

FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO MEDIANTE LO STUDIO DELLE CTC, DEL DNA LIBERO CIRCOLANTE E DEL TESSUTO TUMORALE PRIMITTIVO MEDIANTE NGS

Montecatini Terme, 01/08/2018

Dott.ssa Tania Rossi

CHE COS'È IL CARCINOMA DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO?

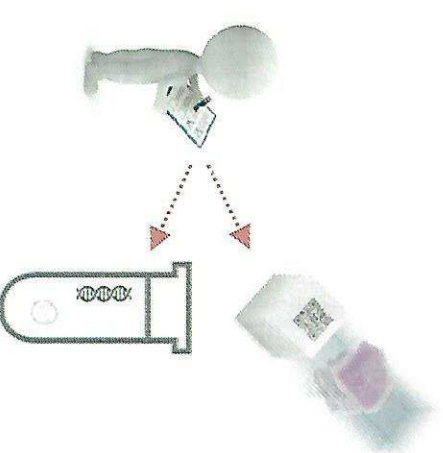
- Sottotipo più aggressivo e con prognosi sfavorevole
- Costituisce il 15% dei tumori mammari
- Le cellule tumorali sono negative per il recettore degli estrogeni (ER), il recettore del Progesterone (PgR) e per l'espressione di HER2, quindi non rispondono alle terapie ormonali (anti-ER e anti-PgR) e alle terapie mirate anti HER2

RICERCA PER LA DEFINIZIONE DI NUOVI
FATTORI DI PROGNOSI E DI PREDIZIONE DI

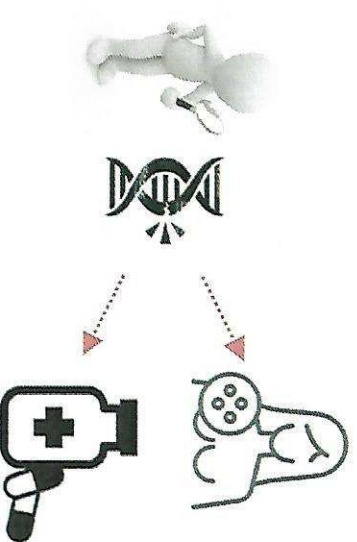
TERAPIA

IL NOSTRO PROGETTO: QUALI SONO GLI OBIETTIVI?

L'obiettivo primario è quello di valutare, con uno studio di fattibilità, il livello di concordanza dei profili molecolari delle tre fonti a disposizione (Cellule Tumoralì Circolanti, DNA tumorale circolante e DNA del tumore primitivo).



L'obiettivo secondario è quello di verificare la presenza di mutazioni singole o di signature riconducibili all'aggressività del tumore e la presenza di mutazioni codificanti o predisponenti l'espressione di potenziali target terapeutici, limitatamente al basso numero di casi che prevede lo studio di fattibilità.



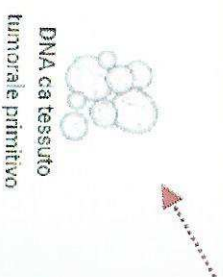
IL NOSTRO PROGETTO

6 PAZIENTI TNBC

Paziente	Istotipo	FFPE	CTC I Accesso	Plasma I Accesso	CTC II Accesso	Plasma II Accesso
1	Duttale	Sì	5	-	//	//
2	Duttale	Sì	0	-	0	-
3	Duttale	Sì	0	+	0	+
4	Duttale	Sì	8	+	3	+
5	Duttale	Sì	0	-	0	+
6	Duttale	Sì	10	+	0	+

6 PAZIENTI NON TNBC

Paziente	Istotipo	FFPE	CTC I Accesso	Plasma I Accesso	CTC II Accesso	Plasma II Accesso
7	Duttale	Sì	0	+	1	+
8	Duttale	Sì	0	+	0	+
9	Duttale	Sì	0	+	0	+
10	Duttale	Sì	3	+	0	+
11	Lobulare	Sì	0	+	0	+
12	Duttale	Sì	1	+	0	+



Circulating Tumor Cells



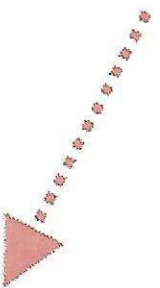
DNA libero circolante

IL NOSTRO PROGETTO

Sequenziamento di geni coinvolti in diversi meccanismi come proliferazione, migrazione e sopravvivenza



