozynową/ 5-monooksygenazę tryptofanową; *PECAM1* – ang. *platelet and endothelial cell adhesion molecule*, antygen adhezyjny płytek i komórek endotelialnych, gen kodujący CD31; *SERPINE1* – ang. *serine proteinase inhibitor family E member 1*, członek rodziny inhibitorów proteinaz serynowych E1, gen kodujący PAI1 (ang. *plasminogen activator inhibitor 1*, inhibitor aktywatora plazminogenu 1).

Odczynniki i startery do analizy jakości transkryptomu

- FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/μL; Roche Diagnostics, nr kat. 04738314001)
- FastStart PCR Buffer (10x, 20 mM MgCl₂; Roche Diagnostics, nr kat. 04738314001)
- dNTPs (10 mM każdy; Roche Diagnostics, nr kat. 04738314001)

- BSA (20 mg/ml, Roche Diagnostics, nr kat. 10711454001)
- Startery (Merck; sekwencje starterów przedstawiono w **Tabeli 4**)
- Woda (jakość HPLC; ThermoFisher Scientific, nr kat. 268300025)

Tabela 4. Sekwencje starterów użytych do multipleksowego PCR w celu analizy jakości transkryptomu [338].

Gen	Starter prawy (5'→3')	Starter lewy (5'→3')	Wielkość produktu [pz]
<i>EEF1A1</i>	CTGTGTCGGGGTTGTAGCCA	TGCCCCAGGACACAGAGACT	290
<i>ACTB</i>	GCGTGACATTAAGGAGAAGCTG	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT	378
<i>GAPDH</i>	CCATCTCCAGGAGCGAGAT	CAGTGGGGACACGGAAGG	489

EEF1A1 – ang. *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*, eukariotyczny czynnik elongacyjny 1 alfa 1

Odczynniki do elektroforezy

- Bufor TAE (50x; EURx, nr kat. E22002)
- Agaroz (BIO STANDARD; Prona, nr kat. BS1)
- Bromek etydyny (Sigma Aldrich, nr kat. E7637)
- Marker wielkości produktów PCR (Invitrogen™, nr kat. 10416014)

Odczynniki do przygotowania bibliotek cDNA i sekwencjonowania (RNA-Seq) pojedynczych komórek

- Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, nr kat. FC-131-1024 i FC-1311096)
- Nextera XT Index Kit (Illumina, nr kat. FC-131-1001)
- IDT® DNA/RNA UD Indexes Set A (Illumina, nr kat. 20027213)
- Ampure XP beads (Beckman Coulter, nr kat. A63881)
- Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, nr kat. 5067-4626)
- High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent Technologies, nr kat. NC1874887)
- MiniSeq High Output Reagent Kit (2x75 bp; Illumina, nr kat. FC-420-1001)
- HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5 (2x150 bp; Illumina, nr kat. FC-501-2501; wykorzystany w ramach usługi w firmie MacroGen)

Urządzenia i akcesoria

- Komora z laminarnym przepływem powietrza do hodowli komórkowych (HERAsafe HS 12 Biosafety Cabinet; Thermo Fisher Scientific/ Heraeus, nr kat. STEM-GLE-1228-LGZ)
- Komory do pracy z DNA/RNA/PCR (Biosan, nr kat. BS-040107-AAA)

- Komora z laminarnym przepływem powietrza do pracy z pojedynczymi komórkami (GuardOne® Laminar Flow; Starlab, nr kat. S8040-0001)
- Inkubator do hodowli komórkowych z kontrolą temperatury i stężenia CO₂ (ICO240med, Memmert)
- Suszarka laboratoryjna (UF30, Memmert)
- Aspirator (Starlab, nr kat. N2400-9000)
- Mikroskop fluorescencyjny (ZEISS AxioVision 200; Zeiss)
- Mikroskop świetlny (Zeiss Primovert, nr kat. 415510-1100-0000)
- Rotator (HulaMixer™ Sample Mixer, Invitrogen™, nr kat. 159-20D)
- Mikromanipulator (TransferMan® 4r; Eppendorf®, nr kat. 5193000012),
- Termocykler z gradientem temperatury (Mastercycler X50s Eppendorf®, nr kat. 6311000010)
- Termocykler do ilościowej analizy ekspresji genów (CFX96™ Real Time System; Bio-Rad, nr kat. 185-50-96)
- Wirówka z chłodzeniem i kontrolą przyspieszenia/hamowania (Centrifuge 5810R, Eppendorf®, nr kat. EP022628188)
- Wirówka z chłodzeniem (Centrifuge 5417R, Eppendorf®, nr kat. Z366021)
- Wirówka MiniSpin® Plus (Eppendorf®, nr kat. EP022620207)
- Wirówko-worteks Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, nr kat. BS-010202-AAA)
- Fluorymetr (Qubit 4, Invitrogen™, nr kat. Q33226)
- Worteks z adapterem na płytkę 96-miejscową (IKA®-Werke, nr kat. 0003617000 oraz 0003428000)
- Worteks z czujnikiem na podczerwień (Starlab, nr kat. N2400-0001)
- Pipety automatyczne jednokanałowe (Eppendorf® Research Plus; Eppendorf®, nr kat. 3123000012, 3123000020, 3123000098, 3123000047, 3123000055, 3123000063)
- Pipetor (accu-jet® pro, Brand, nr kat. 17J04632)
- Wyciągarka do kapilar (DMZ Zeitz Puller; Zeitz-Instruments)
- Sekwencjator MiniSeq System (Illumina, nr kat. SY-420-1001)
- Sekwencjator HiSeq X Ten System (Illumina, nr kat. SY-412-1001; wykorzystany w ramach usługi w firmie Macrogen)

- Aparat do elektroforezy zintegrowany z zasilaczem (Mupid®-One; Advance, nr kat. MU2)
- Transiluminator (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System; Bio-Rad, nr kat. 1070-8170)

Materiały zużywalne i akcesoria

- Statyw magnetyczny na probówki 15 mL (DynaMag™-15 Magnet, Thermofisher Scientific, nr kat. 12301D)
- 96-miejscowy statyw (Axygen, nr kat. L-4880) przymocowany do płytki magnetycznej (Ambion, nr kat. AM10027)
- Aluminiowy blok chłodzący na 96 probówek 0,2 mL (Argos Technologies®, nr kat. GZ-63615-04)
- Filtry strzykawkowe z membraną PVDF (Whatman®, nr kat. WHA9913-2502 i WHA9913-2504)
- Probówki próżniowe BD Vacutainer® (Becton Dickinson, nr kat. BDAM367864)
- Butelki hodowlane T25 i T75 (VWR®, nr kat. 734-2311 i 734-2313)
- Skrobaki do komórek (Starlab, nr kat. CC7600-0250)
- Komora Neubauera (Marienfeld, nr kat. 0640031)
- Płytki 96-dołkowe (Falcon, nr kat. 353072)
- Probówki o zmniejszonej adhezji (MAXYMumRecovery® PCR tubes; Merck, nr kat. AXYPECR02LC oraz (Ultra High Recovery Tubes, Starlab, nr kat. E1415-2600 i Protein LoBind Tubes, Eppendorf®, nr kat. 0030108116)
- Probówki wirówkowe o pojemnościach 0,5 – 2 mL (Starlab, nr kat. S1605-0000, S1615-5500, S1620-2700)
- Slajdy mikroskopowe (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system, Merck, nr kat. C7182)
- Końcówki bez filtra do pipet automatycznych (Starlab, nr kat. S1111-3000, S1110-3000, S1111-0006, S1111-6001)
- Końcówki z filtrem do pipet automatycznych, sterylne (Starlab, nr kat. S1121-3810, S1120-3810, S1120-1840, S1120-8810, S1126-7810)
- Pipety serologiczne (VWR®, nr kat. 612-3702, 612-3700, 612-3698)
- Pipety Pasteura szklane (Brand, nr kat. 747720)
- Pipety Pasteura sterylne (VWR® nr kat. 162-1747)
- Pipety Pasteura niesterylne VWR® 612-2850)

- Probówki typu Falcon (Starlab, nr kat. E1450-0200 i E1415-0100)
- Folie adhezyjne na płytki 96-dołkowe (Bio-Rad, nr kat. MSB1001)
- Płytki 96-dołkowe do qPCR (Bio-Rad, nr kat. MLL9601)

Oprogramowanie

- Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, wersja 3.1)
- Agilent TapeStation Software (Agilent, wersja 4.1.1)
- TapeStation Controller Software (Agilent)
- 2100 Expert Software (Agilent, wersja A.02.10)
- Quantity One® 1-D Analysis Software (Bio-Rad)
- Zen Microscopy Software (Zeiss, wersja 3.5 blue edition)
- qBase^{PLUS} (Biogazelle, wersja 3.0)
- STATISTICA (Statsoft, wersja 13.0)
- GraphPad Prism (GraphPad Software, wersje 8.0-10.1.2)
- ImageJ (Wayne Rasband and contributors, National Institute of Health, wersja 1.54g)
- R (R Development Core Team)
- StatsToDo (narzędzie online: <https://www.statstodo.com/index.php>)
- DAVID *Bioinformatics* (DAVID 2021, v2023q4; narzędzie online: <https://david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=release.html>)
- Primer BLAST (narzędzie online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>)
- Beacon Designer (PREMIER Biosoft International; narzędzie online: <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>)
- Human Protein Atlas (narzędzie online: <https://www.proteinatlas.org>)
- BioRender (Science Suite Inc.)

4. Metody

Analiza retrospektywna

4.1. Klasyfikacja zagęszczonych frakcji krążących komórek nowotworowych od chorych na raka piersi

Próbki od chorych na BC traktowano jako CTCs-pozytywne, jeżeli wykryto w nich ekspresję co najmniej jednego z genów kodujących markery komórek BC (*SCGB2A2*, *ERBB2*) oraz minimum jednego z genów kodujących markery epitelialne (*KRT19*, *CDH1*) lub mezenchymalne (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*). Próbki CTCs-pozytywne klasyfikowano pod względem fenotypu EMT jako eCTCs (*KRT19*- i/lub *CDH1*-pozytywne, *VIM*-, *CDH2*- i *PLS3* negatywne), mCTCs (*KRT19*- i *CDH1*-negatywne, *VIM*- i/lub *CDH2*- i/lub *PLS3*-pozytywne) lub emCTCs, gdzie markery epitelialne i mezenchymalne były koekspresjonowane.

4.2. Analiza ekspresji genów w zagęszczonych frakcjach komórek nowotworowych

W analizie wykorzystano wyniki ekspresji genów pozyskane we wcześniejszych badaniach zespołu [244]. Poziom ekspresji był liczony w programie qBase^{PLUS} (Biogazelle) zmodyfikowanym wzorem $\Delta\Delta Ct$ [339]) na podstawie średniego cyklu kwantyfikacji (ang. *cycle of quantification* – Cq) z dwóch powtórzeń technicznych względem średniej ekspresji genów referencyjnych (ang. *reference genes* – refGs) – *GAPDH* i *YWHAZ*, z uwzględnieniem kalibratora (mieszanina cDNA ze zdrowej tkanki piersi) obecnego na każdej z płytek do qPCR. Poziom ekspresji skalowano do próbki z najniższą ekspresją (równa 1), zaś jeżeli gen nie był ekspresjonowany, jego poziom oznaczono jako 0. Próbki traktowano jako pozytywne pod względem ekspresji danego genu, jeżeli jego ekspresja była wyższa niż najwyższa ekspresja w próbkach kontrolnych od zdrowych ochotniczek.

Analiza prospektywna

4.3. Hodowla komórkowa

Linie komórkowe MCF-7, SK-BR-3 i MDA-MB-231 (ATCC, nr kat. HTB-22, HTB-30 oraz HTB-26) hodowano w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy (VWR®, nr kat. VWRC392-0414) z 10% dodatkiem FBS (Gibco, nr kat. 10270-106) i 1% dodatkiem roztworu penicyliny i streptomycyny (Gene DireX, nr kat. CC502-0100) w butelkach T25 lub T75 (VWR®, nr kat. 734-2311 i 734-2313) w temperaturze 37 °C przy 5% nasyceniu CO₂. Komórki dysocjowano od dna butelki przy użyciu 1x roztworu trypsyny (Sigma Aldrich, nr kat. 59418C) w 1x PBS; Sigma Aldrich, nr kat. P4417) przy konfluencji 70-80%. Wszystkie linie komórkowe były rutynowo sprawdzane pod kątem zakażenia mykoplazmą.

4.4. Określenie wydajności technicznej oraz specyficzności metody izolacji i detekcji pojedynczych krążących komórek nowotworowych

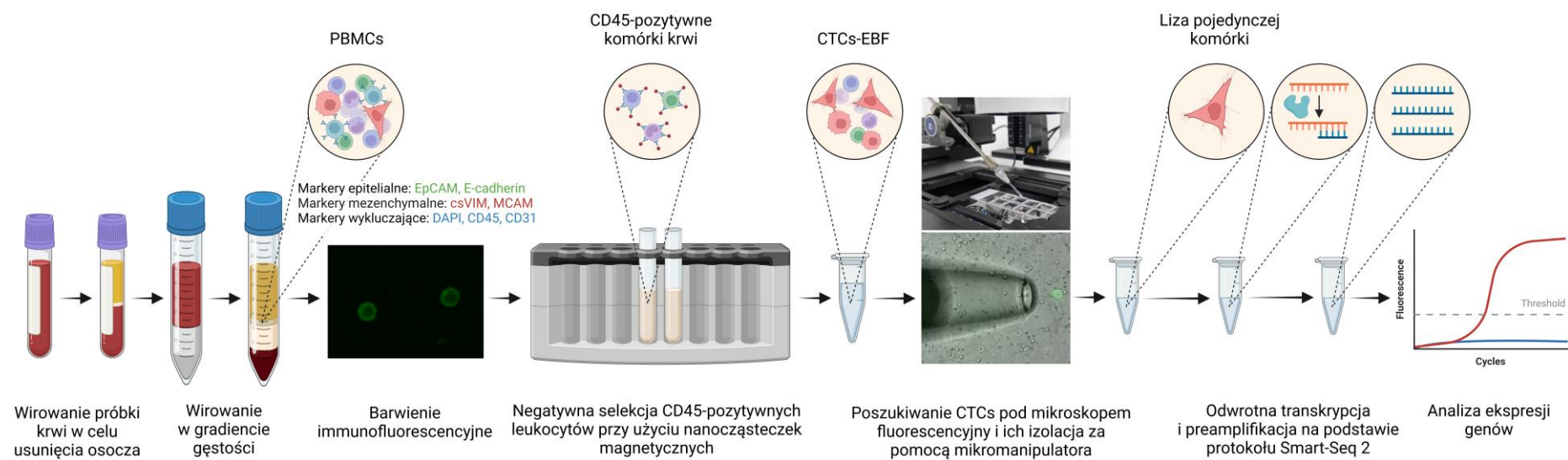
Opracowana metoda umożliwiająca izolację pojedynczych CTCs bazuje na usunięciu osocza bogatego w płytki, wirowaniu w gradiencie gęstości, multipleksowym barwieniu fluorescencyjnym i negatywnej selekcji komórek CD45- dodatnich. Z przygotowanej w taki sposób frakcji komórkowej zawieszanej w 1xPBS, umieszczonej na jednym z okienek slajdu mikroskopowego (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system, Merck, nr kat. C7182), pojedyncze komórki były pobierane z użyciem mikromanipulatora (TransferMan® 4r; Eppendorf®, nr kat. 5193000012; **Ryc. 4**).

Przed przystąpieniem do detekcji i izolacji pojedynczych CTCs z próbek klinicznych, określono odsetek pozostałych PBMCs, specyficzność oraz stopień odzysku (ang. *recovery rate* – RR) metody. Do oceny tych parametrów wykorzystano 5 mL próbki krwi od zdrowych ochotniczek. Odsetek pozostałych PBMCs obliczono na podstawie stosunku liczby PBMCs po wirowaniu w gradiencie gęstości, do liczby PBMCs pozostałych po procedurze wzbogacenia w CTCs próbki krwi (**wzór (1)**). PBMCs liczono pod mikroskopem świetlnym (Zeiss Primovert, Zeiss, nr kat. 415510-1100-0000) z użyciem komory Neubauera (Marienfeld, nr kat. 0640031).

$$\text{Odsetek pozostałych PBMCs} = \frac{\text{liczba PBMCs po procedurze izolacji CTC}}{\text{liczba PBMCs po wirowaniu w gradiencie gęstości}} \times 100\% \quad (1)$$

Specyficzność metody oceniano na podstawie obecności komórek o fenotypie CTCs (EpCAM-/ECAD-pozytywne i/lub csVIM-/MCAM-pozytywne oraz CD45/CD31/DAPI-negatywne) u zdrowych kontroli (n=6, opis grupy kontrolnej w rozdziale 3.1), po poddaniu 5 ml krwi procedurze izolacji CTCs według opracowanego protokołu. W celu określenia RR CTCs, w trzech powtórzeniach biologicznych przeprowadzono test symulujący analizę próbek klinicznych (ang. *spike-in test*, test spike-in). Komórki z linii MCF-7 i MDA-MB-231 (model odpowiednio eCTCs i mCTCs) znakowano przyżyciowo Hoechst 33342 (Invitrogen™, nr kat. H3570), zawieszono w 1x PBS i zliczano na płytce 96-dołkowej (Falcon, nr kat. 353072) pod mikroskopem. Pobierano po 100 komórek z każdej linii komórkowej z wybranych dołków płytki i przenoszono do probówek z 5 mL krwi obwodowej każdej ze zdrowych ochotniczek. Po procedurze, Hoechst-pozytywne komórki (MCF-7 lub MDA-MB-231) zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym (ZEISS AxioVision 200; Zeiss). RR liczono zgodnie ze **wzorem (2)**:

$$RR = \frac{\text{liczba komórek zliczonych po procedurze}}{\text{liczba komórek dodanych do krwi}} \times 100\% \quad (2)$$



Rycina 4. Procedura wzbogacenia, detekcji, izolacji i dalszej analizy transkryptomicznej pojedynczych CTCs o różnych fenotypach EMT od chorych na BC.

4.5. Izolacja, detekcja i pobieranie pojedynczych krążących komórek nowotworowych z próbek klinicznych

Pięciomililitrowe próbki krwi od chorych na BC pobierano do 6 mL probówek opłaszczonych K₂EDTA (BD Vacutainer®, nr kat. BDAM367864). Pierwszy 1 mL krwi z pobrania odrzucano z powodu potencjalnej kontaminacji komórkami epitelialnymi i fibroblastami uwolnionymi wskutek nakłucia skóry. Procedurę izolacji i detekcji CTCs z krwi obwodowej rozpoczynano zazwyczaj do 2 godzin po pobraniu krwi. W celu usunięcia PLTs, krew wirowano w 200×g, 21 °C przez 10 min. Górną warstwę osocza usuwano, pozostawiając około 1 mL osocza powyżej warstwy PBMCs, w celu uniknięcia przypadkowego zaciągnięcia frakcji komórkowej. Pozostałość próbki uzupełniano 1x PBS w temperaturze pokojowej do objętości 9 mL i po delikatnym wymieszaniu przenoszono do nowej 15 mL probówki opłaszczonej CB (2 mM EDTA, 1% FBS w 1x PBS), zawierającej 4 mL sterylnego roztworu Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich, nr kat. 10771), następnie wirowano w 400×g, 21°C przez 30 min, bez przyspieszenia i hamowania. Od tego momentu wszystkie kroki procedury przeprowadzano na lodzie lub w temperaturze 4 °C. Frakcję PBMCs po wirowaniu w gradiencie gęstości pobierano do nowej 15 mL probówki opłaszczonej CB, uzupełniano do objętości 10 mL zimnym (4°C) roztworem 1x PBS i wirowano w 450×g, 4 °C, przez 10 min, w celu uzyskania osadu komórkowego. Osad PBMCs zawieszano w 250 µL sterylnego BB (50 mM glicyny, 5% BSA w 1x PBS) i przenoszono do opłaszczonej CB probówki 1,5 mL (Ultra High Recovery Tubes, Starlab, nr kat. E1415-2600 lub Protein LoBind Tubes, Eppendorf®, nr kat. 0030108116). Próbkę inkubowano z mieszaniem w 4 °C przez 15 min na rotatorze (HulaMixer™ Sample Mixer, Invitrogen™, nr kat. 159-20D) i wirowano przy 400×g, 4 °C, przez 5 min. Po ostrożnym usunięciu supernatantu, dodawano 200 µL roztworu przeciwciał wykrywających EpCAM; rozcieńczenie 1:400, klon VU1D9, skoniugowane z Alexa Fluor® 488; Cell Signalling Technology, nr kat. 5198), ECAD (rozcieńczenie 1:100, klon 67A4, skoniugowane z Alexa Fluor® 488; Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-21791), MCAM (rozcieńczenie 1:200, klon P1H12, skoniugowane z Alexa Fluor® 594, Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-18837), csVIM (rozcieńczenie 1:100; klon WM-59, skoniugowane z Super Bright 436; eBioscience, nr kat. 62-0319-42), CD31 (rozcieńczenie 1:100; klon 84-1, skoniugowane z Texas Red, Abnova, nr kat. H00007431-MT08), oraz DAPI (rozcieńczenie 1:10,000; Sigma Aldrich, nr kat. MBD0015), przygotowanego bezpośrednio przed dodaniem do próbki w sterylnym SB (10 mM glicyny, 1% BSA w 1x PBS), i delikatnie wymieszano. Próbkę inkubowano w 4 °C przez 30 min na rotatorze, następnie wirowano (700×g, 4 °C, 10 s), i po delikatnym wymieszaniu przenoszono do opłaszczonej CB 15 mL probówki zawierającej 125 µL uprzednio przygotowanego zgodnie z protokołem producenta roztworu

magnetycznych cząstek opłaszczonych przeciwciałem wykrywającym CD45 (Dynabeads™ CD45, Thermofisher Scientific, nr kat. 11153D) w CB. Probówkę 1,5 mL przepłukiwano 675 µL roztworu CB i przenoszono do 15 mL probówki zawierającej frakcję komórkową i Dynabeads™ CD45 (całkowita objętość 1 mL). Próbkę inkubowano przez 30 min w 4 °C na rotatorze. W trakcie inkubacji dochodziło do opłaszczenia CD45-pozytywnych komórek krwi magnetycznymi cząsteczkami skoniugowanymi z przeciwciałem anti-CD45. Po 5 min inkubacji w 4 °C, dodawano 5 µL przeciwciał anti-CD45 (klon REA747, skoniugowane z VioBlue®; Miltenyi Biotec, nr kat. 130-110-637) bezpośrednio do probówki (rozcieńczenie końcowe 1:200). Po zakończeniu inkubacji próbkę rozcieńczano zimnym (4 °C) CB do objętości 13 mL, delikatnie mieszano i umieszczano na statywie z magnesami (DynaMag™-15 Magnet, Thermofisher Scientific, nr kat. 12301D) na 10 min, jednocześnie chroniąc przed światłem. Podczas tego kroku, komórki CD45-pozytywne opłaszczone magnetycznymi cząstkami migrowały w kierunku magnesów znajdujących się po bokach probówki, zaś komórki CD45-negatywne (potencjalnie CTCs) pozostawały w roztworze. Po zakończonej inkubacji ostrożnie przenoszono CTCs-EBF do 50 mL probówki opłaszczonej CB i uzupełniano do objętości 25 mL zimnym roztworem (4 °C) CB. Probówkę wirowano w 400×g w 4 °C przez 5 min, usuwano supernatant, a osad komórkowy zawierający CTCs zawieszano w 100 µL roztworu CB. Następnie, odpowiednio rozcieńczoną CTCs-EBF przenoszono na jedno z ośmiu okienek slajdu (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system, Merck, nr kat. C7182) i oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Liczbę oraz fenotyp potencjalnych CTCs określano na podstawie obecności ekspresji markerów epitelialnych (EpCAM/ECAD) i/lub mezenchymalnych (csVIM/MCAM), braku ekspresji markerów komórek endotelialnych (CD31) i hematopoetycznych (CD45) oraz braku sygnału od DAPI (znakującego martwe komórki). W przypadku większości próbek oglądano całą objętość zawiesiny CTCs-EBF, a w przypadku dużej kontaminacji leukocytami określoną część zawiesiny, zaś liczbę CTCs przeliczano proporcjonalnie do obejrzonej objętości roztworu. Pojedyncze komórki (CTCs i do dwóch PBMCs – komórek normalnych, ang. *normal cells* – NCs) pobierano za pomocą mikromanipulatora (TransferMan® 4r; Eppendorf®, nr kat. 5193000012), przenoszono do 0,2 mL probówek (MAXYMumRecovery® PCR tubes; Merck, nr kat. AXYPECR02LC) zawierających 2 µL buforu lizującego (0,1 uL Recombinant RNase Inhibitor (Takara, nr kat. 2313A) w 1,9 uL 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, nr kat. T9284)) i przechowywano w -80 °C do dalszych analiz.

4.6. Odwrotna transkrypcja i preamplifikacja materiału z pojedynczych komórek techniką Smart-Seq2

Materiał ze zlizowanych pojedynczych komórek poddawano odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription* – RT) i preamplifikacji zgodnie z protokołem Smart-Seq2 [333]. Pokrótce, do każdej ze zwirowanych (700×g, 21 °C, 10 s) próbek dodawano po 1 µL starterów oligo-dT30VN (10 µM; 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'; Biomers) oraz 1 µL mieszaniny dNTPs (10 mM każdy; Fermentas, nr kat. R0192), następnie po wymieszaniu i zwirowaniu (700×g, 21 °C, 10 s) inkubowano w 72 °C przez 3 min w termocyklerze (Mastercycler X50s, Eppendorf®, nr kat. 6311000010), po czym niezwłocznie umieszczano je na lodzie. Następnie, po zwirowaniu (700×g, 21 °C, 10 s) do próbek dodawano po 5,7 µL mieszaniny odczynników do RT (Tabela 5), ponownie wymieszano, zwirowano (700×g, 21 °C, 10 s) i przeprowadzono RT w następujących warunkach: 42 °C przez 90 min (RT z przełączeniem matrycy), 10 cykli 50 °C przez 2 min (usunięcie struktur drugorzędowych RNA) i w 42 °C przez 2 min (RT z przełączeniem matrycy), następnie 70 °C przez 15 min (inaktywacja enzymu). Niezwłocznie po zakończeniu RT umieszczano próbki na lodzie, zwirowano (700×g, 21 °C, 10 s) i dodawano po 15 µL mieszaniny odczynników do preamplifikacji (Tabela 6), którą przeprowadzano zgodnie z programem: denaturacja wstępna w 98 °C przez 3 min, 18 cykli w 98 °C przez 20 s (denaturacja), 67 °C przez 15 s (przyłączenie starterów) i 72 °C przez 6 min (wydłużanie amplikonu), oraz wydłużanie końcowe w 72 °C przez 5 min. Po zakończonej preamplifikacji próbki umieszczano w 4 °C, a następnie oczyszczano. W skrócie, do każdej próbki dodawano po 25 µL kulek do oczyszczania DNA (Ampure XP beads, Beckman Coulter, nr kat. A63881), dokładnie wymieszano i inkubowano przez 8 min w temperaturze pokojowej. Następnie, próbki umieszczano w 96-miejscowym statywie (Axygen, nr kat. L-4880) przymocowanym do płytki magnetycznej (Ambion, nr kat. AM10027) i po 5-minutowej inkubacji zbierano klarowny roztwór, uważając przy tym, aby nie naruszyć warstwy magnetycznych kulek z przyłączonym cDNA, które pod wpływem przyciągania magnetycznego osiadały na dnie probówki. Osad dwukrotnie przepłukiwano 200 µL świeżo przygotowanego 80% etanolu (Warchem, nr kat. 37701), po każdym płukaniu umieszczając próbki na magnesie na 30 s. Po usunięciu etanolu próbki suszono przez około 5 min, aż do momentu pojawienia się pęknięć na warstwie kulek magnetycznych. Osad zawieszano w 17,5 µL buforu do elucji (10 mM Tris-Cl, pH 8,5; Qiagen, nr kat. 19086), delikatnie wymieszano, i po umieszczeniu próbek na magnesie na około 2 min pobierano, 15 µL supernatantu, który przenoszono do nowych 200 µL probówek. Probki przechowywano w -20 °C do dalszych analiz.

Tabela 5. Skład mieszaniny odczynników do odwrotnej transkrypcji w pojedynczych komórkach [333].

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy	Objętość [μL]	Końcowa ilość/koncentracja
SuperScript II reverse transcriptase (200 U μl ⁻¹)	Invitrogen™	18064-014	0,50	100 U
RNAse inhibitor (40 U μl ⁻¹)	Clontech	2313A	0,25	10 U
Superscript II first-strand buffer (5×)	Invitrogen™	18064-014	2,00	1×
DTT (100 mM)	Invitrogen™	18064-014	0,50	5 mM
Betaina (5 M)	Sigma Aldrich	61962	2,00	1 M
MgCl ₂ (1 M)	Sigma Aldrich	M8266	0,06	6 mM
TSO (100 μM)	Exiqon	-	0,10	1 μM
Woda wolna od nukleaz	VWR®	733-2573	0,29	-

Tabela 6. Skład mieszaniny odczynników do preamplifikacji RNA z pojedynczych komórek [333].

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy	Objętość [μL]	Końcowa ilość/koncentracja
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2×)	KAPA Biosystems	KK2601	12,50	1×
IS PCR primer (10 μM)	Biomers	-	0,25	0,1 μM
Woda wolna od nukleaz	VWR®	733-2573	2,25	-

4.7. Ocena jakości transkryptomu pojedynczych komórek

Jakość transkryptomu pojedynczych komórek oceniano z użyciem multipleksowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR), w której amplifikowano transkrypty kodowane przez trzy refGs: *EEF1A1*, *ACTB*, oraz *GAPDH*, o długość od 290 do 489 par zasad. Po przygotowaniu mieszaniny odczynników do reakcji (Tabela 7), w termocyklerze Mastercycler X50s (Eppendorf®, nr kat. 6311000010) prowadzono multipleksowy PCR w następujących warunkach: 95 °C przez 4 min, 32 cykle 30 s w 95 °C, 30 s w 58 °C, 90 s w 72 °C, i wydłużanie końcowe przez 7 min w 72 °C [338]. W każdej reakcji uwzględniano negatywną i pozytywną kontrolę. Produkty amplifikacji rozdzielano podczas elektroforezy agarozowej (1,5% agarozą; BIO STANDARD, Prona, nr kat. BS1) w 1x buforze TAE (EURX, nr kat. E0220-02), w aparacie do elektroforezy (Mupid®-One; Advance, nr kat. MU2) w 100 V przez 20 min, następnie 135 V przez 30 min, i wizualizowano w transiluminatorze (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System; Bio-Rad, nr kat. 1070-8170).

Stężenie cDNA w próbkach dobrej jakości (ekspresja minimum 2 z 3 refGs) mierzono za pomocą fluorymetru (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen™, nr kat. Q33238), następnie z próbek o wystarczającej ilości materiału (minimum 1 ng) przygotowywano biblioteki cDNA do analizy transkryptomowej metodą RNA-Seq (protokół opisany w rozdziale 4.9).

Tabela 7. Skład mieszaniny odczynników do multipleksowego PCR [338].

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy	Objętość (μL)	Końcowa ilość/ koncentracja
FastStart PCR Buffer (10x, 20 mM MgCl ₂)	Roche Diagnostics	04738314001	1,0	1x
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/μL)	Roche Diagnostics	04738314001	0,1	0,5 U
dNTPs (10 mM)	Roche Diagnostics	04738314001	0,2	0,2 mM
BSA (20 mg/mL)	Roche Diagnostics	10711454001	0,2	4 mg
Woda (jakość HPLC)	Thermofisher	268300025	6,5	-
Mieszanina starterów*	Merck	-	1,0	4 μM
cDNA z pojedynczej komórki (rozcieńczone 1:5)	-	-	1,0	-

* po 8 μL każdego ze starterów o stężeniu 100 μM + 152 μL wody (jakość HPLC)

4.8. Analiza ekspresji genów metodą qPCR w pojedynczych komórkach

Poziom ekspresji refGs (*ACTB*, *GAPDH*, *YWHAZ*) oraz genów kodujących markery epitelialne (*CDH1*, *EpCAM*, *KRT19*), mezenchymalne (*VIM*, *SERPINE1*, *PLS3*) oraz komórek hematopoetycznych (*PTPRC*) i endotelialnych (*PECAM1*) w pojedynczych komórkach z linii BC (MCF-7 i MDA-MB-231), oraz PBMCs pobranych od chorych na BC analizowano metodą qPCR. Reakcje prowadzono w trzech powtórzeniach technicznych na płytkach 96-dołkowych (Bio-Rad, nr kat. MLL9601) z użyciem termocyklera (CFX96™ Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad, nr kat. 185-50-96), oraz PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, nr kat. A25741) i starterów zaprojektowanych za pomocą narzędzia online Primer-BLAST i Beacon Designer (**Tabela 3**). Wydajność amplifikacji z użyciem wszystkich starterów określano na podstawie analizy krzywych standardowych, a do analiz używano jedynie starterów z wydajnością bliską 100% (±5%). Reakcje qPCR prowadzono w następujących warunkach: 10 min w 95 °C, 40 cykli 15 s w 95 °C, 1 min w 60 °C, następnie 10 s w 95 °C. Krzywe topnienia sporządzano monitorując fluorescencję próbek w temperaturze od 65 do 95 °C ze wzrostem temperatury co 0,5 °C. Poziom ekspresji obliczano na podstawie średniego C_q z powtórzeń technicznych różniących się maksymalnie o 0,5 cykła. Na każdej płytce znajdował się kalibrator (mieszanina cDNA z linii komórkowych BC i PBMCs), który służył do oceny zmienności ekspresji genów między płytkami. Kolejne płytki były kalibrowane w oparciu o różnice w C_q poszczególnych genów w kalibratorze na płytce kalibracyjnej i w kalibratorze na płytce badanej. Następnie poziom ekspresji obliczany był według **wzoru (3)**:

$$\text{Poziom ekspresji} = 2^{Cq_{MAX} - Cq_{badanej\ próbki}} \quad (3)$$

gdzie jako punkt odcięcia (C_q_{MAX}) przyjęto 35 cykl.

4.9. Przygotowanie bibliotek oraz sekwencjonowanie (RNA-Seq) pojedynczych komórek

Stężenie cDNA w próbkach dobrej jakości (ekspresja minimum 2 z 3 refGs w multipleksowym PCR) mierzono za pomocą fluorymetru (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen™, nr kat. Q33238), następnie z próbek o wystarczającej ilości materiału (minimum 1 ng) przygotowywano biblioteki cDNA do analizy transkryptomicznej metodą RNA-Seq.

Z pojedynczych komórek przygotowywano biblioteki do sekwencjonowania przy użyciu zestawu Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, nr kat. FC-131-1024 i FC-131-1096) zgodnie z protokołem opisanym przez Picelli i in (2014) [333]. Trawienie maksymalnie 1 ng cDNA w objętości 5 µL z użyciem odczynników wymienionych w **Tabeli 8** prowadzono przez 5 min w 55 °C w termocyklerze Mastercycler X50s (Eppendorf®, nr kat. 6311000010), po czym niezwłocznie przenoszono próbki na lód. Następnie dodawano 5 µL buforu NT w celu odłączenia Tn5 transpozazy (tagmentazy).

Pofragmentowane cDNA znakowano indeksowanymi adapterami (Nextera XT Index Kit, nr kat. FC-131-1001 lub IDT® DNA/RNA UD Indexes Set A, nr kat. 20027213, oba z Illumina®, **Tabela 9**) i amplifikowano zgodnie z następującym protokołem: 72 °C przez 3 min, 95 °C przez 30 s, 10 cykli 95 °C przez 10 s, 55 °C przez 30 s i 72 °C przez 30 s, następnie 72 °C przez 5 min.

Produkty PCR oczyszczano z użyciem Ampure XP beads (Beckman Coulter, nr kat. A63881) w stosunku 0,7:1. Dystrybucję wielkości fragmentów w przygotowanych bibliotekach cDNA analizowano za pomocą 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, nr kat. G2939BA) i Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, nr kat. 5067-4626) lub 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, nr kat. G2992AA) oraz High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent Technologies, nr kat. NC1874887). W przypadku, gdy krótkie (<135 par zasad) fragmenty stanowiły >30% biblioteki cDNA, oczyszczano je ponownie z użyciem Ampure XP beads w stosunku 0,8:1. Biblioteki cDNA z 49 komórek pobranych od chorych na BC sekwencjonowano z użyciem MiniSeq System (Illumina, nr kat. SY-420-1001) i MiniSeq High Output Reagent Kit (2x75 bp; Illumina, nr kat. FC-420-1001,) lub HiSeq X Ten System (Illumina, nr kat. SY-412-1001) oraz HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5 (2x150 bp; Illumina, nr kat. FC-501-2501, Illumina; usługa wykonana przez Macrogen, Korea).

Tabela 8. Skład mieszaniny odczynników do trawienia [333].

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy	Objętość [μL]	Końcowa ilość/koncentracja
Tagment DNA buffer (2x)	Illumina	FC-131-1024/ FC-131-1096	10,0	1x
Amplicon tagment mix	Illumina	FC-131-1024/ FC-131-1096	5,0	-
Woda (jakość HPLC)	Thermofisher	268300025	15,0	-
cDNA z pojedynczej komórki	-	-	5,0	1 ng

Tabela 9. Skład mieszaniny odczynników do amplifikacji fragmentów cDNA znakowanych indeksowanymi adapterami [333].

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy	Objętość [μL]	Końcowa ilość/koncentracja
Nextera PCR master mix	Illumina	FC-131-1001/ 20027213	15,0	-
Index 1 primers (N7xx)	Illumina	FC-131-1001/ 20027213	5,0	-
Index 2 primers (N5xx)	Illumina	FC-131-1001/ 20027213	5,0	-
cDNA	-	-	25,0	-

4.10. Analiza metod izolacji CTCs o różnych fenotypach EMT od chorych na raka piersi

Wybór metody izolacji CTCs ma duży wpływ na możliwość wykrycia CTCs, szczególnie tych o fenotypie mezenchymalnym, dla których nie ma metody izolacji typu „złoty standard”. Wydajność metody izolacji CTCs określa się poprzez RR, który z kolei weryfikowany jest w teście spike-in, gdzie dominują dwa podejścia: znaną liczbę komórek z nowotworowej linii komórkowej dodaje się do (i) określonej objętości krwi obwodowej lub (ii) zawiesiny PBMCs i poddaje się procedurze izolacji/detekcji, a następnie zlicza się odzyskane komórki.

Aby określić, które metody są najbardziej odpowiednie do detekcji mezenchymalnych CTCs od chorych na BC, przeprowadzono przegląd literatury w celu poszukiwania badań, w których opisano RR (wartość średnią, odchylenie standardowe (ang. *standard deviation* – SD, liczba powtórzeń technicznych) różnych metod, którymi odzyskiwano komórki z linii komórkowych BC o różnym fenotypie EMT. W przypadku, gdy więcej niż jedna praca opisywała RR danej metody, obliczano średnią i SD uwspólnione (ang. *combined mean/SD*). Fenotyp każdej linii komórkowej BC określono na podstawie statusu EMT według Tan i in. (2014) [340]. Wyniki porównano z RR metody CellSearch®, która od lat stanowi „złoty standard” detekcji CTCs, jednakże wychwytuje CTCs w oparciu o marker epitelialny. Dane literaturowe wykorzystane do przeprowadzenia analiz są podsumowane i dostępne pod linkiem: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-021-04064-6#Sec44> (Supplementary file1) [341].

4.11. Analiza bioinformatyczna i statystyczna

Zmienne jakościowe porównywano testem X^2 Pearsona lub testem Fishera, zaś zmienne ciągłe korelowano z użyciem testu rang Spearmana. Różnice w zmiennych ilościowych analizowano testami U Manna-Whitneya i Kruskalla – Wallisa (analiza ekspresji genów) oraz ANOVĄ dwuczynnikową z poprawkami Sidaka, Tukeya i Dunnetta dla porównań wielokrotnych (porównanie RRs metod). Krzywe Kaplana-Meiera dla OS, zdefiniowanego jako czas od operacyjnego usunięcia guza do śmierci chorej lub do momentu ostatniej informacji o losach chorej, porównywano testem log-rank. Hazard względny (ang. *hazard ratio* – HR) z 95% przedziałem ufności (ang. *95% confidence interval* – 95% CI) w celu analizy ryzyka zgonu obliczano z użyciem analizy regresji Coxa. Różnice uznawano za istotne statystyczne, gdy prawdopodobieństwo testowe (ang. *P-value* – *P*) lub oczekiwana proporcja błędów I rodzaju (ang. *false discovery rate* - FDR) były mniejsze niż 0,05. Większość analiz statystycznych wykonano w programach STATISTICA (Statsoft, wersja 13) i GraphPad Prism (GraphPad Software, wersje 8-10). Uwspólnione średnie i SD obliczano z użyciem narzędzia online StatsToDo.

