

# CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI E MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO

## RELAZIONE SCIENTIFICA CONCLUSIVA

**Responsabile del progetto di ricerca:** Dott.ssa Cristina Raimondi

**Supervisore del progetto di ricerca:** Prof.ssa Paola Gazzaniga

### **Introduzione:**

Il carcinoma mammario triplo negativo (triple negative breast cancer, TNBC), caratterizzato dall'assenza di recettori ormonali e dalla mancata iperespressione/amplificazione di HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), è stato negli ultimi anni oggetto di notevole attenzione, a causa del suo comportamento biologico aggressivo e della mancanza di strategie terapeutiche mirate [1]. Le pazienti affette da TNBC hanno infatti un rischio maggiore di recidiva precoce e una prognosi sfavorevole rispetto a pazienti con altri sottotipi di carcinoma mammario. Nelle neoplasie solide, cellule tumorali disseminate dal tumore primitivo in fasi precoci della progressione tumorale e resistenti alle terapie rappresentano la malattia minima residua (minimal residual disease, MRD), la cui presenza non è identificabile attraverso tecniche di imaging né di analisi istopatologiche [2,3]. Di contro, cellule tumorali circolanti presenti nel sangue periferico di pazienti con malattia metastatica rappresentano una fonte facilmente accessibile di materiale biologico, alternativa rispetto al prelievo bioptico di tessuto tumorale [4]. Analisi molecolari altamente sensibili consentono oggi di identificare singole cellule tumorali nel sangue periferico (circulating tumor cells, CTC) di pazienti con neoplasie solide, anche nelle fasi precoci della progressione tumorale. Il concetto di CTC come marcatore di malattia microscopica ha aperto un nuovo scenario sulla possibilità di identificare cellule in transito dal tumore primitivo nella rete vascolare prima

dell'evidenza di metastasi a distanza, consentendo anche l'individuazione di bersagli terapeutici non identificabili nel tumore primitivo [5]. La ricerca delle CTC assume perciò una considerevole rilevanza clinica soprattutto in patologie come il TNBC la cui prognosi è ancora condizionata da frequenti fallimenti terapeutici e riprese precoci di malattia

Nel 2004 uno studio condotto da Cristofanilli et al. ha dimostrato per la prima volta che il numero delle CTC nel sangue periferico di pazienti con carcinoma mammario metastatico rappresenta un fattore prognostico indipendente in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale [6]. Già dallo studio pilota di Cristofanilli è risultato evidente che nel 30-35% delle pazienti il sistema CellSearch<sup>®</sup>, unica metodica approvata dall'FDA per la conta delle CTC, non è in grado di individuare cellule tumorali circolanti.

E' opinione condivisa che l'arricchimento e selezione delle CTC attraverso EpCAM e citocheratine rappresentino il limite principale delle metodiche attualmente disponibili, consentendo l'isolamento delle sole cellule che esprimono antigeni epiteliali [7,8]. Sebbene classicamente considerato a buona prognosi, il gruppo di pazienti in cui il CellSearch<sup>®</sup> non identifica CTC è di fatto eterogeneo. In un lavoro pubblicato nel 2011 da Mego et al è emerso che l'assenza di CTC accomuna pazienti con prognosi significativamente differente, di cui fanno parte pazienti in cui le cellule tumorali circolanti sono realmente assenti e pazienti in cui il sistema CellSearch<sup>®</sup> non è in grado di individuarle [9]. L'ipotesi avanzata dagli autori è che l'analisi CellSearch<sup>®</sup> sottostimi il numero reale di CTC. Il risultato "falso negativo" sarebbe tanto più probabile nella popolazione di pazienti con malattia più aggressiva (triplo-negativo, HER2-positivo), in cui l'espressione eterogenea di marcatori epiteliali e mesenchimali indica livelli diversi di differenziazione lungo il programma di transizione epitelio-mesenchima (epithelial-mesenchymal transition, EMT) [10].

L'eterogeneità nei risultati della conta di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma mammario triplo negativo si riflette di fatto nella complessità biologica della malattia. Come elegantemente dimostrato nel lavoro pubblicato nel 2011 da Lehmann et al, infatti, il carcinoma mammario triplo negativo comprende sei diversi sottotipi molecolari, caratterizzati da specifici

profili di espressione genica e dipendenti da precisi drivers molecolari [11]. Nei sottotipi in cui il profilo di espressione genica si sovrappone a quello dei carcinomi mammari con caratteristiche luminali, è plausibile pensare che le cellule tumorali circolanti mantengano antigeni epiteliali che ne consentono l'identificazione tramite CellSearch. Al contrario, nei sottotipi molecolari in cui sono attive le vie di segnale associate alla transizione epitelio-mesenchima e alla motilità cellulare, l'espressione di marcatori mesenchimali determina una sottostima del numero di cellule tumorali circolanti, compromettendone la validazione clinica come marcatore prognostico e predittivo di risposta alla terapia [12,13].

Con l'obiettivo di verificare l'ipotesi per cui le cellule tumorali circolanti (CTC) da carcinoma mammario triplo negativo sfuggirebbero all'isolamento tramite CellSearch<sup>®</sup>, unico sistema di isolamento delle CTC approvato dall'FDA per uso clinico, a causa della ridotta espressione di antigeni epiteliali, è stato testato l'uso di metodiche antigene-indipendente per identificare cellule con fenotipo mesenchimale/staminale. A corollario delle suddette analisi, le cellule tumorali circolanti, isolate con metodiche non EpCAM-dipendenti, sono state caratterizzate dal punto di vista molecolare per l'espressione di antigeni mesenchimali e staminali.