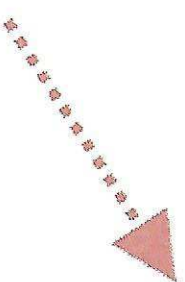
DNA da tessuto
tumoreale primitivo



TP53	BRCA1	RB1	PALB2
CDH1	BRCA2	CDKN2A	GATA3
PTEN	PIK3CA	SMAD4	AKT1
NOTCH1	AR	EGFR	MLH1
CD326			



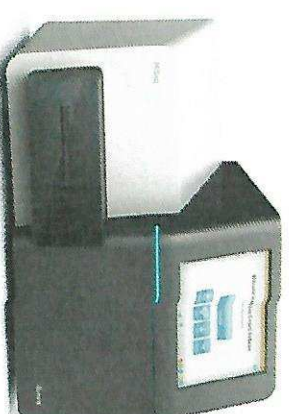
DNA libero circolante



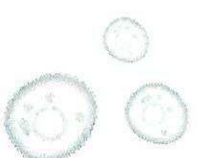
CHIP v2 hotspot					New Hotspot	CNV	
ABL1	EGFR	GNAQ	KRAS	PTPN11	DDR2	FGFR1	ERBB2
AKT1	ERBB2	GNAS	MET	RB1	MEK1	FGFR2	MET
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET	KRAS ex4	FGFR3	
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4	EGFR ex12	EGFR	
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1	BRAF ex11	ALK	
BRAF	FGFR1	IDH2	NPM1	SMO	AR	AR	
CDH1	FGFR2	JAK2	NRAS	SCR	GATA3	MYC	
CDKN2A	FGFR3	JAK3	PDGFRA	STK11	EML4/ALK	CCND	
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53	TMPRSS2/ERG	PTEN	
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL	Fgfr1/ZNF703	PIK3CA	



Circulating Tumor Cells



CIRCULATING TUMOR CELLS - CTC



Isolamento delle singole cellule con DEPArray



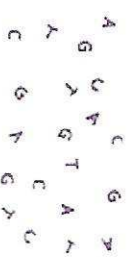
Amplificazione del genoma (Whole-Genome Amplification)



Preparazione delle library e analisi del numero di copie
(Copy Number Variant)



90%



Sequenziamento



WORK IN
PROGRESS



**WORK IN
PROGRESS**

TGCTGGCC A
CGACGGGTAGGC

5GCTGCC
5CGACGGGTAGGC

DNA DA TESSUTO TUMORALE PRIMITIVO



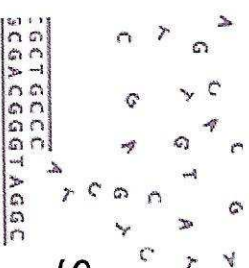
Estrazione del DNA dal tessuto tumorale primitivo (FFPE)



Preparazione delle library e hybridization capture



Sequenziamento



RISULTATI PRELIMINARI SEQUENZIAMENTO

Sample	Mean DephtoCov	% Coverage 50X DephtoCov	% Coverage 100X DephtoCov	% Coverage 200X DephtoCov	% Coverage 500X DephtoCov
FFPE 9	1007.71	99.8	99.8	99.2	88.5
FFPE 10	506.27	99.8	98.8	88.9	50.1
FFPE 11	935.68	99.8	99.8	99.4	86.2
FFPE 5	859.2	99.7	99.5	97.8	78.8
ctDNA 11	592.7	99.8	99.7	98.9	74.5
ctDNA 8	409.99	99.8	99.7	98.2	8.8

