

# RELAZIONE FINALE DI RICERCA

## 1 INTRODUZIONE

Il tumore della mammella è il cancro più diagnosticato nelle donne in tutto il mondo e, nonostante i progressi che la ricerca clinica e scientifica hanno compiuto negli ultimi anni, rimane comunque un importante problema sanitario.

La ricerca ha evidenziato che il tumore della mammella è una malattia eterogenea dal punto di vista delle caratteristiche cliniche e biologiche e, attraverso lo studio del genoma, si è quindi andati oltre alla classica classificazione di questi tumori.

La normale pratica clinica infatti prevede che tale classificazione venga fatta in base alla presenza di tre target *actionable* che sono l'espressione dei recettori ormonali, nello specifico quelli per estrogeni e progesterone, e l'amplificazione del gene HER2, codificante per una proteina nota con il nome di fattore di crescita epidermico. I tumori che esprimono i recettori ormonali possono essere trattati con farmaci ormonali, mentre, per i tumori esprimenti l'amplificazione di HER2, è stato individuato un anticorpo monoclonale noto come trastuzumab (Herceptin). I tumori tripli negativi (TNBC) invece non esprimono alcun target e, per questo motivo, le pazienti non possono beneficiare di alcuna terapia target. Tra le ultime terapie promettenti sono stati individuati gli inibitori PARP come olaparib. Quest'ultimo è stato recentemente approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della mammella metastatica con mutazione del gene *BRCA1/2*. Tale mutazione infatti, sia a livello germinale che somatico, comporta un'alterazione della proteina e a un deficit del sistema di riparazione del DNA all'interno delle cellule tumorali. Olaparib è attivo solo nelle cellule con deficit del riparo e per questo motivo le cellule *BRCA* mutate si prestano alla terapia. Il motivo per cui olaparib sembra funzionare in questi casi è dato dal principio della *synthetic lethality*, descritto per la prima volta da Calvin Bridges nel 1922 sul moscerino della frutta, secondo il quale la combinazione dei difetti di due o più geni porta alla morte cellulare mentre singolarmente non avrebbero avuto effetti deleteri sulla cellula tumorale. Ciononostante, negli ultimi anni molti studi preclinici hanno studiato l'effetto di olaparib nelle linee cellulari di tumore mammario senza mutazione di *BRCA1/2* ma con mutazioni in altri geni in grado di portare, come stesso risultato finale, alla deficienza del riparo del DNA.

Sotto questo punto di vista, le analisi molecolari volte all'analisi dell'impronta genetica del tumore mammario diventano quindi essenziali, sia per la ricerca di target molecolari terapeutici, sia per lo studio di marcatori di risposta alla terapia. Un grande aiuto è stato fornito dall'avanzamento delle tecniche di sequenziamento.

Negli ultimi anni l'attenzione si sta focalizzando sulla biopsia liquida (o *liquid biopsy*) al fine di studiare i tumori a partire da ciò che di tumorale si individua dal sangue, con il vantaggio quindi di ottenere tali

informazioni in modo meno invasivo: le cellule tumorali circolanti (CTC), il DNA tumorale circolante (ctDNA) e gli esosomi. L'esperienza più matura si ha nello studio del ctDNA: piccoli frammenti di DNA rinvenibili nel sangue che vengono liberati dalle cellule tumorali morenti e che possono aiutare alla comprensione della firma genetica tumore. Le CTC invece sono cellule di origine tumorale che evadono dal tumore primario per raggiungere il circolo sanguigno e raggiungere un organo secondario. Nell'organo secondario, una favorevole nicchia per l'impianto e la proliferazione della CTC può dare origine a una metastasi. La CTC trova importanza quindi nel processo biologico della carcinogenesi e non solo. Nel contesto della biopsia liquida l'analisi molecolare può essere utile a individuare il livello di eterogeneità del tumore: CTC con firme molecolari diverse possono indicare cloni eterogenei all'interno del tumore, con conseguente presenza di cellule che rispondono in maniera diversa alle terapie e possibilità di cellule tumorali resistenti. Gli esosomi invece sono piccole vescicole che vengono espulse da tutte le cellule e che trasportano acidi nucleici e proteine a distanza. Possono quindi essere utili ai fini dello studio della creazione della nicchia metastatica.