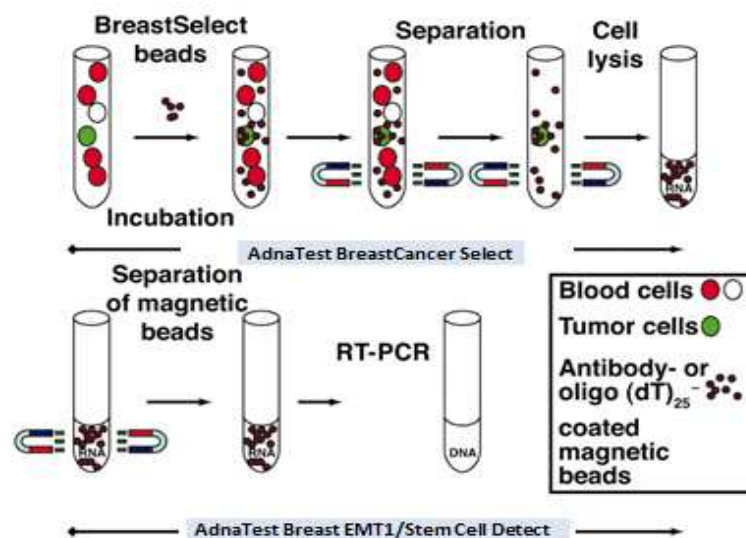
In accordo con le più recenti evidenze scientifiche sulla evoluzione darwiniana del cancro e sulla rilevanza della eterogeneità intratumorale, la variabilità biologica delle cellule tumorali circolanti isolate da sangue periferico di pazienti affette da carcinoma triplo negativo è stata oggetto dell'ultima parte del presente progetto di ricerca [14,15]. In particolare, l'uso di sistemi di nuova generazione per l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule tumorali circolanti (DEPArray Silicon Biosystems) dopo arricchimento con CellSearch ha consentito il sequenziamento genico di singole cellule tumorali circolanti, fornendo una prospettiva nuova ed entusiasmante alla ricerca traslazionale in oncologia.

## Risultati ottenuti nel biennio 2013-2014

### ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI DA CARCINOMA

#### MAMMARIO TRIPLO NEGATIVO CON ADNA TEST BREAST EMT-1/STEM CELL SELECT/DETECT™

AdnaTest BreastCancer™ (Adnagen AG, Langenhagen, Germany) consente l'arricchimento immunomagnetico di cellule tumorali attraverso il legame con antigeni tumore associati ed epiteliali (GA733-2, MUC-1, and HER2) [16]. I campioni di sangue venoso periferico vengono incubati con anticorpi anti-GA733-2 e anti-MUC-1 (AdnaTest BreastCancerSelect). La procedura prevede quindi l'estrazione di mRNA dalle cellule isolate e lisate, utilizzando Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit (DynaL Biotech GmbH, Hamburg, Germany) e successivamente la sintesi di cDNA, sottoposto a multiplex RT-PCR per HER2, MUC-1 e GA733-2 (AdnaTest BreastCancerDetect). Il test di isolamento delle CTC è considerato positivo in caso di espressione di almeno uno dei tre marcatori. Attraverso l'analisi con AdnaTest EMT-1/StemCell Detect, le cellule tumorali precedentemente isolate con AdnaTest BreastCancerSelect possono essere caratterizzate per l'espressione di tre marcatori associati a transizione epitelio-mesenchima (Akt-2, TWIST 1, PI3K $\alpha$ ) e un marcatore di staminalità (ALDH-1) (Fig.1) [17].



<b>Selection/detection markers</b>	
PrimerMix EMT-1	Akt-2, Twist-1 and PI3K $\alpha$
PrimerMix StemCell	ALDH1
PrimerMix BreastDetect	GA 733-2 (EpCAM), MUC-1 and HER-2

**Fig.1 Isolamento e caratterizzazione molecolare delle cellule tumorali circolanti mediante AdnaTest Breast EMT-1/Stem cell Select/Detect™**

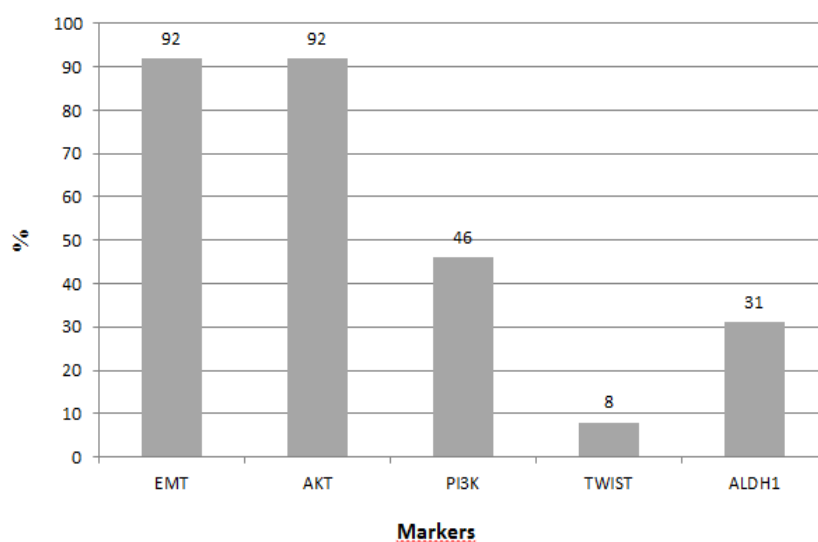
## **Risultati**

E' stato valutato un gruppo di 30 pazienti affette da carcinoma mammario triplo negativo, eterogenee per stadio di malattia. Le caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti arruolate nello studio sono riassunte nella Tabella 1. Un solo campione è stato considerato inadeguato per mancanza di espressione del controllo interno e, pertanto, escluso dallo studio. Nei restanti 29 campioni, l'analisi per la presenza di cellule tumorali circolanti è risultata positiva nel 45% dei casi (13/29 pazienti). La presenza di CTC non ha mostrato alcuna correlazione con i parametri clinico-patologici noti, ove si eccettui il dato, al limite della significatività statistica, relativo alla correlazione tra coinvolgimento linfonodale e presenza di CTC.

