

RELAZIONE FINALE PROGETTO:

ANALISI MEDIANTE qRT-PCR DELL'ESPRESSIONE GENICA DI HER-2 IN CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI (CTC) DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO

La tecnologia attuale, grazie alla messa a punto di protocolli di natura biochimico-fisica, è riuscita a trovare una serie di soluzioni che permettono l'enumerazione, l'arricchimento, l'analisi fenotipica e molecolare delle CTC e di numerosi sottotipi cellulari circolanti rari (cellule endoteliali e midollari).

Il sistema chiamato CellSearch, in uso presso il Laboratorio di Oncologia Molecolare Senologica dell'U.O. Multidisciplinare di Patologia Mammaria dell'A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona, applica una tecnica in cui il sangue venoso prelevato dai pazienti con carcinoma mammario è miscelato a particelle di ferro coperte con un anticorpo specifico per le cellule epiteliali. In contemporanea è eseguita anche una marcatura specifica per i leucociti con un anticorpo accoppiato a un diverso fluoro-cromo perché, essendo presenti nel materiale arricchito, si possono legare con bassa affinità ai marcatori delle cellule epiteliali. Questa tecnologia si compone di due strumenti: un preparatore pre-analitico dei campioni (CellTrack Autoprep System), un analizzatore (CellTrack Analyzer) e di un kit specifico. Il conteggio delle cellule tumorali è eseguito interamente dall'operatore. Un evento è classificato come cellula tumorale quando le sue caratteristiche morfologiche corrispondono a quelle di una cellula tumorale cioè presenta il fenotipo EpCAM+ (Epithelial Cell Adesion Molecule), CK+ (citocheratine), DAPI+ e CD45-.

Questa analisi è attualmente eseguita presso il Laboratorio di Oncologia Molecolare Senologica per i pazienti con carcinoma mammario metastatico al fine di monitorare la risposta alla terapia oncologica.

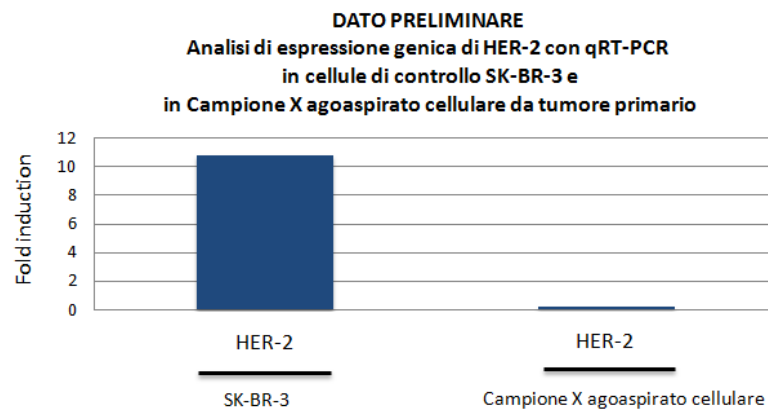
La piattaforma CellSearch si avvale anche di un kit di purificazione (CellSearch Profile kit) disegnato per il recupero delle CTC arricchite immunomagneticamente. In questo caso il prodotto derivato dal passaggio pre-analitico nel CellTraks AutoPrep può essere recuperato e utilizzato per l'estrazione di RNA permettendo la quantificazione dei livelli di espressione genica tra cui quello del gene ERBB2 (HER-2). È stato largamente dimostrato che l'iperespressione del recettore HER-2 è associata a un tipo di carcinoma mammario particolarmente aggressivo, con un notevole rischio di metastatizzazione a distanza. Risulta quindi fondamentale conoscere lo status di HER-2 ai fini di migliorare la pratica clinica poiché, l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale Trastuzumab (Herceptin®) modifica significativamente la storia del carcinoma mammario HER-2 positivo.

La tecnica utilizzata è stata la qRT-PCR: questo metodo prevede un primo step di retrotrascrizione dell'RNA estratto in cDNA e un secondo step che, grazie all'utilizzo di specifici primers e sonde (TaqMan® Gene Expression Assays), permette la quantificazione dell'espressione genica mediante un opportuno calcolo (metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Per procedere nell'analisi, sono stati scelti dei geni costitutivi (housekeeping genes) utilizzati come normalizzatori quali: *MmGl* (gene codificante per mammoglobina) che identifica le cellule epiteliali mammarie e *ACTB* (gene codificante per β -actina) che è ubiquitariamente espresso. Gli estratti, come atteso,

hanno mostrato una concentrazione molto bassa di RNA totale e, attualmente, non è stato possibile eseguirne una significativa caratterizzazione fenotipica.

L'utilizzo del CellSearch Profile kit ha permesso di ampliare l'analisi della fenotipizzazione a cellule ottenute da ago aspirato prelevate a livello del tumore primario: i dati preliminari confermano la presenza di cellule epiteliali caratterizzate dall'espressione di mammoglobina, ma lo studio è ancora da sviluppare.

Un ulteriore e interessante approfondimento dell'analisi dello status di HER-2 è stato realizzato mediante la diretta valutazione della sua espressione genica in RNA estratto da campioni di ago aspirato da carcinoma mammario primario. Fondamentale è stata la scelta di opportuni controlli quali linee cellulari di carcinoma mammario ATCC (American Type Culture Collection): SK-BR-3 (overesprimono HER-2) e MCF-7 (esprimono livelli molto bassi di HER-2). Le analisi condotte su un ridotto numero di campioni hanno permesso di stabilire le condizioni del saggio e di individuare i punti critici da approfondire con studi successivi.



Importante sarà quindi ottimizzare i metodi di estrazione e di purificazione dell'RNA estratto e di quantificazione dell'espressione di HER-2. Inoltre, grazie ad una casistica più numerosa si potrà individuare il cut-off dell'espressione di HER-2 per le diverse condizioni di analisi ossia il valore di soglia tale per cui campioni con valori di grandezze superiori o inferiori sono valutati rispettivamente come positivi o negativi per l'espressione genica di HER-2.

Questi studi sono sicuramente promettenti e indirizzati verso l'ottenimento di un ampio profilo di caratterizzazione dello status di HER-2 a livello delle CTC e delle cellule ottenute mediante ago aspirato da utilizzarsi in oncologia clinica come notevole aiuto per scelte terapeutiche sempre più personalizzate.