Analizy bioinformatyczne i porównawcze danych z sekwencjonowania wykonał dr hab. Tomasz Stokowy zgodnie z poniższymi wytycznymi: sekwencjonowane odczyty dopasowano do genomu referencyjnego GRCh38.p7 przy użyciu HISAT2 2.0.5 [342]. Dopasowane odczyty w odpowiednich regionach adnotacji genu GENCODE v25 [343] zliczono za pomocą funkcji FeatureCounts [344]. Liczby odczytów dalej normalizowano za pomocą DESeq2 [345] w środowisku R/Bioconductor [346]. Analizy porównawcze danych z sekwencjonowania przeprowadzone w R obejmowały oszacowanie krotności zmiany i obliczenie testu t-Studenta.

Markery erytrocytów (ang. *erythrocytes/ red blood cells* – RBCs) i PLTs zidentyfikowano w oparciu o listy dostępne na platformie Human Protein Atlas (Cluster 1: Erythroid cells - Oxygen transport and Cluster 57: Platelets – Hemostasis) [347].

Geny ulegające zróżnicowanej ekspresji (ang. *differentially expressed genes* – DEGs) pomiędzy dwiema grupami zidentyfikowano w oparciu o poziom istotności statystycznej ($P < 0,05$) i \log_2FC ; gdy mediana $\log_2FC \leq -1$, ekspresję genów uważano za obniżoną, a gdy $\log_2FC \geq 1$ – za podwyższoną. DEGs powiązano z GO BP, GO MF, GO CC oraz ścieżkami Reactome i KEGG przy użyciu narzędzia Functional Annotation Tool autorstwa DAVID Bioinformatics Re-sources 6.8 [348-350].

5. Wyniki

Analiza retrospektywna

Celem analizy było określenie fenotypów EMT, ekspresji markerów inwazyjności, macierzystości i formowania klastrów w CTCs-EBFs od chorych na BC (n=83) oraz zdefiniowanie ich wartości klinicznej. Opracowane kryteria klasyfikacji CTCs-EBFs według fenotypu EMT pozwoliły na wyróżnienie fenotypów epitelialnego, mezenchymalnego oraz fenotypu pośredniego – epitelialno-mezenchymalnego, który według doniesień literaturowych może być związany z większą plastycznością [351], czyli zdolnością do zmiany fenotypu na bardziej epitelialny lub mezenchymalny w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Wyniki przedstawione w tej sekcji zostały opublikowane [244].

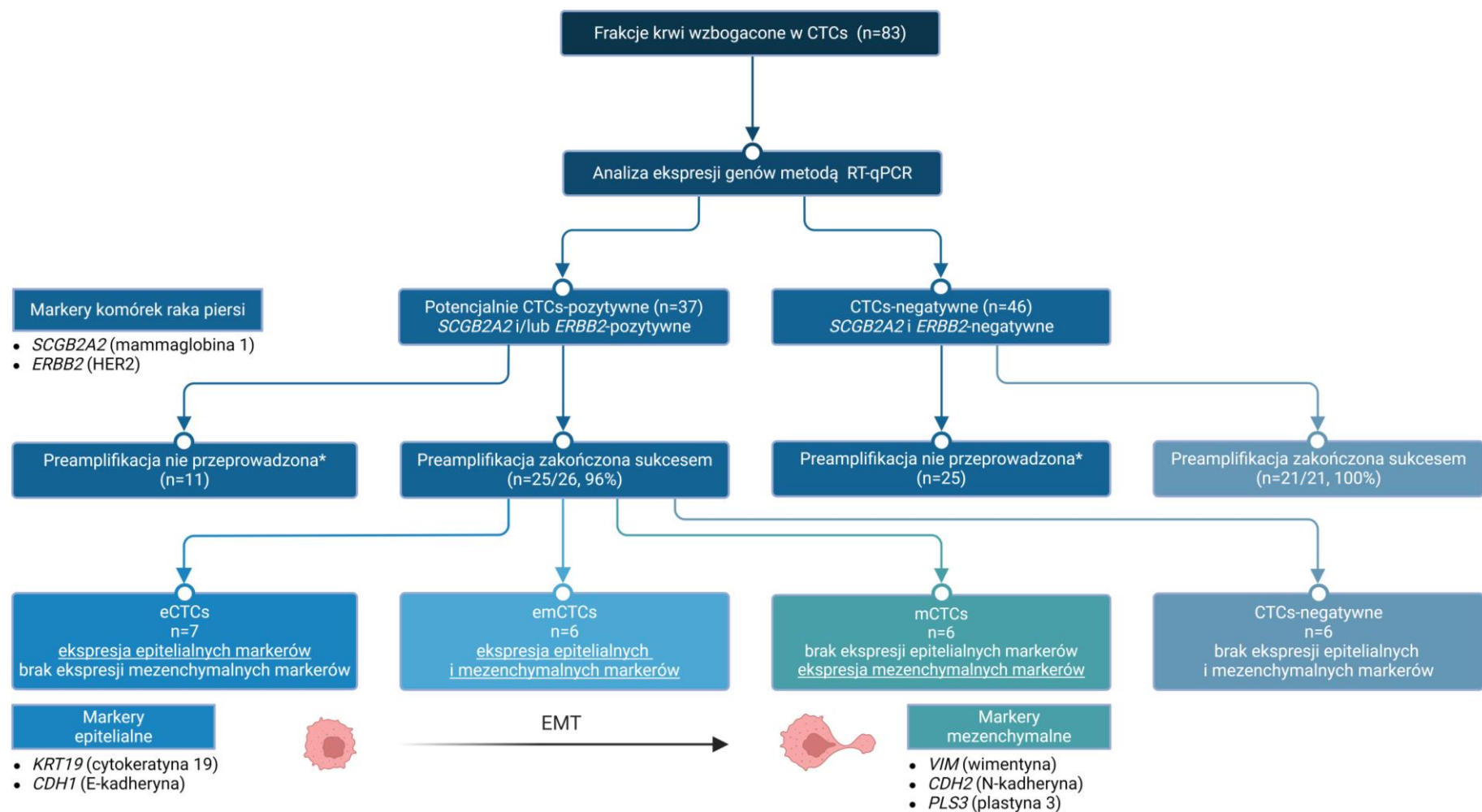
5.1. Identyfikacja fenotypów EMT krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi

Trzydzieści siedem z osiemdziesięciu trzech (45%) analizowanych próbek krwi od chorych na BC było pozytywnych pod względem ekspresji markerów BC – *SCGB2A2* i/lub *ERBB2* (**Ryc. 5**). Próbki *SCGB2A2* i/lub *ERBB2*-pozytywne, mające ekspresję genów epitelialnych i/lub mezenchymalnych (n=19) podzielono na trzy fenotypy:

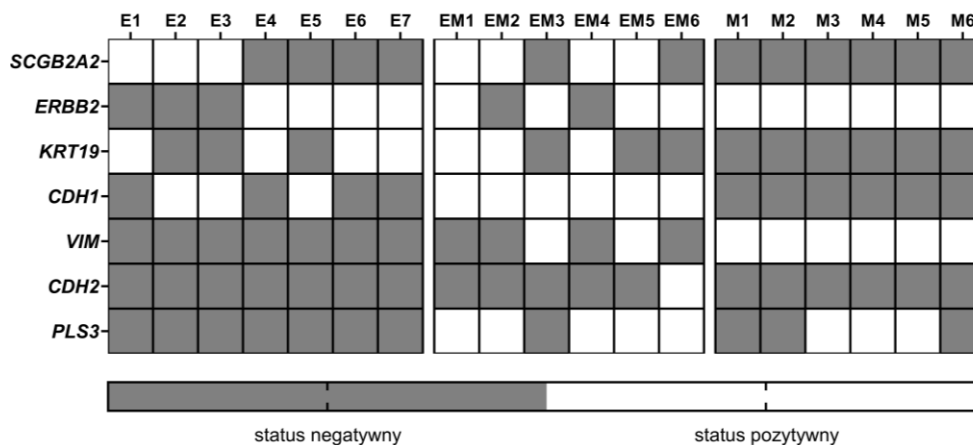
- (i) epitelialny (*KRT19*- i/lub *CDH1*-pozytywne) – 7 z 19 (36,8%),
- (ii) mezenchymalny (*VIM*- i/lub *CDH2*- i/lub *PLS3*-pozytywne) – 6 z 19 (31,6%),
- (iii) epitelialno-mezenchymalny, gdzie markery epitelialne (*KRT19* i/lub *CDH1*) i mezenchymalne (*VIM* i/lub *CDH2* i/lub *PLS3*) były koekspresjonowane – 6 z 19(31,6%) (**Ryc. 5**).

W sześciu próbkach nie odnotowano ekspresji epitelialnych lub mezenchymalnych markerów CTCs, wobec czego zakwalifikowano je jako CTCs-negatywne. Status markerów (pozytywny/negatywny) we wszystkich CTCs-pozytywnych próbkach przedstawiono na **Rycinie 6**.

Żadna z próbek pozyskana od zdrowych ochotniczek nie miała ekspresji *SCGB2A2*, *ERBB2*, *KRT19* oraz *PLAUR* (**Ryc. 7**). Geny *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *PLS3*, *CXCR4*, *CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1* i *JUP* były ekspresjonowane w zdrowych kontrolach, a ich najwyższy poziom ekspresji u zdrowych kontroli stanowił punkt odcięcia, powyżej którego CTCs-EBFs od chorych na BC były rozpatrywane jako CTCs-pozytywne (**Ryc. 6**, **Ryc. 7**).



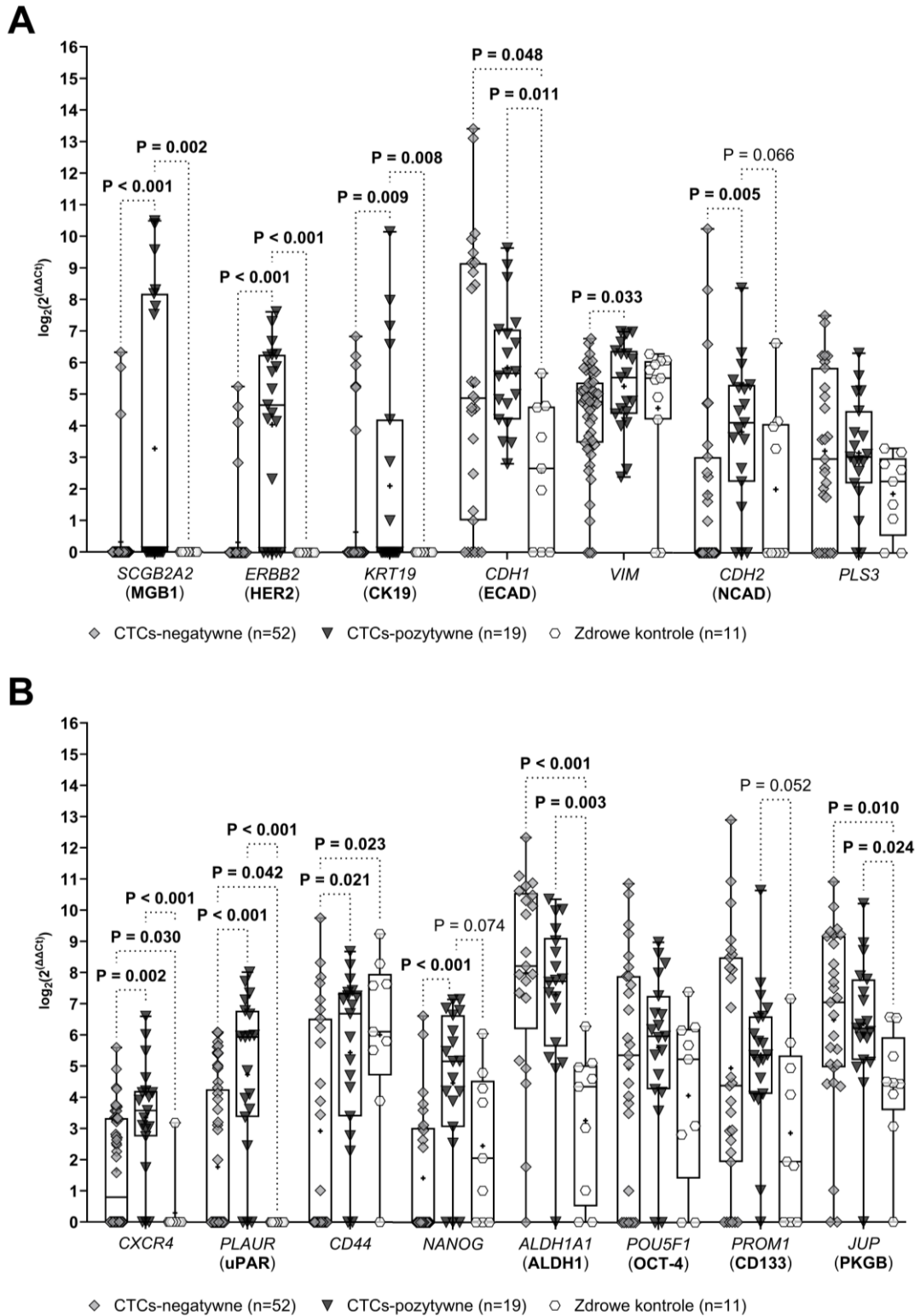
Rycina 5. Schemat przedstawiający próbki od chorych na BC wyłączone i włączone do analizy ekspresji genów. Próbki *SCGB2A2*- i/lub *ERBB2*-pozytywne zostały zakwalifikowane jako CTCs-pozytywne i podzielone na klasy EMT na podstawie ekspresji genów *KRT19*, *CDH1*, *VIM*, *CDH2* i *PLS3*. * - preamplifikacji nie przeprowadzono z powodu małej ilości lub niewystarczającej jakości materiału.



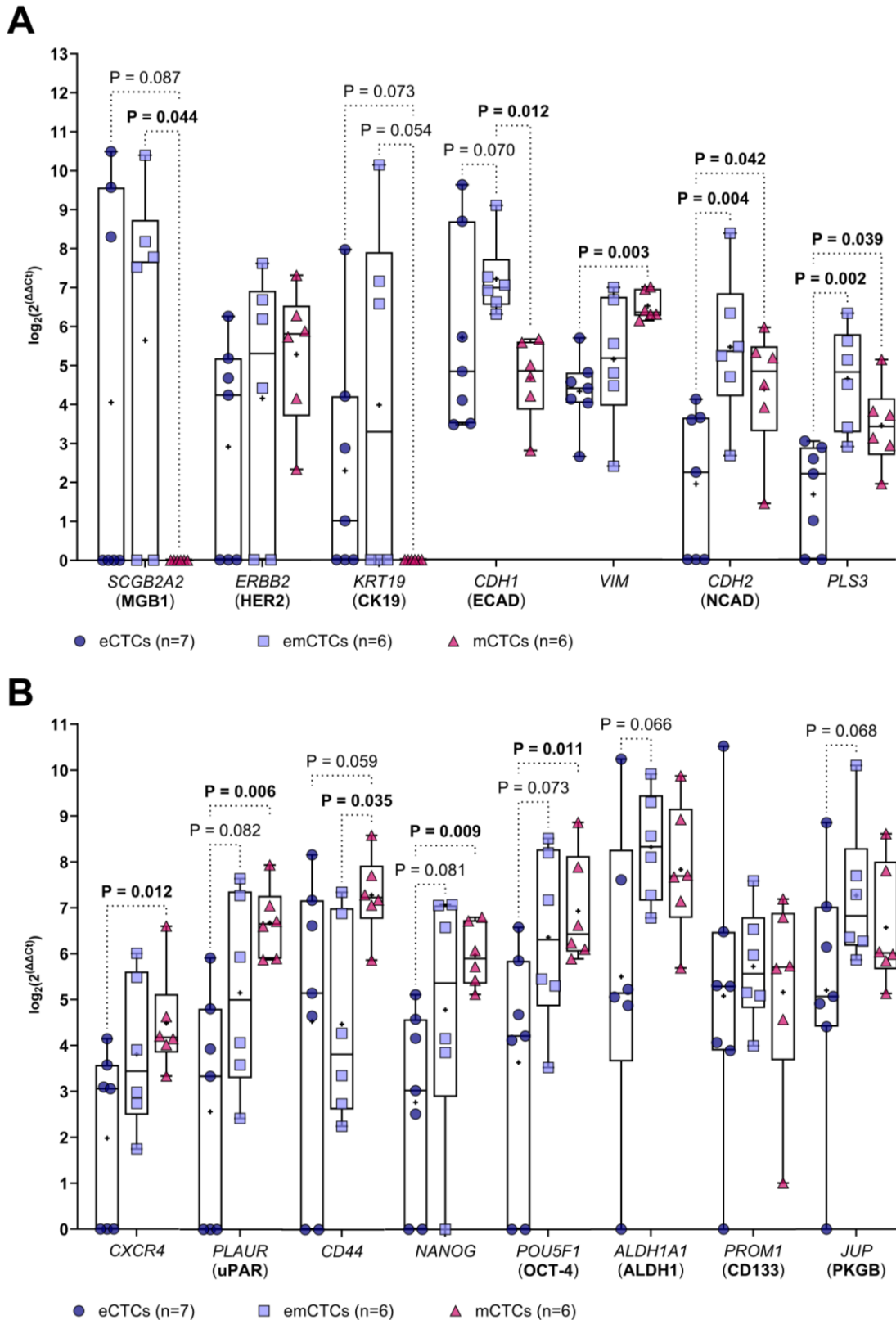
Rycina 6. Status markerów BC, epitelialnych i mezenchymalnych w CTCs-EBFs zakwalifikowanych jako eCTCs (E), emCTCs (EM) i mCTCs (M). Negatywny status markera oznaczono na szaro, zaś pozytywny na biało.

Poziom ekspresji genu *SCGB2A2* był niższy w mCTCs niż emCTCs (mediana 0 vs 7,65; $P=0,044$), oraz wykazywał trend w kierunku zmniejszonej ekspresji w porównaniu do eCTCs ($P=0,087$). Podobne zależności obserwowano w przypadku markerów epitelialnych (*KRT19*, *CDH1*; **Ryc. 8A**), co sugeruje obniżenie ekspresji *SCGB2A2* podczas utraty epitelialności. Z kolei mediana poziomu ekspresji genów kodujących mezenchymalne markery *CDH2* i *PLS3* była najwyższa w emCTCs, nie różniąc się jednak istotnie w porównaniu do mCTCs, gdzie geny te były ekspresjonowane na pośrednim poziomie (*CDH2* – mediana 5,3 vs 4,8, $P=0,411$; *PLS3* – mediana 4,8 vs 3,4, $P=0,305$). Jednocześnie, w eCTCs obserwowano najniższy poziom ekspresji *CDH2* (mediana 2,3) i *PLS3* (mediana 2,2), istotnie niższy w porównaniu do emCTCs (*CDH2* – $P=0,004$, *PLS3* – $P=0,002$) i mCTCs (*CDH2* – $P=0,042$, *PLS3* – $P=0,039$; **Ryc. 8A**), co może być związane z bardziej zaawansowanym EMT w CTCs, które nabyły mezenchymalne cechy.

Następnie skupiono się na analizie ekspresji genów kodujących markery inwazyjności (*CXCR4*, *PLAUR*), macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *POU5F1*, *ALDH1A1*, *PROM1*) oraz formowania klastrów (*JUP*). Wraz z pojawieniem się cech mezenchymalnych zwiększył się poziom ekspresji genów *CXCR4*, *PLAUR*, *NANOG* i *POU5F1* (**Ryc. 8B**). Różnice były istotne, gdy porównywano CTCs o fenotypie epitelialnym oraz mezenchymalnym (*CXCR4* – mediana 3,06 vs 4,18, $P=0,012$; *PLAUR* – mediana 3,32 vs 6,62, $P=0,006$; *NANOG* – mediana 3,01 vs 5,87, $P=0,009$; *POU5F1* – mediana 4,19 vs 6,40, $P=0,011$; **Ryc. 8B**). Z kolei poziomy ekspresji genów kodujących markery macierzystości *ALDH1A1* i *PROM1* oraz marker potencjału do tworzenia klastrów *JUP* nie różniły się pomiędzy CTCs o różnych fenotypach EMT (**Ryc. 8B**).



Rycina 7. (A) Poziom ekspresji genów kodujących *SCGB2A2* i *ERBB2* oraz markery epitelialne (*KRT19*, *CDH1*), mezenchymalne (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*), (B) markery inwazyjności (*CXCR4*, *PLAUR*), macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*) i formowania klastrów (*JUP*) w próbkach CTCs-negatywnych, CTCs-pozytywnych oraz zdrowych kontrolach, porównany testem Kruskala-Wallis. Na wykresie pokazano tylko wartości $P < 0,1$, wartości $P < 0,05$ są pogrubione. Pozioma linia wskazuje medianę, „+” – średnią, ramka – 25-75% percentyl, a wąsy – zakres.



Rycina 8. (A) Poziom ekspresji genów kodujących *SCGB2A2* i *ERBB2* oraz markery epitelialne (*KRT19*, *CDH1*), mezenchymalne (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*), (B) markery inwazyjności (*CXCR4*, *PLAUR*), macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*) i formowania klastrow (*JUP*) w próbkach CTCs-pozytywnych, porównany testem Kruskala-Wallis. Na wykresie pokazano tylko wartości $P < 0,1$, wartości $P < 0,05$ są pogrubione. Pozioma linia wskazuje medianę, „+” – średnią, ramka – 25-75% percentyl, a wąsy – zakres.

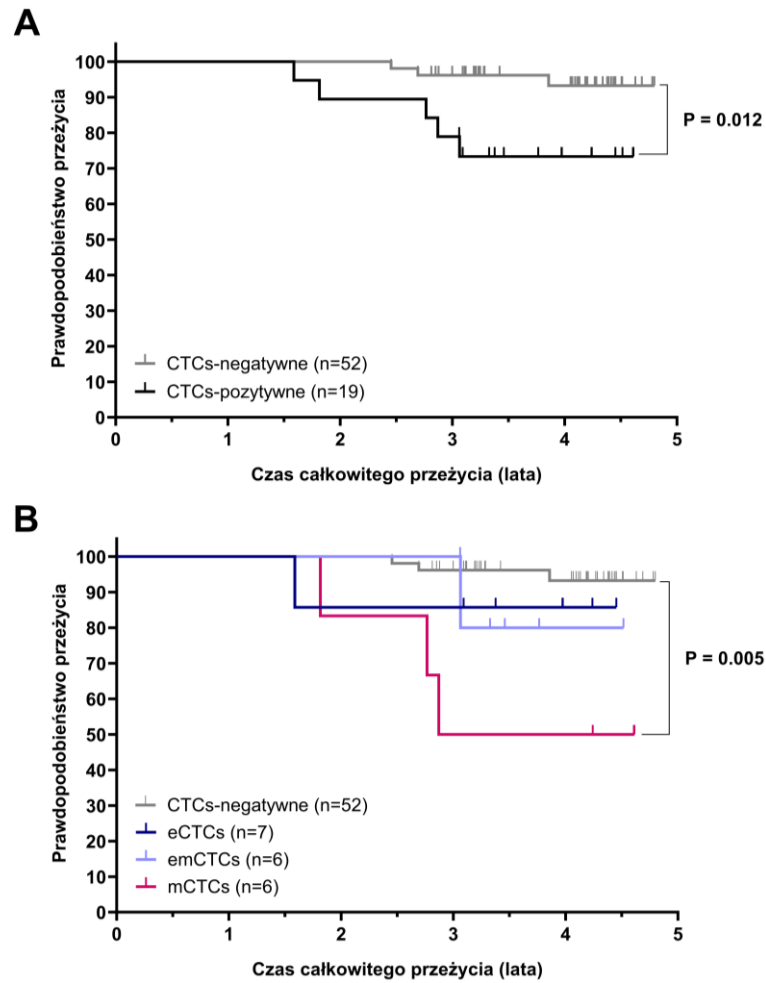
5.2. Znaczenie kliniczne różnych fenotypów EMT w zagęszczonych frakcjach komórek nowotworowych u chorych na raka piersi

Epitelialno-mezenchymalny i mezenchymalny fenotyp CTCs przekłada się na bardziej agresywną charakterystykę nowotworu (**Tabela 10**). Obserwowano więcej niż 3 zajęte węzły chłonne u chorych, u których wykryto emCTCs i mCTCs (emCTCs – 17%, mCTCs – 33% vs eCTCs – 0%; $P=0,003$). U chorych na BC z większymi guzami (status T2-4) również częściej obserwowano emCTC (13%) i mCTCs (16%) w porównaniu do eCTCs (5%, $P=0,023$).

Obecność CTCs we krwi chorych na BC jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym (**Ryc. 9A**); chore, u których wykryto CTCs miały istotnie krótszy OS ($P=0,012$) i większe ryzyko zgonu w porównaniu do pacjentek, u których nie wykryto CTCs ($HR=5,17$, 95% CI 1,23-21,68, $P=0,02$; **Tabela 11**). Co więcej, podział CTCs na fenotypy EMT umożliwił bardziej dokładną charakterystykę ich wartości klinicznej; obecność mezenchymalnych markerów w CTCs-EBFs od chorych na BC korelowała z istotnie krótszym OS ($P=0,005$, **Ryc. 9B**) oraz z większym ryzykiem zgonu ($HR=7,77$, 95% CI 1,85-32,68, $P=0,005$; **Tabela 11**) w porównaniu do chorych CTCs-negatywnych. W analizie wieloczynnikowej obecność mCTCs była niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym ($HR=7,33$, 95% CI 1,06-50,41, $P=0,04$; **Tabela 11**).

Tabela 10. Korelacje pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi a fenotypem EMT CTCs u chorych na BC. Istotnie statystycznie ($P<0,05$) różnice pogrubiono. Procentowość obliczano w stosunku do wszystkich próbek (n).

Cecha	Status	n	CTCs-negatywne	CTCs-pozytywne			P
				eCTCs	emCTCs	mCTCs	
pT (wielkość guza)	pT1	32	26 (81%)	5 (3%)	1 (16%)	0 (0%)	0,023
	pT2-pT4	38	25 (66%)	2 (5%)	5 (13%)	6 (16%)	
pN (obecność przerzutów do węzłów chłonnych)	pN ^{neg}	37	32 (86%)	3 (8%)	1 (3%)	1 (3%)	0,043
	pN ^{pos}	34	20 (59%)	4 (11%)	5 (15%)	5 (15%)	
Liczba zajętych węzłów chłonnych	1-3 (pN1)	59	46 (78%)	7 (12%)	4 (7%)	2 (3%)	0,003
	≥4 (≥pN2)	12	6 (50%)	0 (0%)	2 (17%)	4 (33%)	
G (stopień złośliwości histologicznej)	G1-G2	45	33 (73%)	7 (16%)	2 (4%)	3 (7%)	0,077
	G3	26	19 (73%)	0 (0%)	4 (15%)	3 (12%)	
Status ER	ER ^{neg}	15	12 (80%)	1 (7%)	0 (0%)	2 (13%)	0,483
	ER ^{pos}	56	40 (71%)	6 (11%)	6 (11%)	4 (7%)	
Status PR	PR ^{neg}	16	13 (82%)	1 (6%)	1 (6%)	1 (6%)	0,875
	PR ^{pos}	55	39 (71%)	6 (11%)	5 (9%)	5 (9%)	
Status HER2	HER2 ^{neg}	50	37 (74%)	7 (14%)	2 (4%)	4 (8%)	0,060
	HER2 ^{pos}	19	13 (67%)	0 (0%)	4 (22%)	2 (11%)	



Rycina 9. Wpływ obecności (A) oraz fenotypu CTCs (B) u chorych na BC na czas całkowitego przeżycia. Jedynie istotne statystycznie różnice ($P < 0,05$) zostały pokazane na wykresie. Krzywe przeżycia porównywano testem log-rank.

Tabela 11. Analiza jedno- i wieloczynnikowa ryzyka zgonu chorych na BC ($n=72$) uwzględniająca klasyczne cechy kliniczno-patologiczne w zależności od fenotypu występujących CTCs (w porównaniu do reszty próbek). Istotne statystycznie różnice ($P < 0,05$) pogrubiono.

Zmienna	Analiza jednoczynnikowa			Analiza wieloczynnikowa			
	HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>	
Fenotyp CTCs	eCTCs	1,40	0,17–11,36	0,75	1,13	0,12–10,61	0,92
	emCTCs	1,65	0,20–13,59	0,64	0,95	0,10–8,75	0,97
	mCTCs	7,77	1,85–32,68	0,005	7,33	1,06–50,41	0,04
	jakikolwiek	5,17	1,23–21,68	0,02	3,40	0,69–16,69	0,13

Analiza danych literaturowych dotyczących metod izolacji krążących komórek nowotworowych

W celu porównania metod izolacji i detekcji CTCs o różnych fenotypach dokonano przeglądu opisanych w literaturze metod izolacji CTCs o różnych fenotypach EMT oraz przeprowadzono analizę statystyczną opublikowanych danych. Wyzwaniem stanowiła głównie detekcja CTCs o fenotypie mezenchymalnym ze względu na brak ustandaryzowanej metody bazującej na ekspresji specyficznego zewnątrzkomórkowego markera (a nie tylko cechach fizycznych), który umożliwiałby wychwycenie żywych CTCs do analizy transkryptomicznej. Wyniki przedstawione w tej sekcji zostały opublikowane [341].

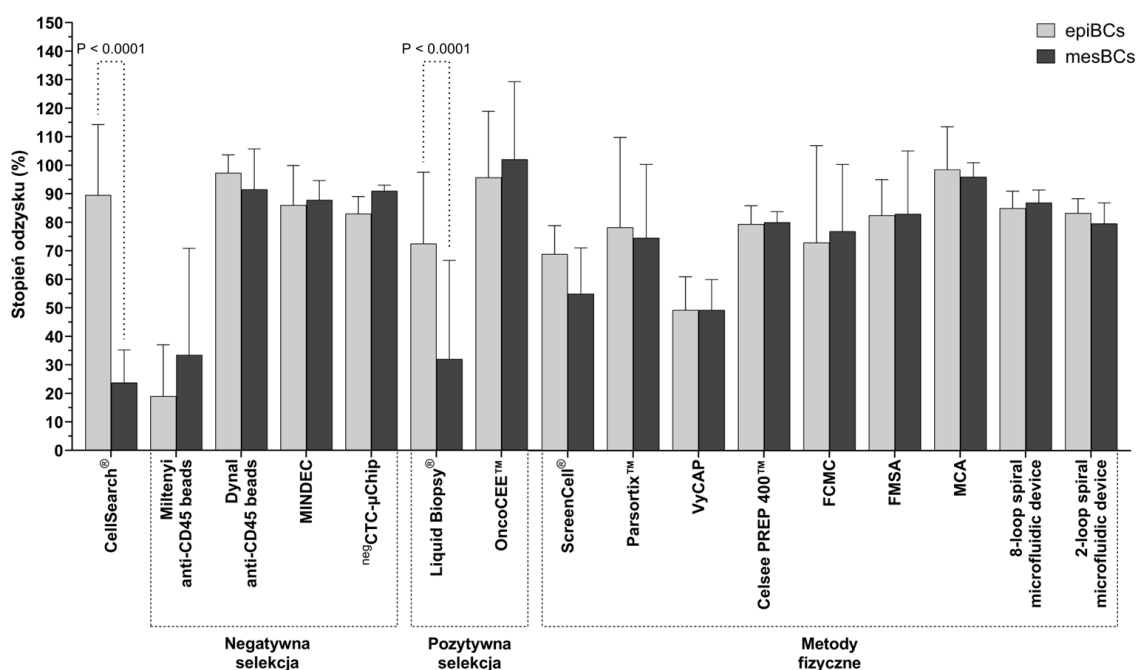
5.3. Wydajność odzysku epitelialnych i mezenchymalnych komórek z linii komórkowych raka piersi w testach symulujących analizę próbek klinicznych

Metody służące do izolacji i detekcji CTCs podzielono według kryterium (właściwości komórek nowotworowych), na jakim bazuje metoda: (i) CellSearch® (pozytywna selekcja epitelialna), (ii) negatywna selekcja (usuwanie komórek z ekspresją markerów leukocytów i komórek endotelialnych), (iii) pozytywna selekcja zależna od markerów (oprócz metody CellSearch®), oraz (iv) metody fizyczne (wykorzystujące różnice w wielkości i odkształcalności komórek).

Większość metod bazujących na negatywnej selekcji (DynaL anti-CD45 beads, MINDEC, negCTC-Chips) i właściwościach fizycznych (Parsortix™, VyCAP, CelSee PREP 400™, FCMC, FMSA, MCA, spiralne urządzenia mikrofluidowe – ang. *spiral microfluidic devices*) charakteryzuje się podobnym współczynnikiem odzysku (RR) bez względu na fenotyp odzyskiwanych komórek nowotworowych (**Ryc. 10**). Spośród analizowanych metod dwie wykazały dysproporcję w izolacji komórek o różnych fenotypach. CellSearch®, metoda bazująca na pozytywnej selekcji w oparciu o ekspresję EpCAM charakteryzuje się najniższym RR komórek BC o fenotypie mezenchymalnym (ang. *mesenchymal BC cells* – mesBCs; 23,7%), jednocześnie pozwalając na wysoki odzysk komórek BC o fenotypie epitelialnym (ang. *epithelial BC cells* – epiBCs; 89,5%, $P < 0,0001$). LiquidBiopsy®, metoda pozytywnej selekcji wykorzystująca markery epitelialne i mezenchymalne również pozwala na skuteczniejszą izolację epiBCs niż mesBCs (72,5% vs 32%, $P < 0,0001$), jednakże OncoCEE™ - metoda z tej samej grupy umożliwia izolację komórek o wszystkich fenotypach EMT. Warto jednak podkreślić, że OncoCEE™ do detekcji wykorzystuje szerszy panel markerów niż LiquidBiopsy® (**Ryc. 10**) [280, 282, 283, 352].

W porównaniu do CellSearch®, poszczególne metody bazujące na negatywnej selekcji (DynaL anti-CD45 beads, MINDEC oraz negCTC- μ Chip) umożliwiają osiągnięcie wyższego RR

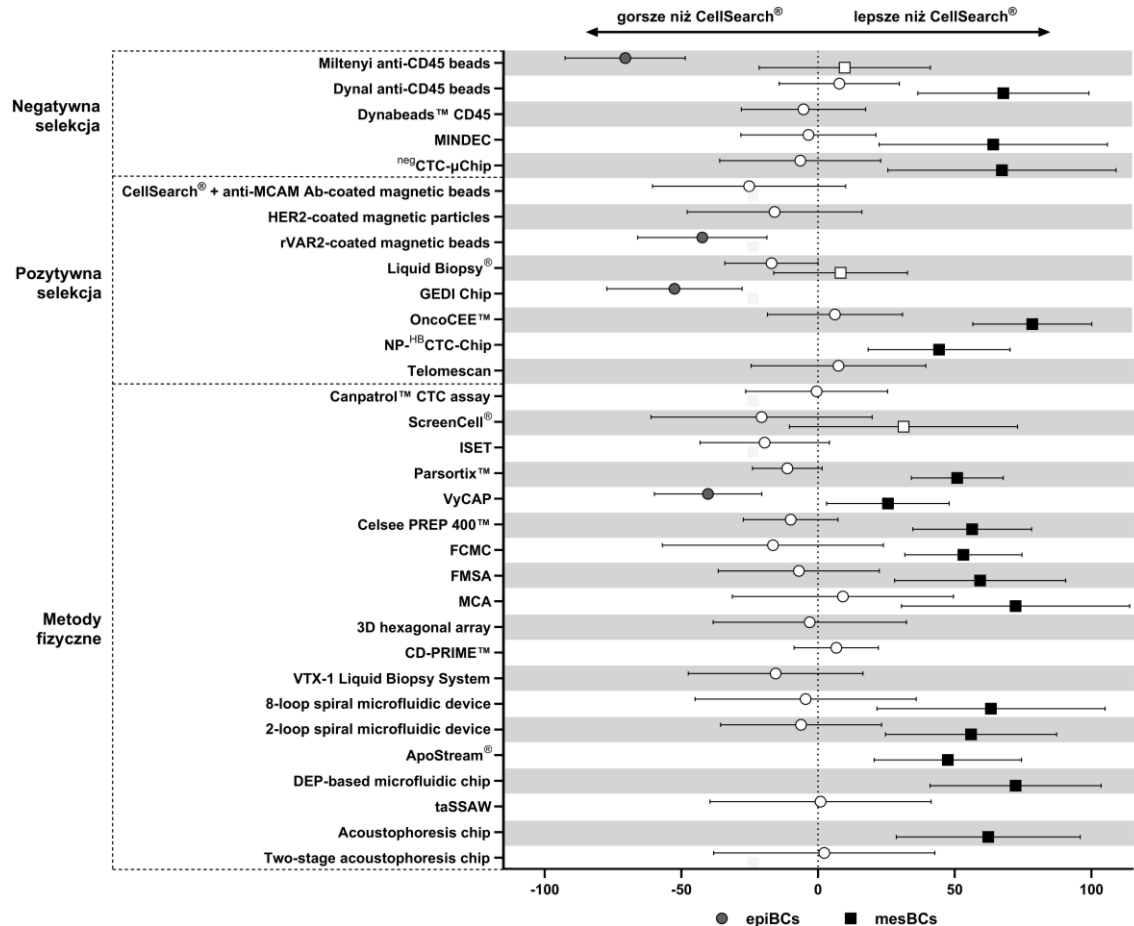
mesBC, oraz nie gorszego RR epiBC - jedynie z użyciem Miltenyi anti-CD45 beads uzyskano gorsze RR epiBC niż CellSearch® (Ryc. 11). Jednocześnie, frakcja komórek BC wzbogacona Miltenyi anti-CD45 beads charakteryzuje się lepszą czystością (zanieczyszczenia PBMCs w stopniu 0,5%) w porównaniu do Dynal anti-CD45 beads (20%) [260]. Metody bazujące na różnicach we właściwościach fizycznych komórek BC (Parsortix™, CelSee PREP 400™, FCMC, FMSA, MCA, spiralne urządzenia mikrofluidowe) generalnie również sprawdzają się lepiej w detekcji mesBC niż CellSearch®, ale równie dobrze wykrywają epiBC. Warto jednak podkreślić, że generalnie w testach spike-in przeprowadzonych z użyciem metod fizycznych do krwi dodawana jest duża liczba komórek z linii komórkowych BC, co nie odwzorowuje stosunku CTCs do PBMCs w próbkach klinicznych.



Rycina 10. RRs epitelialnych (szare) i mezenchymalnych (czarne) komórek z linii BC izolowanych różnymi metodami. Jedynie metody, gdzie dysponowano jednocześnie RRs dla obu fenotypów linii BC, zostały uwzględnione w analizie [260, 263, 264, 280, 282, 288, 290, 291, 294-298, 301, 302, 353-356]. Kolumny wskazują średnią, zaś słupki SD. Jedynie istotne statystycznie różnice ($P < 0,05$) zostały pokazane na wykresie. RRs były porównywane za pomocą ANOVY dwuczynnikowej z poprawką Sidaka dla porównań wielokrotnych.

Wyniki powyższych analiz wskazują, że metody bazujące na negatywnej selekcji leukocytów oraz właściwościach fizycznych CTCs pozwalają na izolację CTCs bez względu na ich fenotyp. W przypadku analizy próbek klinicznych niezbędna jest jednak dalsza detekcja z użyciem markerów specyficznych dla różnych fenotypów EMT, aby zagwarantować rzetelne odróżnienie CTCs od komórek hematopoetycznych. Zakończona powodzeniem izolacja CTCs z próbek klinicznych ściśle zależy od objętości przeanalizowanej krwi, co jest szczególnie istotne, gdy w grupie badanej znajdują się chore we wczesnym stadium BC, u których rozsiew

nowotworu drogą krwionośną jest na początkowym etapie, a odsetek CTCs w porównaniu do komórek krwi – niewielki. W porównaniu do metod fizycznych, metody bazujące na negatywnej selekcji mają wyższą przepustowość, wobec czego umożliwiają przeanalizowanie większej objętości krwi, co w konsekwencji zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia potencjalnych CTCs u chorych.



Rycina 11. Średnia różnica pomiędzy RRs epiBCs (koła) i mesBCs (kwadraty) uzyskanym wybranymi metodami [260-262, 264, 265, 280, 282-286, 288, 290-292, 294-302, 311, 315-317, 357-359] oraz CellSearch® [297, 353, 354, 356] (pokazana na osi Y). Wąsy pokazują 95% CI. Istotne statystycznie różnice ($P < 0,05$) zostały oznaczone zaznaczone kolorem grafitowym (epiBCs) i czarnym (mesBCs), podczas gdy nieistotne statystycznie różnice zaznaczono kolorem białym. RRs były porównywane za pomocą ANOVY dwuczynnikowej z poprawką Dunneta dla porównań wielokrotnych. W przypadku, gdy RRs epiBCs lub mesBCs nie były dostępne dla poszczególnych metod, pokazywano RR tylko dla jednego fenotypu.