All'analisi molecolare, nel gruppo di pazienti CTC-positive, il 92% (12/13) dei campioni è risultato positivo per l'espressione di almeno uno dei marcatori associati a transizione epitelio-mesenchima (Akt2 92%; PI3K 46%; TWIST 8%) e il 31% (4/13) dei campioni è risultato positivo l'espressione di ALDH1, usato come marcatore di staminalità (Fig. 2)

**Tab.1 Caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti CTC-positive**

	<b>Totale</b>	<b>CTC-pos (%)</b>	<b>P value</b>
<b>Totale</b>	29	13 (45%)	-
<b>Tumore</b>			0.379
pT1	13	7 (54%)	
pT2-T4	16	6 (37%)	
<b>Linfonodi</b>			0.047
Negativo	17	5 (29%)	
Positivo	12	8 (67%)	
<b>Metastasi</b>			0.104
Negativo	22	8 (36%)	
Positivo	7	5 (71%)	
<b>Grading</b>			0.113
G2	9	6 (67%)	
G3	20	7 (35%)	



**Fig. 2 Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti. Espressione di marcatori associati a transizione epitelio-mesenchima e ALDH1**

In linea con i dati di letteratura noti [16], l'espressione dei marcatori di transizione epitelio-mesenchima e di staminalità non ha mostrato alcuna correlazione con i parametri clinico-patologici noti (Tab.2)

Il dato per cui né la presenza di cellule tumorali circolanti né il loro profilo molecolare mostrano una correlazione con i parametri clinico-patologici noti nella popolazione studiata è certamente da

inquadrare nell'ambito dei più recenti modelli di progressione tumorale, per i quali la disseminazione di cellule tumorali è un evento precoce, necessario ma non sufficiente per lo sviluppo di metastasi a distanza, e non un sinonimo di stadio avanzato di malattia.

**Tab.2 Caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti CTC-positive distribuite per espressione di marcatori di EMT e ALDH1**

	<b>Totale</b>	<b>CTC<sup>EMT</sup> (%)</b>	<b>P value</b>	<b>CTC<sup>STEM</sup> (%)</b>	<b>P value</b>
<b>Totale</b>	29	12 (41%)	-	4 (14%)	-
<b>Tumore</b>			0.219		0.191
pT1	13	7 (54%)		3 (23%)	
pT2-T4	16	5 (31%)		1 (6%)	
<b>Linfonodi</b>			0.119		0.706
Negativo	17	5 (29%)		2 (12%)	
Positivo	12	7 (58%)		2 (12%)	
<b>Metastasi</b>			0.331		0.965
Negativo	22	8 (36%)		3 (23%)	
Positivo	7	4 (14%)		1 (6%)	
<b>Grading</b>			0.064		0.779
G2	9	6 (67%)		1 (6%)	
G3	20	6 (30%)		3 (23%)	

L'attivazione del processo di transizione epitelio-mesenchima consente alle cellule tumorali di migrare nella circolazione sanguigna e colonizzare organi a distanza. Molti studi hanno già dimostrato che esiste una precisa correlazione tra l'induzione del processo di transizione epitelio-mesenchima e l'aggressività biologica di alcuni sottotipi di carcinoma della mammella. In particolare, l'espressione di marcatori di EMT sembra essere associate al sottotipo basal-like, tipicamente invasivo e con elevato potenziale metastatico [18]. L'isolamento delle CTC da sangue periferico è complicato dal numero esiguo di cellule presenti in circolo e dal fatto che non esiste un marcatore universale per il cancro della mammella. I sistemi attualmente disponibili per l'isolamento delle CTC prevedono in larga parte una prima fase di arricchimento di cellule che esprimono marcatori epiteliali. Il limite principale di questo tipo di metodiche risiede nel fatto che

la sottopopolazione di cellule che ha completato la transizione epitelio-mesenchima non è in alcun modo identificabile, inficiando il significato reale dell'analisi. I risultati ottenuti nella prima fase del progetto di ricerca hanno dimostrato che l'utilizzo di AdnaTest BreastCancer™ consente di identificare CTC con una sensibilità superiore al CellSearch in un gruppo di pazienti affette da carcinoma triplo negativo. Tale dato è verosimilmente da ascrivere al fatto che AdnaTest BreastCancer™ prevede una procedura di arricchimento delle cellule sulla base dell'espressione di due antigeni tumore associati ed epiteliali (EpCAM e MUC1), consentendo di fatto l'isolamento di cellule che abbiano già perso EpCAM, ma che ancora mantengano un fenotipo ibrido epiteliale-mesenchimale. Dato però l'obiettivo ambizioso di voler isolare da sangue periferico di pazienti con carcinoma mammario triplo negativo la sottopopolazione di CTC con caratteristiche di EMT e staminalità, supponendo che questa possa essere la chiave per la definizione del significato prognostico delle CTC in questo setting di malattia e il modello ideale per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici, l'uso di AdnaTest BreastCancer™ appare sostanzialmente inadeguato, essendo il test diretto all'isolamento di CTC con fenotipo, almeno parzialmente, epiteliale.

Con l'obiettivo di poter identificare il pool di cellule francamente mesenchimali, alle quale larga parte della produzione scientifica recente attribuisce un ruolo centrale nel processo di disseminazione del cancro, una sostanziale modifica della metodica stessa mediante aggiunta di nuovi marcatori molecolari (EGFR, HER2, HER3, EpCAM, PI3KCA, AKT2, AR, Aurora kinase, CD133) è stata concordata e tuttora in via di elaborazione.