Con questo studio, il cui scopo primario era quello di valutare il livello di concordanza delle alterazioni genetiche nel tumore primario, nel ctDNA e nelle CTC, abbiamo avuto anche la possibilità di approfondire molto le conoscenze relative alla eterogeneità del tumore, ponendo le basi per nuovi approcci nello studio della resistenza e sensibilità alle terapie nel tumore mammario. In particolare, le analisi sono state eseguite con un approccio di *Next Generation Sequencing* (NGS), la nuova frontiera nel campo della biologia molecolare.

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 Pazienti**

In questo studio sono stati arruolati 12 pazienti (6 TNBC, 6 Luminali A). Sono stati raccolti i campioni di tumore primario incluso in paraffina (FFPE), e sangue periferico e plasma a diversi tempi di accesso. Il tempo di accesso A si riferisce a cellule isolate alla diagnosi, il tempo di accesso B indica CTC isolate post-chirurgia e pre-terapia adiuvante, al tempo C abbiamo le cellule isolate dopo la terapia adiuvante. Le pazienti non sono state sottoposte a terapia neoadiuvante, quindi i dati molecolari relativi al tumore FFPE, il plasma e le CTC al tempo A non presentano variazioni potenzialmente ascrivibili alla terapia e che potrebbero "inficiare" le caratteristiche basali del tumore.

### **2.2 Analisi molecolari su tumore primario FFPE e ctDNA con NGS**

Il ctDNA è stato isolato dal plasma delle pazienti con kit QIAmp Nucleic Acid Extraction Kit (QIAGEN). L'estrazione di DNA dal tumore primario FFPE è stata condotta a partire da 2/4 sezioni di FFPE da 10

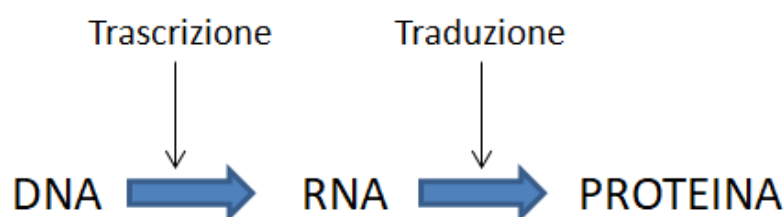
µm, utilizzando il kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific). Dopo aver valutato la concentrazione e la qualità del DNA con metodi spettrofotometrici, sono state preparate le librerie per il sequenziamento con kit NEBNext Ultra II FS Library Quantification Kit (New England). Il *target enrichment* è stato condotto utilizzando un pool di geni *custom* (Integrated DNA Technologies - IDT). I geni sono riportati nella Figura 1. Tra questi molti geni sono coinvolti nel riparo del DNA in seguito a lesioni della doppia elica e quindi potenzialmente coinvolti con la sensibilità all'uso di farmaci innovativi tra cui gli inibitori di PARP come l'Olaparib. I sequenziamenti sono stati eseguiti su piattaforma Illumina utilizzando lo strumento MiSeq (Illumina Inc.).

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

**Figura 1.** Tabella dei geni inclusi nel pannello di sequenziamento NGS.

### 2.3 Analisi di espressione dell'RNA dei geni coinvolti nella cancerogenesi

Le analisi di espressione sono utili per verificare se esistono RNA messaggeri che verosimilmente si tradurranno nella proteina (Figura 2). In particolare, è possibile verificare anche il livello di espressione e quanto questo si discostino rispetto all'espressione rilevabile in un campione sano che corrisponde alla situazione normale.



**Figura 2:** il dogma centrale della biologia. Nel DNA vi sono geni che vengono trasformati in RNA grazie al processo di trascrizione. Attraverso la traduzione si produce la proteina dall'RNA.