Analiza prospektywna

Analiza CTCs-EBFs od chorych na BC z grupy retrospektywnej (n=83) wykazała, że mezenchymalne cechy korelowały z niekorzystną charakterystyką kliniczno-patologiczną, krótszym OS, większym ryzykiem zajęcia węzłów chłonnych oraz ze zwiększoną ekspresją markerów inwazyjności i macierzystości. Niemniej, geny *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *PLS3*, *CXCR4*, *CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1* i *JUP* były ekspresjonowane w zdrowych kontrolach, najprawdopodobniej wskutek ich ekspresji w komórkach występujących w krwi. Z tego względu podjęto się opracowania metody umożliwiającej izolację, detekcję i analizę transkryptomyczną (niewymagającej korekty poziomu tła) CTCs na poziomie pojedynczej komórki, aby określić cechy oraz mechanizmy stojące za zwiększoną agresywnością CTCs ekspresjonujących mezenchymalne markery. Opracowana metoda (**Ryc. 4**) bazuje na (i) negatywnej selekcji komórek CD45 dodatnich, która według analizy danych literaturowych umożliwia izolację CTCs bez względu na ich fenotyp EMT, (ii) detekcji opartej o markery epitelialne (EpCAM/ECAD) i mezenchymalne (csVIM/MCAM) oraz wykluczające (CD45/CD31/ DAPI). Opracowana procedura została opublikowana [360].

5.4. Wydajność techniczna metody izolacji i detekcji pojedynczych krążących komórek nowotworowych

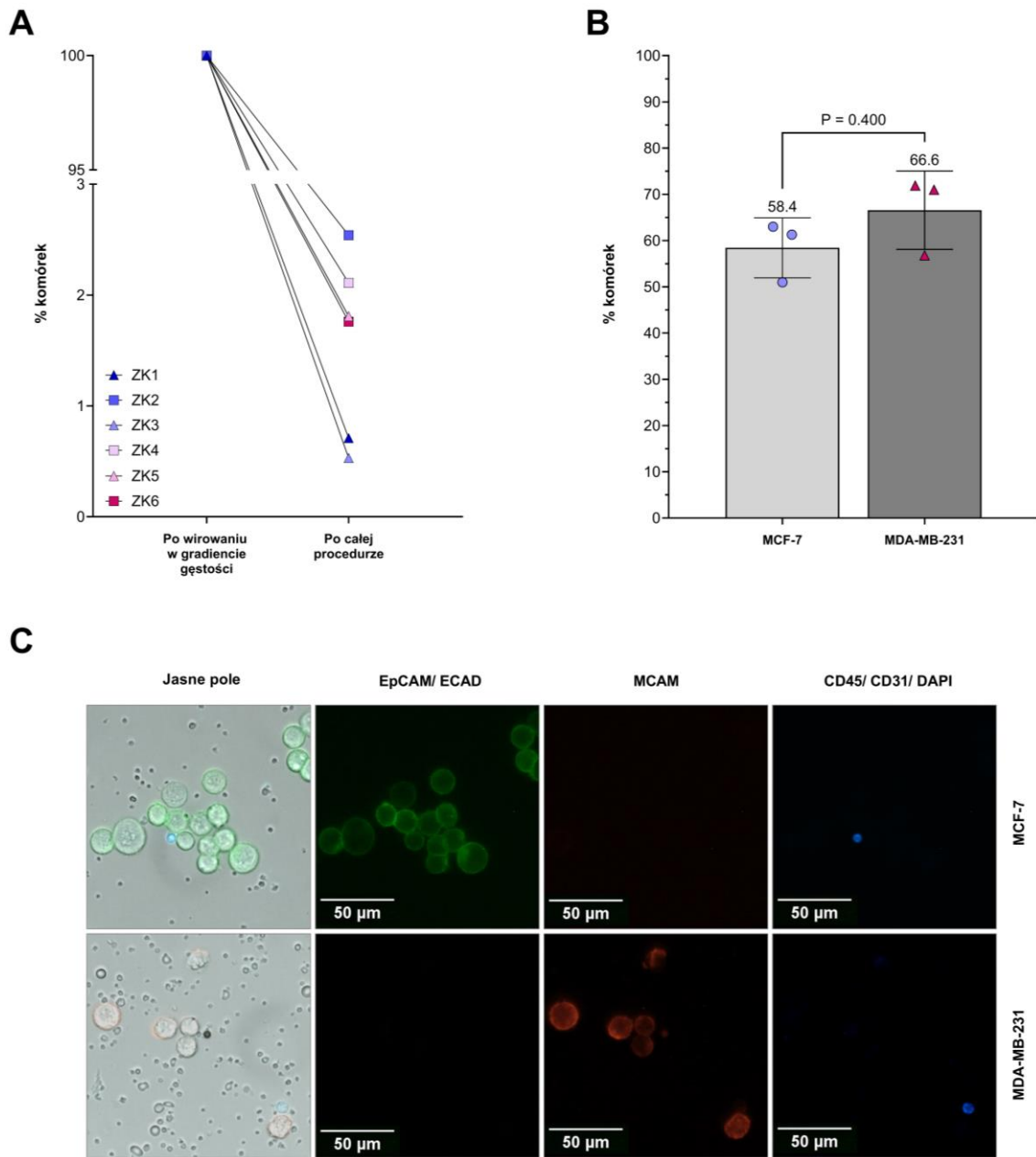
Specyficzność metody określano analizując próbki krwi od 6 zdrowych ochotniczek. Próbki krwi poddano procedurze izolacji CTCs oraz obejrzano zagęszczone zawiesiny komórek pod mikroskopem fluorescencyjnym w celu określenia obecności CD45-/CD31-/DAPI-negatywnych komórek o fenotypie: eCTCs (EpCAM- i/lub ECAD-pozytywne, csVIM- i MCAM negatywne), mCTCs (EpCAM- i ECAD-negatywne, csVIM- i/lub MCAM-pozytywne) lub emCTCs, gdzie markery epitelialne i mezenchymalne były koekspresjonowane. Jedynie w martwych (DAPI-pozytywnych) PBMCs i/lub komórkach o pochodzeniu leukocytnym (CD45-pozytywnych) lub endotelialnym (CD31-pozytywnych) obserwowano wewnątrzkomórkową ekspresję markerów mCTCs (csVIM/MCAM) na poziomie białka.

Po dodaniu 100 komórek z linii komórkowych BC (MCF-7 – fenotyp epitelialny lub MDA-MB-231 – fenotyp mezenchymalny) do 5 mL pełnej krwi i przeprowadzeniu procedury izolacji pojedynczych CTCs, oceniano stopień zagęszczenia (wydajność redukcji ilości niepożądanych PBMCs) oraz stopień odzysku – RR (wydajność wychwytywania komórek nowotworowych z próbki krwi). Metoda izolacji CTCs umożliwia redukcję ilości PBMCs o 98,4% (**Ryc. 12A**; mediana 7 457 059 komórek po wirowaniu w gradiencie gęstości vs 86 550 komórek po całej procedurze). RR dodawanych komórek był podobny dla linii komórkowych BC

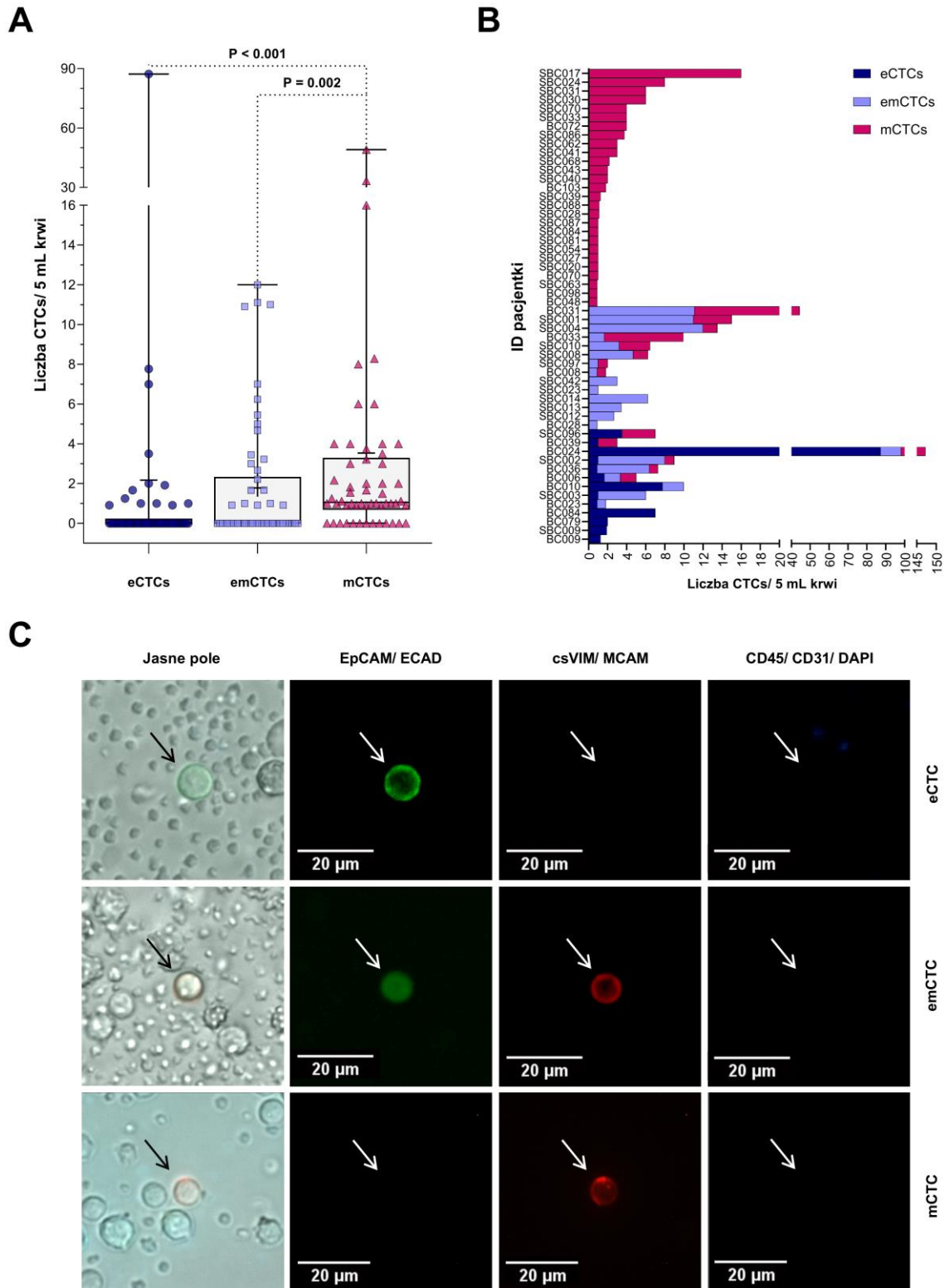
o fenotypach epitelialnym i mezenchymalnym – odzyskano odpowiednio $58,4 \pm 6,5$ i $66,6 \pm 8,5\%$ (średnia \pm SD) dodanych komórek z linii MCF-7 i MDA-MB-231 (**Ryc. 12B**). Reprezentatywne zdjęcia wykrytych komórek z linii MCF-7 i MDA-MB-231 wybarwionych na obecność EpCAM/ECAD, MCAM oraz CD45/CD31/DAPI przedstawiono na **Rycinie 12C**.

5.5. Heterogenność fenotypu EMT w krążących komórkach nowotworowych u chorych na raka piersi

Następnie, analizowano próbki od chorych na BC w celu określenia liczby CTCs i ich fenotypu EMT. Jedynie chore operacyjne, które przed pobraniem próbki krwi nie otrzymywały leczenia systemowego, były włączone do tej analizy. W tej grupie 54 ze 104 (51,9%) chorych było CTCs-pozytywnych, z medianą 1 CTC w 5 mL krwi (średnia \pm SD - $3,8 \pm 15$). Mediana liczby eCTCs oraz emCTCs była niższa niż mediana liczby mCTCs (o fenotypie mezenchymalnym) – odpowiednio 0 i 0 vs 1,1 CTCs (**Ryc. 13A**). Chore różniły się pod względem zaobserwowanych fenotypów CTCs: u 7,4% (4/54) chorych wykryto tylko eCTCs, u 50,0% (27/54) tylko mCTCs, u 11,1% (6/54) tylko emCTCs. U 31,5% (17/54) chorych jednocześnie występowały 2 lub 3 fenotypy CTCs (**Ryc. 13B**). Reprezentatywne zdjęcia wykrytych CTCs przedstawiono na **Rycinie 13C**.



Rycina 12. (A) Liczba PBMCs po wirowaniu w gradiencie gęstości i po całej procedurze izolacji CTCs po przepracowaniu 5 mL próbek krwi od zdrowych ochotniczek (n=6). (B) RR pojedynczych komórek z linii BC MCF-7 (o fenotypie epitelialnym) i MDA-MB-231 (o fenotypie mezenchymalnym) dodanych do 5 mL próbek krwi od zdrowych ochotniczek. Zmienne porównywano testem U Manna-Whitneya. Na rycinie pokazano średnie \pm SD z trzech niezależnych powtórzeń technicznych dla każdej linii komórkowej BC. (C) Reprezentatywne zdjęcia linii komórkowych BC podczas walidacji barwienia immunofluorescencyjnego wykrywającego obecność EpCAM, ECAD, MCAM, CD45 i CD31.

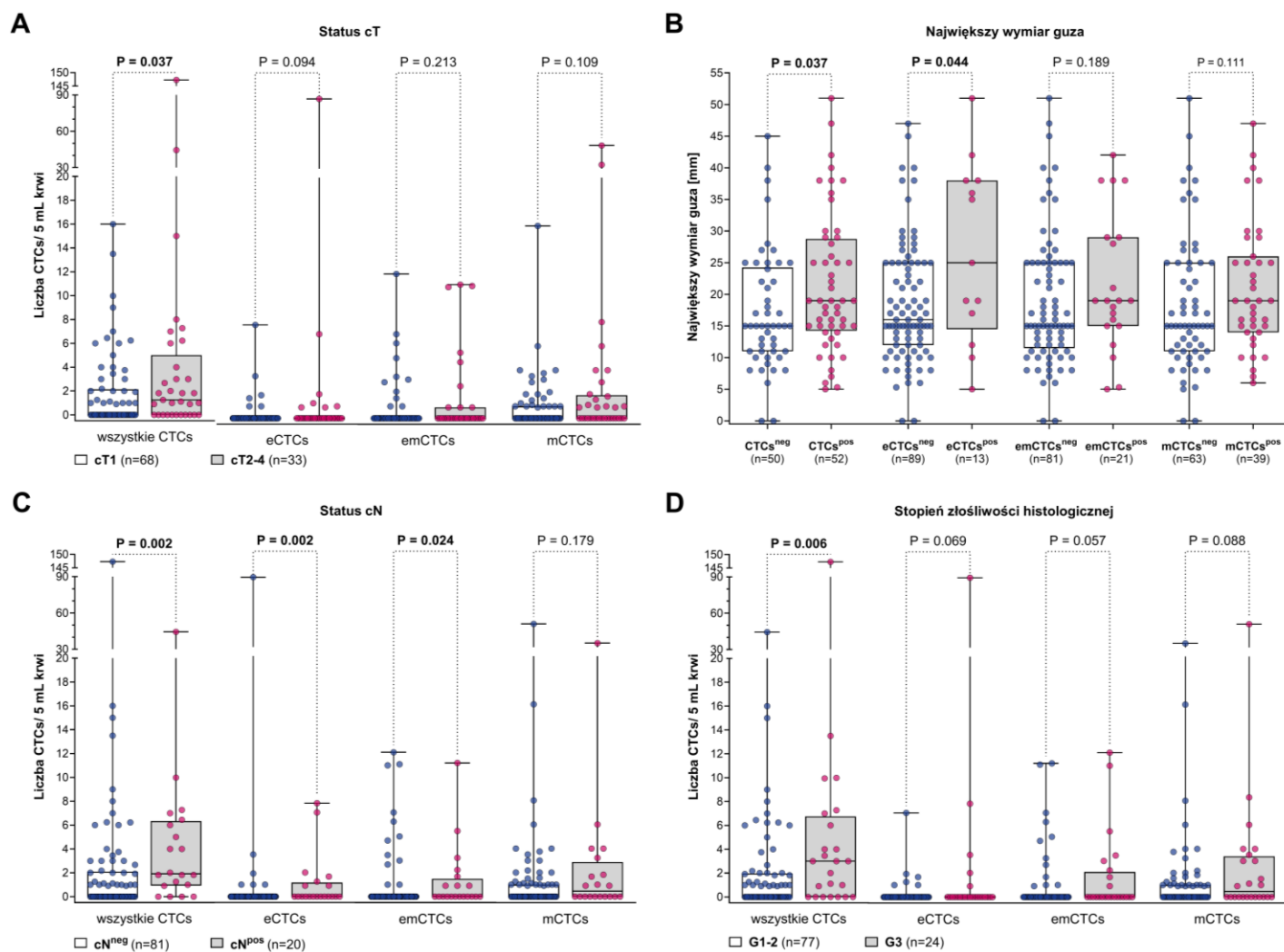


Rycina 13. (A) Liczba CTCs o różnych fenotypach EMT u chorych na BC porównana testem Kruskalla-Wallis. Pionowe linie wskazują medianę, a wąsy 95% CI. Pokazane zostały jedynie istotne statystycznie różnice ($P < 0,05$). (B) Heterogenność fenotypów EMT CTCs wykrytych u CTCs-pozytywnych chorych ($n=54$) ukazana jako całkowita liczba CTCs na 5 mL krwi. (C) Reprezentatywne zdjęcia CTCs wykrytych u chorych na BC.

5.6. Liczba i fenotyp EMT krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi w zależności od ich charakterystyki kliniczno-patologicznej

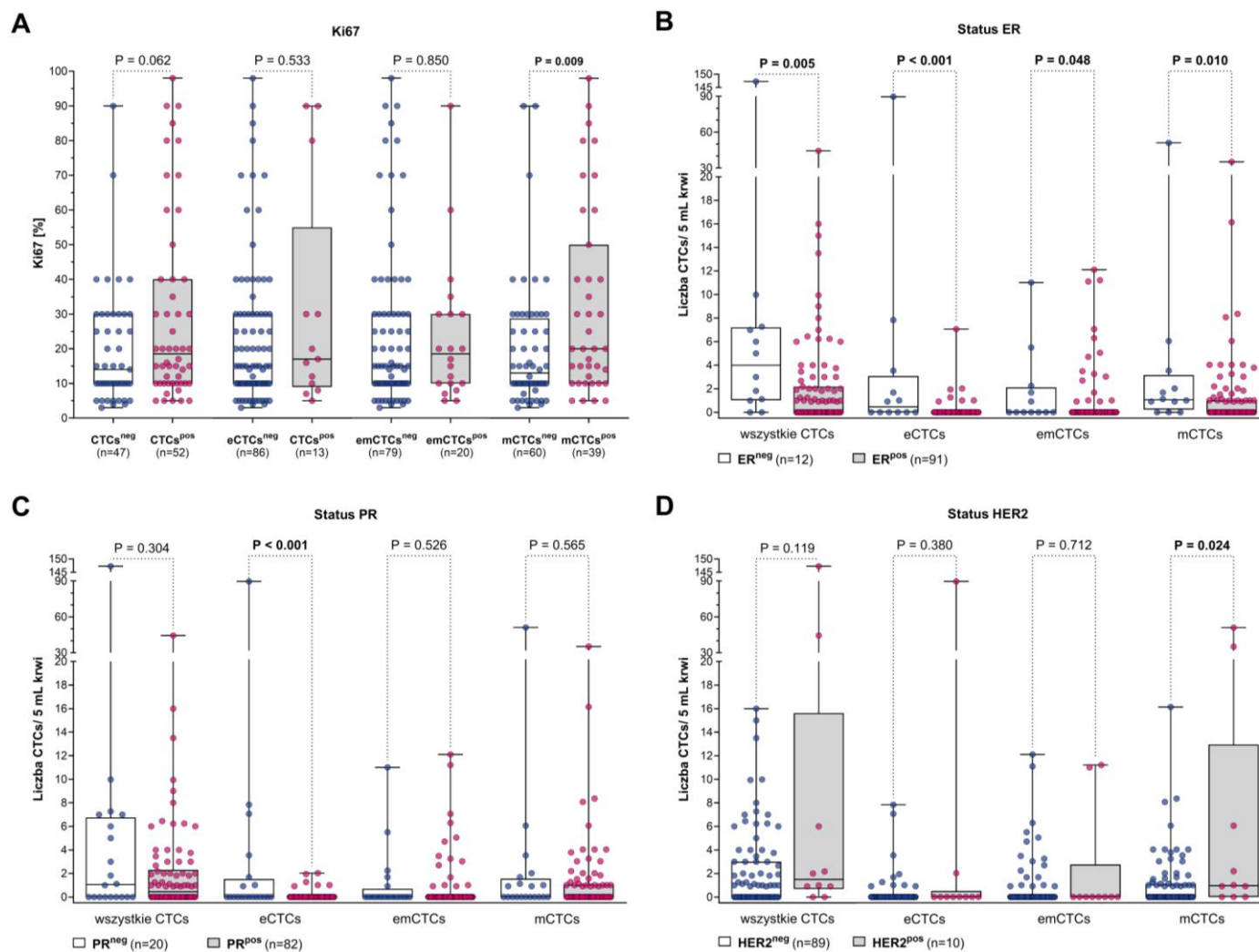
Jedynie całkowita liczba CTCs (wszystkie fenotypy) różniła się pomiędzy chorymi o różnym statusie cechy cT; chore z większymi (cT2-4) guzami miały więcej CTCs niż chore z mniejszymi (cT1) guzami (mediana 1,25 vs 0, $P=0.037$; **Ryc. 14A**). Jednakże, porównując wielkość guzów na podstawie ich średnicy, była ona większa u chorych CTCs-pozytywnych i eCTCs-pozytywnych w porównaniu do chorych o negatywnym statusie CTCs (mediana 15 vs 19 mm, $P=0,037$) i eCTCs (16 vs 25 mm, $P=0.0437$; **Ryc. 14B**). U chorych z zajęтыми węzłami chłonnymi w porównaniu do chorych, u których nie występowały przerzuty do węzłów chłonnych obserwowano więcej wszystkich CTCs (mediana 1,9 vs 0, $P=0,002$), eCTCs (mediana 0 vs 0, $P=0,002$) i emCTCs (mediana 0 vs 0, $P=0.024$) (**Ryc. 14C**). Konsekwentnie, chore, u których wykonano limfadenektomię częściej były CTCs-pozytywne (67% vs 42%, $P=0,02$; **Tabela 12**), co może świadczyć o konieczności interwencji chirurgicznej spowodowanej bardziej zaawansowanym rozsiewem komórek nowotworowych. Liczba wszystkich CTCs była także większa u chorych z mniej zróżnicowanymi (G3) guzami (mediana 0 vs 3, $P=0,006$) w porównaniu z chorymi z guzami o wyższym stopniu zróżnicowania (G1-G2), a w przypadku poszczególnych fenotypów CTCs występował podobny trend (**Ryc. 14D**). Obserwowano ponadto, że odsetek proliferujących (Ki67-pozytywnych) komórek nowotworowych w guzie pierwotnym był większy u chorych, u których wykryto mCTCs w porównaniu do chorych mCTCs-negatywnych (mediana 13% vs 20%, $P=0,009$ **Ryc. 15A**). Przyglądając się statusowi receptorów hormonów steroidowych, chore z ER-negatywnymi guzami miały więcej wszystkich CTCs niż chore ER-pozytywne (mediana 4 vs 0 CTCs, $P=0,005$; **Ryc. 15B**), a podobny kierunek zmian występował, gdy analizowano liczbę eCTCs (mediana 0,5 vs 0; $P<0,001$), emCTCs (mediana 0 vs 0; $P=0,048$) oraz mCTCs (mediana 1 vs 0; $P=0,01$). U chorych PR-negatywnych istotnie więcej było jedynie eCTCs (mediana 0 vs 0; $P<0.001$; **Ryc. 15C**), chore PR-negatywne były również częściej eCTCs-pozytywne (35% vs 7%, $P=0,003$; **Tabela 12**). U chorych HER2-pozytywnych obserwowano więcej mCTCs w porównaniu do chorych HER2-negatywnych (mediana 1 vs 0; $P=0.024$; **Ryc 15D**). Analizując zależność pomiędzy obecnością CTCs i statusem HER2, chore HER2-pozytywne częściej były mCTCs-pozytywne (38% vs 70%, $P=0,04$; **Tabela 12**). Ponadto, CTCs o różnych fenotypach EMT częściej współwystępowały u chorych z TNBC niż z lum A/B BC - 86% chorych z TNBC miało CTCs o co najmniej dwóch różnych fenotypach EMT, w porównaniu do chorych z lum A/B BC, gdzie tylko w 21% przypadków różne fenotypy EMT były wykrywane jednocześnie ($P=0,008$), co jest częściowo konsekwencją nadreprezentacji kilku fenotypów CTCs u chorych o negatywnym statusie ER (70% vs 23%; $P=0,033$) i PR (64% vs 22%; $P=0,046$; **Ryc. 16**).

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi



Rycina 14. Liczba CTCs w zależności od (A) cechy cT, (B) największego wymiaru guza, (C) cechy cN i (D) stopnia złośliwości histologicznej (G) guza u CTCs-negatywnych i CTCs-pozytywnych chorych na BC. Pozioma linia wskazuje medianę, ramka – 25-75% percentyl, a wąsy – zakres.

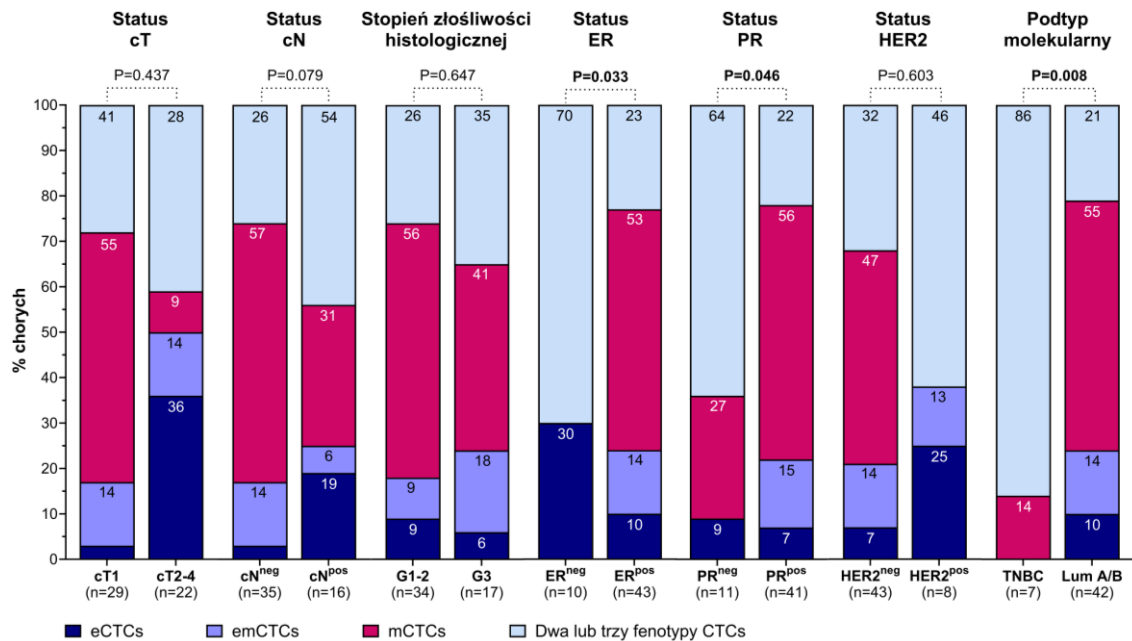
Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi



Rycina 15. (A) Procent komórek proliferujących (Ki67-pozytywnych) w guzie u CTCs-negatywnych i -pozytywnych chorych na BC oraz liczba CTCs w zależności od (B) statusu ER, (C) PR i (D) HER2 guzów. Pozioma linia wskazuje medianę, ramka – 25-75% percentyl, a wąsy – zakres.

Tabela 12. Korelacje pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi chorych na BC a obecnością CTCs o różnych fenotypach EMT analizowane testem χ^2 Pearsona lub testem Fishera (*).

Cecha	Status	n	Obecność							
			CTCs		eCTCs		emCTCs		mCTCs	
			-	+	-	+	-	+	-	+
cT (wielkość guza)	cT1	69	34	35	59	10	55	14	42	27
	cT2-cT3	34	16	18	31	3	27	7	21	13
	P		0.83		0.54*		0.97		0.93	
cN (obecność przerzutów do węzłów chłonnych)	cN ^{neg}	63	33	30	54	9	51	12	39	24
	cN ^{pos}	40	17	23	36	4	31	9	24	16
	P		0.33		0.52*		0.67		0.85	
Limfadenektomia	nie przeprowadzono	66	38	28	61	5	56	10	43	23
	przeprowadzono	33	11	22	27	6	24	9	17	16
	P		0.02		0.11		0.15		0.19	
G (stopień złośliwości histologicznej)	G1-2	77	43	34	71	6	65	12	50	27
	G3	24	7	17	19	5	16	8	12	12
	P		0.02		0.07*		0.08*		0.19	
Status ER	ER ^{neg}	12	2	10	6	6	7	5	3	9
	ER ^{pos}	91	48	43	84	7	75	16	60	31
	P		0.02*		0.0008		0.07		0.01*	
Status PR	PR ^{neg}	20	9	11	13	7	15	5	11	9
	PR ^{pos}	82	41	41	76	6	67	15	52	30
	P		0.69		0.003		0.53*		0.49	
Status HER2	HER2 ^{neg}	89	46	43	79	10	71	18	58	31
	HER2 ^{pos}	10	2	8	8	2	8	2	3	7
	P		0.09*		0.35*		1.00*		0.04*	



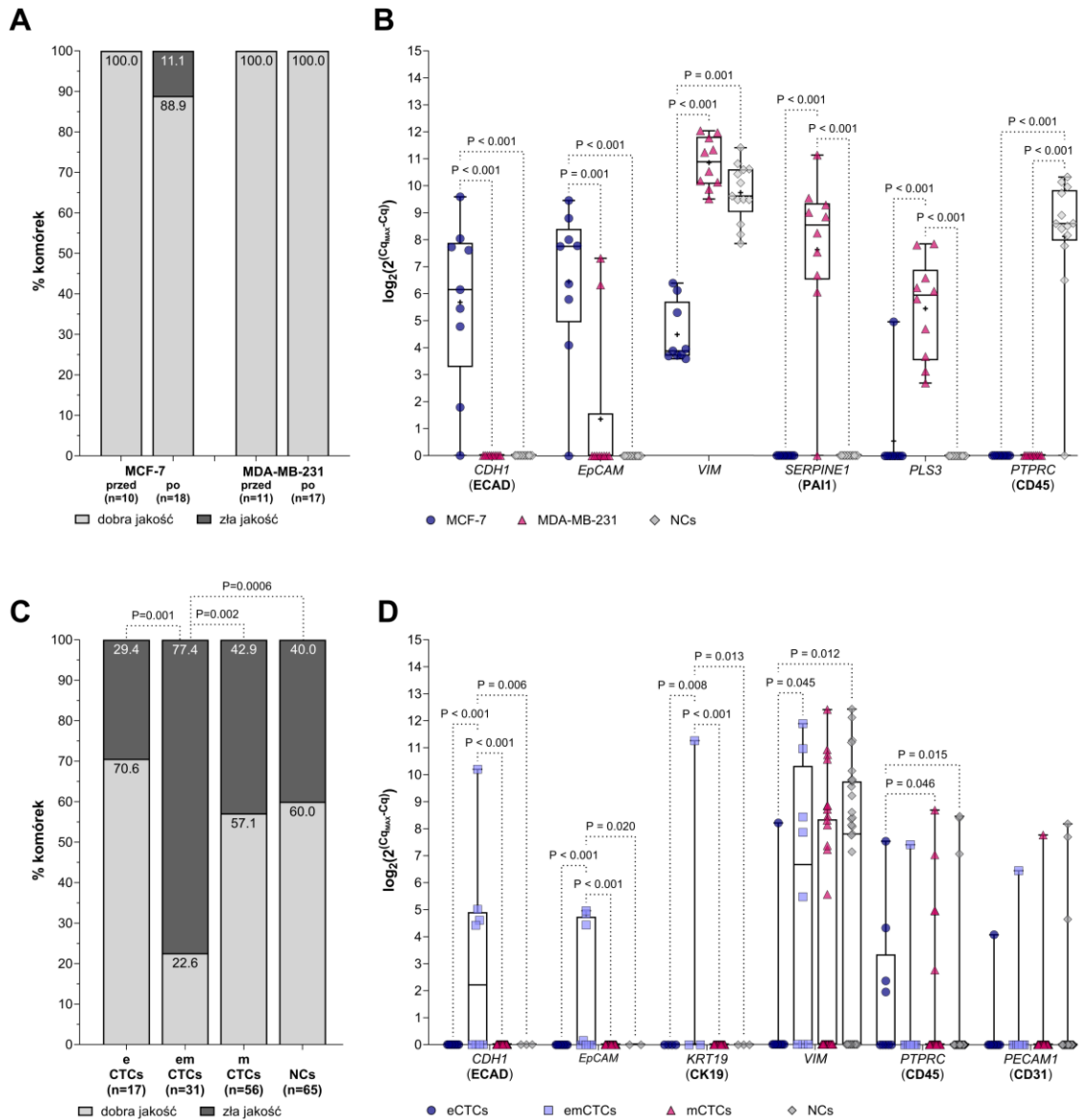
Rycina 16. Heterogenność fenotypowa CTCs w zależności od charakterystyki kliniczno-patologicznej chorych na BC.

5.7. Transkryptomyczne profilowanie pojedynczych krążących komórek nowotworowych

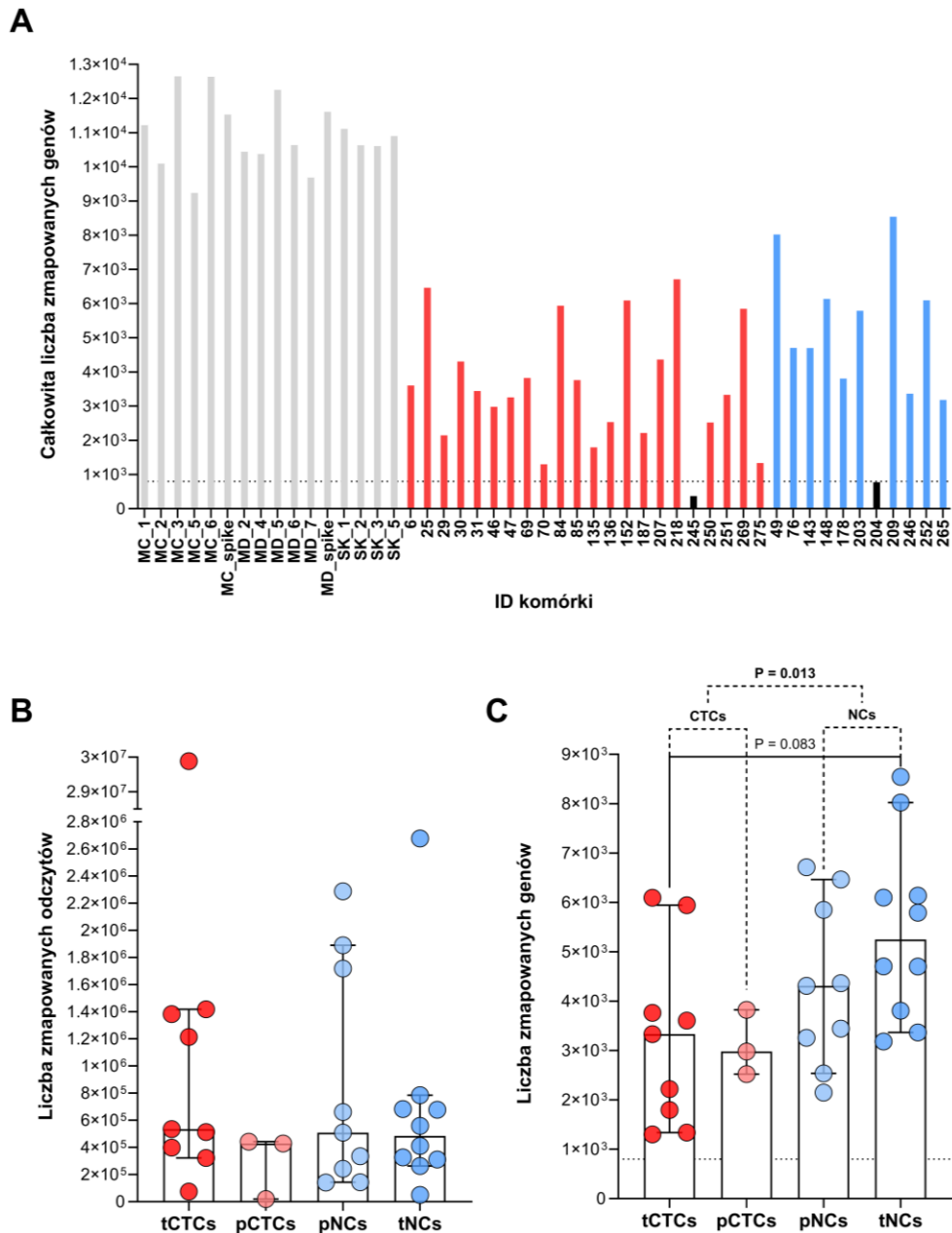
Transkryptomyczne profilowanie pojedynczych komórek z epitelialnych (MCF-7) i mezenchymalnych (MDA-MB-231) linii komórkowych BC pobranych przed i po procedurze izolacji CTCs pokazuje, że opracowana metoda nie wpływa na jakość transkryptomu pojedynczych komórek. Wszystkie komórki z linii MDA-MB-231 i 89% komórek z linii MCF-7 charakteryzowały się dobrą jakością transkryptomem, co definiowane było na podstawie ekspresji co najmniej dwóch z trzech transkryptów refGs w multipleksowym PCR (**Ryc. 17A**) [338]. Różnice w ekspresji 5 genów (oceniane metodą qPCR) kodujących markery EMT (*CDH1*, *EpCAM*, *VIM*, *PLS3*, *SERPINE1*) pozwoliły na identyfikację fenotypu EMT pojedynczych komórek z linii komórkowych BC, a także ich odróżnienie od komórek krwi na podstawie ekspresji genu *PTPRC*, kodującego CD45 (**Ryc. 17B**). Odsetek komórek o dobrej jakości transkryptomie (spełniającym kryteria opisane powyżej) pobranych od chorych na BC wyraźnie różnił się w porównaniu do jakości komórek z linii komórkowych BC; spośród 104 CTCs i 65 NCs wyizolowanych od 46 pacjentek, 51 CTCs (49%) i 39 NCs (60%) charakteryzowało się transkryptomem dobrej jakości (**Ryc. 17C**). Obserwuje tu się wyraźną dysproporcję w odsetku komórek dobrej jakości w porównaniu z układem modelowym (testem spike-in; **Ryc. 17A**), co może być spowodowane warunkami stresowymi, na jakie narażone są CTCs w krwiobiegu. O ile w przypadku komórek z linii komórkowych BC fenotypowanie na podstawie analizy ekspresji metodą qPCR było możliwe, to w przypadku CTCs z próbek klinicznych nie udało się ich jednoznacznie sklasyfikować według fenotypów EMT (**Ryc. 17D**). W CTCs nie obserwowano ekspresji markerów mezenchymalnych (*SERPINE1*, *PLS3*), które były użyte do potwierdzenia fenotypów linii komórkowych BC. Niemniej, obserwowano podobne różnice w poziomie ekspresji genów jak w przypadku CTCs-EBFs analizowanych w próbkach klinicznych; w emCTCs w porównaniu do eCTCs i mCTCs odnotowano istotnie wyższy poziom ekspresji markerów epitelialnych *CDH1* (mediana w emCTCs – 2,2 vs eCTCs/mCTCs – 0, $P < 0,001$ dla obu), *EpCAM* (mediana w emCTCs – 0,8 vs eCTCs/mCTCs – 0, $P < 0,001$ dla obu) i *KRT19* (mediana w emCTCs – 0 vs eCTCs/mCTCs – 0, $P = 0,008$ oraz $P = 0,013$; **Ryc. 17D**).