## **ISOLAMENTO DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI DA CARCINOMA MAMMARIO TRIPLO NEGATIVO MEDIANTE FILTRAZIONE (SCREENCELL® FILTRATION DEVICES)**

Tutti i sistemi di isolamento EpCAM-dipendenti delle CTC derivano dall'idea originale per cui la presenza di cellule epiteliali nel sangue periferico indicherebbe la disseminazione di cellule tumorali. Alla luce delle recenti evidenze sul ruolo della transizione epitelio-mesenchima nel processo di disseminazione tumorale, tale presupposto sembra definitivamente superato e la necessità di utilizzare sistemi antigene-indipendenti per l'isolamento delle CTC appare conseguentemente evidente [19]. L'alternativa più interessante ai sistemi che isolano le CTC sulla base delle loro caratteristiche biologiche è rappresentata dai sistemi di filtrazione, che isolano le cellule sulla base delle dimensioni, indipendentemente dalla loro espressione di antigeni epiteliali [20]. Tra questi, il sistema di filtrazione ScreenCell® risulta di particolare interesse, consentendo a seconda del kit usato di eseguire analisi di biologia molecolare per la definizione del profilo di espressione genica delle CTC oppure di colorare le CTC con tecniche di immunisto chimica per la definizione del fenotipo cellulare o infine di mettere in coltura le CTC per costruire modelli di studio in vitro.

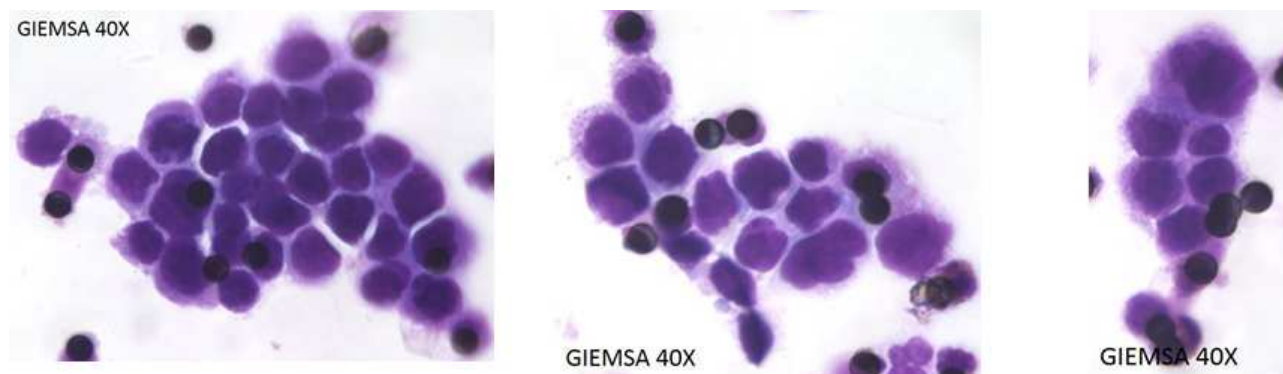
Il sistema di filtrazione ScreenCell® consente di isolare cellule tumorali circolanti a partire da 3mL di sangue periferico mediante una procedura semplice e veloce, che prevede il passaggio del sangue attraverso una membrana con pori circolari ( $7.5 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ) distribuiti casualmente sulla superficie del filtro ( $1 \times 10^5$  pori/cm<sup>2</sup>) [21].

Per l'isolamento non-EpCAM dipendente di cellule tumorali circolanti sono stati usati kit ScreenCell® Cyto and CC, al fine di eseguire rispettivamente analisi immunisto chimica di cellule fissate su vetrino e colture cellulari di cellule vitali. In entrambi i casi i filtri utilizzati consentono di preservare la morfologia delle cellule isolate e gli eventuali microclusters di cellule tumorali.

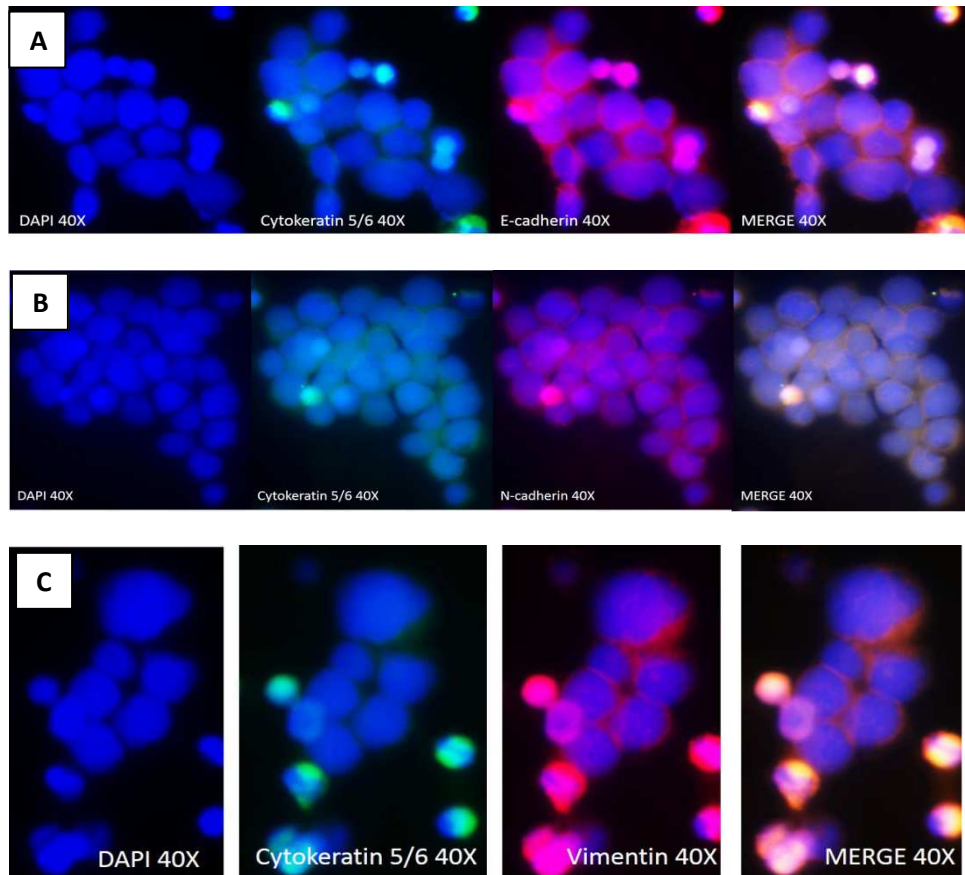
## Risultati

Su cinque pazienti affette da carcinoma triplo negativo metastatico complessivamente studiate, l'analisi ha dimostrato presenza di CTC in tre campioni, dei quali solo uno risultato positivo all'analisi con CellSearch<sup>®</sup> (55 CTC/7.5 mL). Sulle cellule tumorali circolanti isolate per filtrazione, indipendentemente dall'espressione di antigeni epiteliali, è stata eseguita analisi immunocitochimica per marcatori epiteliali (citocheratine 5/6; E-caderina) e mesenchimali (N-caderina; vimentina) [22].