Indica quante volte una
singola base della
sequenza target è letta

Indica la percentuale
delle basi della
sequenza target
coperta almeno 50 volte

Buon coverage del target
fino a 200X

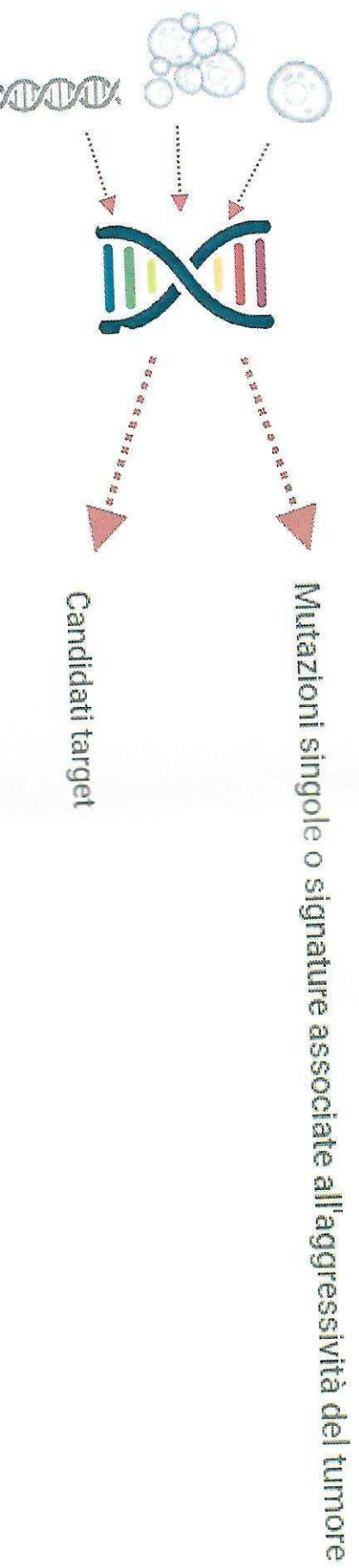
CONCLUSIONI

- Estrazione di tutto il materiale necessario
- La qualità del materiale analizzato ad oggi ha raggiunto livelli ottimali per il 58% delle CTC, il 100% del ctDNA e il 100% del DNA del tumore primario
- Il metodo di sequenziamento ottimizzato ha dato buoni risultati, quindi è possibile procedere con le analisi bioinformatiche
- Per lo studio delle CNV delle CTC le analisi bioinformatiche sono in corso

PROSPECTIVE FUTURE

2018: completamento degli esperimenti e dello studio di fattibilità e analisi bioinformatiche per la valutazione del livello di concordanza tra le tre fonti.

Futuro: aumento della casistica per applicare lo studio di fattibilità ad un minimo di 50 casi per gruppo.



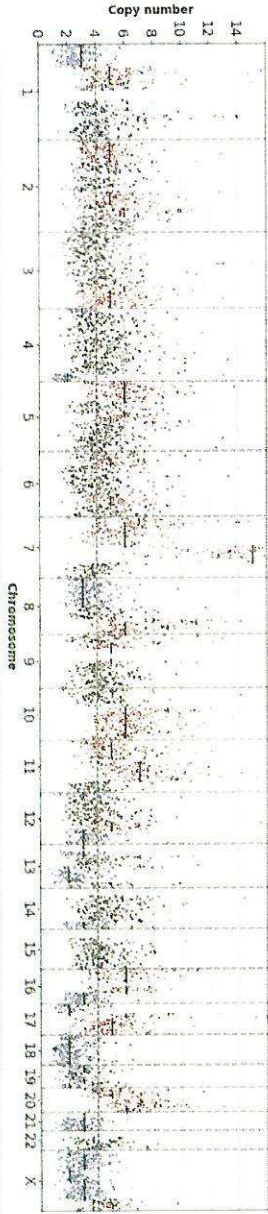
SINGLE-CELL ANALYSIS SETUP ON BREAST CANCER CELL LINE

QC-WGA
Cell image (gel bands)

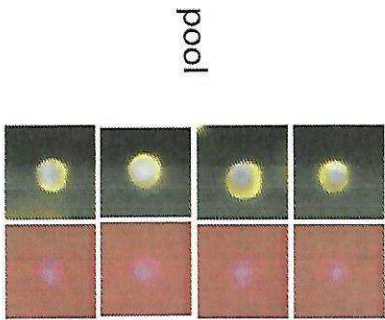
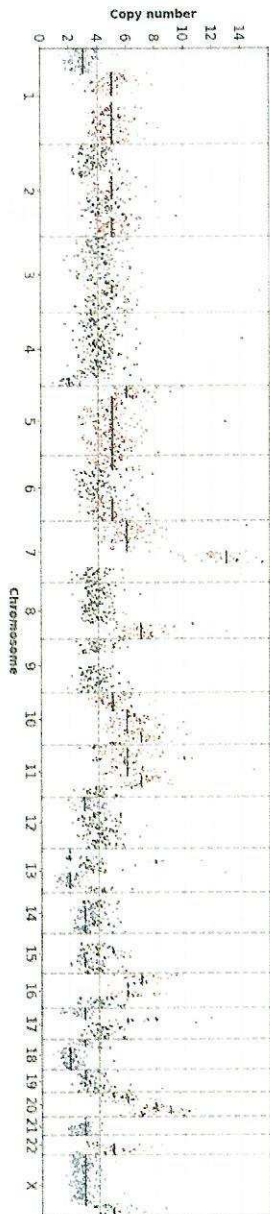
LowPass plot (CNV/LOH analysis)