Analiza ekspresji genów metodą qPCR umożliwia detekcję jedynie wybranych regionów transkryptów uwarunkowanych sekwencją zaprojektowanych starterów, stąd też istnieje możliwość, że gen jest ekspymowany w danej komórce wyizolowanej od chorej na BC, ale konkretny wykrywany fragment transkryptu jest nieobecny (np. wskutek degradacji lub niewydajnej RT). Metoda RNA-Seq pozwala na szersze profilowanie transkryptomiczne – sekwencjonowane są różne fragmenty danego transkryptu. Zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 4.9. z materiału z pojedynczych komórek przygotowano biblioteki cDNA,

a 49 bibliotek z 22 CTCs (7 emCTCs, 15 mCTCs), 11 NCs oraz 16 z komórek kontrolnych z linii komórkowych BC – MCF-7, SK-BR-3 i MDA-MB-231 (w tym dwie pobrane z zawiesiny komórek po testach spike-in) o odpowiedniej dystrybucji wielkości fragmentów (średnio 361 pz) poddano sekwencjonowaniu. Do szczegółowych analiz statystycznych wykorzystano jedynie dobrej jakości dane z sekwencjonowania (minimum 800 zmapowanych genów w komórce [361]) – z analizy odrzucono jedną CTC (ID 245) i jedną NC (ID 204; Ryc. 18A).



Rycina 17. (A) Jakość transkryptomu pojedynczych komórek z linii komórkowych BC MCF-7 i MDA-MB-231 oceniana przed i po przeprowadzeniu procedury izolacji CTCs, oraz (C) pojedynczych CTCs o różnych fenotypach EMT (n=104) i NCS (n=65) od chorych na BC. (B) Pozioma ekspresji markerów epitelialnych (*CDH1*, *EpCAM*, *KRT19*) i mezenchymalnych (*VIM*, *SERPINE1*, *PLS3*) oraz markerów komórek hematopoetycznych (*PTPRC*) i endotelialnych (*PECAM1*) w komórkach MCF-7, MDA-MB-231 i NCs od zdrowych kontroli po procedurze izolacji CTCs oraz (D) w CTCs i NCs pobranych od chorych na BC. Pozioma linia wskazuje medianę, „+” – średnią, ramka – 25-75% percentyl, a wąsy – zakres. Jedynie istotne (P<0,05) różnice są pokazane.

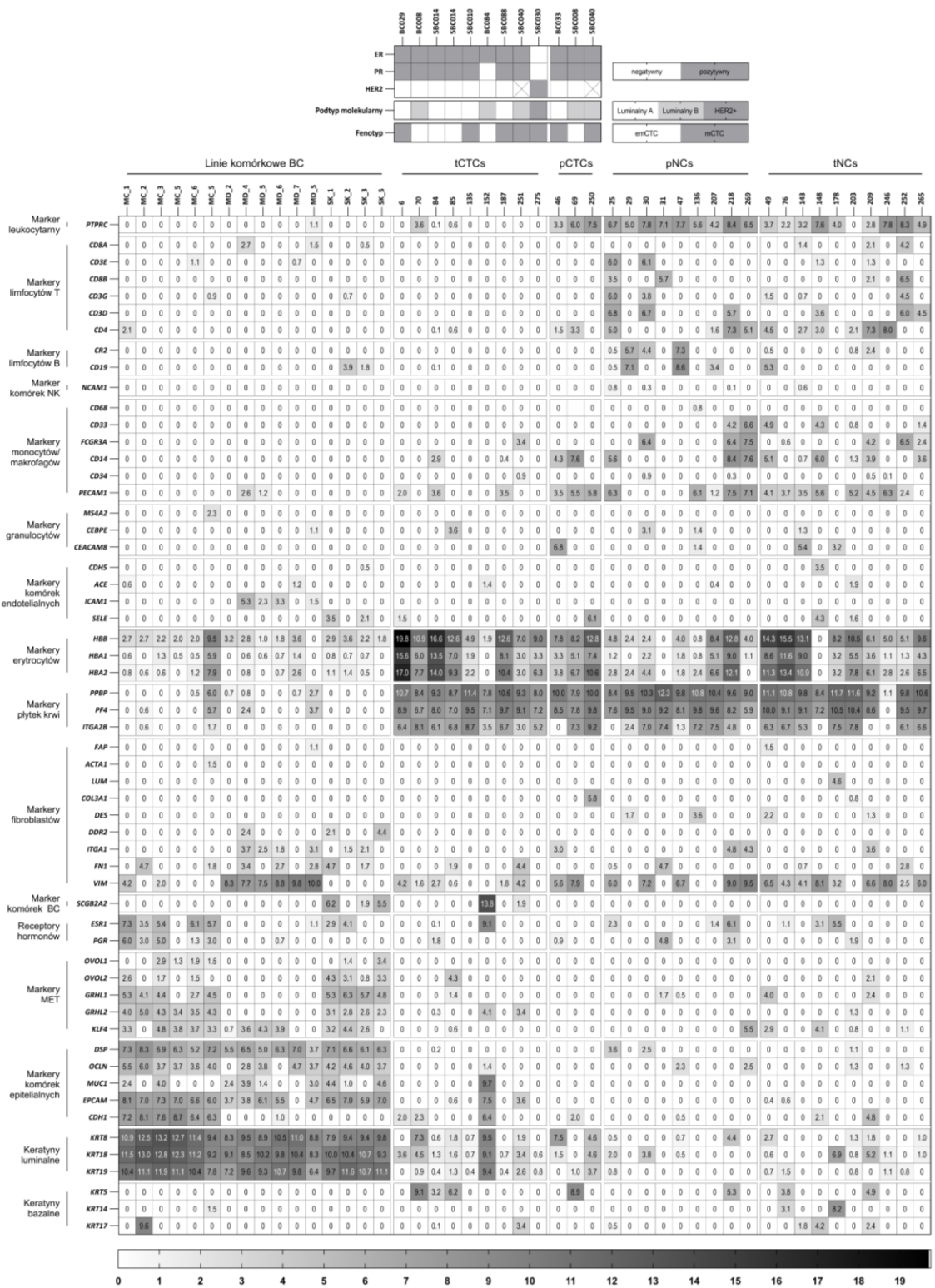


Rycina 18. (A) Liczba zmapowanych genów w pojedynczych komórkach z linii komórkowych BC (szary) i komórkach od chorych na BC – CTCs (czerwony) i NCs (niebieski). Komórki wyłączone z dalszych analiz zaznaczone są na czarno. MC – komórki z linii MCF-7, MC_spike – komórka z linii MCF-7 wyizolowana z pełnej krwi, MD – komórki z linii MDA MB-231, MD_spike – komórka z linii MDA-MB-231 wyizolowana z pełnej krwi, SK – komórki z linii SK-BR-3. (B) Liczba zmapowanych odczytów oraz (C) genów ulegających ekspresji w tCTCs (czerwony), pCTCs (jasny czerwony), pNCs (błękitny) i tNCs (niebieski) porównywana testem Kruskala-Wallis i Manna-Whitneya. Ramki symbolizują medianę, a wąsy 95% CI. Jedynie różnice $P < 0,01$ są zaznaczone na wykresach.

Profil ekspresji markerów BC i markerów komórek hematopoetycznych w komórkach dobrej jakości wskazuje, że niektóre CTCs mają ekspresję genów komórek układu odpornościowego (**Ryc. 19**). Poddaje to w wątpliwość ich nowotworowe pochodzenie, szczególnie w przypadku komórek, u których obserwuje się jednocześnie wiele różnych markerów komórek układu odpornościowego (np. komórka 25, 30). Z tego powodu, na podstawie ekspresji markerów oznaczanych na poziomie białka (EpCAM/ECAD/csVIM/MCAM barwione immunofluorescencyjnie przed mikromanipulacyjną izolacją pojedynczych komórek) oraz ekspresji genów (wyniki RNA-Seq) kodujących markery komórek układu odpornościowego i endotelialnych, markery epitelialne oraz keratyn, komórki pobrane od chorych podzielono na 4 grupy o profilach ekspresji progresywnie wskazujących na charakterystykę komórek układu immunologicznego (**Ryc. 19**):

- (i) prawdziwe CTCs (ang. *true* CTCs – tCTCs) – komórki pobrane na podstawie pozytywnego barwienia białkowych epitelialnych i/lub mezenchymalnych markerów oraz braku sygnału od CD45/CD31. Transkryptomycznie komórki nie wykazują ekspresji (poziom ekspresji genu <4) markerów komórek układu immunologicznego.
- (ii) potencjalne CTCs (ang. *potential* CTCs – pCTCs) – komórki pobrane na podstawie pozytywnego barwienia białkowych epitelialnych i/lub mezenchymalnych markerów oraz braku sygnału od CD45/CD31. Transkryptomycznie komórki wykazują ekspresję (≥ 4) markerów komórek układu immunologicznego i komórek endotelialnych oraz ekspresję (≥ 4) markerów epitelialnych i keratyn.
- (iii) potencjalne NCs (ang. *potential* NCs – pNCs) – komórki pobrane na podstawie pozytywnego barwienia białkowych epitelialnych i/lub mezenchymalnych markerów oraz braku sygnału od CD45/CD31. Transkryptomycznie komórki wykazują ekspresję (≥ 4) markerów komórek układu immunologicznego i komórek endotelialnych, przy braku ekspresji (<4) markerów epitelialnych i keratyn, albo wykazują ekspresję (≥ 4) markerów epitelialnych i keratyn przy jednoczesnej ekspresji (≥ 4) więcej niż 4 markerów komórek układu immunologicznego i endotelialnych.
- (iv) prawdziwe NCs (ang. *true* NCs – tNCs) - komórki pobrane na podstawie braku sygnału od epitelialnych i mezenchymalnych markerów na poziomie białka.

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach
epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi



Rycina 19. Profil ekspresji (mRNA) markerów komórek i płytek krwi, komórek endotelialnych, fibroblastów, komórek BC, receptorów hormonów, markerów MET, a także markerów epitelialnych i KRTs w pojedynczych komórkach z linii komórkowych BC oraz komórek od chorych na BC podzielonych na tCTCs, pCTCs, pNCs i tNCs.

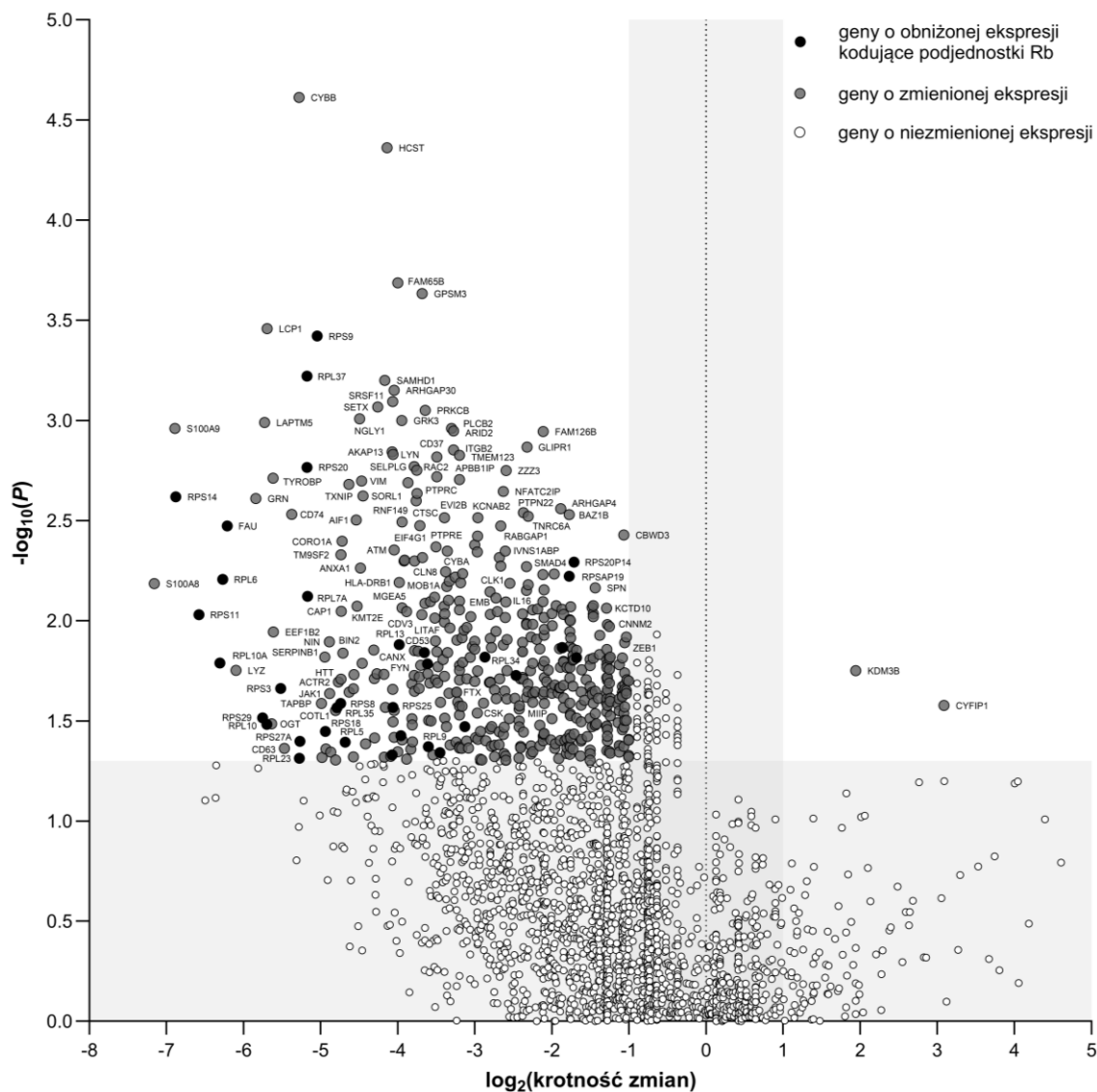
Pojedyncze komórki z linii komórkowych BC wykazywały silną ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za utrzymanie epitelialnej morfologii: luminalnych KRTs (*KRT8*, *KRT18*, *KRT19*), markerów epitelialnych - *DSP*, *OCN*, *MUC1*, *EpCAM* i *CDH1*) oraz markerów MET. tCTCs i pCTCs wykazywały niską ekspresję epitelialnych KRTs, ale niektóre z nich ekspresywały geny kodujące bazalne KRTs (*KRT5*, *KRT17*) oraz gen kodujący MGB1 – *SCGB2A2* (**Ryc. 19**).

Wiele komórek pobranych z krwi chorych na BC charakteryzowało się ekspresją genów kodujących markery RBCs i PLTs (**Ryc. 19**) – najliczniejszych elementów morfotycznych krwi. Dane literaturowe wskazują, że znajdujące się w krwi obwodowej egzosomy zawierające transkrypty RBCs i PLTs mogą być dostarczane do komórek [362-368]. Zakładając taki scenariusz i biorąc pod uwagę, że PLTs mogły zostać przypadkowo zaaspirowane podczas pobierania CTCs, z dalszych analiz wyszczególniających różnice transkryptomocne pomiędzy CTCs i NCs, wyłączono markery RBCs i PLTs (zidentyfikowane na podstawie paneli dostępnych na platformie online Human Protein Atlas [347]).

Podczas gdy liczba odczytów w RNA-Seq nie różniła się w CTCs i NCs (**Ryc. 18B**, liczba zmapowanych genów była istotnie niższa w CTCs niż w NCs ($P=0,0125$, mediana 3156 vs 4701; **Ryc. 18C**). Oznaczałoby to, że w CTC mniej genów ulega ekspresji niż w nienowotworowych NCs. Przypuszczenia te potwierdza analiza różnicowo ekspresowanych genów w tCTCs i tNCs, która wykazała, że 471 genów miało obniżoną ekspresję w tCTCs ($\log_2FC \leq -1$), a wśród nich dominowały geny kodujące białka małej (ang. *ribosomal protein S* - RPSs) i dużej (ang. *ribosomal protein L* - RPLs) podjednostki rybosomów. Jedynie dwa geny charakteryzowały się podwyższoną ekspresją ($\log_2FC > 1$) w tCTCs, kodujące białko cytoplazmatyczne 1 oddziałujące z FMR1 (ang. *cytoplasmic FMR1 interacting protein 1* – *CYFIP1*) oraz demetylazę lizyny 3B (ang. *lysine demethylase 3B* – *KDM3B*) (**Ryc. 20**; pełna lista genów ulegających różnicowej ekspresji została wyszczególniona w **Tabeli U1**).

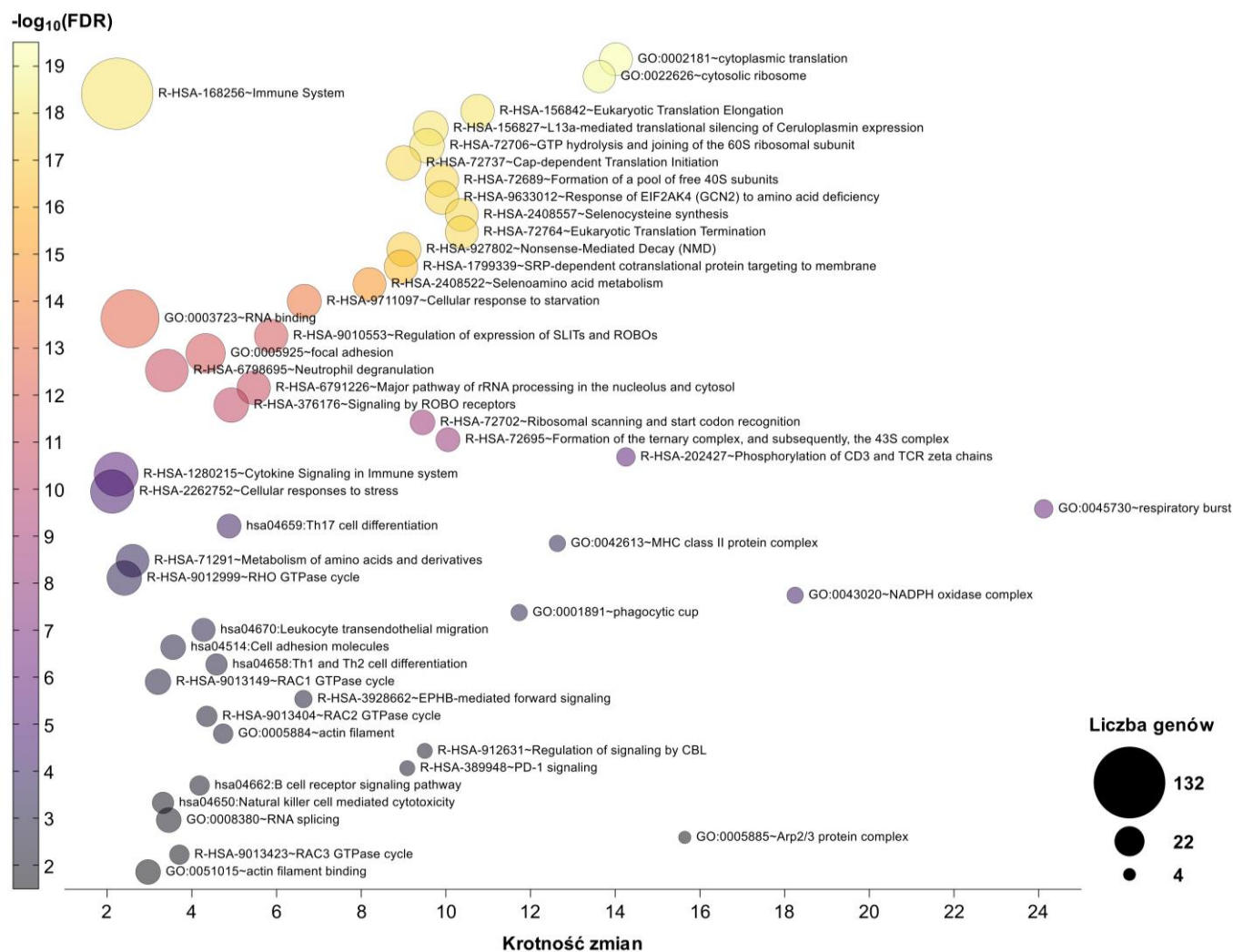
W celu określenia, w jakie procesy zaangażowane są geny o obniżonej ekspresji, przeprowadzono analizę ontologii genów; w której dominowały procesy związane z ekspresją genów na różnych poziomach: transkrypcji i dojrzewania mRNA) i translacji (**Ryc. 21**). Pozostałe procesy zahamowane w tCTC były charakterystyczne dla komórek układu immunologicznego, co potwierdza nieleukocytarny charakter pobranych tCTCs. Lista procesów zahamowanych w tCTCs została wyszczególniona w **Tabeli U2**.

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi



Rycina 20. Geny ulegające różnicowej ekspresji pomiędzy tTCs i tNCs. Geny o zmienionej ekspresji w tTCs zaznaczono na szaro, a geny o obniżonej ekspresji kodujące podjednostki rybosomów – na czarno. Na szarym tle znajdują się geny, których ekspresja nie była istotnie zmieniona ($-1 \leq \log_2(FC) \leq 1$ i/lub $\log_{10}(P) > 1,3$). Różnice w normalizowanej ekspresji pomiędzy grupami analizowano testem Manna-Whitneya.

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi



Rycina 21. Wybrane procesy (GO BP, GO MF, Reactome, KEGG), w które zaangażowane są geny o obniżonej ekspresji w tCTCs w porównaniu do tNCs. Rozmiar koła odpowiada ilości genów zaangażowanych w dany proces, a jego kolor – $\log_{10}(\text{FDR})$.

6. Dyskusja

Z uwagi na molekularną heterogenność CTCs oraz ich istotną rolę w kaskadzie metastatycznej, istnieje potrzeba doskonalenia metod izolacji i detekcji CTCs. Nie wszystkie obecnie stosowane protokoły umożliwiają wychwycenie CTCs o wszystkich fenotypach, zwłaszcza tych, które wskutek EMT utraciły epitelialność i zyskały mezenchymalne cechy [47, 58, 243, 248, 257-259, 277, 369-375].

Niedostosowanie strategii wykrywania heterogennych fenotypowo CTCs podkreśla fakt, że metoda CellSearch® – zaakceptowana przez FDA technika izolacji i detekcji CTCs u chorych na wybrane nowotwory epitelialne [271-274] nadal uznawana jest za złoty standard do oznaczania ilości CTCs. Czułość tej metody w wykrywaniu CTCs, które utraciły epitelialne cechy budzi obawy (47,5% vs 85% w porównaniu do metody wykorzystującej przeciwciała anti-csVIM) [258], gdyż wskutek aktywacji EMT w komórkach nowotworowych [257], ekspresja markerów epitelialnych, w tym EpCAM (marker, o który oparta jest izolacja w CellSearch®), ulega obniżeniu, co wykazano w przypadku wybranych linii komórkowych BC o agresywnym fenotypie [275, 276]. Oparcie selekcji na ekspresji dodatkowych markerów komórek mezenchymalnych i macierzystych zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia CTCs o różnych fenotypach [282, 352], do tej pory jednakże ekspresja mezenchymalnych markerów była często analizowana w CTCs izolowanych w oparciu o marker epitelialny. Taka strategia może być skuteczna, gdy izolowane CTCs zachowują cechy epitelialne, lecz nie jest odpowiednia, gdy celem jest izolacja CTCs, które są bardziej zaawansowane w EMT.

Dane literaturowe wskazują, że mCTCs (CTCs o czysto mezenchymalnym fenotypie) występują u 71,7% chorych z przerzutowym i 35,5% z operacyjnym BC [47], a w miarę postępu choroby u chorych nieodpowiadających na terapię niemal cała populacja CTCs może wykazywać cechy mezenchymalne [243]. Zastosowanie niewłaściwej techniki izolacji/ identyfikacji mCTCs zwiększa ryzyko uzyskania fałszywie-negatywnego wyniku detekcji [47, 243, 258], a utrata informacji na temat subpopulacji CTCs występujących u tak dużego odsetka chorych na BC skutkuje uzyskaniem niepełnego obrazu heterogenności CTCs. CTCs o różnych fenotypach EMT mogą dostarczyć cennych klinicznie informacji, dlatego odpowiednie zaprojektowanie protokołu izolacji i identyfikacji CTCs w próbkach klinicznych jest kluczowe dla ich kompleksowej charakteryzacji, a ukierunkowane na nie leczenie stanowi potencjalną strategię ograniczającą powstawanie przerzutów [376, 377]. Dodatkowo, procesy biologiczne stojące za agresywnością CTCs nadal są niedostatecznie poznane. Zastosowanie metody izolacji i detekcji CTCs operującej na żywych komórkach otwiera zatem drogę do ich analizy transkryptomicznej, a w konsekwencji ich bardziej szczegółowej biologicznej charakteryzacji.

Analiza retrospektywna

W retrospektywnej części badań opisanych w pracy doktorskiej przeprowadzono analizę ekspresji genów metodą qPCR w CTCs-EBFs wzbogaconych we wszystkie fenotypy EMT. Chociaż zastosowana metoda nie gwarantuje uzyskania całkowicie czystej frakcji CTCs, która może być zanieczyszczona komórkami krwi (szczególnie tymi o niskim poziomie/ braku ekspresji CD45), to zastosowanie odpowiedniego punktu odcięcia (powyżej poziomu tła obserwowanego w zdrowych kontrolach) pozwoliło na dokładniejszą klasyfikację CTCs-EBFs.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że jedna trzecia (6/19, 31,5%) CTC-pozytywnych próbek wykazywała jednoczesną ekspresję markerów epitelialnych i mezenchymalnych, a eCTC- i mCTCs-pozytywne chore stanowiły odpowiednio 37% i 31,5% badanej grupy. Równoczesna detekcja markerów epitelialnych i mezenchymalnych może wskazywać na obecność zarówno współwystępujących CTCs o fenotypie czysto epitelialnym i czysto mezenchymalnym, jak i fenotypie epitelialno-mezenchymalnym. Jednakże, ze względu na ograniczenia stosowanej metody, nie można było tego jednoznacznie potwierdzić. Co ważne, zarówno bifenotypowość CTCs [249, 378], jak i współwystępowanie w krążeniu CTCs o fenotypach epitelialnym i mezenchymalnym [379] związane są z większym ryzykiem występowania przerzutów. W przypadku CTCs o hybrydowym, epitelialno-mezenchymalnym fenotypie, niekorzystna prognoza może być związana z nabywaniem mezenchymalnych cech zwiększających potencjał do formowania przerzutów, takich jak ekspresja genów związanych z macierzystością, formowaniem klastrów CTCs, lub choćby częściową epitelialnością, która umożliwia szybszą kolonizację [378, 380]. Jednoczesna obecność eCTCs i mCTCs w krążeniu sprzyja kooperatywnej kolonizacji; mCTCs są bardziej inwazyjne i mają większy potencjał do oddzielenia się od guza, pokonania bariery naczyń krwionośnych, a także przetrwania w krążeniu, zaś eCTCs charakteryzują się większym potencjałem kolonizacyjnym [379]. W tym kontekście, analiza CTCs na poziomie pojedynczej komórki oferowałaby możliwość precyzyjnego określenia ich fenotypu i heterogenności.

Według danych literaturowych chore na BC z przerzutami odległymi, u których występują mCTCs, mają gorszą prognozę [47, 243, 249, 258], jednak rola CTCs o mezenchymalnym fenotypie nie została jeszcze dokładnie zbadana w kontekście wczesnych etapów kaskady metastatycznej. W grupie chorych CTCs-pozytywnych, 61% wykazywało ekspresję markerów mezenchymalnych CTCs, podczas gdy u 31,5% chorych występowały tylko mCTCs. Bazując na ekspresji *VIM* i *TWIST1* Zhang i in. (2017) wykazali obecność emCTCs i/lub mCTCs u 71,8%, a tylko mCTCs u 1% nieprzerzutowych CTCs-pozytywnych chorych na BC, co stanowiło mniejszy odsetek niż w przypadku chorych przerzutowych (odpowiednio 87,6% i 4,1%) [47].

Ponadto, obecność emCTCs i/lub mCTCs okazała się być wskaźnikiem obecności odległych przerzutów, a obecność nawet jednej mCTCs w 5 mL próbkach krwi obwodowej od chorych na BC była związana z progresją choroby [47]. W pracy Ou i in. (2018) zaobserwowano analogiczną zależność między występowaniem CTCs o różnych fenotypach a gorszą prognozą; chorzy na raka wątroby, u których wykryto mCTCs mieli krótszy DFS niż ci, u których wykryto eCTCs i emCTCs [381]. Bardziej agresywny przebieg choroby w przypadku detekcji mCTCs potwierdzają też wyniki opisane w pracy doktorskiej – obecność mCTCs wykrywanych przy użyciu wykorzystanego przez mnie szerszego panelu markerów (*ERBB2*, *SCGB2A2*, *VIM*, *CDH2*, *PLS3*) była związana z 7-krotnie wyższym ryzykiem zgonu. W CTCs-EBF o hybrydowym, epitelialno-mezenchymalnym fenotypie zaobserwowano podwyższoną ekspresję *PLS3*, co wskazuje, że podobnie jak w przypadku raka jelita grubego [382], *PLS3* może być skutecznym markerem CTCs przechodzących EMT, charakteryzującym się jednocześnie niską ekspresją w komórkach krwi od zdrowych kontroli.

Analiza metod izolacji krążących komórek nowotworowych

Na podstawie danych literaturowych opisujących wyniki testów spike-in wykazano, że większość metod zaprojektowanych w celu wykrycia CTCs o różnych fenotypach EMT lepiej niż CellSearch® izolują mCTCs, podczas gdy tylko niektóre z nich wykazują gorszy stopień odzysku eCTCs w porównaniu do CellSearch®. Jednocześnie, żadna z metod nie umożliwiała uzyskania istotnie lepszego odzysku eCTCs niż CellSearch®, uzasadniając postrzeganie tej metody jako złotego standardu ich detekcji.

Porównując dane z testów spike-in oraz próbek od chorych na BC, wydaje się, że izolację mCTCs umożliwiają wybrane metody fizyczne, negatywna selekcja i metody bazujące na szerokim panelu markerów (np. OncoCEE™). Jednakże, metody oparte na właściwościach fizycznych nie były dotychczas rutynowo stosowane do izolacji CTCs z próbek klinicznych, co uniemożliwiło sprawdzenie ich użyteczności w analizach próbek od chorych. Certyfikowanie przez FDA w 2022 roku mikrofluidowego systemu Parsortix® PC1 jako urządzenia do wzbogacania w CTCs próbek krwi od chorych na BC z przerzutami odległymi otwiera drogę do izolacji szerokiego spektrum fenotypów CTCs w próbkach klinicznych. Parsortix® P1 pozwala na izolację komórek BC o każdym fenotypie EMT [383], a jego skuteczność w analizie próbek klinicznych została potwierdzona [384], jednak użyteczność tego systemu do charakterystyki różnych fenotypów CTCs będzie ściśle zależała od metody detekcji.

Porównywanie metod izolacji CTCs o różnych fenotypach EMT jedynie na podstawie danych literaturowych niesie ze sobą ograniczenia wynikające z faktu, że zostały one pozyskane na podstawie eksperymentów przeprowadzonych w różnych ośrodkach, z użyciem różnych

objętości krwi, liczby dodawanych komórek oraz technik detekcji. Detekcja komórek z linii komórkowych na podstawie barwnika użytego do wyznakowania komórek przed procedurą izolacji albo optymalnego markera może skutkować uzyskaniem wysokiego stopnia odzysku, ale niekoniecznie przekłada się na możliwość zaobserwowania heterogenności CTCs u chorych. Przydatność poszczególnych metod izolacji CTCs może być ograniczona w analizie próbek klinicznych ze względu na pominięcie krytycznej roli odpowiedniego markera do detekcji CTCs.

Na chwilę obecną ograniczona ilość danych literaturowych uniemożliwia jednoznaczne określenie optymalnego markera do detekcji mCTCs, co stanowi uzasadnienie kompleksowej charakteryzacji CTCs z próbek klinicznych na poziomie pojedynczej komórki, co przeprowadzono w analizie prospektywnej opisywanej w pracy doktorskiej. Definiowanie mCTCs nie powinno opierać się na ekspresji markerów plejotropowych, jak EMT-TFs, które odpowiadają za regulację różnych programów molekularnych [385]. W CTCs obserwuje się heterogenną ekspresję markerów mezenchymalnych i EMT, dlatego zastosowanie wielu markerów może zwiększyć czułości detekcji. Musi to jednak być zrównoważone specyficznością markera oraz markerów wykluczających, gdyż poszczególne markery mezenchymalne/EMT (np. *VIM*, EMT-TFs) mogą ulegać ekspresji w komórkach występujących we krwi [248, 257, 259, 369, 375].

Analiza prospektywna

Bazując na wynikach analizy danych literaturowych, metodę izolacji CTCs opracowaną w ramach pracy doktorskiej oparto o negatywną selekcję, która umożliwia izolację CTCs niezależnie od statusu EMT. Wzbogacenie w CTCs krwi obwodowej od chorych na BC metodą wirowania w gradiencie gęstości oraz negatywnej selekcji CD45-pozytywnych komórek krwi pozwoliło na uzyskanie optymalnej czystości frakcji komórkowej do manualnej detekcji potencjalnych CTCs. Biorąc pod uwagę heterogenność fenotypową EMT różnych subpopulacji CTCs, ich detekcję oparto o panel markerów epitelialnych – EpCAM i ECAD, oraz mezenchymalnych – csVIM i MCAM. Wybrane markery mezenchymalne są ekspresjonowane w liniach komórkowych BC o mezenchymalnym fenotypie, charakteryzują guzy BC o niekorzystnych cechach kliniczno-patologicznych i są związane z krótszym OS [196, 258, 265, 386-388]. Występują jednak również w innych komórkach znajdujących się w krwiobiegu [248, 389], co uzasadnia dodatkowe zastosowanie markerów wykluczających hematopoetyczne (CD45) i endotelialne (CD31) pochodzenie potencjalnych CTCs. Strategia przyjęta w opracowanym protokole pozwoliła na określenie fenotypu pojedynczych komórek: epitelialnego, epitelialno-mezenchymalnego i mezenchymalnego, oraz ich mikromanipulacyjną izolację w celu dalszej, bardziej szczegółowej charakterystyki transkryptomicznej. Opracowana

metoda nie izolowała także preferencyjnie komórek o danym fenotypie EMT; w testach spike-in z równą wydajnością izolowano komórki BC o fenotypach epitelialnym i mezenchymalnym, jednocześnie uzyskując wyższy RR tych ostatnich (66,6%), w porównaniu do CellSearch® (23,7% [341]).

U 48% (50/104) operacyjnych chorych na BC analizowanych prospektywnie występowały emCTCs i/lub mCTCs, zaś u 26% (27/104) jedynie mCTCs. Podobnie jak w przypadku chorych analizowanych retrospektywnie, odsetek mCTCs-pozytywnych chorych różnił się od wartości literaturowych, wykazując jeszcze większą dysproporcję (mCTCs – 5%) [341]. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że jeden z markerów mezenchymalnych użytych przez badaczy do detekcji mCTCs – *TWIST1*, podobnie jak pozostałe EMT-TFs, jest ekspresyjowany na niskim poziomie w komórkach nowotworowych, a liczba jego transkryptów w komórce jest ściśle regulowana przez ścieżki transdukcji sygnału aktywujące i hamujące EMT. Dodatkowo, analiza danych literaturowych wskazuje, że EM-TFs nie są markerami umożliwiającymi czułą detekcję mCTCs u przerzutowych chorych na BC [341].

Przyglądając się zależnościom pomiędzy liczbą CTCs a cechami kliniczno-patologicznymi chorych na BC, można zauważyć, że więcej istotnych statystycznie różnic obserwowano, gdy rozpatrywano całkowitą liczbę CTCs (o wszystkich fenotypach), co sugeruje, że detekcja CTCs w całym spektrum fenotypów EMT może przekładać się na ich znaczenie kliniczne. Guzy chorych mCTCs-pozytywnych częściej były HER2-dodatnie oraz miały wysoki potencjał proliferacyjny. Chore na TNBC częściej wykazywały wysoką heterogenność fenotypów CTCs w porównaniu do chorych lum A/B (86% vs 21% chorych z więcej niż jednym fenotypem CTCs). Ze względu na fakt, że u chorych z TNBC częściej obserwuje się gorszą charakterystykę kliniczno-patologiczną oraz złe rokowanie [36], obecność CTCs o różnych fenotypach EMT u jednej chorej może świadczyć o większej plastyczności BC o tym podtypie molekularnym i być związana z jego zwiększoną agresywnością

Przechodząc dalej do charakterystyki molekularnej CTCs, zaobserwowano, że opracowana metoda izolacji i detekcji CTCs nie wpływała na jakość transkryptomu analizowanych komórek w testach spike-in, jednak odsetek dobrej jakości komórek pobranych od chorych na BC był wyraźnie niższy niż w przypadku układu modelowego (linie komórkowe). Warto podkreślić, że linie komórkowe mają ustabilizowany fenotyp i są hodowane w optymalnych warunkach, podczas gdy CTCs, dla których układ krwionośny nie jest naturalnym środowiskiem, są narażone na szereg czynników stresowych, takich jak uszkodzenia mechaniczne, stres oksydacyjny, kontrola ze strony układu immunologicznego i brak otrzymywanych fizjologicznych sygnałów [390], co może prowadzić do zahamowania ekspresji genów

i/lub degradacji mRNA, które nawet w warunkach homeostazy jest nietrwałe. Ogranicza to również możliwość fenotypowania CTCs za pomocą niskoprzepustowych metod (np. qPCR), co skłania do stosowania wysokoprzepustowych metod takich jak RNA-Seq wykorzystany do przedstawionej w pracy doktorskiej biologicznej charakterystyki pojedynczych CTCs.

Wykorzystując opracowaną metodę izolacji i detekcji pojedynczych komórek z krwi obwodowej pobrano 33 komórki (CTCs i NCs) od chorych na BC, które poddano sekwencjonowaniu transkryptomu. Zaobserwowano, że część komórek, które na poziomie białka miały ekspresję markerów epitelialnych, na poziomie RNA wykazywały ekspresję transkryptów komórek układu odpornościowego. Aby wykluczyć komórki fałszywie zidentyfikowane jako CTCs, wprowadzono ich klasyfikację opartą o profil ekspresji progresywnie wskazujący na charakterystykę komórek układu immunologicznego. Jedynie komórki pobrane na podstawie pozytywnego barwienia na obecność epitelialnych i/lub mezenchymalnych markerów oraz braku sygnału od CD45/CD31, oraz transkryptomycznie wykazujące niską ekspresję markerów komórek układu immunologicznego lub jej brak, były uwzględnione w analizach funkcji biologicznych.

Przyglądając się parametrom danych uzyskanych w wyniku sekwencjonowania, liczba odczytów nie różni się pomiędzy podgrupami pobranych komórek, ale w CTCs zostało zmapowanych mniej genów niż w NCs. Mniejszą liczbę genów ulegających ekspresji w tCTCs potwierdza obserwacja, że w porównaniu do tNCs, 471 genów miało obniżoną ekspresję. Wśród tych genów dominowały geny kodujące podjednostki rybosomów oraz geny krytyczne dla procesu translacji. Zmniejszona ekspresja RPL15 w CTCs została opisana jako główny czynnik przyczyniający się do zahamowania translacji i zwiększenia agresywności eCTCs u chorych na BC [332]. Jednocześnie, gen o najbardziej podwyższonej ekspresji w tCTCs – *CYFIP1*, koduje białko pełniące rolę inhibitora translacji poprzez wiązanie z czapeczką mRNA [391]. Dane literaturowe wskazują na potencjał inhibitorów transkrypcji i translacji w leczeniu BC, zarówno stosowanych samodzielnie jak i w terapiach kombinowanych [392-394]. Wyniki badań przedklinicznych i klinicznych nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi, czy testowane terapie mogą skutecznie hamować wzrost nowotworu nie wywołując jednocześnie skutków ubocznych dyskwalifikujących ich zastosowanie w praktyce klinicznej [392, 393].

Drugi z genów o podwyższonej ekspresji w tCTCs, *KDM3B*, koduje demetylazę reszt lizynowych ogonów histonów, która poprzez usuwanie grup metylowych może wpływać na regulację dostępności chromatyny [395]. *KDM3B* odgrywa istotną rolę w komórkach nowotworowych poprzez swoje działanie regulatorowe na poziomie transkrypcji genów kluczowych dla wielu procesów związanych z nowotworzeniem. Nadekspresję *KDM3B*

obserwowano w nowotworach epitelialnych [396-400], co związane było z niekorzystną charakterystyką kliniczno-patologiczną i gorszym rokowaniem [398, 400].

W raku jelita grubego KDM3B pełni rolę regulatora ścieżki sygnalizacyjnej Wnt/ β -CAT poprzez bezpośrednie wiązanie z regionem promotorowym genów kodujących β -kateninę oraz zaangażowanych w ścieżkę Wnt *AXIN2* (ang. *axis inhibition protein 2*) i *DKK1* (ang. *Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1*) [401]. W liniach komórkowych BC KDM3B aktywuje ścieżkę Wnt/ β -CAT poprzez hamowanie ekspresji *LMO2* (ang. *LIM domain only 2*) [399]. Ekspresja KDM3B jest również istotna dla kształtowania agresywnego fenotypu komórek nowotworowych w raku prostaty opornym na kastrację [402]. Ponadto, KDM3B wpływa na zwiększenie odsetka agresywnej populacji ALDH1-pozytywnych komórek w liniach komórkowych raka jelita, a także promuje oporność tych komórek na apoptozę indukowaną cisplatyną i irinotekaniem [401].