Le immagini delle cellule tumorali circolanti isolate con kit ScreenCell<sup>®</sup> Cyto in tre campioni sono mostrate nella Figura 3. A scopo esemplificativo, le colorazioni ottenute con analisi immunocitochimica in uno dei tre campioni sono mostrate nella Figura 4.



**Fig. 3** Cellule tumorali circolanti isolate mediante ScreenCell<sup>®</sup> Cyto kit da sangue periferico di pazienti affette da carcinoma mammario triplo negativo



**Fig. 4** Colorazioni ottenute con analisi immunoistochimica su CTC isolate con ScreenCell<sup>®</sup> Cyto kit. **Pannello A:** CTC marcate con anticorpi anti-citocheratine basali 5/6 e anti-E-caderina; **Pannello B:** CTC marcate con anticorpi anti-citocheratine basali 5/6 e N-caderina; **Pannello C:** CTC marcate con anticorpi anti-citocheratine basali 5/6 e anti-vimentina)

Parallelamente, sono state definite le condizioni sperimentali per l'espansione in coltura di cellule tumorali circolanti con fenotipo ibrido epiteliale-mesenchimale, isolate con ScreenCell CC. Tale procedura è propedeutica all'inoculazione di CTC in topi NOD SCID per la costruzione di modelli di PDX (patient-derived xenografts) (collaborazione con Istituto Nazionale Tumori Regina Elena).

## **ANALISI DEL PROFILO MUTAZIONALE DI SINGOLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI CON SISTEMA DEPARRAY™**

Il significato prognostico della conta delle CTC nel sangue periferico di pazienti con carcinoma metastatico della mammella tramite CellSearch® system ha ormai raggiunto livelli di evidenza scientifica convincenti [23]. Particolare attenzione è riservata alla possibilità di caratterizzare il genotipo e il fenotipo delle CTC, soprattutto alla luce delle più recenti evidenze che mostrano come le CTC riflettano più da vicino la biologia dei cloni cellulari dominanti rispetto al tumore primitivo o alle cellule delle metastasi a distanza [24]. La difficoltà principale nella definizione accurata del profilo molecolare delle CTC è la loro purificazione. I protocolli e le tecniche attualmente in uso prevedono una fase di arricchimento delle CTC, necessaria dato il loro numero esiguo nel sangue periferico, ma non prevedono una fase di purificazione delle CTC rispetto ai globuli bianchi, limitando l'attendibilità delle procedure di identificazione di marcatori CTC-specifici.

Solo di recente, è stata ideata una tecnologia innovativa, DEPArray™ system (Di-Electro-Phoretic Array system; Silicon Biosystems (SB, Bologna, Italia), che consente l'isolamento e la caratterizzazione di singole cellule tumorali circolanti [25]. Il DEPArray™ system lavora a valle rispetto all'analisi CellSearch, il cui protocollo standard deve pertanto essere rispettato durante la prima fase del workflow. Il sistema CELLTRACKS® AUTOPREP® eroga il campione processato in una cartuccia inserita in un supporto cartuccia MAGNEST®. Il potente campo magnetico del supporto cartuccia MAGNEST® attrae le cellule marcate magneticamente sulla superficie della cartuccia. La cartuccia posta all'interno del supporto MAGNEST® deve essere conservata al buio e a 4 °C. Il campione così conservato viene successivamente aspirato dalla cartuccia CellSearch® e trasferito nella cartuccia DEPArray™, dalla quale le cellule selezionate possono essere movimentate singolarmente mediante campi elettrici e recuperate per l'analisi genetica. Il limite principale nella applicabilità clinica del sistema DEPArray™ è rappresentato dal fatto che durante la fase di trasferimento del campione da una cartuccia all'altra, inevitabilmente una quota variabile dal 20 al 60% delle cellule tumorali presenti nel campione viene inevitabilmente persa.

Di contro, il sistema DEPArray™ offre, ad oggi, l'opportunità unica di studiare singole cellule tumorali circolanti, superando i limiti imposti dalla eterogeneità biologica intra-tumorale.

La piattaforma DEPArray™ è basata sul principio fisico della dielettroforesi. Il cuore del sistema è costituito da un microchip che integra un array di 300.000 elettrodi in un circuito microfluidico. Quando una sospensione di cellule viene iniettata attraverso il sistema di canali, le singole cellule vengono ingabbiate in corrispondenza dell'array in levitazione stabile, senza mai toccare il substrato. Le cellule vengono quindi analizzate in fluorescenza e in campo chiaro, selezionate in funzione di specifici criteri di gating e successivamente analizzate sulla base delle proprietà morfologiche prima della selezione finale. Le cellule selezionate vengono movimentate singolarmente mediante campi elettrici e recuperate per l'analisi genetica.

La tecnologia di Silicon Biosystems si basa sulla capacità di un campo elettrico di esercitare forze su cellule sospese in un liquido. In accordo con questo principio elettrocinetico, che è chiamato dielettroforesi (DEP), una particella neutra, quando è soggetta a campi elettrici non uniformi, subisce una forza diretta verso posizioni dello spazio con intensità di campo crescenti (dielettroforesi positiva - pDEP) o decrescenti (dielettroforesi negativa - nDEP). Nel sistema DEPArray™ il campo elettrico è generato sulla superficie di un chip di silicio direttamente interfacciato a una camera microfluidica contenente la sospensione di cellule. Ciascun elettrodo può essere programmato per realizzare una gabbia di dielettroforesi posizionata nella regione dello spazio corrispondente all'elettrodo; all'interno di ciascuna di tali gabbie di dielettroforesi una particella può essere intrappolata in levitazione stabile per poi essere analizzata individualmente. L'analisi condotta su ciascuna cellula consente al sistema di effettuare sofisticate analisi basate sulle immagini in fluorescenza grazie alle quali è possibile identificare le caratteristiche peculiari che distinguono una cellula target da decine di migliaia di altre cellule contaminanti. Passo dopo passo le cellule target possono essere movimentate in modo indipendente ma simultaneamente verso una zona del chip da cui possono essere recuperate in modo automatico mediante controllo microfluidico.