È stata eseguita la estrazione dell'RNA dai campioni del tessuto tumorale FFPE a partire da 2/4 sezioni di campione da 10 µm. L'estrazione è stata condotta usando il kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific). Dopo averlo quantificato con metodi spettrofotometrici, 100 ng di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando SuperScript VILO IV MasterMix (Thermo Fisher Scientific). Sono state eseguite analisi dell'espressione dell'RNA di alcuni geni tra cui AR, il cui prodotto proteico è il recettore androgenico, utilizzando sonde TaqMan (Thermo Fisher Scientific) in triplicato per ogni campione, confrontando il tumore con le controparti sane. Le analisi sono state condotte con Real-Time PCR e i risultati sono stati normalizzati utilizzando *GAPDH* come gene *housekeeping*. A seguito

dei risultati ottenuti, è stata valutata anche la espressione di un microRNA, un piccolo frammento con funzioni regolatorie che, quando presente ad alti livelli rispetto al normale sembra essere in grado di “spegnere” il trascritto con conseguente produzione limitata della proteina (il recettore androgenico). Al contrario, quando il microRNA è poco espresso, non è in grado di spegnere il trascritto e la produzione di recettore androgenico può aumentare perturbando le funzioni della cellula. Le analisi di espressione del microRNA sono state condotte a partire da cDNA sintetizzato tramite TaqMan microRNA RT kit (Thermo Fisher Scientific), arricchendo per il microRNA in esame. Per la reazione di Real-Time PCR sono state utilizzate sonde TaqMan (Thermo Fisher Scientific). I risultati sono stati confrontati con le controparti sane e normalizzati utilizzando RNU6B come *housekeeping*.

## **2.4 Analisi genetica delle CTC**

Le CTC sono state isolate come cellule singole dal sangue intero (18 ml) delle pazienti ai tempi A, B e C. L'isolamento è stato eseguito mediante del DEPArray (Menarini Silicon Biosystems). Ogni singola CTC è stata sottoposta a *whole genome amplification* (WGA) per permettere la sua lisi e l'amplificazione del genoma utilizzando il kit Ampli1 WGA Kit (Menarini Silicon Biosystems). La qualità del DNA è stata valutata con kit Ampli1 QC Kit (Menarini Silicon Biosystems) utilizzando un gel di agarosio 1,2%. Sono state preparate le librerie per il sequenziamento delle aberrazioni cromosomiche, o *copy number variation* (CNV) per il sequenziamento su piattaforma Illumina utilizzando il kit Ampli1 LowPass for Illumina (Menarini Silicon Biosystems). A causa della scarsa qualità dei dati ottenuti con questo primo approccio sperimentale, si è deciso di spostare le analisi su una piattaforma tecnologica alternativa Illumina, quella Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Le librerie prodotte con il kit Ampli1 LowPass for Ion Torrent (Menarini Silicon Biosystems) sono state corse su Ion Torrent S5 e le analisi bioinformatiche sono state eseguite dall'unità di Bioinformatica dell'Istituto. La analisi delle mutazioni delle stesse CTC su piattaforma Illumina non è stata possibile a causa del non corretto funzionamento del kit, ancora in fase di test preliminari presso l'azienda che lo sta producendo.

## **2.5 Isolamento e analisi di esosomi delle pazienti**

L'isolamento degli esosomi è stato eseguito dal plasma delle pazienti attraverso metodi basati sulle dimensioni delle vescicole esosomiali, detti SEC (*size exclusion chromatography* o *column-based*). gli esosomi dei tempi A, B e C così arricchiti Sono stati analizzati per le analisi successive. Per l'analisi di 37 antigeni di superficie, è stato utilizzato il kit per citofluorimetria MACSPLEX (Miltenyi).

## 3 RISULTATI

### 3.1 Analisi di mutazioni del DNA del tumore primario e del ctDNA

La ricerca di varianti del tumore FFPE con NGS è stata eseguita su 10 pazienti delle 12 in quanto il materiale di due campioni FFPE non era di qualità adeguata a poter permettere le analisi, mentre l'analisi del ctDNA è stata eseguita solo su 8 in quanto per 4 pazienti non è stato possibile recuperare il plasma.

L'analisi bioinformatica ha restituito i dati filtrando i polimorfismi (varianti con frequenza maggiore all'1% nella popolazione) e le varianti riportate come benigne sul database online ClinVar.