Aby komórki nowotworowe mogły przerzutować, muszą pokonać barierę naczyń krwionośnych i dostać się do krwiobiegu, gdzie są narażone na czynniki wywołujące stres komórkowy, negatywnie wpływające na potencjał metastatyczny CTCs [390]. Dane literaturowe wskazują na rolę KDM3B w hamowaniu ferroptozy – regulowanej ścieżki śmierci komórkowej charakteryzującej się zależną od żelaza akumulacją wodoronadtlenków lipidów [403]. Nadekspresja *KDM3B* w komórkach nowotworowych prowadzi do zwiększenia ekspresji genu *SLC7A11* (ang. *solute carrier family 7 member 11*), kodującego antyporter cystyny i glutaminianu (substratów glutationu) oraz *GPX4*, kodującego peroksydazę glutationową (ang. *glutathione peroxidase 4*), których aktywność ogranicza negatywne skutki działania ROS [404].

KDM3B pełni istotną rolę w patogenezie nowotworów poprzez regulację szeregu procesów biologicznych związanych z inwazyjnością, przerzutowaniem i opornością na leczenie. Jego działanie czyni go potencjalnym celem terapeutycznym i biomarkerem prognostycznym. Inhibitory KDM3B są obecnie intensywnie badane pod kątem ich potencjalnego zastosowania w leczeniu nowotworów, w tym BC [405-407]. Warto jednak zauważyć, że inhibitory KDM3B są wciąż w fazie badań przedklinicznych, a ich skuteczność i bezpieczeństwo muszą być jeszcze dokładnie zbadane przed wprowadzeniem ich do praktyki leczniczej.

7. Podsumowanie i wnioski

W pracy doktorskiej zaadresowano zagadnienia dotyczące klinicznego i biologicznego znaczenia CTCs o różnych fenotypach EMT u chorych na BC oraz ograniczeń metod izolacji i detekcji CTCs wynikających z ich heterogenności i małej liczby w krwi obwodowej na wczesnych etapach kaskady metastatycznej, dzięki czemu:

- (i) zidentyfikowano CTCs o fenotypach epitelialnym, epitelialno-mezenchymalnym i mezenchymalnym w CTCs-EBF od retrospektywnie analizowanych chorych na operacyjnego BC, oceniono ich cechy biologiczne (inwazyjność, macierzystość, zdolność do formowania klastrow) oraz wartość rokowniczą.

Ekspresja genów odpowiedzialnych za cechy promujące rozsiew (*CXCR4*, *PLAUR*, *CD44*, *NANOG*, *POU5F1*) zwiększała się wraz mezenchymalnymi cechami CTCs. Obecność emCTCs i mCTCs wiązała się z niekorzystną charakterystyką kliniczno-patologiczną – przerzutami do węzłów chłonnych oraz większym rozmiarem guza, zaś obecność mCTCs była niezależnym czynnikiem 7-krotnie wyższego ryzyka zgonu.

- (ii) w oparciu o dane literaturowe wytypowano metodę izolacji pojedynczych CTCs w całym spektrum fenotypów EMT z krwi chorych na BC.

Wybór metody opartej o fizyczne właściwości CTCs czy negatywną selekcję, a nie o ekspresję wąskiego spektrum markerów epitelialnych, stwarza większe prawdopodobieństwo izolacji i charakterystyki CTCs o różnych fenotypach EMT i różnym potencjalne metastatycznym.

- (iii) opracowano protokół izolacji i detekcji pojedynczych CTCs o fenotypach epitelialnym, epitelialno-mezenchymalnym i mezenchymalnym, umożliwiającą ich charakterystykę transkryptomiczną na poziomie pojedynczej komórki.

Opisany protokół izolacji i detekcji CTCs charakteryzuje się dobrymi parametrami technicznymi w układzie modelowym – w testach spike-in umożliwiał wykrycie 58,4% epitelialnych komórek MCF-7 oraz 66,6% mezenchymalnych komórek MDA-MB-231, które charakteryzowały się dobrą jakością transkryptomem. Dodatkowo, za pomocą opracowanego panelu markerów jest możliwe rozróżnienie ich fenotypów w qPCR.

- (iv) u prospektywnie analizowanych operacyjnych chorych na BC oznaczono liczbę CTCs, ich fenotypy EMT i stopień heterogenności oraz skorelowano te parametry z danymi kliniczno-patologicznymi chorych. Na podstawie analizy transkryptomicznej pojedynczych CTCs określono ich znaczenie biologiczne

oraz zidentyfikowano zmienione w nich procesy, które mogą być istotne dla przeżycia CTCs.

Wyniki badania prospektywnego również wskazują na zależność pomiędzy obecnością i liczbą CTCs o różnych fenotypach, a bardziej agresywnymi cechami nowotworu, przy czym więcej eCTCs obserwowano u chorych z zajęтыми węzłami chłonnymi oraz z guzami o negatywnym statusie receptorów hormonów steroidowych, podczas gdy liczba mCTCs była większa u chorych z guzami HER2-dodatnimi oraz guzami o większym potencjale proliferacyjnym. Co więcej, największą heterogenność fenotypów EMT CTCs obserwowano u chorych z TNBC. Świadczy to o istnieniu pewnej tendencji do rozsiewu określonych fenotypów EMT CTCs w zależności od charakterystyki molekularnej nowotworu.

Niemniej, na podstawie analizy danych transkryptomicznych określono populację komórek fałszywie zidentyfikowanych jako CTCs na podstawie barwienia immunofluorescyjnego. Oznacza to, że obecność i liczba CTCs, które korelowano z danymi kliniczno-patologicznymi mogły zostać określone nieprawidłowo. Pomimo tego, istnieje istotna zależność pomiędzy obecnością i liczbą CTCs o różnych fenotypach EMT a charakterystyką kliniczno-patologiczną chorych na BC. Wykluczenie fałszywie-pozytywnych wyników mogłoby potencjalnie zwiększyć siłę tych korelacji, ale jest to niemożliwe w przypadku detekcji CTCs na poziomie białka.

Analiza transkryptomiczna pojedynczych komórek pobranych od chorych na BC wykazała, że w porównaniu do komórek krwi mniej genów jest ekspresowanych w CTCs, zaś geny o obniżonej ekspresji (kodujące podjednostki rybosomów) w CTCs są zaangażowane w proces translacji. W tCTCs obserwowano również podwyższoną ekspresję genu *CYFIP1*, kodującego inhibitor translacji. Czynniki stresowe, które oddziałują na CTCs obecne w krążeniu mogą wpływać na ich żywotność, ale także na różne procesy biologiczne, w tym te związane z ekspresją genów. Można przypuszczać, że zahamowanie procesów molekularnych związanych z translacją stanowi pro-przeżyciową strategię umożliwiającą przetrwanie CTCs w niekorzystnych warunkach.

8. Tabele uzupełniające

Tabela U1. Lista genów ulegających różnicowej ekspresji w tCTCs.

ENSEMBL ID	ENTREZ ID	Symbol genu	Nazwa genu	log ₂ (FC)	P
ENSG00000164587.11	6208	<i>RPS14</i>	ribosomal protein S14	-6,91	0,0026
ENSG00000143546.9	6279	<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8	-6,83	0,0145
ENSG00000163220.10	6280	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9	-6,71	0,0032
ENSG00000198034.10	6191	<i>RPS4X</i>	ribosomal protein S4 X-linked	-6,47	0,020
ENSG00000142534.6	6205	<i>RPS11</i>	ribosomal protein S11	-6,47	0,0134
ENSG00000089009.15	6128	<i>RPL6</i>	ribosomal protein L6	-6,11	0,0088
ENSG00000149806.10	2197	<i>FAU</i>	FAU ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion	-5,98	0,0040
ENSG00000011600.11	7305	<i>TYROBP</i>	transmembrane immune signaling adaptor TYROBP	-5,98	0,0004
ENSG00000147162.13	8473	<i>OGT</i>	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	-5,97	0,0127
ENSG00000110700.6	6207	<i>RPS13</i>	ribosomal protein S13	-5,92	0,0215
ENSG00000019582.14	972	<i>CD74</i>	CD74 molecule	-5,80	0,0030
ENSG00000213741.9	6235	<i>RPS29</i>	ribosomal protein S29	-5,77	0,010
ENSG00000147403.16	6134	<i>RPL10</i>	ribosomal protein L10	-5,72	0,0428
ENSG00000162511.7	7805	<i>LAPTM5</i>	lysosomal protein transmembrane 5	-5,70	0,0027
ENSG00000136167.13	3936	<i>LCP1</i>	lymphocyte cytosolic protein 1	-5,61	0,0011
ENSG00000148303.16	6130	<i>RPL7A</i>	ribosomal protein L7a	-5,53	0,0112
ENSG00000265972.5	10628	<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein	-5,51	0,001
ENSG00000204287.13	3122	<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	-5,50	0,003
ENSG00000143947.13	6233	<i>RPS27A</i>	ribosomal protein S27a	-5,47	0,0128
ENSG00000171863.12	6201	<i>RPS7</i>	ribosomal protein S7	-5,34	0,046
ENSG00000125691.12	9349	<i>RPL23</i>	ribosomal protein L23	-5,29	0,0246
ENSG00000162434.11	3716	<i>JAK1</i>	Janus kinase 1	-5,19	0,0107
ENSG00000030582.17	2896	<i>GRN</i>	granulin precursor	-5,10	0,0057
ENSG00000145592.13	6167	<i>RPL37</i>	ribosomal protein L37	-5,10	0,0008

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG0000021355.12	1992	<i>SERPINB1</i>	serpin family B member 1	-5,09	0,0059
ENSG00000122406.12	6125	<i>RPL5</i>	ribosomal protein L5	-5,09	0,0126
ENSG00000198755.10	4736	<i>RPL10A</i>	ribosomal protein L10a	-5,07	0,030
ENSG00000132670.20	5786	<i>PTPRA</i>	protein tyrosine phosphatase receptor type A	-5,02	0,0240
ENSG00000135046.13	301	<i>ANXA1</i>	annexin A1	-4,99	0,0045
ENSG00000170776.21	11214	<i>AKAP13</i>	A-kinase anchoring protein 13	-4,99	0,000
ENSG00000008988.9	6224	<i>RPS20</i>	ribosomal protein S20	-4,98	0,0035
ENSG00000165168.7	1536	<i>CYBB</i>	cytochrome b-245 beta chain	-4,98	0,0001
ENSG00000100503.23	51199	<i>NIN</i>	ninein	-4,95	0,006
ENSG00000135390.17	517	<i>ATP5MC2</i>	ATP synthase membrane subunit c locus 2	-4,94	0,0068
ENSG00000136942.14	11224	<i>RPL35</i>	ribosomal protein L35	-4,93	0,0099
ENSG00000197386.10	3064	<i>HTT</i>	huntingtin	-4,92	0,011
ENSG00000103187.7	23406	<i>COTL1</i>	coactosin like F-actin binding protein 1	-4,92	0,0094
ENSG00000142657.20	5226	<i>PGD</i>	phosphogluconate dehydrogenase	-4,91	0,0424
ENSG00000182670.13	7267	<i>TTC3</i>	tetratricopeptide repeat domain 3	-4,90	0,022
ENSG00000151092.16	55768	<i>NGLY1</i>	N-glycanase 1	-4,90	0,0006
ENSG00000101347.8	25939	<i>SAMHD1</i>	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1	-4,90	0,0002
ENSG00000108298.9	6143	<i>RPL19</i>	ribosomal protein L19	-4,89	0,0281
ENSG00000168028.13	3921	<i>RPSA</i>	ribosomal protein SA	-4,88	0,042
ENSG00000149273.14	6188	<i>RPS3</i>	ribosomal protein S3	-4,81	0,0313
ENSG00000138071.13	10097	<i>ACTR2</i>	actin related protein 2	-4,78	0,0062
ENSG00000231925.11	6892	<i>TAPBP</i>	TAP binding protein	-4,75	0,043
ENSG00000110934.10	51411	<i>BIN2</i>	bridging integrator 2	-4,75	0,0051
ENSG00000128340.14	5880	<i>RAC2</i>	Rac family small GTPase 2	-4,74	0,0009
ENSG00000177885.13	2885	<i>GRB2</i>	growth factor receptor bound protein 2	-4,72	0,045
ENSG00000111913.17	9750	<i>RIPOR2</i>	RHO family interacting cell polarization regulator 2	-4,71	0,0001
ENSG00000114942.13	1933	<i>EEF1B2</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	-4,71	0,0219
ENSG00000188042.7	10123	<i>ARL4C</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 4C	-4,68	0,049

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000131236.16	10487	<i>CAP1</i>	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1	-4,68	0,0111
ENSG00000231389.7	3113	<i>HLA-DPA1</i>	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	-4,67	0,015
ENSG00000204472.12	199	<i>AIF1</i>	allograft inflammatory factor 1	-4,64	0,002
ENSG00000244754.8	10443	<i>N4BP2L2</i>	NEDD4 binding protein 2 like 2	-4,63	0,011
ENSG00000196126.11	3123	<i>HLA-DRB1</i>	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-4,63	0,004
ENSG00000169442.8	1043	<i>CD52</i>	CD52 molecule	-4,60	0,004
ENSG00000110077.14	64231	<i>MS4A6A</i>	membrane spanning 4-domains A6A	-4,57	0,0013
ENSG00000204323.5	643008	<i>SMIM5</i>	small integral membrane protein 5	-4,54	0,009
ENSG00000110880.10	23603	<i>CORO1C</i>	coronin 1C	-4,53	0,0244
ENSG00000100201.20	10521	<i>DDX17</i>	DEAD-box helicase 17	-4,51	0,0242
ENSG00000186517.13	257106	<i>ARHGAP30</i>	Rho GTPase activating protein 30	-4,51	0,000
ENSG00000137642.12	6653	<i>SORL1</i>	sortilin related receptor 1	-4,47	0,0011
ENSG00000107290.13	23064	<i>SETX</i>	senataxin	-4,45	0,0003
ENSG00000005483.20	55904	<i>KMT2E</i>	lysine methyltransferase 2E	-4,41	0,0155
ENSG00000170889.13	6203	<i>RPS9</i>	ribosomal protein S9	-4,40	0,001
ENSG00000149311.18	472	<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	-4,36	0,0010
ENSG00000198408.13	10724	<i>OGA</i>	O-GlcNAcase	-4,35	0,003
ENSG00000101558.13	9218	<i>VAPA</i>	VAMP associated protein A	-4,33	0,0307
ENSG00000109861.15	1075	<i>CTSC</i>	cathepsin C	-4,31	0,0013
ENSG00000116251.9	6146	<i>RPL22</i>	ribosomal protein L22	-4,30	0,0218
ENSG00000166974.12	10982	<i>MAPRE2</i>	microtubule associated protein RP/EB family member 2	-4,30	0,0254
ENSG00000143119.12	963	<i>CD53</i>	CD53 molecule	-4,26	0,0092
ENSG00000100077.14	157	<i>GRK3</i>	G protein-coupled receptor kinase 3	-4,26	0,0005
ENSG00000127022.14	821	<i>CANX</i>	calnexin	-4,25	0,0252
ENSG00000102879.15	11151	<i>CORO1A</i>	coronin 1A	-4,25	0,0094
ENSG0000010810.17	2534	<i>FYN</i>	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-4,24	0,0096
ENSG00000163660.11	57018	<i>CCNL1</i>	cyclin L1	-4,23	0,0281
ENSG00000159140.19	6651	<i>SON</i>	SON DNA and RNA binding protein	-4,22	0,0230

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000075151.20	8672	<i>EIF4G3</i>	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	-4,19	0,0078
ENSG00000065413.18	91526	<i>ANKRD44</i>	ankyrin repeat domain 44	-4,19	0,0139
ENSG00000095787.21	51322	<i>WAC</i>	WW domain containing adaptor with coiled-coil	-4,18	0,0370
ENSG00000130741.10	1968	<i>EIF2S3</i>	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma	-4,16	0,0184
ENSG00000102007.10	5355	<i>PLP2</i>	proteolipid protein 2	-4,15	0,0279
ENSG00000125304.8	9375	<i>TM9SF2</i>	transmembrane 9 superfamily member 2	-4,14	0,0090
ENSG00000153914.15	140890	<i>SREK1</i>	splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1	-4,14	0,0038
ENSG00000157873.17	8764	<i>TNFRSF14</i>	TNF receptor superfamily member 14	-4,13	0,0041
ENSG00000108405.3	5023	<i>P2RX1</i>	purinergic receptor P2X 1	-4,13	0,0320
ENSG00000120899.17	2185	<i>PTK2B</i>	protein tyrosine kinase 2 beta	-4,12	0,0155
ENSG00000237550.5	254948	<i>RPL9P8</i>	ribosomal protein L9 pseudogene 8	-4,10	0,025
ENSG00000101150.17	7165	<i>TPD52L2</i>	TPD52 like 2	-4,06	0,0143
ENSG00000198830.10	3151	<i>HMG2</i>	high mobility group nucleosomal binding domain 2	-4,06	0,028
ENSG00000163349.21	204851	<i>HIPK1</i>	homeodomain interacting protein kinase 1	-4,06	0,0170
ENSG00000108848.15	51747	<i>LUC7L3</i>	LUC7 like 3 pre-mRNA splicing factor	-4,03	0,0240
ENSG00000163162.8	284996	<i>RNF149</i>	ring finger protein 149	-4,02	0,0014
ENSG00000118181.10	6230	<i>RPS25</i>	ribosomal protein S25	-4,02	0,0414
ENSG00000091527.15	55573	<i>CDV3</i>	CDV3 homolog	-4,01	0,0038
ENSG00000126264.9	10870	<i>HCST</i>	hematopoietic cell signal transducer	-4,01	0,0001
ENSG00000116754.13	9295	<i>SRSF11</i>	serine and arginine rich splicing factor 11	-4,01	0,0016
ENSG00000167526.13	6137	<i>RPL13</i>	ribosomal protein L13	-3,97	0,017
ENSG00000185811.16	10320	<i>IKZF1</i>	IKAROS family zinc finger 1	-3,96	0,005
ENSG00000131469.12	6155	<i>RPL27</i>	ribosomal protein L27	-3,96	0,0478
ENSG00000137841.11	5330	<i>PLCB2</i>	phospholipase C beta 2	-3,94	0,0007
ENSG00000167978.16	23524	<i>SRRM2</i>	serine/arginine repetitive matrix 2	-3,92	0,034
ENSG00000145287.10	51316	<i>PLAC8</i>	placenta associated 8	-3,92	0,0117
ENSG00000173821.19	57674	<i>RNF213</i>	ring finger protein 213	-3,91	0,025
ENSG00000111716.12	3945	<i>LDHB</i>	lactate dehydrogenase B	-3,91	0,0012

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000188846.13	9045	<i>RPL14</i>	ribosomal protein L14	-3,90	0,006
ENSG00000110876.9	6404	<i>SELPLG</i>	selectin P ligand	-3,90	0,0008
ENSG00000081237.18	5788	<i>PTPRC</i>	protein tyrosine phosphatase receptor type C	-3,90	0,0011
ENSG00000144713.12	6161	<i>RPL32</i>	ribosomal protein L32	-3,89	0,0036
ENSG00000261371.5	5175	<i>PECAM1</i>	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	-3,89	0,010
ENSG00000176903.4	9240	<i>PNMA1</i>	PNMA family member 1	-3,88	0,002
ENSG00000142937.11	6202	<i>RPS8</i>	ribosomal protein S8	-3,88	0,0377
ENSG00000185862.6	2124	<i>EVI2B</i>	ecotropic viral integration site 2B	-3,86	0,002
ENSG00000197969.11	23230	<i>VPS13A</i>	vacuolar protein sorting 13 homolog A	-3,85	0,025
ENSG00000114857.17	4820	<i>NKTR</i>	natural killer cell triggering receptor	-3,83	0,0108
ENSG00000182372.9	2055	<i>CLN8</i>	CLN8 transmembrane ER and ERGIC protein	-3,83	0,004
ENSG00000104408.9	3646	<i>EIF3E</i>	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	-3,82	0,0159
ENSG00000134294.13	54407	<i>SLC38A2</i>	solute carrier family 38 member 2	-3,82	0,0394
ENSG00000124831.18	9208	<i>LRRFIP1</i>	LRR binding FLII interacting protein 1	-3,81	0,0049
ENSG00000151702.16	2313	<i>FLI1</i>	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor	-3,81	0,0120
ENSG00000111775.2	1337	<i>COX6A1</i>	cytochrome c oxidase subunit 6A1	-3,81	0,0214
ENSG00000101745.16	23253	<i>ANKRD12</i>	ankyrin repeat domain 12	-3,80	0,0166
ENSG00000167461.11	4218	<i>RAB8A</i>	RAB8A, member RAS oncogene family	-3,80	0,0056
ENSG00000213654.9	63940	<i>GPSM3</i>	G protein signaling modulator 3	-3,80	0,000
ENSG00000181555.20	29072	<i>SETD2</i>	SET domain containing 2, histone lysine methyltransferase	-3,78	0,045
ENSG00000091039.16	114882	<i>OSBPL8</i>	oxysterol binding protein like 8	-3,78	0,0294
ENSG00000163682.15	6133	<i>RPL9</i>	ribosomal protein L9	-3,74	0,0133
ENSG00000048740.18	10659	<i>CELF2</i>	CUGBP Elav-like family member 2	-3,74	0,0068
ENSG00000169398.19	5747	<i>PTK2</i>	protein tyrosine kinase 2	-3,74	0,036
ENSG00000153046.17	9425	<i>CDYL</i>	chromodomain Y like	-3,73	0,0073
ENSG00000160255.17	3689	<i>ITGB2</i>	integrin subunit beta 2	-3,73	0,0009
ENSG00000169554.18	9839	<i>ZEB2</i>	zinc finger E-box binding homeobox 2	-3,73	0,047
ENSG00000147526.19	6867	<i>TACC1</i>	transforming acidic coiled-coil containing protein 1	-3,72	0,0088

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000123144.10	79002	<i>TRIR</i>	telomerase RNA component interacting RNase	-3,72	0,0268
ENSG00000254087.7	4067	<i>LYN</i>	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-3,71	0,004
ENSG00000150593.17	27250	<i>PDCD4</i>	programmed cell death 4	-3,71	0,0264
ENSG00000163131.10	1520	<i>CTSS</i>	cathepsin S	-3,69	0,0036
ENSG00000166501.12	5579	<i>PRKCB</i>	protein kinase C beta	-3,68	0,0001
ENSG00000089280.18	2521	<i>FUS</i>	FUS RNA binding protein	-3,67	0,0126
ENSG00000005844.17	3683	<i>ITGAL</i>	integrin subunit alpha L	-3,66	0,0058
ENSG00000157106.16	23049	<i>SMG1</i>	SMG1 nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase	-3,66	0,0169
ENSG00000130755.12	9535	<i>GMFG</i>	glia maturation factor gamma	-3,65	0,0159
ENSG00000183354.11	158358	<i>KIAA2026</i>	uncharacterized protein KIAA2026	-3,65	0,010
ENSG00000110395.6	867	<i>CBL</i>	Cbl proto-oncogene	-3,64	0,0090
ENSG00000197747.8	6281	<i>S100A10</i>	S100 calcium binding protein A10	-3,64	0,022
ENSG00000022267.16	2273	<i>FHL1</i>	four and a half LIM domains 1	-3,64	0,0389
ENSG00000078369.17	2782	<i>GNB1</i>	G protein subunit beta 1	-3,62	0,0112
ENSG00000104894.11	951	<i>CD37</i>	CD37 molecule	-3,62	0,0006
ENSG00000181467.4	5912	<i>RAP2B</i>	RAP2B, member of RAS oncogene family	-3,62	0,023
ENSG00000171858.17	6227	<i>RPS21</i>	ribosomal protein S21	-3,61	0,046
ENSG00000196683.10	54543	<i>TOMM7</i>	translocase of outer mitochondrial membrane 7	-3,61	0,042
ENSG00000168066.20	7536	<i>SF1</i>	splicing factor 1	-3,61	0,018
ENSG00000026025.15	7431	<i>VIM</i>	vimentin	-3,61	0,0049
ENSG00000135976.17	375248	<i>ANKRD36</i>	ankyrin repeat domain 36	-3,61	0,0259
ENSG00000120708.16	7045	<i>TGFBI</i>	transforming growth factor beta induced	-3,61	0,0432
ENSG00000169045.17	3187	<i>HNRNPH1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	-3,61	0,018
ENSG00000189067.12	9516	<i>LITAF</i>	lipopolysaccharide induced TNF factor	-3,60	0,009
ENSG00000169967.16	10746	<i>MAP3K2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	-3,60	0,014
ENSG00000101294.16	81502	<i>HM13</i>	histocompatibility minor 13	-3,58	0,0105
ENSG00000034510.5	9168	<i>TMSB10</i>	thymosin beta 10	-3,56	0,0164
ENSG00000081320.10	9262	<i>STK17B</i>	serine/threonine kinase 17b	-3,55	0,0076

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG0000005810.17	23077	<i>MYCBP2</i>	MYC binding protein 2	-3,54	0,0145
ENSG00000038427.15	1462	<i>VCAN</i>	versican	-3,54	0,0142
ENSG00000113648.16	9555	<i>MACROH2A1</i>	macroH2A.1 histone	-3,53	0,0069
ENSG00000152601.17	4154	<i>MBNL1</i>	muscleblind like splicing regulator 1	-3,53	0,0169
ENSG00000144028.14	23020	<i>SNRNP200</i>	small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200	-3,52	0,0111
ENSG00000138698.14	5910	<i>RAP1GDS1</i>	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	-3,51	0,0219
ENSG00000167863.11	10476	<i>ATP5H</i>	ATP synthase peripheral stalk subunit D	-3,50	0,040
ENSG00000109920.12	23360	<i>FNBP4</i>	formin binding protein 4	-3,50	0,0347
ENSG00000090382.6	4069	<i>LYZ</i>	Lysozyme	-3,50	0,0365
ENSG00000100815.12	9321	<i>TRIP11</i>	thyroid hormone receptor interactor 11	-3,49	0,0444
ENSG00000100300.17	706	<i>TSPO</i>	translocator protein	-3,49	0,0092
ENSG00000067900.7	6093	<i>ROCK1</i>	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1	-3,49	0,0090
ENSG00000132274.15	10346	<i>TRIM22</i>	tripartite motif containing 22	-3,48	0,0058
ENSG00000121892.14	23244	<i>PDS5A</i>	PDS5 cohesin associated factor A	-3,48	0,0187
ENSG00000197629.5	219972	<i>MPEG1</i>	macrophage expressed 1	-3,46	0,033
ENSG00000114867.20	1981	<i>EIF4G1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	-3,46	0,0066
ENSG00000088888.17	57506	<i>MAVS</i>	mitochondrial antiviral signaling protein	-3,45	0,0115
ENSG00000129534.13	55320	<i>MIS18BP1</i>	MIS18 binding protein 1	-3,43	0,0045
ENSG00000165119.20	3190	<i>HNRNPK</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	-3,42	0,0009
ENSG00000105323.16	11100	<i>HNRNPUL1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U like 1	-3,39	0,0098
ENSG00000162889.10	9261	<i>MAPKAPK2</i>	MAPK activated protein kinase 2	-3,39	0,0418
ENSG00000152558.14	114908	<i>TMEM123</i>	transmembrane protein 123	-3,39	0,0003
ENSG00000077420.15	54518	<i>APBB1IP</i>	amyloid beta precursor protein binding family B member 1 interacting protein	-3,39	0,0014
ENSG00000145416.13	55016	<i>MARCHF1</i>	membrane associated ring-CH-type finger 1	-3,38	0,0141
ENSG00000124151.18	8202	<i>NCOA3</i>	nuclear receptor coactivator 3	-3,38	0,0328
ENSG00000168610.14	6774	<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	-3,37	0,022
ENSG00000103811.15	1512	<i>CTSH</i>	cathepsin H	-3,37	0,0099
ENSG00000103653.16	1445	<i>CSK</i>	C-terminal Src kinase	-3,36	0,0110

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000124795.14	7913	<i>DEK</i>	DEK proto-oncogene	-3,35	0,0246
ENSG00000100941.8	5411	<i>PNN</i>	pinin, desmosome associated protein	-3,34	0,0403
ENSG00000111252.10	10019	<i>SH2B3</i>	SH2B adaptor protein 3	-3,33	0,0049
ENSG00000155629.14	118788	<i>PIK3AP1</i>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	-3,32	0,0330
ENSG00000072501.17	8243	<i>SMC1A</i>	structural maintenance of chromosomes 1A	-3,32	0,0041
ENSG00000069424.14	8514	<i>KCNAB2</i>	potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta subunit 2	-3,32	0,0018
ENSG00000189079.15	196528	<i>ARID2</i>	AT-rich interaction domain 2	-3,32	0,001
ENSG00000152795.17	9987	<i>HNRNPDL</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like	-3,31	0,0464
ENSG00000230590.8	100302692	<i>FTX</i>	FTX transcript, XIST regulator	-3,31	0,011
ENSG00000111237.18	51699	<i>VPS29</i>	VPS29 retromer complex component	-3,31	0,0281
ENSG00000204257.14	3108	<i>HLA-DMA</i>	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	-3,30	0,005
ENSG00000196628.15	6925	<i>TCF4</i>	transcription factor 4	-3,30	0,048
ENSG00000111670.14	79158	<i>GNPTAB</i>	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase subunits alpha and beta	-3,30	0,0075
ENSG00000119707.13	58517	<i>RBM25</i>	RNA binding motif protein 25	-3,29	0,0118
ENSG00000089248.6	10961	<i>ERP29</i>	endoplasmic reticulum protein 29	-3,28	0,0243
ENSG00000142227.10	2014	<i>EMP3</i>	epithelial membrane protein 3	-3,28	0,0342
ENSG00000119535.17	1441	<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor	-3,25	0,0040
ENSG00000169567.11	3094	<i>HINT1</i>	histidine triad nucleotide binding protein 1	-3,24	0,030
ENSG00000135317.12	57231	<i>SNX14</i>	sorting nexin 14	-3,23	0,0150
ENSG00000114978.17	55233	<i>MOB1A</i>	MOB kinase activator 1A	-3,22	0,0150
ENSG00000137154.12	6194	<i>RPS6</i>	ribosomal protein S6	-3,21	0,0153
ENSG00000115091.11	10096	<i>ACTR3</i>	actin related protein 3	-3,21	0,0488
ENSG00000113441.15	4012	<i>LNPEP</i>	leucyl and cystinyl aminopeptidase	-3,20	0,0057
ENSG00000138594.13	29766	<i>TMOD3</i>	tropomodulin 3	-3,20	0,0467
ENSG00000198837.9	9909	<i>DENND4B</i>	DENN domain containing 4B	-3,18	0,003
ENSG00000090905.18	27327	<i>TNRC6A</i>	trinucleotide repeat containing adaptor 6A	-3,18	0,0014
ENSG00000007168.12	5048	<i>PAFAH1B1</i>	platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1	-3,17	0,0438
ENSG00000153250.19	5937	<i>RBMS1</i>	RNA binding motif single stranded interacting protein 1	-3,16	0,0103

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG0000078747.14	83737	<i>ITCH</i>	itchy E3 ubiquitin protein ligase	-3,15	0,0089
ENSG00000283041.1	729998	<i>LOC729998</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma pseudogene	-3,15	0,015
ENSG00000122705.16	1211	<i>CLTA</i>	clathrin light chain A	-3,15	0,0135
ENSG00000168675.18	753	<i>LDLRAD4</i>	low density lipoprotein receptor class A domain containing 4	-3,11	0,012
ENSG00000174839.12	201627	<i>DENND6A</i>	DENN domain containing 6A	-3,10	0,003
ENSG00000186566.12	23131	<i>GPATCH8</i>	G-patch domain containing 8	-3,10	0,010
ENSG00000235552.4	645387	<i>RPL6P27</i>	ribosomal protein L6 pseudogene 27	-3,10	0,029
ENSG00000108669.16	9267	<i>CYTH1</i>	cytohesin 1	-3,09	0,0151
ENSG00000028137.18	7133	<i>TNFRSF1B</i>	TNF receptor superfamily member 1B	-3,08	0,0108
ENSG00000147168.12	3561	<i>IL2RG</i>	interleukin 2 receptor subunit gamma	-3,07	0,0086
ENSG00000135090.13	51347	<i>TAOK3</i>	TAO kinase 3	-3,06	0,0018
ENSG00000155097.11	528	<i>ATP6VIC1</i>	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit C1	-3,02	0,0152
ENSG00000204397.7	114769	<i>CARD16</i>	caspase recruitment domain family member 16	-3,02	0,016
ENSG00000136490.8	80774	<i>LIMD2</i>	LIM domain containing 2	-3,02	0,0064
ENSG00000051523.10	1535	<i>CYBA</i>	cytochrome b-245 alpha chain	-3,02	0,0111
ENSG00000133112.16	7178	<i>TPT1</i>	tumor protein, translationally-controlled 1	-3,01	0,0473
ENSG00000188404.8	6402	<i>SELL</i>	selectin L	-3,00	0,011
ENSG00000114861.18	27086	<i>FOXP1</i>	forkhead box P1	-3,00	0,0153
ENSG00000174718.11	55196	<i>RESF1</i>	retroelement silencing factor 1	-3,00	0,007
ENSG00000164031.16	79982	<i>DNAJB14</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B14	-2,99	0,0120
ENSG00000233927.4	6234	<i>RPS28</i>	ribosomal protein S28	-2,98	0,019
ENSG00000152518.7	678	<i>ZFP36L2</i>	ZFP36 ring finger protein like 2	-2,97	0,0307
ENSG00000158604.14	222068	<i>TMED4</i>	transmembrane p24 trafficking protein 4	-2,96	0,0068
ENSG00000136280.15	83605	<i>CCM2</i>	CCM2 scaffold protein	-2,93	0,0130
ENSG00000142634.12	79180	<i>EFHD2</i>	EF-hand domain family member D2	-2,93	0,0242
ENSG00000011454.16	23637	<i>RABGAP1</i>	RAB GTPase activating protein 1	-2,93	0,0026
ENSG00000104824.16	3191	<i>HNRNPL</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	-2,93	0,0341
ENSG00000186908.14	23390	<i>ZDHHC17</i>	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 17	-2,91	0,012

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000134242.15	26191	<i>PTPN22</i>	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22	-2,90	0,0019
ENSG00000126107.14	79654	<i>HECTD3</i>	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 3	-2,90	0,0319
ENSG00000115523.16	10578	<i>GNLY</i>	granulysin	-2,89	0,0112
ENSG00000198818.9	113402	<i>SFT2D1</i>	SFT2 domain containing 1	-2,89	0,013
ENSG00000076641.4	55824	<i>PAG1</i>	phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	-2,88	0,0067
ENSG00000119866.20	53335	<i>BCL11A</i>	BCL11 transcription factor A	-2,87	0,0334
ENSG00000159322.17	83440	<i>ADPGK</i>	ADP dependent glucokinase	-2,87	0,0044
ENSG0000013441.15	1195	<i>CLK1</i>	CDC like kinase 1	-2,87	0,0055
ENSG00000093144.18	55862	<i>ECHDC1</i>	ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	-2,86	0,0157
ENSG00000172349.17	3603	<i>IL16</i>	interleukin 16	-2,85	0,005
ENSG00000118308.15	4033	<i>IRAG2</i>	inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated 2	-2,85	0,0154
ENSG00000281103.1	100506776	<i>TRG-AS1</i>	T cell receptor gamma locus antisense RNA 1	-2,85	0,023
ENSG00000133226.16	10250	<i>SRRM1</i>	serine and arginine repetitive matrix 1	-2,84	0,0244
ENSG00000104714.13	157697	<i>ERICH1</i>	glutamate rich 1	-2,83	0,0272
ENSG00000112343.10	10475	<i>TRIM38</i>	tripartite motif containing 38	-2,83	0,0164
ENSG00000168071.21	283234	<i>CCDC88B</i>	coiled-coil domain containing 88B	-2,83	0,018
ENSG00000188994.12	23036	<i>ZNF292</i>	zinc finger protein 292	-2,83	0,022
ENSG00000065534.18	4638	<i>MYLK</i>	myosin light chain kinase	-2,81	0,0378
ENSG00000057608.16	2665	<i>GDI2</i>	GDP dissociation inhibitor 2	-2,81	0,0477
ENSG00000119900.7	79627	<i>OGFRL1</i>	opioid growth factor receptor like 1	-2,79	0,0070
ENSG00000140386.12	49855	<i>SCAPER</i>	S-phase cyclin A associated protein in the ER	-2,78	0,0165
ENSG00000185432.11	25840	<i>METTL7A</i>	thiol methyltransferase 1A	-2,77	0,023
ENSG00000140988.15	6187	<i>RPS2</i>	ribosomal protein S2	-2,77	0,0482
ENSG00000109475.16	6164	<i>RPL34</i>	ribosomal protein L34	-2,76	0,0209
ENSG00000168918.13	3635	<i>INPP5D</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	-2,76	0,035
ENSG00000101596.14	23347	<i>SMCHD1</i>	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	-2,75	0,0117
ENSG00000064607.16	10147	<i>SUGP2</i>	SURP and G-patch domain containing 2	-2,75	0,0083
ENSG00000158869.10	2207	<i>FCER1G</i>	Fc epsilon receptor Ig	-2,75	0,0407

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000253729.7	5591	<i>PRKDC</i>	protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	-2,73	0,006
ENSG00000167483.17	199786	<i>NIBAN3</i>	niban apoptosis regulator 3	-2,71	0,022
ENSG00000264538.6	440423	<i>SUZ12P1</i>	SUZ12 pseudogene 1	-2,70	0,021
ENSG00000132334.16	5791	<i>PTPRE</i>	protein tyrosine phosphatase receptor type E	-2,70	0,0110
ENSG00000032219.18	5926	<i>ARID4A</i>	AT-rich interaction domain 4A	-2,70	0,0350
ENSG00000104907.12	55621	<i>TRMT1</i>	tRNA methyltransferase 1	-2,70	0,0294
ENSG00000170275.14	10491	<i>CRTAP</i>	cartilage associated protein	-2,68	0,042
ENSG00000167895.14	147138	<i>TMC8</i>	transmembrane channel like 8	-2,68	0,012
ENSG00000140750.16	55114	<i>ARHGAP17</i>	Rho GTPase activating protein 17	-2,65	0,0274
ENSG00000177189.12	6197	<i>RPS6KA3</i>	ribosomal protein S6 kinase A3	-2,65	0,014
ENSG00000162402.13	23358	<i>USP24</i>	ubiquitin specific peptidase 24	-2,64	0,0419
ENSG00000164713.9	25798	<i>BRI3</i>	brain protein I3	-2,63	0,0112
ENSG00000173209.22	130872	<i>AHSA2P</i>	activator of HSP90 ATPase homolog 2, pseudogene	-2,62	0,024
ENSG00000065526.10	23013	<i>SPEN</i>	spen family transcriptional repressor	-2,62	0,0290
ENSG00000105202.8	2091	<i>FBL</i>	fibrillarin	-2,61	0,0175
ENSG00000116679.15	10625	<i>IVNS1ABP</i>	influenza virus NS1A binding protein	-2,61	0,0034
ENSG00000242299.1	100131863	<i>RPS18P5</i>	Ribosomal Protein S18 Pseudogene 5	-2,61	0,014
ENSG00000036549.12	26009	<i>ZZZ3</i>	zinc finger ZZ-type containing 3	-2,60	0,0012
ENSG00000124782.19	6239	<i>RREB1</i>	Ras responsive element binding protein 1	-2,56	0,0058
ENSG00000129128.12	60559	<i>SPCS3</i>	signal peptidase complex subunit 3	-2,55	0,0077
ENSG00000103740.9	23205	<i>ACSBG1</i>	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	-2,52	0,0078
ENSG00000141480.17	409	<i>ARRB2</i>	arrestin beta 2	-2,52	0,0298
ENSG00000153064.11	55024	<i>BANK1</i>	B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	-2,50	0,0302
ENSG00000105339.10	22898	<i>DENND3</i>	DENN domain containing 3	-2,49	0,0109
ENSG00000000938.12	2268	<i>FGR</i>	FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-2,49	0,0077
ENSG00000139641.12	23344	<i>ESYT1</i>	extended synaptotagmin 1	-2,48	0,0118
ENSG00000067066.16	6672	<i>SP100</i>	SP100 nuclear antygen	-2,47	0,0260
ENSG00000139278.9	11010	<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis related 1	-2,47	0,0005