Il sistema DEPArray™ utilizza una meccanica di alta precisione e una tecnologia avanzata di image-processing per eseguire un workflow, riassunto dai seguenti step fondamentali, per l'isolamento di singole cellule tumorali circolanti (Fig. 5):

- caricamento del campione mediante controllo microfluidico: vengono utilizzati e controllati dei gradienti di pressione necessari a far fluire il campione dal serbatoio di ingresso all'interno del chip. Il processo di caricamento viene monitorato e controllato automaticamente dal sistema. Una volta che il campione è stato caricato sul chip, il sistema crea le condizioni ideali all'interno del chip per ingabbiare le cellule e tenerle in sospensione durante tutte le fasi del processo garantendo un controllo robusto e affidabile del sistema
- acquisizione e analisi delle immagini: l'analisi del campione è ottenuta attraverso la scansione ottica dell'intera superficie del chip con molteplici filtri in fluorescenza oltre che in campo chiaro
- identificazione e selezione delle cellule target: in questo step le cellule target sono classificate e selezionate. Le cellule possono essere analizzate sotto diversi aspetti per validare la loro natura. Il sistema consente di visualizzare scatter plot o istogrammi delle misure effettuate durante lo step di analisi e fornisce una rappresentazione in forma di tabella di tutte le misure effettuate sulle immagini. Per ogni cellula selezionata viene inoltre mostrata la galleria delle immagini acquisite durante lo step di analisi per consentire all'utente di integrare le misure effettuate dal calcolatore con una valutazione morfologica
- sorting automatico delle cellule target identificate: in questo step, ciascuna cellula di interesse è individualmente e simultaneamente portata dalla posizione iniziale sino al punto di recupero. Il controllo digitale della movimentazione eseguito su ciascuna delle cellule di interesse consente al sistema di ottenere una purezza di sorting elevata
- recupero delle cellule target: il processo di sorting e di recupero può essere iterato consentendo la raccolta separata di molteplici cellule o gruppi di cellule purificate che

saranno poi destinate all'analisi genetica eseguita tramite tecniche tradizionali di biologia molecolare

La caratterizzazione molecolare di singole Cellule Tumorali Circolanti isolate per mezzo del DEPArray™ è basata sull'amplificazione dell'intero genoma (Whole Genome Amplification – WGA) delle cellule di interesse attraverso il kit Ampli1™ WGA. Dopo amplificazione, il sequenziamento del DNA (Ampli1™ Sequencing Kits) fornisce un'immagine completa delle variazioni genetiche, cellula per cellula, in maniera dinamica ed automatizzata, rispetto alle mutazioni di geni target predefiniti.

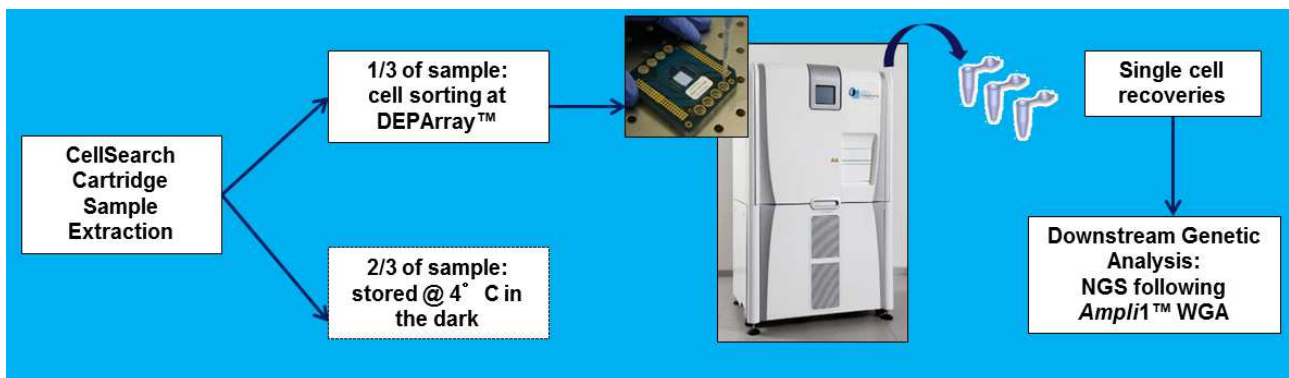


Fig. 5 Estrazione di cellule tumorali circolanti da cartuccia CellSearch e successiva analisi genetica.

## Risultati

Il concetto di eterogeneità intra-tumorale è attualmente oggetto di notevole interesse da parte della comunità scientifica internazionale. E' stato ormai ampiamente dimostrato che diverse sottopopolazioni cellulari, con profili di espressione genica distinti, coesistono nel contesto di un singolo tumore e competono per guadagnare un vantaggio replicativo. Secondo la teoria dell'evoluzione darwiniana del cancro, infatti, la chiave per la comprensione della biologia dei