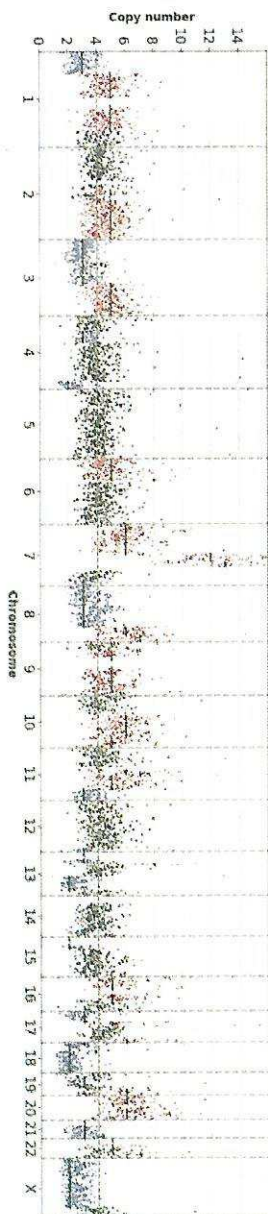
2 bands MED



1 band LOW

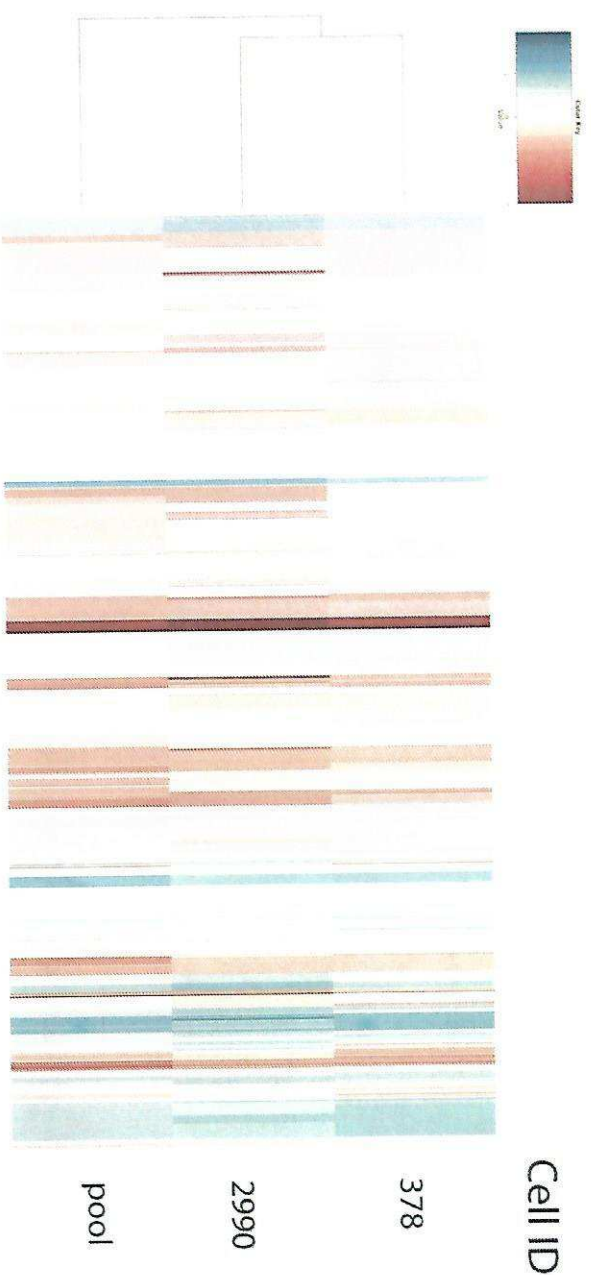


3 bands HIGH



ID	COUNTS	DLRS	LMAD	R50	READSxFRAG
378	2.163.931	0.40	0.74	33	1,44
2990	1.115.790	0.37	0.70	31	1,45
pool	2.233.786	0.33	0.57	42	1,27

Profiles Clustering



Copy-number data revealed
clear aberrant profiles,
highly concordant between
the three samples (>95%)