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000140853.15	84166	<i>NLR5</i>	NLR family CARD domain containing 5	-2,46	0,0353
ENSG00000197442.9	4217	<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	-2,46	0,014
ENSG00000178695.5	115207	<i>KCTD12</i>	potassium channel tetramerization domain containing 12	-2,45	0,011
ENSG00000187147.17	55182	<i>RNF220</i>	ring finger protein 220	-2,44	0,009
ENSG00000105372.6	6223	<i>RPS19</i>	ribosomal protein S19	-2,44	0,0276
ENSG0000010610.9	920	<i>CD4</i>	CD4 molecule	-2,42	0,0208
ENSG00000073849.14	6480	<i>ST6GAL1</i>	ST6 beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	-2,42	0,0083
ENSG00000111275.12	217	<i>ALDH2</i>	aldehyde dehydrogenase 2 family member	-2,41	0,0241
ENSG00000115232.13	3676	<i>ITGA4</i>	integrin subunit alpha 4	-2,39	0,0081
ENSG00000137776.16	79811	<i>SLTM</i>	SAFB like transcription modulator	-2,39	0,0297
ENSG00000142347.16	4542	<i>MYO1F</i>	myosin IF	-2,39	0,0213
ENSG00000153006.15	285672	<i>SREK1IP1</i>	SREK1 interacting protein 1	-2,39	0,0140
ENSG00000126756.11	8409	<i>UXT</i>	ubiquitously expressed prefoldin like chaperone	-2,38	0,0134
ENSG00000009954.10	9031	<i>BAZ1B</i>	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B	-2,37	0,0013
ENSG00000138246.15	23317	<i>DNAJC13</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13	-2,37	0,0440
ENSG00000176953.12	84901	<i>NFATC2IP</i>	nuclear factor of activated T cells 2 interacting protein	-2,37	0,006
ENSG00000126070.19	192669	<i>AGO3</i>	argonaute RISC catalytic component 3	-2,36	0,0159
ENSG00000184007.18	8073	<i>PTP4A2</i>	protein tyrosine phosphatase 4A2	-2,35	0,029
ENSG00000154310.16	23043	<i>TNIK</i>	TRAF2 and NCK interacting kinase	-2,35	0,0078
ENSG00000140368.12	9051	<i>PSTPIP1</i>	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	-2,35	0,0190
ENSG00000082153.17	9689	<i>BZW1</i>	basic leucine zipper and W2 domains 1	-2,35	0,0387
ENSG00000157500.10	26060	<i>APPL1</i>	adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1	-2,34	0,0375
ENSG00000132388.12	7326	<i>UBE2G1</i>	ubiquitin conjugating enzyme E2 G1	-2,34	0,0056
ENSG00000198502.5	3127	<i>HLA-DRB5</i>	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	-2,33	0,007
ENSG00000174238.14	5306	<i>PITPNA</i>	phosphatidylinositol transfer protein alpha	-2,33	0,029
ENSG00000118503.14	7128	<i>TNFAIP3</i>	TNF alpha induced protein 3	-2,33	0,0435
ENSG00000141646.13	4089	<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	-2,33	0,0049
ENSG00000170571.11	133418	<i>EMB</i>	embigin	-2,33	0,014

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000140105.17	7453	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase 1	-2,33	0,0384
ENSG00000089063.14	29058	TMEM230	transmembrane protein 230	-2,32	0,0157
ENSG00000215021.8	11331	PHB2	prohibitin 2	-2,32	0,008
ENSG00000167323.11	6786	STIM1	stromal interaction molecule 1	-2,32	0,0308
ENSG00000187239.16	23048	FNBP1	formin binding protein 1	-2,31	0,035
ENSG00000188986.6	25920	NELFB	negative elongation factor complex member B	-2,31	0,021
ENSG00000124588.19	4835	NQO2	N-ribosyldihydronicotinamide:quinone reductase 2	-2,31	0,0316
ENSG00000131165.14	5119	CHMP1A	charged multivesicular body protein 1A	-2,31	0,0139
ENSG00000107099.15	81704	DOCK8	dedicator of cytokinesis 8	-2,30	0,0103
ENSG00000163635.17	6314	ATXN7	ataxin 7	-2,29	0,0168
ENSG00000101265.15	9770	RASSF2	Ras association domain family member 2	-2,29	0,0088
ENSG00000166912.16	54893	MTMR10	myotubularin related protein 10	-2,28	0,0298
ENSG00000170345.9	2353	FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	-2,27	0,014
ENSG00000145715.14	5921	RASA1	RAS p21 protein activator 1	-2,27	0,0466
ENSG00000163219.11	9938	ARHGAP25	Rho GTPase activating protein 25	-2,26	0,0109
ENSG00000143157.11	57645	POGK	pogo transposable element derived with KRAB domain	-2,26	0,0200
ENSG00000155744.9	285172	HYCC2	hyccin PI4KA lipid kinase complex subunit 2	-2,25	0,0003
ENSG00000196295.11	401320	GARS1-DT	GARS1 Divergent Transcript	-2,25	0,012
ENSG00000123329.17	64333	ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9	-2,24	0,0167
ENSG00000256537.4	100129361	SMIM10L1	small integral membrane protein 10 like 1	-2,24	0,016
ENSG00000135677.10	2799	GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	-2,24	0,0215
ENSG00000172890.11	55191	NADSYN1	NAD synthetase 1	-2,23	0,013
ENSG00000084693.15	60509	AGBL5	AGBL carboxypeptidase 5	-2,23	0,0374
ENSG00000122224.17	4063	LY9	lymphocyte antigen 9	-2,22	0,0189
ENSG00000065135.10	2773	GNAI3	G protein subunit alpha i3	-2,22	0,0381
ENSG00000134516.15	1794	DOCK2	dedicator of cytokinesis 2	-2,22	0,0194
ENSG00000150995.18	3708	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	-2,22	0,0477
ENSG00000126882.12	286336	FAM78A	family with sequence similarity 78 member A	-2,22	0,0168

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000116691.10	60672	<i>MIIP</i>	migration and invasion inhibitory protein	-2,21	0,0261
ENSG00000197471.11	6693	<i>SPN</i>	sialophorin	-2,20	0,006
ENSG00000023734.10	11171	<i>STRAP</i>	serine/threonine kinase receptor associated protein	-2,20	0,0377
ENSG00000197535.14	4644	<i>MYO5A</i>	myosin VA	-2,20	0,008
ENSG00000138814.16	5530	<i>PPP3CA</i>	protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha	-2,19	0,0145
ENSG00000167613.15	3903	<i>LAIR1</i>	leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1	-2,19	0,011
ENSG00000099204.18	3983	<i>ABLIM1</i>	actin binding LIM protein 1	-2,18	0,0220
ENSG00000115355.15	55704	<i>CCDC88A</i>	coiled-coil domain containing 88A	-2,18	0,0255
ENSG00000068745.14	51447	<i>IP6K2</i>	inositol hexakisphosphate kinase 2	-2,18	0,0102
ENSG00000071537.13	6400	<i>SEL1L</i>	SEL1L adaptor subunit of ERAD E3 ubiquitin ligase	-2,16	0,0230
ENSG00000110852.4	9976	<i>CLEC2B</i>	C-type lectin domain family 2 member B	-2,15	0,0140
ENSG00000085265.10	2219	<i>FCN1</i>	ficolin 1	-2,15	0,0321
ENSG00000054654.16	23224	<i>SYNE2</i>	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	-2,14	0,0266
ENSG00000148019.12	84131	<i>CEP78</i>	centrosomal protein 78	-2,14	0,0147
ENSG00000131196.17	4772	<i>NFATC1</i>	nuclear factor of activated T cells 1	-2,13	0,0121
ENSG00000052841.14	55761	<i>TTC17</i>	tetratricopeptide repeat domain 17	-2,13	0,0434
ENSG00000197226.12	23061	<i>TBC1D9B</i>	TBC1 domain family member 9B	-2,13	0,028
ENSG00000063978.15	6047	<i>RNF4</i>	ring finger protein 4	-2,13	0,0158
ENSG00000102699.5	143	<i>PARP4</i>	poly(ADP-ribose) polymerase family member 4	-2,12	0,0486
ENSG00000197530.12	142678	<i>MIB2</i>	MIB E3 ubiquitin protein ligase 2	-2,11	0,013
ENSG00000257621.7	379025	<i>PSMA3-AS1</i>	PSMA3 antisense RNA 1	-2,09	0,042
ENSG00000015475.18	637	<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist	-2,08	0,0471
ENSG00000241553.12	10093	<i>ARPC4</i>	actin related protein 2/3 complex subunit 4	-2,08	0,021
ENSG00000145675.14	5295	<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	-2,07	0,0272
ENSG00000227081.5	654365	<i>RPS27P3</i>	ribosomal protein S27 pseudogene 3	-2,07	0,015
ENSG00000072818.11	9744	<i>ACAP1</i>	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1	-2,06	0,0049
ENSG00000165178.9	654817	<i>NCF1C</i>	neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene	-2,06	0,0276
ENSG00000116489.12	829	<i>CAPZA1</i>	capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 1	-2,06	0,0237

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000196912.12	57730	<i>ANKRD36B</i>	ankyrin repeat domain 36B	-2,06	0,015
ENSG00000028528.14	6642	<i>SNX1</i>	sorting nexin 1	-2,06	0,0068
ENSG00000269858.5	112398	<i>EGLN2</i>	egl-9 family hypoxia inducible factor 2	-2,06	0,009
ENSG00000147853.16	50808	<i>AK3</i>	adenylate kinase 3	-2,05	0,0177
ENSG00000177663.13	23765	<i>IL17RA</i>	interleukin 17 receptor A	-2,05	0,008
ENSG00000130592.15	4046	<i>LSP1</i>	lymphocyte specific protein 1	-2,05	0,0101
ENSG00000137502.9	27314	<i>RAB30</i>	RAB30, member RAS oncogene family	-2,05	0,0147
ENSG0000018280.16	6556	<i>SLC11A1</i>	solute carrier family 11 member 1	-2,04	0,0170
ENSG0000017260.19	27032	<i>ATP2C1</i>	ATPase secretory pathway Ca ²⁺ transporting 1	-2,03	0,0264
ENSG00000137947.11	2959	<i>GTF2B</i>	general transcription factor IIB	-2,03	0,0218
ENSG00000009413.15	5980	<i>REV3L</i>	REV3 like, DNA directed polymerase zeta catalytic subunit	-2,01	0,0109
ENSG00000141376.22	54828	<i>BCAS3</i>	BCAS3 microtubule associated cell migration factor	-2,01	0,0182
ENSG00000147872.9	123	<i>PLIN2</i>	perilipin 2	-2,01	0,0178
ENSG00000072958.8	8907	<i>AP1M1</i>	adaptor related protein complex 1 subunit mu 1	-2,00	0,0167
ENSG00000082212.12	4200	<i>ME2</i>	malic enzyme 2	-1,99	0,0239
ENSG00000130309.10	79709	<i>COLGALT1</i>	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 1	-1,99	0,0259
ENSG00000119138.4	687	<i>KLF9</i>	KLF transcription factor 9	-1,93	0,0319
ENSG00000067560.10	387	<i>RHOA</i>	Ras homolog family member A	-1,93	0,0298
ENSG00000198286.9	84433	<i>CARD11</i>	caspase recruitment domain family member 11	-1,92	0,008
ENSG00000170027.6	7532	<i>YWHAG</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma	-1,92	0,035
ENSG00000120925.15	81790	<i>RNF170</i>	ring finger protein 170	-1,91	0,0089
ENSG00000004534.14	10180	<i>RBM6</i>	RNA binding motif protein 6	-1,91	0,0462
ENSG00000070814.17	6949	<i>TCOF1</i>	treacle ribosome biogenesis factor 1	-1,91	0,0143
ENSG00000080345.17	55183	<i>RIF1</i>	replication timing regulatory factor 1	-1,90	0,0125
ENSG00000089820.15	393	<i>ARHGAP4</i>	Rho GTPase activating protein 4	-1,89	0,0017
ENSG00000110906.12	83892	<i>KCTD10</i>	potassium channel tetramerization domain containing 10	-1,89	0,0076
ENSG00000144468.16	84236	<i>RHBDD1</i>	rhomboid domain containing 1	-1,88	0,0131
ENSG00000104047.14	56986	<i>DTWD1</i>	DTW domain containing 1	-1,88	0,0205

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000164091.11	80335	<i>WDR82</i>	WD repeat domain 82	-1,87	0,0059
ENSG00000067208.14	7813	<i>EVI5</i>	ecotropic viral integration site 5	-1,87	0,0200
ENSG00000163513.17	7048	<i>TGFBR2</i>	transforming growth factor beta receptor 2	-1,86	0,0310
ENSG00000163466.15	10109	<i>ARPC2</i>	actin related protein 2/3 complex subunit 2	-1,85	0,0157
ENSG00000135686.12	79786	<i>KLHL36</i>	kelch like family member 36	-1,85	0,0140
ENSG00000183298.5	730029	<i>RPSAP19</i>	ribosomal protein SA pseudogene 19	-1,84	0,004
ENSG00000268043.7	149013	<i>NBPF12</i>	NBPF member 12	-1,83	0,026
ENSG00000198001.13	51135	<i>IRAK4</i>	interleukin 1 receptor associated kinase 4	-1,83	0,008
ENSG00000106070.17	2887	<i>GRB10</i>	growth factor receptor bound protein 10	-1,81	0,0140
ENSG00000120802.13	7112	<i>TMPO</i>	thymopoietin	-1,80	0,0345
ENSG00000059728.10	4084	<i>MXD1</i>	MAX dimerization protein 1	-1,80	0,0195
ENSG00000174891.12	51319	<i>RSRC1</i>	arginine and serine rich coiled-coil 1	-1,79	0,015
ENSG00000110075.14	55291	<i>PPP6R3</i>	protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	-1,78	0,0074
ENSG00000114796.15	54800	<i>KLHL24</i>	kelch like family member 24	-1,78	0,0476
ENSG00000059377.16	6916	<i>TBXAS1</i>	thromboxane A synthase 1	-1,77	0,0218
ENSG00000125505.16	79143	<i>MBOAT7</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	-1,76	0,0205
ENSG00000160712.12	3570	<i>IL6R</i>	interleukin 6 receptor	-1,76	0,0374
ENSG00000215030.5	388344	<i>RPL13P12</i>	ribosomal protein L13 pseudogene 12	-1,76	0,025
ENSG00000145782.12	9140	<i>ATG12</i>	autophagy related 12	-1,76	0,0280
ENSG00000122692.8	55234	<i>SMU1</i>	SMU1 DNA replication regulator and spliceosomal factor	-1,75	0,0331
ENSG00000122008.15	51426	<i>POLK</i>	DNA polymerase kappa	-1,74	0,0126
ENSG00000223803.1	440992	<i>RPS20P14</i>	ribosomal protein S20 pseudogene 14	-1,74	0,004
ENSG00000197563.10	23556	<i>PIGN</i>	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N	-1,74	0,028
ENSG00000170876.7	79188	<i>TMEM43</i>	transmembrane protein 43	-1,74	0,023
ENSG00000033030.13	55596	<i>ZCCHC8</i>	zinc finger CCHC-type containing 8	-1,74	0,0094
ENSG00000107551.20	83937	<i>RASSF4</i>	Ras association domain family member 4	-1,72	0,0259
ENSG00000122566.20	3181	<i>HNRNPA2B1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	-1,71	0,0270
ENSG00000104886.11	55111	<i>PLEKHJ1</i>	pleckstrin homology domain containing J1	-1,71	0,0203

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000163563.7	4332	<i>MNDA</i>	myeloid cell nuclear differentiation antygen	-1,70	0,0197
ENSG00000135678.11	1368	<i>CPM</i>	carboxypeptidase M	-1,69	0,0294
ENSG00000124813.20	860	<i>RUNX2</i>	RUNX family transcription factor 2	-1,69	0,0286
ENSG00000103326.11	6650	<i>CAPN15</i>	calpain 15	-1,69	0,0482
ENSG00000144909.7	114885	<i>OSBPL11</i>	oxysterol binding protein like 11	-1,68	0,0145
ENSG00000203875.10	387066	<i>SNHG5</i>	small nucleolar RNA host gene 5	-1,67	0,026
ENSG00000140931.19	123920	<i>CMTM3</i>	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 3	-1,64	0,0428
ENSG00000182389.19	785	<i>CACNB4</i>	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 4	-1,63	0,027
ENSG00000100580.7	283578	<i>TMED8</i>	transmembrane p24 trafficking protein family member 8	-1,61	0,0217
ENSG00000129925.10	58986	<i>PGAP6</i>	post-GPI attachment to proteins 6	-1,60	0,0166
ENSG00000168899.4	10791	<i>VAMP5</i>	vesicle associated membrane protein 5	-1,60	0,020
ENSG00000111300.9	80018	<i>NAA25</i>	N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	-1,59	0,0237
ENSG00000096401.7	988	<i>CDC5L</i>	cell division cycle 5 like	-1,58	0,0201
ENSG00000160145.15	8997	<i>KALRN</i>	kalirin RhoGEF kinase	-1,56	0,0406
ENSG00000082397.17	23136	<i>EPB41L3</i>	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3	-1,56	0,0174
ENSG00000266094.7	83593	<i>RASSF5</i>	Ras association domain family member 5	-1,56	0,044
ENSG00000131069.19	55902	<i>ACSS2</i>	acyl-CoA synthetase short chain family member 2	-1,55	0,0315
ENSG00000095059.15	1725	<i>DHPS</i>	deoxyhypusine synthase	-1,55	0,0276
ENSG00000171051.8	2357	<i>FPR1</i>	formyl peptide receptor 1	-1,52	0,021
ENSG00000198223.16	1438	<i>CSF2RA</i>	colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha	-1,52	0,035
ENSG00000136271.10	54606	<i>DDX56</i>	DEAD-box helicase 56	-1,51	0,0248
ENSG00000198898.13	830	<i>CAPZA2</i>	capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 2	-1,51	0,042
ENSG00000039319.16	9765	<i>ZFYVE16</i>	zinc finger FYVE-type containing 16	-1,51	0,0162
ENSG00000081665.13	440515	<i>ZNF506</i>	zinc finger protein 506	-1,50	0,0257
ENSG00000100365.14	4689	<i>NCF4</i>	neutrophil cytosolic factor 4	-1,50	0,0255
ENSG00000198642.6	55958	<i>KLHL9</i>	kelch like family member 9	-1,49	0,022
ENSG00000163946.13	23272	<i>TASOR</i>	transcription activation suppressor	-1,48	0,0297
ENSG00000001631.15	889	<i>KRIT1</i>	KRIT1 ankyrin repeat containing	-1,48	0,0430

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000154874.15	284047	<i>CCDC144B</i>	coiled-coil domain containing 144B, pseudogene	-1,46	0,0354
ENSG00000152620.12	133686	<i>NADK2</i>	NAD kinase 2	-1,45	0,0311
ENSG00000163947.11	50650	<i>ARHGEF3</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	-1,45	0,0192
ENSG00000151883.17	79668	<i>PARP8</i>	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8	-1,45	0,0203
ENSG00000075884.13	55843	<i>ARHGAP15</i>	Rho GTPase activating protein 15	-1,45	0,0378
ENSG00000198055.10	2870	<i>GRK6</i>	G protein-coupled receptor kinase 6	-1,45	0,009
ENSG00000213492.2	90859	<i>NT5C3AP1</i>	NT5C3A pseudogene 1	-1,44	0,032
ENSG00000009790.14	80342	<i>TRAF3IP3</i>	TRAF3 interacting protein 3	-1,43	0,0232
ENSG00000104870.12	2217	<i>FCGRT</i>	Fc gamma receptor and transporter	-1,43	0,0480
ENSG00000116497.17	64766	<i>S100PBP</i>	S100P binding protein	-1,42	0,0106
ENSG00000213064.9	375035	<i>SFT2D2</i>	SFT2 domain containing 2	-1,41	0,035
ENSG00000007392.16	55692	<i>LUC7L</i>	LUC7 like	-1,40	0,0418
ENSG00000112773.15	55603	<i>TENT5A</i>	terminal nucleotidyltransferase 5A	-1,40	0,0341
ENSG00000177674.15	57085	<i>AGTRAP</i>	angiotensin II receptor associated protein	-1,40	0,045
ENSG00000132965.9	241	<i>ALOX5AP</i>	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	-1,40	0,0305
ENSG00000113916.17	604	<i>BCL6</i>	BCL6 transcription repressor	-1,40	0,0405
ENSG00000110931.18	10645	<i>CAMKK2</i>	calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2	-1,40	0,0329
ENSG00000223960.6	101927027	<i>CHROMR</i>	cholesterol induced regulator of metabolism RNA	-1,39	0,013
ENSG00000230202.1	387101	<i>RPL29P4</i>	ribosomal protein L29 pseudogene 4	-1,38	0,031
ENSG00000116062.14	2956	<i>MSH6</i>	mutS homolog 6	-1,37	0,0186
ENSG00000148842.17	54805	<i>CNNM2</i>	cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 2	-1,37	0,0086
ENSG00000182487.12	654816	<i>NCF1B</i>	neutrophil cytosolic factor 1B pseudogene	-1,36	0,037
ENSG00000119979.16	404636	<i>DENND10</i>	DENN domain containing 10	-1,35	0,0229
ENSG00000093167.17	9209	<i>LRRFIP2</i>	LRR binding FLII interacting protein 2	-1,34	0,0157
ENSG00000110324.10	3587	<i>IL10RA</i>	interleukin 10 receptor subunit alpha	-1,34	0,0341
ENSG00000086300.15	29887	<i>SNX10</i>	sorting nexin 10	-1,33	0,0212
ENSG00000040933.15	3631	<i>INPP4A</i>	inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A	-1,33	0,0211
ENSG00000196911.10	3841	<i>KPNA5</i>	karyopherin subunit alpha 5	-1,33	0,046

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000204577.11	11025	<i>LILRB3</i>	leukocyte immunoglobulin like receptor B3	-1,32	0,019
ENSG00000065923.9	84679	<i>SLC9A7</i>	solute carrier family 9 member A7	-1,31	0,0353
ENSG00000166275.15	119032	<i>BORCS7</i>	BLOC-1 related complex subunit 7	-1,31	0,0243
ENSG00000185278.15	84614	<i>ZBTB37</i>	zinc finger and BTB domain containing 37	-1,29	0,021
ENSG00000086102.18	4799	<i>NFX1</i>	nuclear transcription factor, X-box binding 1	-1,29	0,0153
ENSG00000177853.14	9849	<i>ZNF518A</i>	zinc finger protein 518A	-1,29	0,018
ENSG00000118482.11	23469	<i>PHF3</i>	PHD finger protein 3	-1,28	0,0393
ENSG00000115419.12	2744	<i>GLS</i>	glutaminase	-1,28	0,0332
ENSG00000135541.20	54806	<i>AHL1</i>	Abelson helper integration site 1	-1,28	0,0197
ENSG00000100991.11	26133	<i>TRPC4AP</i>	transient receptor potential cation channel subfamily C member 4 associated protein	-1,27	0,0404
ENSG00000131378.13	23180	<i>RFTN1</i>	raftlin, lipid raft linker 1	-1,27	0,0220
ENSG00000116254.17	26038	<i>CHD5</i>	chromodomain helicase DNA binding protein 5	-1,27	0,0192
ENSG00000168961.16	3965	<i>LGALS9</i>	galectin 9	-1,27	0,024
ENSG00000124198.8	10564	<i>ARFGEF2</i>	ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 2	-1,27	0,0290
ENSG00000099219.13	79956	<i>ERMP1</i>	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	-1,26	0,0240
ENSG00000144040.12	94097	<i>SFXN5</i>	sideroflexin 5	-1,26	0,0286
ENSG00000115271.10	25801	<i>GCA</i>	grancalcin	-1,26	0,0061
ENSG00000023892.10	50619	<i>DEF6</i>	DEF6 guanine nucleotide exchange factor	-1,21	0,0217
ENSG00000092964.17	1808	<i>DPYSL2</i>	dihydropyrimidinase like 2	-1,21	0,0263
ENSG00000128563.13	79706	<i>PRKRIP1</i>	PRKR interacting protein 1	-1,20	0,0154
ENSG00000181852.17	10193	<i>RNF41</i>	ring finger protein 41	-1,20	0,026
ENSG00000061676.14	10787	<i>NCKAP1</i>	NCK associated protein 1	-1,19	0,0308
ENSG00000077984.5	8530	<i>CST7</i>	cystatin F	-1,19	0,0266
ENSG00000163754.17	2992	<i>GYG1</i>	glycogenin 1	-1,19	0,0224
ENSG00000168234.12	125488	<i>TTC39C</i>	tetratricopeptide repeat domain 39C	-1,19	0,015
ENSG00000059378.12	64761	<i>PARP12</i>	poly(ADP-ribose) polymerase family member 12	-1,19	0,0327
ENSG00000169403.11	5724	<i>PTAFR</i>	platelet activating factor receptor	-1,18	0,022
ENSG00000196369.10	647135	<i>SRGAP2B</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B	-1,17	0,020

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000196873.15	220869	<i>ZNG1E</i>	Zn regulated GTPase metalloprotein activator 1E	-1,17	0,003
ENSG00000112079.8	11329	<i>STK38</i>	serine/threonine kinase 38	-1,17	0,0490
ENSG00000065882.15	23216	<i>TBC1D1</i>	TBC1 domain family member 1	-1,16	0,0343
ENSG00000145860.11	153830	<i>RNF145</i>	ring finger protein 145	-1,16	0,0302
ENSG00000243199.1	642828	<i>RPL6P10</i>	ribosomal protein L6 pseudogene 10	-1,16	0,035
ENSG00000043462.11	3937	<i>LCP2</i>	lymphocyte cytosolic protein 2	-1,16	0,0280
ENSG00000188827.10	84464	<i>SLX4</i>	SLX4 structure-specific endonuclease subunit	-1,15	0,021
ENSG00000166035.10	3990	<i>LIPC</i>	lipase C, hepatic type	-1,14	0,0227
ENSG00000134954.14	2113	<i>ETS1</i>	ETS proto-oncogene 1, transcription factor	-1,14	0,0254
ENSG00000123384.13	4035	<i>LRP1</i>	LDL receptor related protein 1	-1,13	0,0182
ENSG00000164307.12	51752	<i>ERAP1</i>	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-1,12	0,0468
ENSG00000158517.13	653361	<i>NCF1</i>	neutrophil cytosolic factor 1	-1,12	0,0327
ENSG00000141556.20	6904	<i>TBCD</i>	tubulin folding cofactor D	-1,12	0,0499
ENSG00000171490.12	26156	<i>RSL1D1</i>	ribosomal L1 domain containing 1	-1,12	0,031
ENSG00000244716.3	100132742	<i>RPL17P7</i>	ribosomal protein L17 pseudogene 7	-1,11	0,022
ENSG00000163719.19	64419	<i>MTMR14</i>	myotubularin related protein 14	-1,10	0,0276
ENSG00000188549.12	388115	<i>CCDC9B</i>	coiled-coil domain containing 9B	-1,10	0,043
ENSG00000174720.15	51574	<i>LARP7</i>	La ribonucleoprotein 7, transcriptional regulator	-1,09	0,029
ENSG00000170142.11	7324	<i>UBE2E1</i>	ubiquitin conjugating enzyme E2 E1	-1,09	0,034
ENSG00000031003.10	51306	<i>FAM13B</i>	family with sequence similarity 13 member B	-1,09	0,0226
ENSG00000136813.14	23392	<i>ECPAS</i>	Ecm29 proteasome adaptor and scaffold	-1,09	0,0282
ENSG00000160294.10	8888	<i>MCM3AP</i>	minichromosome maintenance complex component 3 associated protein	-1,08	0,0409
ENSG00000215252.11	440270	<i>GOLGA8B</i>	golgin A8 family member B	-1,08	0,026
ENSG00000136193.16	9805	<i>SCRN1</i>	secernin 1	-1,07	0,0336
ENSG00000164305.18	836	<i>CASP3</i>	caspase 3	-1,06	0,0286
ENSG00000186469.8	54331	<i>GNG2</i>	G protein subunit gamma 2	-1,06	0,023
ENSG00000197852.9	55924	<i>INKA2</i>	inka box actin regulator 2	-1,06	0,020
ENSG00000147036.11	347404	<i>LANCL3</i>	LanC like family member 3	-1,04	0,0193

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epithelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

ENSG00000175115.11	55690	<i>PACS1</i>	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	-1,04	0,038
ENSG00000225205.5	124900513	<i>PDK1-AS1</i>	PDK1 And ITGA6 Antisense RNA 1	-1,03	0,041
ENSG00000127533.3	9002	<i>F2RL3</i>	F2R like thrombin or trypsin receptor 3	-1,02	0,0200
ENSG00000135905.18	55619	<i>DOCK10</i>	dedicator of cytokinesis 10	-1,02	0,0219
ENSG00000140992.18	5170	<i>PDPK1</i>	3-phosphoinositide dependent protein kinase 1	-1,02	0,0187
ENSG00000111911.6	135114	<i>HINT3</i>	histidine triad nucleotide binding protein 3	-1,02	0,0291
ENSG00000134982.16	324	<i>APC</i>	APC regulator of WNT signaling pathway	-1,01	0,0320
ENSG00000139370.11	121260	<i>SLC15A4</i>	solute carrier family 15 member 4	-1,01	0,0410
ENSG00000155256.17	118813	<i>ZFYVE27</i>	zinc finger FYVE-type containing 27	-1,01	0,0495
ENSG00000120733.13	51780	<i>KDM3B</i>	lysine demethylase 3B	1,94	0,0224
ENSG00000273749.4	23191	<i>CYFIP1</i>	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	3,09	0,0280

Tabela U2. Lista procesów zahamowanych w tCTCs.

Proces	Zaangażowane geny	FE	FDR
GO:0045730~respiratory burst	<i>CD52, CYBA, CYBB, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, RAC2, SLC11A1</i>	24,12	8,31E-07
GO:0043020~NADPH oxidase complex	<i>CYBA, CYBB, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, RAC2</i>	18,25	4,39E-05
R-HSA-1236973~Cross-presentation of particulate exogenous antigens (phagosomes)	<i>CYBA, CYBB, NCF2, NCF4</i>	17,42	1,62E-02
GO:0002503~peptide antigen assembly with MHC class II protein complex	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	16,08	5,02E-03
GO:0005885~Arp2/3 protein complex	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4</i>	15,64	1,79E-02
GO:0046598~positive regulation of viral entry into host cell	<i>CD4, CD74, HLA-DRB1, LGALS9, TRIM38</i>	15,19	2,99E-02
GO:0015935~small ribosomal subunit	<i>FAU, RPS18, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS9</i>	15,08	3,52E-06
R-HSA-202427~Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	<i>CD4, CSK, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, PAG1, PTPN22, PTPRC</i>	14,25	2,36E-06
GO:0002181~cytoplasmic translation	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	14,02	4,34E-20
GO:2000406~positive regulation of T cell migration	<i>AIF1, CORO1A, DOCK8, ITGA4, SPN, TNFRSF14</i>	13,67	1,02E-02
GO:0002504~antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	13,67	1,02E-02
GO:0022626~cytosolic ribosome	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS3, RPS8, RPS9</i>	13,62	7,34E-20
GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	<i>FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	12,98	1,00E-08
GO:0071556~integral component of lumenal side of endoplasmic reticulum membrane	<i>CANX, CD74, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HM13, TAPBP</i>	12,94	5,29E-05
GO:0098553~lumenal side of endoplasmic reticulum membrane	<i>CANX, CD74, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HM13, TAPBP</i>	12,94	5,29E-05

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

GO:0042613~MHC class II protein complex	<i>CD74, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	12,63	3,15E-04
GO:0023026~MHC class II protein complex binding	<i>CD4, CD74, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	12,34	4,23E-04
R-HSA-9735869~SARS-CoV-1 modulates host translation machinery	<i>FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	12,24	6,88E-09
GO:0001891~phagocytic cup	<i>AIF1, ANXA1, ARHGAP25, BIN2, CORO1A, LCPI, RAB11FIP2</i>	11,73	4,73E-04
R-HSA-5668599~RHO GTPases Activate NADPH Oxidases	<i>CYBA, CYBB, NCF2, NCF4, PRKCB, RAC2, S100A8, S100A9</i>	11,61	7,64E-05
GO:0007159~leukocyte cell-cell adhesion	<i>ITGA4, ITGAL, ITGB2, PECAM1, PTPRC, ROCK1, SELL, SYK</i>	11,39	1,29E-03
GO:0019886~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	<i>CD74, CTSS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	11,39	1,29E-03
GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	<i>RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9</i>	11,35	2,08E-09
R-HSA-202430~Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	<i>CD4, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, PTPN22</i>	11,00	2,84E-03
GO:0042554~superoxide anion generation	<i>CYBA, CYBB, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4</i>	10,93	2,36E-02
R-HSA-2730905~Role of LAT2/NTAL/LAB on calcium mobilization	<i>FYN, LYN, PDPK1, PIK3R1, SYK</i>	10,89	1,30E-02
R-HSA-156902~Peptide chain elongation	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,84	1,40E-18
R-HSA-192823~Viral mRNA Translation	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,84	1,40E-18
R-HSA-156842~Eukaryotic Translation Elongation	<i>EEF1B2, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,75	8,15E-19
GO:0050870~positive regulation of T cell activation	<i>CCDC88B, CD4, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	10,72	1,66E-03
R-HSA-975956~Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	<i>EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,52	8,65E-19

R-HSA-2408557~Selenocysteine synthesis	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,38	2,70E-18
R-HSA-72764~Eukaryotic Translation Termination	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,38	2,70E-18
R-HSA-72695~Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	<i>EIF2S3, EIF3E, FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	10,05	3,85E-09
R-HSA-9633012~Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency	<i>EIF2S3, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,91	2,44E-18
R-HSA-72689~Formation of a pool of free 40S subunits	<i>EIF3E, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,91	2,44E-18
R-HSA-156827~L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,64	8,15E-19
R-HSA-72706~GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,56	8,15E-19
R-HSA-912631~Regulation of signaling by CBL	<i>CBL, FYN, LYN, PIK3R1, RPS27A, SYK</i>	9,50	5,06E-03
R-HSA-72702~Ribosomal scanning and start codon recognition	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,45	2,15E-09
R-HSA-72649~Translation initiation complex formation	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,45	2,15E-09
R-HSA-72662~Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,29	2,72E-09
GO:0019882~antigen processing and presentation	<i>CD74, CTSH, CTSS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	9,11	1,29E-03
R-HSA-389948~PD-1 signaling	<i>CD4, CSK, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	9,09	6,22E-03
R-HSA-927802~Nonsense-Mediated Decay (NMD)	<i>EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SMG1</i>	9,01	6,36E-18

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

R-HSA-975957~Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	<i>EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SMG1</i>	9,01	6,36E-18
R-HSA-72737~Cap-dependent Translation Initiation	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,00	2,40E-18
R-HSA-72613~Eukaryotic Translation Initiation	<i>EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	9,00	2,40E-18
R-HSA-1799339~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SPCS3</i>	8,94	3,40E-17
R-HSA-9754678~SARS-CoV-2 modulates host translation machinery	<i>FAU, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	8,88	3,91E-07
GO:0042788~polysomal ribosome	<i>RPL10A, RPL18A, RPL32, RPL6, RPL7A, RPS29</i>	8,80	6,30E-03
GO:0050778~positive regulation of immune response	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, SYK</i>	8,62	1,90E-02
GO:0004715~non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	<i>BAZ1B, CLK1, CSK, FGR, FYN, JAK1, LYN, PTK2B, SYK</i>	8,45	1,19E-03
R-HSA-2408522~Selenoamino acid metabolism	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	8,20	1,59E-15
R-HSA-9013422~RHOBTB1 GTPase cycle	<i>ROCK1, SPEN, SRRM1, TRA2B, VIM</i>	7,57	4,61E-02
GO:0031295~T cell costimulation	<i>CARD11, CSK, FYN, LYN, PDPK1, SPN, TNFRSF14</i>	7,42	3,66E-02
R-HSA-9607240~FLT3 Signaling	<i>CBL, CSK, FYN, GRB10, PIK3R1, RPS27A, SH2B3, SYK</i>	7,33	1,63E-03
hsa05140:Leishmaniasis	<i>CYBA, CYBB, FOS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IRAK4, ITGA4, ITGB2, JAK1, NCF2, NCF4, PRKCB</i>	7,30	2,29E-07
GO:0005840~ribosome	<i>CANX, FAU, RPL10, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL37, RPL5, RPL6, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS6KA3, RPS8, RPS9, SF1</i>	7,28	6,36E-13
R-HSA-168273~Influenza Viral RNA Transcription and Replication	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	7,17	5,20E-14
GO:0006909~phagocytosis	<i>ANXA1, CORO1A, ITGAL, ITGB2, LRP1, NCF2, NCF4, PECAM1, RAB11FIP2, SLC11A1, SLTM</i>	7,16	1,03E-03
GO:0031623~receptor internalization	<i>DNM3, GRK2, GRK3, ITC, ITGB2, LRP1, SNX1, SYK</i>	7,15	1,68E-02

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

R-HSA-9692914~SARS-CoV-1-host interactions	<i>FAU, ITCH, KPNB1, MAVS, PDPK1, RCAN3, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SMAD4</i>	6,90	5,48E-09
R-HSA-168255~Influenza Infection	<i>CANX, CLTA, FAU, KPNB1, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	6,88	3,87E-15
hsa05310:Asthma	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	6,80	1,44E-02
R-HSA-1222556~ROS and RNS production in phagocytes	<i>ATP6V1C1, CYBA, CYBB, NCF2, NCF4, RAC2, SLC11A1</i>	6,77	7,41E-03
R-HSA-9711097~Cellular response to starvation	<i>ATP6V1C1, EIF2S3, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	6,66	3,82E-14
R-HSA-3928662~EPHB-mediated forward signaling	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, FYN, KALRN, LYN, ROCK1</i>	6,64	2,96E-03
GO:0030658~transport vesicle membrane	<i>CD74, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, SORL1</i>	6,55	1,94E-02
R-HSA-512988~Interleukin-3, Interleukin-5 and GM-CSF signaling	<i>CBL, CSF2RA, FYN, IL2RG, JAK1, LYN, PIK3R1, RPS27A, SYK</i>	6,53	1,12E-03
GO:0003735~structural constituent of ribosome	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	6,37	8,87E-12
hsa05416:Viral myocarditis	<i>EIF4G1, EIF4G3, FYN, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGAL, ITGB2, RAC2</i>	6,29	9,34E-05
GO:0005771~multivesicular body	<i>CD63, CD74, CHMP1A, CST7, SORL1, TPT1</i>	6,26	2,33E-02
GO:0006412~translation	<i>EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, WARS1</i>	6,24	9,53E-12
GO:0001772~immunological synapse	<i>CARD11, CD37, CD53, CORO1A, HLA-DRA, HLA-DRB1</i>	6,12	2,52E-02
GO:0042102~positive regulation of T cell proliferation	<i>AIF1, ANXA1, CARD11, CCDC88B, CORO1A, HLA-DMB, HLA-DPA1, PTPRC, SPN</i>	6,03	1,68E-02
R-HSA-114604~GPVI-mediated activation cascade	<i>FYN, LYN, PDPK1, PIK3R1, RAC2, SYK</i>	5,97	3,80E-02
hsa03010:Ribosome	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	5,89	1,44E-11
R-HSA-9010553~Regulation of expression of SLITs and ROBOs	<i>EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	5,87	2,86E-12

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

GO:0070821~tertiary granule membrane	<i>CD53, CYBA, CYBB, ITGB2, KCNAB2, LAIR1, RAP2B, SLC11A1, VAMP8</i>	5,79	2,59E-03
GO:0031234~extrinsic component of cytoplasmic side of plasma membrane	<i>CYTH1, ESYT1, FGR, FYN, JAK1, KCNAB2, LYN, PTK2B, SYK</i>	5,71	2,66E-03
GO:0030666~endocytic vesicle membrane	<i>CD74, CSF3R, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, LRP1, LYN, RPS27A</i>	5,71	2,66E-03
GO:0035579~specific granule membrane	<i>AP1M1, CD53, CYBA, CYBB, ITGAL, ITGB2, KCNAB2, LAIR1, RAP2B, TNFRSF1B, VAMP8</i>	5,67	4,73E-04
hsa05171:Coronavirus disease - COVID-19	<i>CYBB, FAU, FOS, IL6R, IRAK4, JAK1, MAVS, PIK3R1, PRKCB, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SYK</i>	5,60	5,50E-15
GO:0035577~azurophil granule membrane	<i>BRI3, CD63, DNAJC13, FPR1, GLIPR1, IRAG2, VAMP8</i>	5,57	1,56E-02
R-HSA-388841~Costimulation by the CD28 family	<i>CD4, CSK, FYN, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, LYN, PDPK1, PIK3R1, TNFRSF14</i>	5,55	5,02E-04
hsa05330:Allograft rejection	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	5,55	2,79E-02
R-HSA-451927~Interleukin-2 family signaling	<i>CSF2RA, IL2RG, JAK1, LGALS9, PIK3R1, PTK2B, SYK</i>	5,54	2,00E-02
R-HSA-6791226~Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	<i>FAU, FBL, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	5,46	1,71E-11
R-HSA-9664422~FCGR3A-mediated phagocytosis	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, FGR, FYN, LYN, MYO5A, SYK</i>	5,31	4,03E-03
R-HSA-9664407~Parasite infection	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, FGR, FYN, LYN, MYO5A, SYK</i>	5,31	4,03E-03
R-HSA-9664417~Leishmania phagocytosis	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, FGR, FYN, LYN, MYO5A, SYK</i>	5,31	4,03E-03
R-HSA-8868773~rRNA processing in the nucleus and cytosol	<i>FAU, FBL, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	5,18	5,99E-11
R-HSA-9678108~SARS-CoV-1 Infection	<i>CANX, FAU, ITCH, KPNB1, MAVS, PDPK1, RCAN3, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SMAD4, ST6GAL1</i>	5,15	9,92E-08
GO:0030670~phagocytic vesicle membrane	<i>ATG12, CORO1A, CYBA, CYBB, RAB8A, RAC2, SLC11A1, TAPBP, VAMP8</i>	5,15	4,65E-03
hsa05332:Graft-versus-host disease	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	5,02	3,91E-02
hsa04672:Intestinal immune network for IgA production	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGA4</i>	5,02	1,92E-02
GO:0032040~small-subunit processome	<i>FBL, PRKDC, RPS11, RPS14, RPS19, RPS27A, RPS8, RPS9</i>	5,01	1,12E-02