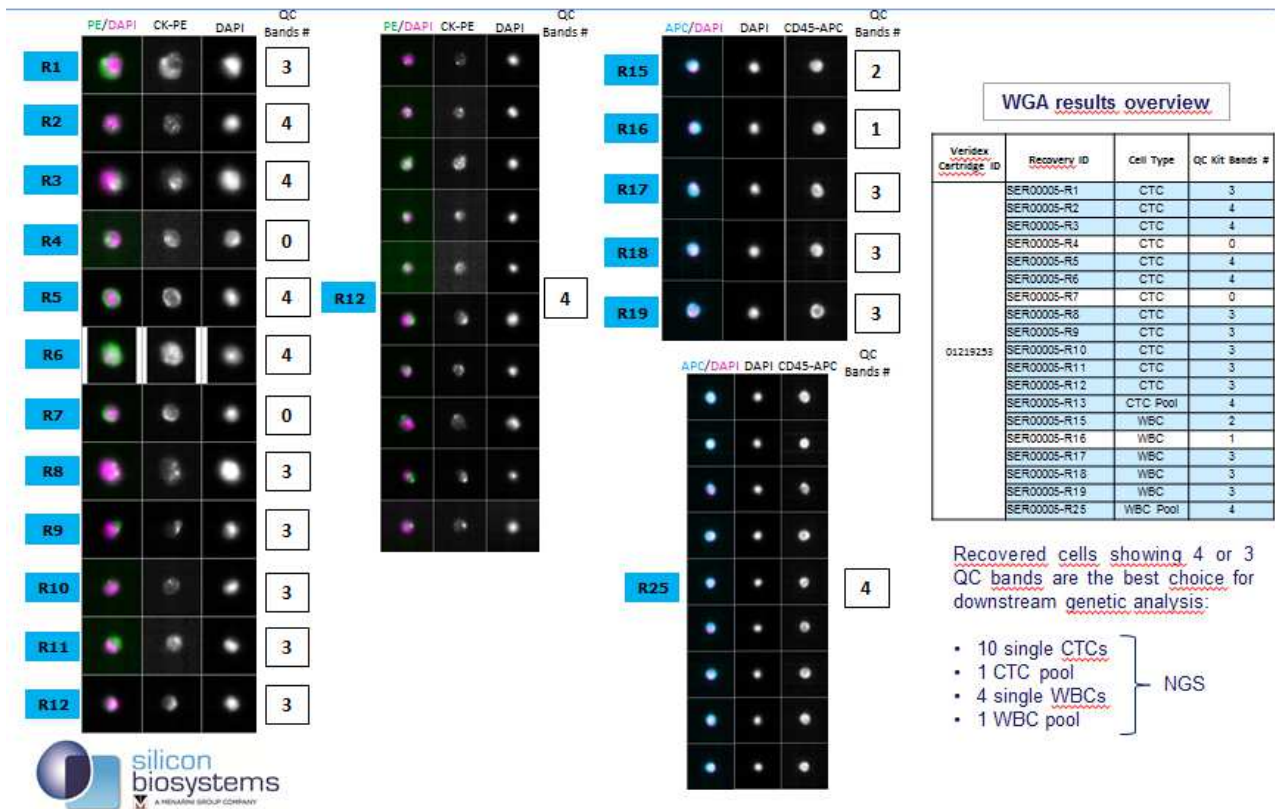
tumori risiede nella definizione delle vie di segnale che governano la replicazione e la sopravvivenza dei cloni cellulari dominanti [26].

L'eterogeneità biologica delle cellule tumorali circolanti, rilevante ai fini della validazione della biopsia liquida in oncologia clinica, complica ulteriormente lo scenario nel quale si muove la ricerca sull'analisi mutazionale del cancro. Identificare alterazioni genetiche ed epigenetiche presenti in una sottopopolazione cellulare, infatti, risulta tanto più complicato quanto più esiguo è il numero delle cellule di interesse. Per i motivi suddetti, l'utilizzo del DEPArray™ system per l'isolamento di singole cellule tumorali circolanti, dopo arricchimento mediante CellSearch®, appare tanto innovativo quanto interessante.

Dal momento che l'efficienza del DEPArray™ system nel recupero di singole cellule per l'analisi genetica dipende strettamente dal numero di cellule presenti nel campione processato mediante CELLTRACKS® AUTOPREP®, è stato necessario lo screening di 10 pazienti per poter identificare un campione in cui il numero di CTC fosse sufficiente a garantire l'esito dell'analisi su singola cellula, evitando così spreco di materiale biologico e costi inutili. Nel campione selezionato per l'analisi mediante DEPArray™, infatti, il sistema CellSearch® ha identificato la presenza di un numero di CTC >1000/7.5 mL. La cartuccia erogata dal CELLTRACKS® AUTOPREP® è stata inviata direttamente alla Silicon Biosystems (SB, Bologna, Italia) per l'analisi mediante DEPArray™ system.



Per l'analisi genetica sono state selezionate 10 singole CTC e un pool di 12 CTC. Sono stati parallelamente analizzati 4 singoli globuli bianchi e un pool di globuli bianchi, usati come controllo per l'analisi genetica (Fig. 6)



**Fig. 6 Selezione di cellule tumorali circolanti da cartuccia CellSearch per Whole Genome Amplification – WGA**

Il successivo sequenziamento del genoma delle cellule tumorali di interesse ha rivelato la presenza della mutazione somatica PIK3CA COSM755 (responsabile per una sostituzione aminoacidica non sense nel dominio H1074R catalitico della proteina) in tutte le singole CTC e nel pool di CTC [27]. Tale mutazione non è invece stata identificata nei singoli globuli bianchi e nel pool di globuli bianchi analizzato, a conferma del fatto che si tratta di una mutazione somatica a carico delle sole cellule tumorali circolanti (Fig. 7)

Cell Type							CTC										WBC				
							Number of Cells										Number of Cells				
Gene Name	Allele Name	Chrom	Position	VCF Ref	VCF Var	AA Mutation	Library ID	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Single	Pool
							L234	L235	L236	L237	L238	L239	L240	L241	L242	L243	L244	L245	L246	L247	L248
							Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq	Freq
PIK3CA	COSM775*	chr3	178952085	A	G	p.H1047R		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
	COSM94986*	chr3	178952085	A	G	p.H1047R		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0

**Fig.7 Presenza di mutazione somatica PIK3CA COSM755 (H1047R) in omozigosi nel 100% delle CTC analizzate**

Il gene oncosoppressore TP53 e l'oncogene PIK3CA sono i geni più frequente mente mutati nel carcinoma della mammella [28,29]. In particolare, le mutazioni a carico di PIK3CA, prevalentemente a carico degli esoni 20 e 9, si osservano nel 20-40% dei casi di carcinoma mammario., di chiaro significato prognostico e predittivo nel carcinoma della mammella ER+ e HER2+. L'attivazione costitutiva del pathway di PI3K/AKT, infatti, è associata a resistenza alla terapia endocrina e correla con una minore risposta alla terapia con trastuzumab e lapatinib in pazienti affette da carcinoma della mammella [30,31].