Per quel che riguarda le analisi su FFPE, per i geni *AKT*, *EGFR*, *EPCAM*, *ESR1*, *NOTCH1*, *PTEN* non è emersa alcuna alterazione. Sono state riscontrate in totale 45 mutazioni in 10 pazienti, molte delle quali (27%) nel gene *KMT2C*. Seguono, in ordine di frequenza, *BRCA2* e *PIK3CA*. Le alterazioni di *KMT2C* sono state individuate a frequenze molto basse (<6%) indicando la presenza di una popolazione clonale con tale alterazione. Le analisi eseguite sul ctDNA delle pazienti hanno mostrato che *KMT2C* rimane il gene più alterato, seguito sempre da *BRCA2* e *PIK3CA*. I risultati sono quindi sovrapponibili a quanto ottenuto nel tumore primario. Tuttavia, per ogni paziente, solo alcune mutazioni combaciano in FFPE e in ctDNA. Alcune mutazioni sono presenti solo nel materiale FFPE e non nel ctDNA, e viceversa.

### 3.2 Analisi di espressione di AR nel tumore primario

Le analisi di espressioni di AR è stata eseguita su tutte le 12 pazienti tramite Real-Time PCR. La letteratura riguardo l'espressione del gene AR nel tumore della mammella mostra risultati spesso contrastanti ma il suo studio negli ultimi anni è stato molto approfondito. Anche nella nostra casistica, AR mostra livelli di espressioni variabili, essendo presente ad alti livelli in alcune pazienti e molto basso in altri, senza discriminazione di sottotipo.

Pertanto si è deciso di valutare l'espressione di un microRNA che, da letteratura, è descritto come un regolatore dell'espressione di AR, con l'obiettivo di verificare se l'andamento di AR fosse imputabile all'andamento del microRNA. I risultati hanno mostrato che il microRNA è di fatto espresso a livelli molto bassi rispetto alla controparte sana in 11 campioni, mentre solo in una paziente mostra livelli molto alti di espressione. Questo risultato suggerisce che la mancanza di questo microRNA possa essere coinvolto di regolazione di AR e che quindi dovrebbe essere più approfonditamente studiato nell'ambito della ricerca sul recettore per gli androgeni.

### 3.3 Analisi del CNV delle CTC

Le analisi delle aberrazioni cromosomiche nelle CTC sono state inizialmente programmate per confermare che le cellule isolate con DEPArray fossero effettivamente tumorali, avendo un corredo cromosomico alterato. Infatti, le CTC, trattandosi di cellule maligne, generalmente mostrano una serie di aberrazioni cromosomiche non comunemente riscontrabili nelle cellule sane. Infatti, molte regioni delle cellule tumorali mostrano frammenti di cromosomi in eccesso (gain) o in difetto (loss), conducendo a un alterato dosaggio genico che sposta la cellula dalla normale condizione omeostatica.

La metodica ha dimostrato di riuscire a discriminare, sulla base del profilo di CNV, cellule tumorali rispetto alle cellule sane come ad esempio i leucociti, come mostrato in figura 3.

Tuttavia, grazie alla mole di dati generata da questo tipo di analisi, si è deciso di procedere con una serie di indagini di tipo bioinformatico atte a individuare i pathways (traducibili come processi biologici) alterati per ogni singola CTC. In particolare, una pathway si dice alterata quando i geni che codificano per le proteine coinvolte in quel processo si trovano in una regione in gain o in loss.

Le analisi mostrano che le CTC sono estremamente eterogenee, avendo infatti pathway alterati spesso molto diversi, ma che riconducono analogamente a una condizione patologica. Tuttavia, le pathway più frequentemente alterate sono prevalentemente coinvolte in fenomeni di tipo infiammatorio.

Stratificando l'analisi per tempo di accesso (A, B e C) è stato possibile individuare pathway diverse che potrebbero essere correlate alla risposta alla terapia adiuvante.

### **3.4 Analisi degli antigeni esosomali**

Nonostante negli ultimi anni ci sia stato uno studio prevalentemente del contenuto di queste vescicole (proteine, mRNA, microRNA) poco si sa degli antigeni che queste vescicole presentano in superficie e che svolgono un compito importante nel far sì che l'esosoma comunichi con il microambiente tumorale.