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

hsa04612:Antigen processing and presentation	<i>CANX, CD4, CD74, CTSS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, TAPBP</i>	4,96	1,37E-03
R-HSA-376176~Signaling by ROBO receptors	<i>CAP1, EIF4G1, FAU, PFN1, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	4,93	3,34E-11
R-HSA-72312~rRNA processing	<i>FAU, FBL, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	4,93	1,94E-10
hsa04940:Type I diabetes mellitus	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	4,90	4,21E-02
hsa04659:Th17 cell differentiation	<i>CD4, FOS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IL2RG, IL6R, JAK1, NFATC1, PPP3CA, SMAD4, TGFB2</i>	4,88	9,08E-05
GO:0034774~secretory granule lumen	<i>ARHGAP9, BIN2, COTL1, CTSH, FCN1, FGR, GMFG, GYG1, ROCK1, S100A8, S100A9, SERPINB1</i>	4,85	7,22E-04
GO:0005884~actin filament	<i>AIF1, ANXA1, CORO1A, COTL1, FYN, LCPI, MYO5A, PSTPIP1, RAC2, RCSD1</i>	4,74	3,77E-03
GO:0030669~clathrin-coated endocytic vesicle membrane	<i>CD4, CD74, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, VAMP8</i>	4,69	3,04E-02
GO:0035578~azurophil granule lumen	<i>ACTR2, CAP1, CTSC, GCA, GNS, GRN, LYZ, MNDA, PLAC8</i>	4,64	7,65E-03
hsa04658:Th1 and Th2 cell differentiation	<i>CD4, FOS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IL2RG, JAK1, NFATC1, PPP3CA</i>	4,58	1,25E-03
GO:0045335~phagocytic vesicle	<i>CORO1A, CTSS, CYBB, MPEG1, RAB8A, SRGAP2B, VIM</i>	4,56	3,29E-02
GO:0032588~trans-Golgi network membrane	<i>AP1M1, CD74, CLTA, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, MARCHF1, RAB8A, VPS53</i>	4,39	5,81E-03
R-HSA-9013404~RAC2 GTPase cycle	<i>ARHGAP17, CYBA, CYBB, DOCK2, ESYT1, NCF2, NCF4, PIK3R1, RAC2, TAOK3, TMPO</i>	4,35	3,47E-03
GO:0005925~focal adhesion	<i>ACTR2, ACTR3, ANXA1, APBB1IP, ARPC2, CAP1, CBL, CYBA, HNRNPK, HSP90B1, IL16, ITGA4, ITGB2, JAK1, LCPI, LRP1, PDPK1, PFN1, PTK2B, PTPRA, PTPRC, RAC2, RPL10A, RPL22, RPL23, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SYNE2, VIM</i>	4,32	3,08E-12
hsa05321:Inflammatory bowel disease	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IL2RG, NFATC1</i>	4,32	1,87E-02
hsa04670:Leukocyte transendothelial migration	<i>CYBA, CYBB, GNAI3, ITGA4, ITGAL, ITGB2, NCF2, NCF4, PECAM1, PIK3R1, PRKCB, PTK2B, RAC2, ROCK1</i>	4,28	6,06E-04
hsa04640:Hematopoietic cell lineage	<i>CD37, CD4, CSF2RA, CSF3R, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IL6R, ITGA4</i>	4,26	1,90E-03
hsa04662:B cell receptor signaling pathway	<i>BANK1, CARD11, FOS, LYN, NFATC1, PIK3R1, PPP3CA, PRKCB, RAC2, SYK</i>	4,18	7,46E-03
GO:0004713~protein tyrosine kinase activity	<i>BAZ1B, CLK1, CSK, FGR, FYN, HIPK1, JAK1, LYN, PTK2B, SLTM, SYK</i>	4,17	2,87E-02

GO:1904813~ficolin-1-rich granule lumen	<i>ACTR2, BIN2, COTL1, CTSH, CTSS, FCN1, GMFG, GNS, GYG1, KPNB1, MNDA</i>	4,13	4,65E-03
GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	<i>CDC5L, HNRNPH1, HNRNPK, PNN, SF3B1, SNRNP200, SRRM1, ZCCHC8</i>	4,08	2,91E-02
R-HSA-72766~Translation	<i>EEF1B2, EIF2S3, EIF3E, EIF4G1, FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SPCS3, WARS1</i>	4,06	4,47E-10
R-HSA-2029480~Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, FGR, FYN, LYN, MYO5A, PIK3R1, SYK</i>	4,05	1,11E-02
GO:0043123~positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	<i>AKAP13, ATP2C1, CARD11, CARD16, CD4, CD74, FYN, HLA-DRB1, IRAK4, LGALS9, LITAF, MAVS, MIB2, PRKCB, TMED4, TRIM22, TRIM38, ZDHHC17</i>	4,00	1,03E-03
R-HSA-2132295~MHC class II antigen presentation	<i>AP1M1, CANX, CAPZA1, CD74, CLTA, CTSC, CTSH, CTSS, DNMT3, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>	3,97	9,74E-04
R-HSA-6785807~Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	<i>ANXA1, FOS, HSP90B1, IL2RG, IL6R, ITGB2, JAK1, MCL1, PIK3R1, TNFRSF1B, VIM, ZEB1</i>	3,87	4,03E-03
GO:0005681~spliceosomal complex	<i>CDC5L, HNRNPK, IVNS1ABP, PNN, PRKRIP1, SF1, SF3B1, SNRNP200, SREK1, SRRM1, TRA2B</i>	3,80	7,35E-03
hsa05323:Rheumatoid arthritis	<i>ATP6V1C1, FOS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGAL, ITGB2</i>	3,78	1,25E-02
R-HSA-202403~TCR signaling	<i>CARD11, CD4, CSK, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, PAG1, PDPK1, PIK3R1, PTPN22, PTPRC, RPS27A</i>	3,77	2,91E-03
R-HSA-9013423~RAC3 GTPase cycle	<i>ARHGAP15, ARHGAP17, CYBA, CYBB, ESYT1, NCF2, NCF4, PIK3R1, TAOK3, TMPO</i>	3,71	1,98E-02
GO:0031902~late endosome membrane	<i>CD63, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, MARCHF1, OSBPL11, SLC11A1, SNX14, VAMP8</i>	3,70	5,36E-03
hsa05150:Staphylococcus aureus infection	<i>FPR1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGAL, ITGB2, SELPLG</i>	3,66	1,44E-02
hsa05100:Bacterial invasion of epithelial cells	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CBL, CLTA, DNMT3, PIK3R1</i>	3,65	3,80E-02
R-HSA-1236975~Antigen processing-Cross presentation	<i>CTSS, CYBA, CYBB, LNPEP, NCF2, NCF4, RPS27A, S100A8, S100A9, TAPBP, VAMP8</i>	3,65	1,20E-02
hsa04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, LYN, PIK3R1, PRKCB, PTPRC, RAC2, SYK</i>	3,62	1,44E-02
GO:0010008~endosome membrane	<i>ANXA1, CD63, DNAJC13, FCGRT, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IRAK4, LEPROT, NCF4, RPS27A, SLC9A7, SNX1, SORL1, TM9SF2, VPS13A, VPS29, VPS53</i>	3,61	5,29E-05
hsa05135:Yersinia infection	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CD4, FOS, IRAK4, ITGA4, NFATC1, PIK3R1, PTK2B, RAC2, ROCK1, RPS6KA3</i>	3,59	2,18E-03
GO:0045121~membrane raft	<i>CARD11, CBL, CD4, CSK, EFHD2, FYN, GNAI3, LDHB, LYN, PAG1, PECAM1, PTK2B, PTPRC, RAP2B, S100A10, SLC25A5, TGFB2, TNFRSF1B, TPP1</i>	3,58	1,61E-04

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

hsa04514:Cell adhesion molecules	<i>CD4, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGA4, ITGAL, ITGB2, PECAM1, PTPRC, SELL, SELPLG, SPN, VCAN</i>	3,56	1,03E-03
R-HSA-4420097~VEGFA-VEGFR2 Pathway	<i>CYBA, CYBB, FYN, NCF2, NCF4, PDPK1, PIK3R1, PRKCB, PTK2B, ROCK1</i>	3,52	2,74E-02
GO:0014069~postsynaptic density	<i>ACTR2, BCL11A, DNM3, EIF3E, FYN, INPP4A, KALRN, LYN, PDPK1, PHB2, PTK2B, RAB8A, RPL14, RPL6, RPS14, RPS18, RPS19, RPS25, RPS3, SRGAP2B</i>	3,49	1,31E-04
hsa04145:Phagosome	<i>ATP6V1C1, CANX, CORO1A, CTSS, CYBA, CYBB, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITGB2, NCF2, NCF4</i>	3,47	1,90E-03
hsa04142:Lysosome	<i>AP1M1, CD63, CLTA, CTSC, CTSH, CTSS, DMXL2, GNPTAB, GNS, LAPTM5, LITAF, SLC11A1, TPP1</i>	3,46	5,16E-03
GO:0008380~RNA splicing	<i>CDC5L, FUS, IVNS1ABP, LUC7L3, PNN, PRKRIP1, RBM25, RSRC1, SF3B1, SMU1, SON, SREK1, SREK1IP1, SRRM1, SRSF11, SUGP2</i>	3,45	1,11E-02
R-HSA-6798695~Neutrophil degranulation	<i>ACTR2, AP1M1, ARHGAP9, BIN2, BRI3, CAP1, CD53, CD63, COTL1, CTSC, CTSH, CTSS, CYBA, CYBB, DNAJC13, DOCK2, FCN1, FGR, FPR1, GCA, GLIPR1, GMFG, GNS, GRN, GYG1, IRAG2, ITGAL, ITGB2, KCNAB2, KPNB1, LAIR1, LYZ, MNDA, PECAM1, PLAC8, PTPRC, RAP2B, ROCK1, S100A8, S100A9, SELL, SERPINB1, SLC11A1, TMT1A, TNFRSF1B, TYROBP, VAMP8</i>	3,41	1,56E-11
GO:0030027~lamellipodium	<i>ABLIM1, ACTR2, ACTR3, AIF1, APBB1IP, ARPC2, CCDC88A, CORO1A, PSTPIP1, PTK2B, RAC2, ROCK1, SNX1, SRGAP2B</i>	3,39	3,84E-03
hsa04144:Endocytosis	<i>ACAP1, ACTR2, ACTR3, ARFGEF2, ARPC2, ARPC4, CAPZA1, CBL, CHMP1A, CLTA, CYTH1, DNM3, GRK2, GRK3, GRK6, IL2RG, ITCH, RAB11FIP2, RAB8A, RNF41, SNX1, TGFB2, VPS29, ZFYVE16</i>	3,37	3,40E-05
GO:0055037~recycling endosome	<i>ARFGEF2, DENND6A, MYO5A, SLC9A7, SORL1, TMEM230, TNIK, TPP1, VAMP8, VPS53</i>	3,33	2,77E-02
hsa05166:Human T-cell leukemia virus 1 infection	<i>ATM, CANX, CD4, FOS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IL2RG, ITGAL, ITGB2, JAK1, NFATC1, PIK3R1, PPP3CA, SLC25A5, SMAD4, TGFB2, TSPO</i>	3,32	1,51E-04
hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	<i>FYN, HCST, ITGAL, ITGB2, NFATC1, PIK3R1, PPP3CA, PRKCB, PTK2B, RAC2, SYK, TYROBP</i>	3,32	1,09E-02
GO:0005770~late endosome	<i>CD74, CST7, CTSS, GRN, HTT, MYO5A, RNF149, SLC11A1, SNX14, TMEM230, VPS29</i>	3,31	1,82E-02
GO:0016363~nuclear matrix	<i>ARID2, ATXN7, BCL11A, CHMP1A, PHB2, S100A10, SMC1A, SRRM1, VIM</i>	3,27	4,75E-02
GO:0005765~lysosomal membrane	<i>AP1M1, ATP6V1C1, CD63, CD74, CHMP1A, CSF3R, DNAJC13, GNAI3, GNB1, GNB4, GRN, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, LAPTM5, LITAF, LNPEP, LRP1, LYN, MARCHF1, SLC11A1, SNX14, TRAF3IP3, VAMP8, VPS13A</i>	3,24	7,24E-06
R-HSA-194138~Signaling by VEGF	<i>CYBA, CYBB, FYN, NCF2, NCF4, PDPK1, PIK3R1, PRKCB, PTK2B, ROCK1</i>	3,23	4,61E-02
R-HSA-9013149~RAC1 GTPase cycle	<i>ARHGAP15, ARHGAP17, ARHGAP25, ARHGAP30, ARHGAP4, ARHGAP9, CYBA, CYBB, DOCK2, DOCK8, ESYT1, KALRN, NCF2, NCF4, PIK3R1, TAOK3, TMPO</i>	3,20	1,55E-03
R-HSA-9658195~Leishmania infection	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CYBA, FGR, FYN, GNAI3, GNB1, GNB4, LYN, MYO5A, PSTPIP1, SYK, TXNIP</i>	3,19	4,03E-03

R-HSA-9824443~Parasitic Infection Pathways	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CYBA, FGR, FYN, GNAI3, GNB1, GNB4, LYN, MYO5A, PSTPIP1, SYK, TXNIP</i>	3,19	4,03E-03
hsa05145:Toxoplasmosis	<i>GNAI3, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IRAK4, JAK1, PDPK1</i>	3,17	2,79E-02
hsa04380:Osteoclast differentiation	<i>CYBA, FOS, FYN, JAK1, NCF2, NCF4, NFATC1, PIK3R1, PPP3CA, SYK, TGFB2, TYROBP</i>	3,12	1,44E-02
hsa04611:Platelet activation	<i>APBB1IP, FYN, GNAI3, LYN, PIK3R1, PLCB2, ROCK1, STIM1, SYK, TBXAS1, VAMP8</i>	3,12	2,02E-02
R-HSA-8856828~Clathrin-mediated endocytosis	<i>ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CBL, CD4, CLTA, DN3, FBNP1, GRK2, GRK3, RPS27A, VAMP8</i>	3,10	1,37E-02
R-HSA-422475~Axon guidance	<i>ABLIM1, ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CAP1, CLTA, DN3, EIF4G1, FAU, FYN, GRB10, KALRN, LYN, PFN1, PIK3R1, PITPNA, PTPRA, PTPRC, ROCK1, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS6KA3, RPS8, RPS9, TYROBP</i>	3,09	1,47E-10
GO:0006468~protein phosphorylation	<i>ATM, CSF2RA, CSK, FGR, FYN, GMFG, GRK2, GRK3, GRK6, HCST, HIPK1, JAK1, KALRN, LYN, MAP3K2, MAP3K5, PDPK1, PIK3R1, PRKCB, PRKDC, PTK2B, PTPRA, ROCK1, RSRC1, SMG1, STK17B, SYK, TAOK3, TGFB2, TNK1</i>	3,08	9,16E-05
GO:0051015~actin filament binding	<i>ABLIM1, ACTR2, ACTR3, AIF1, ARPC2, ARPC4, CAPZA1, CORO1A, COTL1, LCP1, LIMD2, MYO1F, MYO5A, PSTPIP1, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS6KA3, RPS8, RPS9, TYROBP</i>	2,97	2,87E-02
R-HSA-9675108~Nervous system development	<i>ABLIM1, ACTR2, ACTR3, ARPC2, ARPC4, CAP1, CLTA, DN3, EIF4G1, FAU, FYN, GRB10, KALRN, LYN, PFN1, PIK3R1, PITPNA, PTPRA, PTPRC, ROCK1, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS6KA3, RPS8, RPS9, TYROBP</i>	2,95	6,59E-10
hsa05152:Tuberculosis	<i>CD74, CORO1A, CTSS, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IRAK4, ITGB2, JAK1, LSP1, PPP3CA, SYK</i>	2,93	7,46E-03
R-HSA-9705683~SARS-CoV-2-host interactions	<i>FAU, IL17RA, JAK1, MAVS, PDPK1, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	2,92	4,03E-03
GO:0031410~cytoplasmic vesicle	<i>ACSBG1, AP1M1, ARFGF2, ARHGAP30, ATM, ATP6V1C1, CCDC88A, CLTA, COMMD7, CST7, DENND3, DENND4B, FBNP1, ITCH, LAPTM5, MPEG1, PDPK1, RAC2, SNX1, TMEM123</i>	2,89	1,38E-03
R-HSA-3858494~Beta-catenin independent WNT signaling	<i>AGO3, CLTA, GNB1, GNB4, NFATC1, PFN1, PLCB2, PPP3CA, PRKCB, RAC2, RPS27A, TNRC6A</i>	2,86	3,94E-02
hsa05170:Human immunodeficiency virus 1 infection	<i>AP1M1, ATM, CD4, FOS, GNAI3, GNB1, GNB4, IRAK4, NFATC1, PIK3R1, PPP3CA, PRKCB, PTK2B, RAC2, SAMHD1, TAPBP, TNFRSF1B</i>	2,82	5,16E-03
GO:0042995~cell projection	<i>ACTR2, ARPC2, ARPC4, BIN2, GRK3, HNRNPK, KCTD12, OGT, PDPK1, RAB11FIP2, RAC2, ZDHHC17</i>	2,82	3,04E-02
GO:0031901~early endosome membrane	<i>ANXA1, DNAJC13, HLA-DRA, INPP4A, ITCH, LDLRAD4, MARCHF1, RCC2, SNX1, SORL1, VAMP8, ZFYVE16</i>	2,79	3,21E-02

hsa05169:Epstein-Barr virus infection	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, IRAK4, ITGAL, JAK1, LYN, MAVS, PIK3R1, POLK, SYK, TAPBP, VIM</i>	2,78	7,46E-03
hsa04613:Neutrophil extracellular trap formation	<i>CYBA, CYBB, FPR1, ITGAL, ITGB2, MACROH2A1, NCF2, NCF4, PIK3R1, PLCB2, PRKCB, RAC2, SELPLG, SLC25A5, SYK</i>	2,76	1,16E-02
hsa04062:Chemokine signaling pathway	<i>DOCK2, FGR, GNAI3, GNB1, GNB4, GRK2, GRK3, GRK6, LYN, PIK3R1, PLCB2, PRKCB, PTK2B, RAC2, ROCK1</i>	2,75	1,16E-02
hsa05164:Influenza A	<i>HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HNRNPUL1, IRAK4, JAK1, MAVS, PIK3R1, PRKCB, SLC25A5</i>	2,67	2,38E-02
R-HSA-168249~Innate Immune System	<i>ACTR2, ACTR3, AP1M1, ARHGAP9, ARPC2, ARPC4, ATG12, ATP6V1C1, BIN2, BRI3, CAP1, CAPZA1, CARD11, CD4, CD53, CD63, COTL1, CTSC, CTSH, CTSS, CYBA, CYBB, DNAJC13, DNMT3, DOCK2, FCN1, FGR, FOS, FPR1, FYN, GCA, GLIPR1, GMFG, GNLY, GNS, GRN, GYG1, HSP90B1, IRAG2, IRAK4, ITCH, ITGAL, ITGB2, KCNAB2, KPNB1, LAIR1, LRRFIP1, LYN, LYZ, MAVS, MNDA, MYO5A, NCF2, NCF4, NFATC1, NLRC5, PDPK1, PECAM1, PIK3R1, PLAC8, PPP3CA, PRKDC, PSTPIP1, PTPRC, RAC2, RAP2B, ROCK1, RPS27A, RPS6KA3, S100A8, S100A9, SELL, SERPINB1, SLC11A1, SYK, TMT1A, TNFRSF1B, TXNIP, TYROBP, VAMP8</i>	2,61	4,18E-14
R-HSA-71291~Metabolism of amino acids and derivatives	<i>FAU, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9</i>	2,60	2,13E-04
hsa05415:Diabetic cardiomyopathy	<i>ATP5MC2, ATP5PD, CYBA, CYBB, NCF2, NCF4, NDUFA6, NDUFB3, NDUFB8, PIK3R1, PLCB2, PRKCB, RAC2, SLC25A5, TGFB2</i>	2,60	1,56E-02
GO:0005768~endosome	<i>ANXA1, ARPC2, CLEC18B, CST7, CYBA, FYN, GRN, IL2RG, JAK1, LEPROT, MARCHF1, RAB11FIP2, RAB8A, SLC11A1, SNX1, SORL1, TM9SF2, VPS29</i>	2,59	7,35E-03
GO:0005769~early endosome	<i>ANXA1, AP1M1, CD4, CHMP1A, CORO1A, HTT, ITCH, LRP1, MIB2, MYO5A, RCSD1, SERPINB1, SORL1, TMEM230, VAMP8, VPS29, ZFYVE16</i>	2,55	1,19E-02
GO:0003723~RNA binding	<i>AGO3, CANX, CDC5L, CELF2, CORO1A, DDX56, DEK, EIF3E, EIF4G1, EIF4G3, FAU, FBL, FUS, GPATCH8, GRN, HMGN2, HNRNPH1, HNRNPK, HNRNPUL1, HSP90B1, KCTD12, KPNB1, LRP1, LUC7L3, MYO5A, NELFB, NFX1, PDCD4, PFN1, PNISR, PNN, PRKDC, RBM25, RBMS1, RCAN3, RCC2, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SAMHD1, SELENOH, SETX, SF1, SF3B1, SLC25A5, SLTM, SMC1A, SMG1, SNRNP200, SON, SPEN, SREK1, SRRM1, SRSF11, SUGP2, TASOR, TCOF1, TNRC6A, TPD52L2, TPT1, TRA2B, TRMT1, ZCCHC8</i>	2,54	2,98E-13
R-HSA-1280218~Adaptive Immune System	<i>AP1M1, CANX, CAPZA1, CARD11, CD4, CD74, CLEC2B, CLTA, CSK, CTSC, CTSH, CTSS, CYBA, CYBB, DNMT3, ERAP1, FYN, HCST, HECTD3, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, ITCH, ITGA4, ITGAL, ITGB2, LAIR1, LNPEP, LYN, MIB2, NCF2, NCF4, NFATC1, PAG1, PDPK1, PIK3R1, PPP3CA, PRKCB, PTPN22, PTPRC, RNF220, RNF4, RNF41, RPS27A, S100A8, S100A9, SELL, STIM1, SYK, TAPBP, TNFRSF14, TYROBP, UBE2G1, VAMP8</i>	2,54	4,86E-09

Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno – mezenchymalnych u chorych na raka piersi

R-HSA-72163~mRNA Splicing - Major Pathway	<i>CDC5L, FUS, HNRNPH1, HNRNPK, LUC7L3, PNN, PRKRIP1, RBM25, SF1, SF3B1, SMU1, SNRNP200, SRRM1, SRSF11, TRA2B</i>	2,52	3,25E-02
GO:0015629~actin cytoskeleton	<i>ABLIM1, ACTR2, ACTR3, AKAP13, ARPC2, CAPZA1, FGR, KALRN, LCP1, LIMD2, LSP1, MYO1F, MYO5A, STK17B</i>	2,46	3,71E-02
hsa05417:Lipid and atherosclerosis	<i>CYBA, CYBB, FOS, HSP90B1, IRAK4, LYN, MAP3K5, MIB2, NCF2, NCF4, NFATC1, PDPK1, PIK3R1, PLCB2, PPP3CA</i>	2,45	2,31E-02
GO:0004712~protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	<i>ATM, BAZ1B, CLK1, CSK, FGR, FYN, HIPK1, IRAK4, JAK1, KALRN, LYN, MAP3K2, MAP3K5, PDPK1, PRKCB, PRKDC, PTK2B, ROCK1, RPS6KA3, SLTM, SMG1, STK17B, SYK, TAOK3, TNIK</i>	2,43	1,22E-02
R-HSA-449147~Signaling by Interleukins	<i>ANXA1, CANX, CAPZA1, CBL, CD4, CSF2RA, CSF3R, FOS, FPR1, FYN, HSP90B1, IL16, IL17RA, IL2RG, IL6R, IRAK4, ITGB2, JAK1, LCP1, LGALS9, LYN, MCL1, NLRC5, PDCD4, PIK3R1, PTPNA, PTK2B, RPS27A, RPS6KA3, SYK, TNFRSF1B, VIM, ZEB1</i>	2,43	1,17E-04
R-HSA-72172~mRNA Splicing	<i>CDC5L, FUS, HNRNPH1, HNRNPK, LUC7L3, PNN, PRKRIP1, RBM25, SF1, SF3B1, SMU1, SNRNP200, SRRM1, SRSF11, TRA2B</i>	2,43	4,41E-02
R-HSA-9012999~RHO GTPase cycle	<i>AKAP13, ARHGAP15, ARHGAP17, ARHGAP25, ARHGAP30, ARHGAP4, ARHGAP9, ARHGEF3, CCDC88A, CSK, CYBA, CYBB, DOCK2, DOCK8, EFHD2, ESYT1, FNBP1, KALRN, NCF2, NCF4, OSBPL11, PIK3R1, PTK2B, RAC2, ROCK1, SPEN, SRRM1, TAOK3, TMPO, TRA2B, VIM</i>	2,41	2,89E-04
GO:0005764~lysosome	<i>CD74, CST7, CTSC, CTSH, CTSS, FNBP1, GNS, GRN, HLA-DRA, LAPTM5, MARCHF1, MYO5A, SLC11A1, SNX1, SNX14, TPP1</i>	2,40	2,64E-02
GO:0035556~intracellular signal transduction	<i>AKAP13, ARFGEF2, ARHGEF3, FYN, IRAK4, JAK1, KALRN, LYN, MAP3K2, NFATC1, NLRC5, PAG1, PDPK1, PLCB2, PRKCB, ROCK1, RPS6KA3, SH2B3, SMAD4, STK17B, SYK, TAOK3, TNIK, TYROBP</i>	2,37	2,91E-02
R-HSA-5663205~Infectious disease	<i>ACTR2, ACTR3, AP1M1, ARPC2, ARPC4, CANX, CBL, CD4, CHMP1A, CLTA, CORO1A, CYBA, DOCK2, FAU, FGR, FYN, GNAI3, GNB1, GNB4, GTF2B, HNRNPK, IL17RA, IL6R, ITCH, ITGA4, JAK1, KPNB1, LYN, MAVS, MYO5A, NELFB, PACS1, PDPK1, PSTPIP1, RCAN3, ROCK1, RPL10, RPL10A, RPL13, RPL14, RPL18A, RPL22, RPL23, RPL32, RPL34, RPL35, RPL37, RPL5, RPL6, RPL7A, RPL9, RPS11, RPS14, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS27A, RPS29, RPS3, RPS8, RPS9, SLC25A5, SMAD4, SPCS3, ST6GAL1, SYK, TXNIP</i>	2,35	6,87E-10
hsa05163:Human cytomegalovirus infection	<i>AKAP13, GNAI3, GNB1, GNB4, IL6R, JAK1, NFATC1, PIK3R1, PLCB2, PPP3CA, PRKCB, PTK2B, RAC2, ROCK1, TAPBP</i>	2,34	3,09E-02

FE – ang. *fold enrichment*, krotność wzbogacenia

9. Spis tabel

Tabela 1.	Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy chorych na BC analizowanej retrospektywnie. _____	31
Tabela 2.	Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy chorych na BC analizowanej prospektywnie. _____	32
Tabela 3.	Sekwencje starterów użytych do ilościowego PCR. _____	36
Tabela 4.	Sekwencje starterów użytych do multipleksowego PCR w celu analizy jakości transkryptomu. _____	37
Tabela 5.	Skład mieszaniny odczynników do odwrotnej transkrypcji w pojedynczych komórkach. _____	47
Tabela 6.	Skład mieszaniny odczynników do preamplifikacji RNA z pojedynczych komórek. _____	47
Tabela 7.	Skład mieszaniny odczynników do multipleksowego PCR. _____	48
Tabela 8.	Skład mieszaniny odczynników do trawienia. _____	50
Tabela 9.	Skład mieszaniny odczynników do amplifikacji fragmentów cDNA znakowanych indeksowanymi adapterami. _____	50
Tabela 10.	Korelacje pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi a fenotypem EMT CTCs u chorych na BC. _____	57
Tabela 11.	Analiza jedno- i wieloczynnikowa ryzyka zgonu chorych na BC (n=72) uwzględniająca klasyczne cechy kliniczno-patologiczne w zależności od fenotypu występujących CTCs. _____	58
Tabela 12.	Korelacje pomiędzy cechami kliniczno-patologicznymi chorych na BC a obecnością CTCs o różnych fenotypach EMT. _____	69

10. Spis rycin

Rycina 1.	(A) Liczba zachorowań na nowotwory i zgonów z powodu nowotworów wśród kobiet w 2022 roku w Polsce i (B) na świecie. _____	13
Rycina 2.	Elementy kaskady metastatycznej (inwazja, intrawazacja, migracja w krążeniu, ekstrawazacja, kolonizacja) prowadzące do rozsiewu nowotworu. _____	20
Rycina 3.	Spektrum fenotypów CTCs powstających wskutek EMT wraz z wybranymi cechami charakterystycznymi: fenotyp epitelialny – adhezja, polarność, fenotyp epitelialno-mezenchymalny – plastyczność, fenotyp mezenchymalny – utrata polarności, reorganizacja cytoszkieletu, mobilność, macierzystość. ____	23
Rycina 4.	Procedura wzbogacenia, detekcji, izolacji i dalszej analizy transkryptomicznej pojedynczych CTCs o różnych fenotypach EMT od chorych na BC. _____	43
Rycina 5.	Schemat przedstawiający próbki od chorych na BC wyłączone i włączone do analizy ekspresji genów. _____	53
Rycina 6.	Status markerów BC, epitelialnych i mezenchymalnych w CTCs-EBFs zakwalifikowanych jako eCTCs (E), emCTCs (EM) i mCTCs (M). _____	54

- Rycina 7.** (A) Poziom ekspresji genów kodujących *SCGB2A2* i *ERBB2* oraz markery epitelialne (*KRT19*, *CDH1*), mezenchymalne (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*), (B) markery inwazyjności (*CXCR4*, *PLAUR*), macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*) i formowania klastrów (*JUP*) w próbkach CTCs-negatywnych, CTCs-pozytywnych oraz zdrowych kontrolach. _____ 55
- Rycina 8.** (A) Poziom ekspresji genów kodujących *SCGB2A2* i *ERBB2* oraz markery epitelialne (*KRT19*, *CDH1*), mezenchymalne (*VIM*, *CDH2*, *PLS3*), (B) markery inwazyjności (*CXCR4*, *PLAUR*), macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *ALDH1A1*, *POU5F1*, *PROM1*) i formowania klastrów (*JUP*) w próbkach CTCs-pozytywnych. _____ 56
- Rycina 9.** Wpływ obecności (A) oraz fenotypu CTCs (B) u chorych na BC na czas całkowitego przeżycia. _____ 58
- Rycina 10.** RRs epitelialnych (szare) i mezenchymalnych (grafitowe) komórek z linii BC izolowanych różnymi metodami. _____ 60
- Rycina 11.** Średnia różnica pomiędzy RRs epiBCs (koła) i mesBCs (kwadraty) uzyskanym wybranymi metodami oraz CellSearch®. _____ 61
- Rycina 12.** (A) Liczba PBMCs po wirowaniu w gradiencie gęstości i po całej procedurze izolacji CTCs po przeprosowaniu 5 mL próbek krwi od zdrowych ochotniczek (n=6). (B) RR pojedynczych komórek z linii BC MCF-7 (o fenotypie epitelialnym) i MDA-MB-231 (o fenotypie mezenchymalnym) dodanych do 5 mL próbek krwi od zdrowych ochotniczek. (C) Reprezentatywne zdjęcia linii komórkowych BC podczas walidacji barwienia immunofluorescencyjnego wykrywającego obecność EpCAM, ECAD, MCAM, CD45 i CD31. _____ 64
- Rycina 13.** (A) Liczba CTCs o różnych fenotypach EMT u chorych na BC. (B) Heterogenność fenotypów EMT CTCs wykrytych u CTCs-pozytywnych chorych (n=54) ukazana jako całkowita liczba CTCs na 5 mL krwi. (C) Reprezentatywne zdjęcia CTCs wykrytych u chorych na BC. _____ 65
- Rycina 14.** Liczba CTCs w zależności od (A) cechy cT, (B) największego wymiaru guza, (C) cechy cN i (D) stopnia złośliwości histologicznej (G) guza u CTCs-negatywnych i CTCs-pozytywnych chorych na BC. _____ 67
- Rycina 15.** (A) Procent komórek proliferujących (Ki67-pozytywnych) w guzie u CTCs-negatywnych i -pozytywnych chorych na BC oraz liczba CTCs w zależności od (B) statusu ER, (C) PR i (D) HER2 guzów. _____ 68
- Rycina 16.** Heterogenność fenotypowa CTCs w zależności od charakterystyki kliniczno-patologicznej chorych na BC. _____ 69
- Rycina 17.** (A) Jakość transkryptomu pojedynczych komórek z linii komórkowych BC MCF-7 i MDA-MB-231 oceniana przed i po przeprowadzeniu procedury izolacji CTCs, oraz (C) pojedynczych CTCs o różnych fenotypach EMT (n=104) i NCS (n=65) od chorych na BC. (B) Poziom ekspresji markerów epitelialnych (*CDH1*, *EpCAM*, *KRT19*) i mezenchymalnych (*VIM*, *SERPINE1*, *PLS3*) oraz markerów komórek hematopoetycznych (*PTPRC*) i endotelialnych (*PECAM1*) w komórkach MCF-7, MDA-MB-231 i NCs od zdrowych kontroli

- po procedurze izolacji CTCs oraz (D) w CTCs i NCs pobranych od chorych na BC. _____ 71
- Rycina 18.** (A) Liczba zmapowanych genów w pojedynczych komórkach z linii komórkowych BC (szary) i komórkach od chorych na BC – CTCs (czerwony) i NCs (niebieski). Komórki wyłączone z dalszych analiz zaznaczone są na czarno. (B) Liczba zmapowanych odczytów oraz (C) genów ulegających ekspresji w tCTCs (czerwony), pCTCs (jasny czerwony), pNCs (błękitny) i tNCs (niebieski). _____ 72
- Rycina 19.** Profil ekspresji (mRNA) markerów komórek i płytek krwi, komórek endotelialnych, fibroblastów, komórek BC, receptorów hormonów, markerów MET, a także markerów epitelialnych i KRTs w pojedynczych komórkach z linii komórkowych BC oraz komórek od chorych na BC podzielonych na tCTCs, pCTCs, pNCs i tNCs. _____ 74
- Rycina 20.** Geny ulegające różnicowej ekspresji pomiędzy tCTCs i tNCs. Geny o zmienionej ekspresji w tCTCs zaznaczono na szaro, a geny o obniżonej ekspresji kodujące podjednostki rybosomów – na czarno. Na szarym tle znajdują się geny, których ekspresja nie była istotnie zmieniona. _____ 76
- Rycina 21.** Wybrane procesy (GO BP, GO MF, Reactome, KEGG), w które zaangażowane są geny o obniżonej ekspresji w tCTCs w porównaniu do tNCs. Rozmiar koła odpowiada ilości genów zaangażowanych w dany proces, a jego kolor – $\log_{10}(\text{FDR})$. _____ 77

11. Piśmiennictwo

1. Ferlay, J., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1)*. 2024 [15.04.2024]; Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>.
2. J, F., et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow (version 1.1)*. 2024 [cited 2024 15.04.2024]; Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>.
3. Zavala, V.A., et al., *Cancer health disparities in racial/ethnic minorities in the United States*. *Br J Cancer*, 2021. **124**(2): p. 315-332.
4. Gomez, S.L., et al., *Cancer incidence trends among Asian American populations in the United States, 1990-2008*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(15): p. 1096-110.
5. Pinheiro, P.S., et al., *Cancer incidence in first generation U.S. Hispanics: Cubans, Mexicans, Puerto Ricans, and new Latinos*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(8): p. 2162-9.
6. Brinton, L.A., M.M. Gaudet, and G.L. Gierach, *Breast cancer*, in *Cancer epidemiology and prevention*, M. Thun, et al., Editors. 2017, Oxford University Press: Oxford. p. 861-888.
7. Henderson, L.M., et al., *The Role of Social Determinants of Health in Self-Reported Access to Health Care Among Women Undergoing Screening Mammography*. *J Womens Health (Larchmt)*, 2020. **29**(11): p. 1437-1446.
8. Reeder-Hayes, K., et al., *Disparities in Use of Human Epidermal Growth Hormone Receptor 2-Targeted Therapy for Early-Stage Breast Cancer*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(17): p. 2003-9.
9. Kelsey, J.L., M.D. Gammon, and E.M. John, *Reproductive factors and breast cancer*. *Epidemiol Rev*, 1993. **15**(1): p. 36-47.
10. Olsson, H.L. and M.L. Olsson, *The Menstrual Cycle and Risk of Breast Cancer: A Review*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 21.
11. Chen, C.L., et al., *Hormone replacement therapy in relation to breast cancer*. *JAMA*, 2002. **287**(6): p. 734-41.

12. Lambertini, M., et al., *Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies*. *Cancer Treat Rev*, 2016. **49**: p. 65-76.
13. Merrill, R.M., et al., *Cancer risk associated with early and late maternal age at first birth*. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(3): p. 583-93.
14. Kuchenbaecker, K.B., et al., *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *JAMA*, 2017. **317**(23): p. 2402-2416.
15. Chen, S. and G. Parmigiani, *Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(11): p. 1329-33.
16. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(6): p. 497-506.
17. Birch, J.M., et al., *Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations*. *Oncogene*, 2001. **20**(34): p. 4621-8.
18. Wilson, J.R., et al., *A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations*. *J Med Genet*, 2010. **47**(11): p. 771-4.
19. Tan, M.H., et al., *Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(2): p. 400-7.
20. Eidemüller, M., et al., *Evidence for Increased Susceptibility to Breast Cancer From Exposure to Ionizing Radiation Due to a Familial History of Breast Cancer: Results From the Swedish Hemangioma Cohort*. *Am J Epidemiol*, 2021. **190**(1): p. 76-84.
21. Helm, J.S. and R.A. Rudel, *Adverse outcome pathways for ionizing radiation and breast cancer involve direct and indirect DNA damage, oxidative stress, inflammation, genomic instability, and interaction with hormonal regulation of the breast*. *Arch Toxicol*, 2020. **94**(5): p. 1511-1549.
22. Kay, J.E., et al., *Application of the Key Characteristics Framework to Identify Potential Breast Carcinogens Using Publicly Available*. *Environ Health Perspect*, 2024. **132**(1): p. 17002.
23. Jones, M.E., et al., *Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort*. *Breast Cancer Res*, 2017. **19**(1): p. 118.
24. Rumgay, H., et al., *Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study*. *Lancet Oncol*, 2021. **22**(8): p. 1071-1080.
25. Arnold, M., et al., *Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(1): p. 36-46.
26. Rumgay, H., et al., *International burden of cancer deaths and years of life lost from cancer attributable to four major risk factors: a population-based study in Brazil, Russia, India, China, South Africa, the United Kingdom, and United States*. *EClinicalMedicine*, 2023. **66**: p. 102289.
27. Shirdarreh, M. and R.C. Pezo, *Impact of obesity on clinical outcomes in hormone receptor-positive breast cancer: a systematic review*. *Breast Cancer*, 2021. **28**(3): p. 755-764.
28. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. *Ann Oncol*, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
29. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
30. Hennigs, A., et al., *Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study*. *BMC Cancer*, 2016. **16**(1): p. 734.
31. Zuo, T., et al., *The influence of stage at diagnosis and molecular subtype on breast cancer patient survival: a hospital-based multi-center study*. *Chin J Cancer*, 2017. **36**(1): p. 84.
32. Wu, S.G., et al., *The effect of distant metastases sites on survival in de novo stage-IV breast cancer: A SEER database analysis*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(6): p. 1010428317705082.
33. Al Sukhun, S., et al., *Systemic Treatment of Patients With Metastatic Breast Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline*. *JCO Glob Oncol*, 2024. **10**: p. e2300285.