Il pathway di PI3K rappresenta a livello intracellulare un punto di interconnessione su cui convergono vie di segnale diverse, implicate nell'attivazione della crescita e della proliferazione delle cellule tumorali. Il gene PIK3CA è, tra tutti, quello più frequentemente mutato nel carcinoma della mammella, senza distinzioni di rilievo tra i diversi sottotipi molecolari. Si tratta perlopiù di mutazioni attivanti, a carico degli esoni 9 e 20 [32]. Nel carcinoma mammario recettore per estrogeno (ER)-positivo, l'attivazione costitutiva del pathway di PI3K/AKT è associata a resistenza all'endocrinoterapia, a causa del cross-talk tra la via di segnale del recettore per estrogeno e le tirosin-chinasi che attivano il pathway di PI3K. o attraverso l'attivazione ligando-indipendente del recettore per estrogeno via mTORC1. Nel carcinoma mammario HER2-positivo l'attivazione del pathway di PI3K, a causa di mutazioni del gene PIK3CA o della perdita di funzione di PTEN, correla con la resistenza alle terapie anti-HER2. Diverse line di evidenza mostrano come l'uso di inibitori di PI3K possano ripristinare la sensibilità alla terapia endocrina e alla terapia anti-HER2. Analisi in vitro hanno dimostrato l'attività degli inibitori di PI3K/mTOR in almeno tre sottotipi molecolari di carcinoma mammario triplo negativo ('mesenchymal-like', 'mesenchymal stem-like' and 'luminal androgen receptor'). Il knockdown di PTEN induce, in cellule di carcinoma mammario con mutazione di BRCA1, sensibilità ai PARP-inibitori, fornendo il razionale biologico per la combinazione tra inibitori di PI3K e

PARP inibitori per la terapia del subset di pazienti con carcinoma mammario BRCA1-mutato. Oltre agli analoghi della rapamicina, già sperimentati in studi clinici di fase II e III in combinazione con endocrinoterapia in pazienti affette da carcinoma mammario metastatico, diversi nuovi inibitori del pathway di PI3K/AKT/mTOR sono attualmente in corso di sviluppo clinico. Evidenze precliniche suggeriscono che l'attività antiproliferativa di tali composti sia particolarmente significativa su tumori con mutazioni attivanti di PIK3CA [33]. Sulla base di tali premesse, appare quanto mai significativa l'identificazione della mutazione somatica di PIK3CA mediante NGS dopo isolamento di CTC con DEPArray™ da sangue periferico di una paziente con carcinoma mammario triplo negativo. Un simile dato, infatti, rappresenta la dimostrazione della necessità di personalizzare lo studio delle caratteristiche molecolari di una malattia come il carcinoma mammario triplo negativo, in cui la considerevole eterogeneità biologica pone evidenti limiti alle strategie terapeutiche convenzionali.

## References:

1. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD et al. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2014;20(4):782-90.
2. Cristofanilli M. The "microscopic" revolution in breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103(5):877-80.
3. Ignatiadis M, Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(5):222.
4. Bardia A, Haber DA. Solidifying liquid biopsies: can circulating tumor cell monitoring guide treatment selection in breast cancer? *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3470-1.
5. Raimondi C, Gianni W, Cortesi E, Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(5):496-508
6. Cristofanilli M1, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-91
7. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):449-55
8. Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C, et al. Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. *J Cell Mol Med.* 2011;15(5):1066-70.
9. Mego M, De Giorgi U, Dawood S, et al. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer.* 2011;129(2):417-23
10. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012;12:178.

11. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. et al Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67
12. Raimondi C, Gradilone A, Gazzaniga P. Controversies in circulating tumor cell count during therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(5):499-507
13. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Clinical utility of circulating tumor cell counting through CellSearch(®): the dilemma of a concept suspended in Limbo. *Onco Targets Ther.* 2014;7:619-25
14. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012;72(19):4875-82.
15. Hayes DF, Paoletti C Circulating tumour cells: insights into tumour heterogeneity. *J Intern Med.* 2013;274(2):137-43.
16. Müller V, Riethdorf S, Rack B, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer: 10.1186/bcr3243.
17. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, 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):R15.
18. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013;339(6119):580-4.
19. Barriere G, Fici P, Gallerani G, et al. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med.* 2014;2(11):109
20. Vona G, Sabile A, Louha M, 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):57-63.

21. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 2011;31(2):427-41.
22. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008;68(4):989-97
23. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):406-14.
24. Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med.* 2013 Nov;19(11):1450-64.
25. Peeters DJ, De Laere B, Van den Eynden GG, et al. Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer.* 2013;108(6):1358-67.
26. Polyak K. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: a case for Darwinian tumor evolution. *Nat Med.* 2014;20(4):344-6
27. Balko, J.M., I. Mayer, M. Levy, C. Arteaga. 2015. PIK3CA Mutations in Breast Cancer. *My Cancer Genome* <http://www.mycancergenome.org/content/disease/breast-cancer/pik3ca/>
28. Fernandez SV, Bingham C, Fittipaldi P, et al. TP53 mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):445.
29. Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol.* 2014. pii: S1574-7891(14)00286-5.
30. Provenzano A, Kurian S, Abraham J. Overcoming endocrine resistance in breast cancer: role of the PI3K and the mTOR pathways. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(2):143-7.
31. Lavaud P, Andre F. Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials. *BMC Med.* 2014;12(1):132.

32. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, et al. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224.
33. Zardavas D, Baselga J, Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(4):191-210.