In questo contesto, le analisi da noi svolte sugli esosomi delle pazienti ha mostrato che gli antigeni di superficie si manifestano in maniera diversa in base al tempo di accesso. In particolare, nelle fasi iniziali si ha un aumento degli antigeni che in letteratura sono comunemente associati a staminalità, mentre altri antigeni sembrano aumentare in seguito alla terapia a scapito di altri.

## **4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI**

La *liquid biopsy*, insieme ai suoi elementi più studiati (CTC, ctDNA ed esosomi), è stata ampiamente studiata in quanto sembra essere in grado di dare risultati relativi all'impronta genetica del tumore in maniera non invasiva rispetto alla biopsia classica. Tuttavia, i dati sono ancora discordanti su quanto effettivamente l'analisi di frammenti di DNA o di altri elementi riscontrabili nel sangue possano concordare con quanto effettivamente è presente nel cancro.

I risultati da noi ottenuti mostrano dati che riflettono l'eterogeneità della malattia tumorale della mammella. Tale eterogeneità è spesso causa di resistenza alla terapia e progressione tumorale, essendo presenti diversi cloni con alterazioni molecolari diverse. Abbiamo notato questa eterogeneità nei profili di CNV delle CTC isolate da sangue. Infatti, i processi biologici alterati nelle CTC erano diversi a livello delle CTC isolate nello stesso paziente, dimostrando che le cellule liberate dal tumore primario sono cloni con caratteristiche diverse (eterogeneità intra-paziente) quindi potenzialmente in grado di rispondere in maniera diversa alle terapie. Inoltre, le CTC erano molto diverse anche tra pazienti diversi (eterogeneità inter-paziente). Solo attraverso questi studi è possibile approfondire l'analisi dei cloni in quanto l'analisi del *bulk* di cellule non riuscirebbe ad arrivare a questa risoluzione. Tali dati potrebbero in futuro offrire la possibilità di individuare, attraverso l'utilizzo della *liquid biopsy*, la presenza di cloni con caratteristiche resistenti, con grande impatto sulla decisione terapeutica e sul *management* della paziente dal punto di vista clinico.

Ciononostante, la condivisione della alterazione di pathway in molte CTC riflette invece la necessità di proseguire gli studi su queste caratteristiche, in quanto potranno in futuro spiegare processi che si dimostrano vitali per le CTC nel circolo sanguigno, le cui cause non sono ancora ben note.

Anche attraverso il sequenziamento del DNA del tumore primario si è potuta osservare una certa eterogeneità cellulare, essendo presenti molte alterazioni dei geni analizzati e a basse frequenze potenzialmente indice di tale fenomeno, osservato anche nel ctDNA. Tale eterogeneità manifesta inoltre la possibilità di utilizzare il ctDNA per aumentare la conoscenza della firma genetica del tumore primario in maniera meno invasiva.

Inoltre, i nostri risultati aprono anche la strada allo studio di un microRNA che ha come target il gene AR, codificante per il recettore degli androgeni. Il microRNA infatti è stato visto presente a bassi livelli in 11 campioni su 12, indicando un possibile effetto di *tumor-suppressor*. La sua funzione necessita quindi ulteriori indagini, valutando anche il sottotipo.

I risultati verranno sottomessi a riviste scientifiche di spessore internazionale sotto forma di articoli scientifici e in quella sede saranno meglio discussi.

### **Ringraziamenti**

Vorrei ringraziare tutta l'associazione Annastaccatolisa e in particolare Roberta, persona forte e dolce che ha sostenuto il mio lavoro e che ho avuto modo di conoscere personalmente. Oltre alla ricerca, è stato per me emozionante parlare di Anna Lisa con Roberta dopo aver letto il libro "Toglietemi tutto ma non il sorriso", che mi ha fatto capire che era proprio come si descriveva nel libro: genuina, sensibile e forte. È stato per me importante anche conoscere le persone a lei vicine, gli amici, che mi hanno trasmesso in poche ore l'affetto che provano ancora per lei e oggi lo traducono in impegno per ricordarla con questa associazione. Ho condotto la mia ricerca pensando molto a lei, e continuerò a condurla pensando a lei e a tutte le donne che si sono trovate, purtroppo, nella sua situazione. Ringrazio anche l'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori IRST-IRCCS e il coordinatore del gruppo Nanobiomics and Liquid Niche, Dr Francesco Fabbri.