34. Andre, F., et al., *Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update-Integration of Results From TAILORx*. J Clin Oncol, 2019. **37**(22): p. 1956-1964.
35. Loibl, S., et al., *Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2024. **35**(2): p. 159-182.
36. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
37. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
38. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
39. Ye, X. and R.A. Weinberg, *Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 675-686.
40. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
41. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn, 2005. **233**(3): p. 706-20.
42. Arnoux, V., et al., *Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4738-49.
43. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
44. Zeisberg, M., et al., *Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23337-47.
45. Marconi, G.D., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis*. Cells, 2021. **10**(7).
46. Fidler, I.J. and G. Poste, *The "seed and soil" hypothesis revisited*. Lancet Oncol, 2008. **9**(8): p. 808.
47. Zhang, S., et al., *Mesenchymal phenotype of circulating tumor cells is associated with distant metastasis in breast cancer patients*. Cancer Manag Res, 2017. **9**: p. 691-700.
48. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
49. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(2): p. 69-84.
50. Ricciardi, M., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells*. Br J Cancer, 2015. **112**(6): p. 1067-75.
51. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
52. Sadrkhanloo, M., et al., *STAT3-EMT axis in tumors: Modulation of cancer metastasis, stemness and therapy response*. Pharmacol Res, 2022. **182**: p. 106311.
53. McFarland, B.C., et al., *NF- κ B-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78728.
54. Wang, Z., et al., *The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(6): p. 745-51.
55. Natsuzaka, M., et al., *Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1758.
56. Shao, S., et al., *Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner*. Mol Cancer, 2015. **14**(1): p. 28.
57. Larue, L. and A. Bellacosa, *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7443-54.

58. Kallergi, G., et al., *Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(5): p. R80.
59. Gulhati, P., et al., *mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways*. *Cancer Res*, 2011. **71**(9): p. 3246-56.
60. Kim, E.Y., et al., *Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 β signaling-mediated upregulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells*. *Respir Res*, 2014. **15**: p. 26.
61. Davies, M., et al., *Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways*. *J Cell Biochem*, 2005. **95**(5): p. 918-31.
62. Cichon, M.A. and D.C. Radisky, *ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail*. *Oncotarget*, 2014. **5**(9): p. 2827-38.
63. Li, J. and B.P. Zhou, *Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 49.
64. Xue, W., et al., *Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers*. *Cell Mol Life Sci*, 2024. **81**(1): p. 79.
65. Janda, E., et al., *Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(2): p. 299-313.
66. Xie, L., et al., *Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 603-10.
67. Pires, B.R., et al., *NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0169622.
68. Popeda, M., et al., *NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(12).
69. Cheng, J.T., et al., *Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Cells*, 2019. **8**(10).
70. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer*. *Nat Med*, 2013. **19**(11): p. 1438-49.
71. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
72. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. *Cell*, 2004. **117**(7): p. 927-39.
73. Zhang, Y.Q., et al., *Over-Expressed Twist Associates with Markers of Epithelial Mesenchymal Transition and Predicts Poor Prognosis in Breast Cancers via ERK and Akt Activation*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135851.
74. Fang, X., et al., *Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal*. *Oncogene*, 2011. **30**(47): p. 4707-20.
75. Li, C.W., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1*. *Cancer Res*, 2012. **72**(5): p. 1290-300.
76. Laderoute, K.R., et al., *5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(14): p. 5336-47.
77. Mahdi, S.H., et al., *The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2015. **583**: p. 18-26.
78. Li, L., et al., *Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells*. *Int J Mol Med*, 2015. **36**(1): p. 113-22.

79. Kim, J., et al., *EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(51): p. 85021-85032.
80. Sullivan, N.J., et al., *Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(33): p. 2940-7.
81. Gao, X., et al., *PIM1 is responsible for IL-6-induced breast cancer cell EMT and stemness via c-myc activation*. *Breast Cancer*, 2019. **26**(5): p. 663-671.
82. Deng, F., et al., *Overexpression of IL-8 promotes cell migration via PI3K-Akt signaling pathway and EMT in triple-negative breast cancer*. *Pathol Res Pract*, 2021. **223**: p. 152824.
83. Bonde, A.K., et al., *Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 35.
84. Cohen, E.N., et al., *Inflammation Mediated Metastasis: Immune Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0132710.
85. Gregory, P.A., et al., *An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(10): p. 1686-98.
86. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 891-906.
87. Avizienyte, E. and M.C. Frame, *Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 542-7.
88. Katoh, D., et al., *Binding of $\alpha\beta 1$ and $\alpha\beta 6$ integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells*. *Oncogenesis*, 2013. **2**(8): p. e65.
89. Kim, Y., et al., *Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts*. *J Cell Biol*, 2009. **184**(2): p. 309-22.
90. Scott, L.E., S.H. Weinberg, and C.A. Lemmon, *Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Front Cell Dev Biol*, 2019. **7**: p. 135.
91. Kariya, Y., M. Oyama, and T. Suzuki, *$\alpha\beta 3$ Integrin induces partial EMT independent of TGF- β signaling*. *Commun Biol*, 2021. **4**(1): p. 490.
92. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(3): p. 295-305.
93. Zhang, L., et al., *Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 108.
94. Zhang, W., et al., *HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129603.
95. Liu, K.H., et al., *Hypoxia Stimulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells Through Accumulation of Nuclear β -Catenin*. *Anticancer Res*, 2018. **38**(11): p. 6299-6308.
96. Tsai, Y.P. and K.J. Wu, *Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis*. *J Biomed Sci*, 2012. **19**(1): p. 102.
97. Cheng, Z.X., et al., *Nuclear factor- κ B-dependent epithelial to mesenchymal transition induced by HIF-1 α activation in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23752.
98. McMahon, S., et al., *Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24171-81.
99. Jiang, B.H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1*. *Cell Growth Differ*, 2001. **12**(7): p. 363-9.
100. Zhang, Q., et al., *Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(5): p. 962-73.

101. Movafagh, S., S. Crook, and K. Vo, *Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate*. J Cell Biochem, 2015. **116**(5): p. 696-703.
102. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res, 2010. **44**(5): p. 479-96.
103. Di Meo, S., et al., *Harmful and Beneficial Role of ROS*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7909186.
104. de Sá Junior, P.L., et al., *The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 2467940.
105. Abell, A.N., et al., *MAP3K4/CBP-regulated H2B acetylation controls epithelial-mesenchymal transition in trophoblast stem cells*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 525-37.
106. Zavadil, J., et al., *Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 157-61.
107. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 582-9.
108. Kong, W., et al., *MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(22): p. 6773-84.
109. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 28.
110. McGrail, D.J., et al., *SNAIL-induced epithelial-to-mesenchymal transition produces concerted biophysical changes from altered cytoskeletal gene expression*. FASEB J, 2015. **29**(4): p. 1280-9.
111. Kidd, M.E., D.K. Shumaker, and K.M. Ridge, *The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 1-6.
112. Sun, B.O., et al., *Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression*. Biomed Rep, 2015. **3**(5): p. 603-610.
113. Olson, M.F. and E. Sahai, *The actin cytoskeleton in cancer cell motility*. Clin Exp Metastasis, 2009. **26**(4): p. 273-87.
114. Han, A.C., et al., *Distinct cadherin profiles in special variant carcinomas and other tumors of the breast*. Hum Pathol, 1999. **30**(9): p. 1035-9.
115. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
116. Bolós, V., et al., *The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 499-511.
117. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
118. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 631-44.
119. Hazan, R.B., et al., *Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 779-90.
120. Zhang, K., et al., *TGF- β 1 induces the dissolution of tight junctions in human renal proximal tubular cells: role of the RhoA/ROCK signaling pathway*. Int J Mol Med, 2013. **32**(2): p. 464-8.
121. Nurmagambetova, A., et al., *Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 22164.
122. Mendez, M.G., S. Kojima, and R.D. Goldman, *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. FASEB J, 2010. **24**(6): p. 1838-51.
123. Nielsen, B.S., et al., *Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer*. Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 168-77.

124. Nielsen, B.S., et al., *Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer*. Lab Invest, 2001. **81**(11): p. 1485-501.
125. Pyke, C., et al., *Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas*. Am J Pathol, 1991. **138**(5): p. 1059-67.
126. Corte, M.D., et al., *Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **90**(1): p. 33-40.
127. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 564259.
128. Ilunga, K., et al., *Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion*. Int J Exp Pathol, 2004. **85**(6): p. 373-9.
129. Wang, T.N., D. Albo, and G.P. Tuszynski, *Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production*. Surgery, 2002. **132**(2): p. 220-5.
130. Schmidt, A., et al., *Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34441-6.
131. Liotta, L.A., et al., *Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane*. Cancer Res, 1981. **41**(11 Pt 1): p. 4629-36.
132. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 159-78.
133. Matsuoka, H., et al., *Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(6): p. 705-13.
134. McColl, B.K., et al., *Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 863-8.
135. Fernandis, A.Z., et al., *Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 157-67.
136. Wang, C., et al., *PKC ζ phosphorylates VASP to mediate chemotaxis in breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2023. **433**(2): p. 113823.
137. Müller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
138. Lee, B.C., et al., *Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(6): p. 327-38.
139. Bockhorn, M., R.K. Jain, and L.L. Munn, *Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?* Lancet Oncol, 2007. **8**(5): p. 444-8.
140. Helmlinger, G., et al., *Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(8): p. 778-83.
141. Liotta, L.A., M.G. Saidel, and J. Kleinerman, *The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process*. Cancer Res, 1976. **36**(3): p. 889-94.
142. Heyder, C., et al., *Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. **128**(10): p. 533-8.
143. Khuon, S., et al., *Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 3): p. 431-40.
144. Xian, X., et al., *Pericytes limit tumor cell metastasis*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 642-51.
145. Dudley, A.C., *Tumor endothelial cells*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(3): p. a006536.

146. Dhami, S.P.S., et al., *Breast cancer cells mediate endothelial cell activation, promoting von Willebrand factor release, tumor adhesion, and transendothelial migration*. J Thromb Haemost, 2022. **20**(10): p. 2350-2365.
147. Anderberg, C., et al., *Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination*. J Exp Med, 2013. **210**(3): p. 563-79.
148. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
149. Chang, Y.S., et al., *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14608-13.
150. Regmi, S., A. Fu, and K.Q. Luo, *High Shear Stresses under Exercise Condition Destroy Circulating Tumor Cells in a Microfluidic System*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 39975.
151. Ildiz, E.S., et al., *Travelling under pressure - hypoxia and shear stress in the metastatic journey*. Clin Exp Metastasis, 2023. **40**(5): p. 375-394.
152. Shaw Bagnall, J., et al., *Deformability of Tumor Cells versus Blood Cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18542.
153. Simpson, C.D., K. Anyiwe, and A.D. Schimmer, *Anoikis resistance and tumor metastasis*. Cancer Lett, 2008. **272**(2): p. 177-85.
154. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
155. Beerling, E., et al., *Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity*. Cell Rep, 2016. **14**(10): p. 2281-8.
156. Tripathi, S.C., et al., *Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(11): p. E1555-64.
157. Terry, S., et al., *Acquisition of tumor cell phenotypic diversity along the EMT spectrum under hypoxic pressure: Consequences on susceptibility to cell-mediated cytotoxicity*. Oncoimmunology, 2017. **6**(2): p. e1271858.
158. Chen, L., et al., *Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5241.
159. Akalay, I., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2418-27.
160. Aceto, N., et al., *Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis*. Cell, 2014. **158**(5): p. 1110-1122.
161. Szczerba, B.M., et al., *Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression*. Nature, 2019. **566**(7745): p. 553-557.
162. Egan, K., N. Cooke, and D. Kenny, *Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage*. Clin Exp Metastasis, 2014. **31**(6): p. 697-704.
163. Nieswandt, B., et al., *Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets*. Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1295-300.
164. Placke, T., et al., *Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells*. Cancer Res, 2012. **72**(2): p. 440-8.
165. Kopp, H.G., T. Placke, and H.R. Salih, *Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7775-83.
166. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.
167. Messaritakis, I., et al., *Bcl-2 expression in circulating tumor cells (CTCs) of patients with small cell lung cancer (SCLC) receiving front-line treatment*. Lung Cancer, 2018. **124**: p. 270-278.

168. Tong, H., et al., *Coculture of cancer cells with platelets increases their survival and metastasis by activating the TGF β /Smad/PAI-1 and PI3K/AKT pathways*. *Int J Biol Sci*, 2023. **19**(13): p. 4259-4277.
169. Yan, M. and P. Jurasz, *The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1863**(3): p. 392-400.
170. Guo, Y., et al., *Platelets promote invasion and induce epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells by TGF- β signaling pathway*. *Gynecol Oncol*, 2019. **153**(3): p. 639-650.
171. Labelle, M., S. Begum, and R.O. Hynes, *Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(5): p. 576-90.
172. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
173. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*. *Annu Rev Nutr*, 1996. **16**: p. 33-50.
174. Wiseman, H. and B. Halliwell, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*. *Biochem J*, 1996. **313** (Pt 1)(Pt 1): p. 17-29.
175. Poulsen, H.E., H. Prieme, and S. Loft, *Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion*. *Eur J Cancer Prev*, 1998. **7**(1): p. 9-16.
176. Lee, S.Y., et al., *Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism*. *Cancer Res*, 2012. **72**(14): p. 3607-17.
177. Lee, S.Y., et al., *Dlx-2 is implicated in TGF- β - and Wnt-induced epithelial-mesenchymal, glycolytic switch, and mitochondrial repression by Snail activation*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(4): p. 1768-80.
178. Shenoy, A.K. and J. Lu, *Cancer cells remodel themselves and vasculature to overcome the endothelial barrier*. *Cancer Lett*, 2016. **380**(2): p. 534-544.
179. Strell, C. and F. Entschladen, *Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells*. *Cell Commun Signal*, 2008. **6**: p. 10.
180. Liu, X., et al., *Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(1): p. 96-113.
181. Zhao, Q., et al., *Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 154.
182. Rahn, J.J., et al., *MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1*. *Clin Exp Metastasis*, 2005. **22**(6): p. 475-83.
183. Yu, L.G., et al., *Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(1): p. 773-81.
184. Zen, K., et al., *CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration*. *PLoS One*, 2008. **3**(3): p. e1826.
185. Perea Paizal, J., S.H. Au, and C. Bakal, *Squeezing through the microcirculation: survival adaptations of circulating tumour cells to seed metastasis*. *Br J Cancer*, 2021. **124**(1): p. 58-65.
186. Wendel, C., et al., *CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30046.
187. Luker, K.E., et al., *Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(45): p. 4750-8.
188. Qi, J., et al., *Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(9): p. 4386-97.
189. Klemke, M., et al., *High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers*. *J Cell Physiol*, 2007. **212**(2): p. 368-74.

190. Laferrière, J., F. Houle, and J. Huot, *Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(3): p. 257-64.
191. Shirure, V.S., N.M. Reynolds, and M.M. Burdick, *Mac-2 binding protein is a novel E-selectin ligand expressed by breast cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44529.
192. Burdick, M.M., et al., *HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13899-905.
193. Eichbaum, C., et al., *Breast cancer cell-derived cytokines, macrophages and cell adhesion: implications for metastasis*. Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3219-27.
194. Siegel, P.M., et al., *Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8430-5.
195. Lee, T.H., et al., *Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5277-84.
196. Wang, X., et al., *Vimentin plays an important role in the promotion of breast cancer cell migration and invasion by leucine aminopeptidase 3*. Cytotechnology, 2020. **72**(5): p. 639-647.
197. Swift, J., et al., *Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation*. Science, 2013. **341**(6149): p. 1240104.
198. Malanchi, I., et al., *Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization*. Nature, 2011. **481**(7379): p. 85-9.
199. Wyckoff, J., et al., *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7022-9.
200. Calon, A., et al., *Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation*. Cancer Cell, 2012. **22**(5): p. 571-84.
201. Lu, X., et al., *VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging α 4 β 1-positive osteoclast progenitors*. Cancer Cell, 2011. **20**(6): p. 701-14.
202. Kim, S.W., et al., *Role of the endothelin axis in astrocyte- and endothelial cell-mediated chemoprotection of cancer cells*. Neuro Oncol, 2014. **16**(12): p. 1585-98.
203. Oskarsson, T., et al., *Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 867-74.
204. Hiratsuka, S., et al., *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis*. Cancer Cell, 2002. **2**(4): p. 289-300.
205. Eisinger-Mathason, T.S., et al., *Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis*. Cancer Discov, 2013. **3**(10): p. 1190-205.
206. Nowak, D.G., et al., *MYC Drives Pten/Trp53-Deficient Proliferation and Metastasis due to IL6 Secretion and AKT Suppression via PHLPP2*. Cancer Discov, 2015. **5**(6): p. 636-51.
207. Li, B., et al., *Id1-induced IGF-II and its autocrine/endocrine promotion of esophageal cancer progression and chemoresistance--implications for IGF-II and IGF-IR-targeted therapy*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(10): p. 2651-62.
208. Zhang, X.H., et al., *Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals*. Cancer Cell, 2009. **16**(1): p. 67-78.
209. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 820-7.
210. Yeo, E.J., et al., *Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(11): p. 2962-73.
211. Mazzieri, R., et al., *Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells*. Cancer Cell, 2011. **19**(4): p. 512-26.

212. Kuang, D.M., et al., *Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1327-37.
213. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
214. Bayne, L.J., et al., *Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer*. Cancer Cell, 2012. **21**(6): p. 822-35.
215. Dalotto-Moreno, T., et al., *Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1107-17.
216. Sosa, M.S., P. Bragado, and J.A. Aguirre-Ghiso, *Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 611-22.
217. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 834-46.
218. Hüsemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
219. Ranganathan, A.C., A.P. Adam, and J.A. Aguirre-Ghiso, *Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy*. Cell Cycle, 2006. **5**(16): p. 1799-807.
220. Adam, A.P., et al., *Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5664-72.
221. Gimbrone, M.A., et al., *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization*. J Exp Med, 1972. **136**(2): p. 261-76.
222. Bragado, P., et al., *TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(11): p. 1351-61.
223. Ghajar, C.M., et al., *The perivascular niche regulates breast tumour dormancy*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 807-17.
224. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
225. Gao, D., et al., *Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition*. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1384-94.
226. Ocaña, O.H., et al., *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 709-24.
227. Demirkan, B., *The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET) in Breast Cancer Bone Metastasis: Potential Targets for Prevention and Treatment*. J Clin Med, 2013. **2**(4): p. 264-82.
228. Sogunro, O., et al., *Detecting accurate tumor size across imaging modalities in breast cancer*. Breast Dis, 2021. **40**(3): p. 177-182.
229. Barrière, G., et al., *Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 114.
230. They, L., et al., *Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer*. JNCI Cancer Spectr, 2019. **3**(2): p. pkz026.
231. Janni, W.J., et al., *Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(10): p. 2583-93.
232. Wang, C., et al., *Prognostic value of HER2 status on circulating tumor cells in advanced-stage breast cancer patients with HER2-negative tumors*. Breast Cancer Res Treat, 2020. **181**(3): p. 679-689.
233. Magbanua, M.J.M., et al., *Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Hormone Receptor-positive Metastatic Breast Cancer Patients who Received Letrozole with or Without Bevacizumab*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(18): p. 4911-4920.

234. Bortolini Silveira, A., et al., *Multimodal liquid biopsy for early monitoring and outcome prediction of chemotherapy in metastatic breast cancer*. NPJ Breast Cancer, 2021. **7**(1): p. 115.
235. Paoletti, C., et al., *Circulating tumor cell number and endocrine therapy index in ER positive metastatic breast cancer patients*. NPJ Breast Cancer, 2021. **7**(1): p. 77.
236. Magbanua, M.J.M., et al., *Serial Analysis of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Receiving First-Line Chemotherapy*. J Natl Cancer Inst, 2021. **113**(4): p. 443-452.
237. Bidard, F.C., et al., *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(6): p. 560-567.
238. Bidard, F.C., et al., *Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2021. **7**(1): p. 34-41.
239. Wang, X.Q., et al., *Effect of CTCs and INHBA level on the effect and prognosis of different treatment methods for patients with early breast cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(24): p. 12735-12740.
240. Shliakhtunou, Y.A., *CTCs-oriented adjuvant personalized cytostatic therapy non-metastatic breast cancer patients: continuous non-randomized prospective study and prospective randomized controlled study*. Breast Cancer Res Treat, 2021. **186**(2): p. 439-451.
241. Bhatia, S., et al., *New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 71.
242. Grigore, A.D., et al., *Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT*. J Clin Med, 2016. **5**(5).
243. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
244. Markiewicz, A., et al., *Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2019. **11**(1).
245. Markiewicz, A., et al., *Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression - the impact of molecular subtype and stromal composition*. Acta Biochim Pol, 2021.
246. Voon, D.C., et al., *The EMT spectrum and therapeutic opportunities*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 878-891.
247. Zhou, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition status of circulating tumor cells in breast cancer and its clinical relevance*. Cancer Biol Med, 2020. **17**(1): p. 169-180.
248. Markiewicz, A., et al., *Mesenchymal phenotype of CTC-enriched blood fraction and lymph node metastasis formation potential*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93901.
249. Bulfoni, M., et al., *In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 30.
250. Strati, A., et al., *Prognostic Significance of TWIST1, CD24, CD44, and ALDH1 Transcript Quantification in EpCAM-Positive Circulating Tumor Cells from Early Stage Breast Cancer Patients*. Cells, 2019. **8**(7).
251. Guan, X., et al., *The prognostic and therapeutic implications of circulating tumor cell phenotype detection based on epithelial-mesenchymal transition markers in the first-line chemotherapy of HER2-negative metastatic breast cancer*. Cancer Commun (Lond), 2019. **39**(1): p. 1.
252. Markiewicz, A., et al., *Epithelial-mesenchymal transition markers in lymph node metastases and primary breast tumors - relation to dissemination and proliferation*. Am J Transl Res, 2014. **6**(6): p. 793-808.
253. Horimoto, Y., et al., *Analysis of circulating tumour cell and the epithelial mesenchymal transition (EMT) status during eribulin-based treatment in 22 patients with metastatic breast cancer: a pilot study*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 287.
254. Ueo, H., et al., *Circulating tumour cell-derived platin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer*. Br J Cancer, 2015. **112**(9): p. 1519-26.

255. Mego, M., et al., *Circulating Tumor Cells With Epithelial-to-mesenchymal Transition Phenotypes Associated With Inferior Outcomes in Primary Breast Cancer*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(4): p. 1829-1837.
256. Markiewicz, A., et al., *Aggressive Phenotype of Cells Disseminated via Hematogenous and Lymphatic Route in Breast Cancer Patients*. *Transl Oncol*, 2018. **11**(3): p. 722-731.
257. Mego, M., et al., *Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(4): p. 808-16.
258. Satelli, A., et al., *Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response*. *Clin Chem*, 2015. **61**(1): p. 259-66.
259. Giordano, A., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(11): p. 2526-34.
260. Kallergi, G., et al., *Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs)*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **40**(3-4): p. 411-419.
261. Guo, M., et al., *Real-time quantitative RT-PCR detection of circulating tumor cells from breast cancer patients*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(1): p. 281-9.
262. Kang, H., et al., *Evaluation of Positive and Negative Methods for Isolation of Circulating Tumor Cells by Lateral Magnetophoresis*. *Micromachines (Basel)*, 2019. **10**(6).
263. Ozkumur, E., et al., *Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(179): p. 179ra47.
264. Lapin, M., et al., *MINDEC-An Enhanced Negative Depletion Strategy for Circulating Tumour Cell Enrichment*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28929.
265. Mostert, B., et al., *Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **127**(1): p. 33-41.
266. Baccelli, I., et al., *Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(6): p. 539-44.
267. Lustberg, M., et al., *Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells*. *Recent Results Cancer Res*, 2012. **195**: p. 97-110.
268. Ignatiadis, M., M. Lee, and S.S. Jeffrey, *Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(21): p. 4786-800.
269. Ferreira, M.M., V.C. Ramani, and S.S. Jeffrey, *Circulating tumor cell technologies*. *Mol Oncol*, 2016. **10**(3): p. 374-94.
270. Bailey, P.C. and S.S. Martin, *Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology*. *Cells*, 2019. **8**(6).
271. Miller, M.C., G.V. Doyle, and L.W. Terstappen, *Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer*. *J Oncol*, 2010. **2010**: p. 617421.
272. Bozec, A., et al., *Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013. **270**(10): p. 2745-9.
273. Gazzaniga, P., et al., *Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(9): p. 2352-6.
274. Yang, C., et al., *Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 725.
275. Sieuwerts, A.M., et al., *Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(1): p. 61-6.
276. Königsberg, R., et al., *Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients*. *Acta Oncol*, 2011. **50**(5): p. 700-10.

277. Onstenk, W., et al., *Improved Circulating Tumor Cell Detection by a Combined EpCAM and MCAM CellSearch Enrichment Approach in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(3): p. 821-7.
278. Satelli, A., et al., *Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(4): p. 899-906.
279. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(18): p. 3033-46.
280. Strauss, W.M., et al., *Analysis of tumor template from multiple compartments in a blood sample provides complementary access to peripheral tumor biomarkers*. *Oncotarget*, 2016. **7**(18): p. 26724-38.
281. Mayer, J.A., et al., *FISH-based determination of HER2 status in circulating tumor cells isolated with the microfluidic CEE™ platform*. *Cancer Genet*, 2011. **204**(11): p. 589-95.
282. Pecot, C.V., et al., *A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(7): p. 580-6.
283. Park, M.H., et al., *Enhanced Isolation and Release of Circulating Tumor Cells Using Nanoparticle Binding and Ligand Exchange in a Microfluidic Chip*. *J Am Chem Soc*, 2017. **139**(7): p. 2741-2749.
284. Galletti, G., et al., *Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device*. *Lab Chip*, 2014. **14**(1): p. 147-56.
285. Sand, N.T., et al., *Optimization of rVAR2-Based Isolation of Cancer Cells in Blood for Building a Robust Assay for Clinical Detection of Circulating Tumor Cells*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(7).
286. Kim, S.J., et al., *A novel approach using telomerase-specific replication-selective adenovirus for detection of circulating tumor cells in breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **128**(3): p. 765-73.
287. Halo, T.L., et al., *NanoFlares for the detection, isolation, and culture of live tumor cells from human blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(48): p. 17104-9.
288. Harouaka, R.A., et al., *Flexible micro spring array device for high-throughput enrichment of viable circulating tumor cells*. *Clin Chem*, 2014. **60**(2): p. 323-33.
289. Wu, S., et al., *Enrichment and enumeration of circulating tumor cells by efficient depletion of leukocyte fractions*. *Clin Chem Lab Med*, 2015. **53**(2): p. 337.
290. Kim, T.H., et al., *FAST: Size-Selective, Clog-Free Isolation of Rare Cancer Cells from Whole Blood at a Liquid-Liquid Interface*. *Anal Chem*, 2017. **89**(2): p. 1155-1162.
291. Drucker, A., et al., *Comparative performance of different methods for circulating tumor cell enrichment in metastatic breast cancer patients*. *PLoS One*, 2020. **15**(8): p. e0237308.
292. Vona, G., et al., *Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(1): p. 57-63.
293. Hvichia, G.E., et al., *A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells*. *Int J Cancer*, 2016. **138**(12): p. 2894-904.
294. Miller, M.C., et al., *The Parsortix™ Cell Separation System-A versatile liquid biopsy platform*. *Cytometry A*, 2018. **93**(12): p. 1234-1239.
295. Andree, K.C., et al., *Self-Seeding Microwells to Isolate and Assess the Viability of Single Circulating Tumor Cells*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(3).
296. Riahi, R., et al., *A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer*. *Int J Oncol*, 2014. **44**(6): p. 1870-8.
297. Sawada, T., et al., *Prognostic Impact of Circulating Tumor Cell Detected Using a Novel Fluidic Cell Microarray Chip System in Patients with Breast Cancer*. *EBioMedicine*, 2016. **11**: p. 173-182.
298. Hosokawa, M., et al., *Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells*. *Anal Chem*, 2010. **82**(15): p. 6629-35.

299. Zheng, S., et al., *3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood*. Biomed Microdevices, 2011. **13**(1): p. 203-13.
300. Lemaire, C.A., et al., *Fast and Label-Free Isolation of Circulating Tumor Cells from Blood: From a Research Microfluidic Platform to an Automated Fluidic Instrument, VTX-1 Liquid Biopsy System*. SLAS Technol, 2018. **23**(1): p. 16-29.
301. Warkiani, M.E., et al., *Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells*. Lab Chip, 2014. **14**(1): p. 128-37.
302. Warkiani, M.E., et al., *Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics*. Nat Protoc, 2016. **11**(1): p. 134-48.
303. Swennenhuis, J.F., et al., *Self-seeding microwell chip for the isolation and characterization of single cells*. Lab Chip, 2015. **15**(14): p. 3039-46.
304. Yang, Y., et al., *Microfluidic device for DNA amplification of single cancer cells isolated from whole blood by self-seeding microwells*. Lab Chip, 2015. **15**(22): p. 4331-7.
305. Stevens, M., et al., *VyCAP's puncher technology for single cell identification, isolation, and analysis*. Cytometry A, 2018. **93**(12): p. 1255-1259.
306. Gascoyne, P.R., et al., *Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis*. Electrophoresis, 2009. **30**(8): p. 1388-98.
307. Shim, S., et al., *Dynamic physical properties of dissociated tumor cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation*. Integr Biol (Camb), 2011. **3**(8): p. 850-62.
308. Moon, H.S., et al., *Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)*. Lab Chip, 2011. **11**(6): p. 1118-25.
309. An, J., et al., *Separation of malignant human breast cancer epithelial cells from healthy epithelial cells using an advanced dielectrophoresis-activated cell sorter (DACs)*. Anal Bioanal Chem, 2009. **394**(3): p. 801-9.
310. Kang, Y., et al., *DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size*. Biomed Microdevices, 2008. **10**(2): p. 243-9.
311. Gupta, V., et al., *ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood*. Biomicrofluidics, 2012. **6**(2): p. 24133.
312. Alazzam, A., et al., *Dielectrophoresis-based microfluidic devices for field-flow fractionation*. Medical Devices & Sensors, 2018. **1**(1): p. e10007.
313. Ding, X., et al., *On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(28): p. 11105-9.
314. Ding, X., et al., *Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 12992-7.
315. Li, P., et al., *Acoustic separation of circulating tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 4970-5.
316. Karthick, S., et al., *Acoustic impedance-based size-independent isolation of circulating tumour cells from blood using acoustophoresis*. Lab Chip, 2018. **18**(24): p. 3802-3813.
317. Antfolk, M., et al., *Acoustofluidic, label-free separation and simultaneous concentration of rare tumor cells from white blood cells*. Anal Chem, 2015. **87**(18): p. 9322-8.
318. Navin, N., et al., *Tumour evolution inferred by single-cell sequencing*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 90-4.
319. Torres, L., et al., *Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(2): p. 143-55.
320. Yachida, S., et al., *Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1114-7.
321. Kwak, E.L., et al., *Molecular Heterogeneity and Receptor Coamplification Drive Resistance to Targeted Therapy in MET-Amplified Esophagogastric Cancer*. Cancer Discov, 2015. **5**(12): p. 1271-81.

322. Eberwine, J., et al., *Analysis of gene expression in single live neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 3010-4.
323. Brady, G., M.A.M. Barbara, and N.N. Iscove. *Representative in Vitro cDNA Amplification From Individual Hemopoietic Cells and Colonies*. 1990.
324. Tang, F., et al., *mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 377-82.
325. Islam, S., et al., *Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq*. Genome Res, 2011. **21**(7): p. 1160-7.
326. Hashimshony, T., et al., *CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification*. Cell Rep, 2012. **2**(3): p. 666-73.
327. Gorges, T.M., et al., *Assessment of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells*. Clin Chem, 2016. **62**(11): p. 1504-1515.
328. Paoletti, C., et al., *Comprehensive Mutation and Copy Number Profiling in Archived Circulating Breast Cancer Tumor Cells Documents Heterogeneous Resistance Mechanisms*. Cancer Res, 2018. **78**(4): p. 1110-1122.
329. Rothé, F., et al., *Interrogating breast cancer heterogeneity using single and pooled circulating tumor cell analysis*. NPJ Breast Cancer, 2022. **8**(1): p. 79.
330. Sundaresan, T.K., et al., *Evaluation of endocrine resistance using ESR1 genotyping of circulating tumor cells and plasma DNA*. Breast Cancer Res Treat, 2021. **188**(1): p. 43-52.
331. Jordan, N.V., et al., *HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells*. Nature, 2016. **537**(7618): p. 102-106.
332. Ebright, R.Y., et al., *Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis*. Science, 2020. **367**(6485): p. 1468-1473.
333. Picelli, S., et al., *Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2*. Nat Protoc, 2014. **9**(1): p. 171-81.
334. Yanai, I. and T. Hashimshony, *CEL-Seq2-Single-Cell RNA Sequencing by Multiplexed Linear Amplification*. Methods Mol Biol, 2019. **1979**: p. 45-56.
335. Sasagawa, Y., et al., *Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity*. Genome Biol, 2013. **14**(4): p. R31.
336. Marinov, G.K., et al., *From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing*. Genome Res, 2014. **24**(3): p. 496-510.
337. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2017: John Wiley & Sons.
338. Durst, F.C., et al., *Targeted transcript quantification in single disseminated cancer cells after whole transcriptome amplification*. PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0216442.
339. Hellems, J., et al., *qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data*. Genome Biol, 2007. **8**(2): p. R19.
340. Tan, T.Z., et al., *Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(10): p. 1279-93.
341. Topa, J., et al., *Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features-an unreachable target?* Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(2): p. 81.
342. Kim, D., et al., *Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(8): p. 907-915.
343. Harrow, J., et al., *GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1760-74.
344. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. Bioinformatics, 2014. **30**(7): p. 923-30.
345. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.

346. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
347. Karlsson, M., et al., *A single-cell type transcriptomics map of human tissues*. Sci Adv, 2021. **7**(31).
348. Sherman, B.T., et al., *DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(W1): p. W216-W221.
349. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
350. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.
351. Balcik-Ercin, P., et al., *Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Circulating Tumor Cell Lines Sequentially Derived from a Patient with Colorectal Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(21).
352. Mikolajczyk, S.D., et al., *Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood*. J Oncol, 2011. **2011**: p. 252361.
353. Hillig, T., et al., *In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods*. Tumour Biol, 2015. **36**(6): p. 4597-601.
354. Allard, W.J., et al., *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6897-904.
355. de Wit, S., et al., *The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12270.
356. de Wit, S., et al., *EpCAM high and EpCAM low circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients*. Oncotarget, 2018. **9**(86): p. 35705-35716.
357. Xu, H., et al., *Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9758-65.
358. Wu, S., et al., *Enrichment and enumeration of circulating tumor cells by efficient depletion of leukocyte fractions*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(2): p. 243-51.
359. Alazzam, A., et al., *Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis*. Electrophoresis, 2011. **32**(11): p. 1327-36.
360. Topa, J., A.J. Żaczek, and A. Markiewicz, *Isolation of Viable Epithelial and Mesenchymal Circulating Tumor Cells from Breast Cancer Patients*. Methods Mol Biol, 2024. **2752**: p. 43-52.
361. Cheng, Y.H., et al., *Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2163.
362. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
363. Kerkelä, E., et al., *Exploring Transcriptomic Landscapes in Red Blood Cells, in Their Extracellular Vesicles and on a Single-Cell Level*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(21).
364. Parolini, I., et al., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34211-22.
365. Kumar, S.D., et al., *Evidence for low-level translation in human erythrocytes*. Mol Biol Cell, 2022. **33**(12): p. br21.
366. Laffont, B., et al., *Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles*. Blood, 2013. **122**(2): p. 253-61.
367. Risitano, A., et al., *Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer*. Blood, 2012. **119**(26): p. 6288-95.
368. Kirschbaum, M., et al., *Horizontal RNA transfer mediates platelet-induced hepatocyte proliferation*. Blood, 2015. **126**(6): p. 798-806.
369. Kallergi, G., et al., *Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(3): p. R59.

370. Armstrong, A.J., et al., *Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(8): p. 997-1007.
371. Bredemeier, M., et al., *Establishment of a multimarker qPCR panel for the molecular characterization of circulating tumor cells in blood samples of metastatic breast cancer patients during the course of palliative treatment*. *Oncotarget*, 2016. **7**(27): p. 41677-41690.
372. Kasimir-Bauer, S., et al., *Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(1): p. R15.
373. Markou, A., et al., *Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay*. *Clin Chem*, 2011. **57**(3): p. 421-30.
374. Raimondi, C., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **130**(2): p. 449-55.
375. Strati, A., et al., *Prognostic Significance of*. *Cells*, 2019. **8**(7).
376. Reijm, E.A., et al., *An 8-gene mRNA expression profile in circulating tumor cells predicts response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 123.
377. Javaid, S., et al., *MAPK7 Regulates EMT Features and Modulates the Generation of CTCs*. *Mol Cancer Res*, 2015. **13**(5): p. 934-43.
378. Francart, M.E., et al., *Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases*. *Dev Dyn*, 2018. **247**(3): p. 432-450.
379. Tsuji, T., S. Ibaragi, and G.F. Hu, *Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis*. *Cancer Research*, 2009. **69**(18): p. 7135-9.
380. Jolly, M.K., et al., *Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 155.
381. Ou, H., et al., *Circulating Tumor Cell Phenotype Indicates Poor Survival and Recurrence After Surgery for Hepatocellular Carcinoma*. *Dig Dis Sci*, 2018.
382. Yokobori, T., et al., *Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis*. *Cancer Res*, 2013. **73**(7): p. 2059-69.
383. Templeman, A., et al., *Analytical performance of the FDA-cleared Parsortix*. *J Circ Biomark*, 2023. **12**: p. 26-33.
384. Cohen, E.N., et al., *A Multi-Center Clinical Study to Harvest and Characterize Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Breast Cancer Using the Parsortix*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(21).
385. Yang, J., et al., *Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. **21**(6): p. 341-352.
386. Yamashita, N., et al., *Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2018. **18**(5): p. e1003-e1009.
387. Polioudaki, H., et al., *Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 399.
388. Zabouo, G., et al., *CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(1): p. R1.
389. Strijbos, M.H., et al., *Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(11): p. 1731-5.
390. Nieto, M.A., et al., *EMT: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
391. De Rubeis, S., et al., *CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation*. *Neuron*, 2013. **79**(6): p. 1169-82.

392. Akcakanat, A., D.S. Hong, and F. Meric-Bernstam, *Targeting translation initiation in breast cancer*. Translation (Austin), 2014. **2**(1): p. e28968.
393. Laham-Karam, N., et al., *Transcription and Translation Inhibitors in Cancer Treatment*. Front Chem, 2020. **8**: p. 276.
394. Jiang, S.L., et al., *Targeting translation regulators improves cancer therapy*. Genomics, 2021. **113**(1 Pt 2): p. 1247-1256.
395. Brauchle, M., et al., *Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60549.
396. Björkman, M., et al., *Systematic knockdown of epigenetic enzymes identifies a novel histone demethylase PHF8 overexpressed in prostate cancer with an impact on cell proliferation, migration and invasion*. Oncogene, 2012. **31**(29): p. 3444-56.
397. An, M.J., et al., *Histone demethylase KDM3B regulates the transcriptional network of cell-cycle genes in hepatocarcinoma HepG2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **508**(2): p. 576-582.
398. Qu, L.H., et al., *Comprehensive analyses of prognostic biomarkers and immune infiltrates among histone lysine demethylases (KDMs) in hepatocellular carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2022. **71**(10): p. 2449-2467.
399. Hu, A., et al., *KDM3B-ETF1 fusion gene downregulates LMO2 via the WNT/ β -catenin signaling pathway, promoting metastasis of invasive ductal carcinoma*. Cancer Gene Ther, 2022. **29**(2): p. 215-224.
400. Lin, G.H., et al., *Comprehensive Analyses of Prognostic Values and Immune Infiltration of KDM3 Gene Family in Hepatocellular Carcinoma*. Mol Biotechnol, 2023. **65**(5): p. 752-765.
401. Li, J., et al., *KDM3 epigenetically controls tumorigenic potentials of human colorectal cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signalling*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15146.
402. Saraç, H., et al., *Systematic characterization of chromatin modifying enzymes identifies KDM3B as a critical regulator in castration resistant prostate cancer*. Oncogene, 2020. **39**(10): p. 2187-2201.
403. Stockwell, B.R., et al., *Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease*. Cell, 2017. **171**(2): p. 273-285.
404. Wang, Y., et al., *Histone demethylase KDM3B protects against ferroptosis by upregulating SLC7A11*. FEBS Open Bio, 2020. **10**(4): p. 637-643.
405. Kim, Y.Y., et al., *KDM3B inhibitors disrupt the oncogenic activity of PAX3-FOXO1 in fusion-positive rhabdomyosarcoma*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 1703.
406. Singh, B., V.N. Sarli, and A. Lucci, *Sensitization of Resistant Breast Cancer Cells with a Jumonji Family Histone Demethylase Inhibitor*. Cancers (Basel), 2022. **14**(11).
407. Xu, X., et al., *Small molecular modulators of JMJD1C preferentially inhibit growth of leukemia cells*. Int J Cancer, 2020. **146**(2): p. 400-412.