

## HER-2 m-RNA ed HER-2 ECD (dominio extracellulare) circolanti nel sangue di pazienti con tumore precoce della mammella(\*)

Benedetta Salvadori, Claudio Orlando, Pamela Pinzani, Vito Distante, <sup>1</sup>Donato Casella, <sup>2</sup>Simonetta Bianchi, <sup>2</sup>Milena Paglierani, <sup>2</sup>Vania Vezzosi, <sup>3</sup>Rainer Neumann, <sup>1</sup>Luigi Cataliotti, Mario Pazzagli

Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica,

<sup>1</sup>Dipartimento di Clinica Chirurgica,

<sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Umana ed Oncologica, Università di Firenze,

<sup>3</sup>Dipartimento Medico, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germania

### ABSTRACT

#### Circulating Her-2 Mrna And Her-2/ecd In Blood Of Early Breast Cancer Patients

The HER-2 gene encodes a 185kDa transmembrane glycoprotein member of the type I family of growth factor receptors. HER-2 gene activation has been found in 20% to 40% of breast cancers, analysed for gene amplification or overexpression. This has been associated with poor prognosis, high risk of relapse and reduced patient survival. HER-2 status assessment is usually studied in advanced breast cancer. We investigated a group of patients affected by early breast cancer and the role of circulating HER-2 extracellular domain (ECD) and HER-2 mRNA, potentially suitable for monitoring HER-2 status in the tumor. Circulating ECD/HER-2 was determined, before and after surgery, in 50 patients with early stage infiltrating breast cancer. In the same blood samples we measured HER-2 mRNA with a quantitative real-time RT-PCR assay. These results were compared with HER-2 status in the tumor, evaluated by immunohistochemistry and real-time RT-PCR. Although the blood levels of ECD/HER-2 before surgery were in the normal range (below 15 ng/ml), we observed a significant decrease ( $p < 0.001$ ) of levels of this circulating protein in post-surgery samples. Blood HER-2 mRNA was significantly higher ( $p = 0.001$ ) in pre-surgery cancer patients than in healthy subjects. After surgery, HER-2 mRNA decreased significantly ( $p = 0.04$ ) reaching the level of the control group. In tissue samples, HER-2 mRNA expression was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in tumor specimens than in the corresponding normal tissue of the same patient. Interestingly, only patients that showed overexpression in the tumor, measured both by RT-PCR and immunohistochemistry, had a significant decrease in the circulating levels of both ECD/HER-2 and HER-2 mRNA after surgery ( $p = 0.001$  and  $p = 0.04$ , respectively). We conclude that pre- and post-surgery measurements of circulating ECD/HER-2 and HER-2 mRNA are useful in defining HER-2 status and may identify a subgroup of early breast cancer patients which could benefit of a selected therapy.

### RIASSUNTO

Il gene HER-2 codifica una glicoproteina transmembrana di 185 kDa membro della famiglia di recettori di fattori di crescita di tipo I. L'attivazione di HER-2 è stata trovata nel 20-40% dei tumori della mammella, come amplificazione genica o overespressione. Questa attivazione risulta associata ad una cattiva prognosi, aumentato rischio di ripresa di malattia e ridotto tempo di sopravvivenza. Lo status di HER-2 è generalmente studiato nel cancro mammario metastatico. Abbiamo invece analizzato un gruppo di pazienti affette da tumore precoce della mammella, ed il ruolo del dominio extracellulare (ECD) della proteina circolante HER-2 e del suo mRNA, associato a cellule circolanti, potenzialmente utili per il monitoraggio dello status di HER-2 nel tumore. ECD/HER-2 è stato misurato, prima e dopo intervento chirurgico, in 50 pazienti con tumore precoce della mammella. Negli stessi campioni di sangue abbiamo misurato l'mRNA di HER-2 mediante un dosaggio di RT-PCR quantitativa. Questi risultati sono stati comparati con lo status di HER-2 nel tumore, misurato mediante immunostochimica ed RT-PCR real time. Nonostante i livelli ematici di ECD/HER-2 pre-operatori fossero mediamente nel range di normalità (15 ng/ml), abbiamo osservato una riduzione significativa ( $p < 0.001$ ) dei livelli della proteina circolante nei prelievi post-intervento. Il livello di mRNA circolante era più elevato nei pazienti pre-intervento ( $p = 0.001$ ) che nei soggetti di controllo. Dopo l'intervento, questo parametro si riduceva in maniera statisticamente significativa ( $p = 0.04$ ) tanto da rientrare nei livelli del gruppo di controllo. Nei campioni tissutali, l'espressione dell'mRNA di HER-2 era significativamente più elevata ( $p < 0.001$ ) nel tumore che nel corrispondente tessuto normale della stessa paziente. Inoltre soltanto le pazienti che mostravano overespressione nel tumore, misurata sia con immunostochimica che con RT-PCR quantitativa, avevano una riduzione significativa dei livelli circolanti sia di ECD che di HER-2 mRNA in seguito all'intervento chirurgico ( $p = 0.001$  e  $p = 0.04$  rispettivamente). Riteniamo quindi che la misura pre e post-inter-

(\*) Lavoro presentato a "SIBioC 2003", 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze Ottobre 2003.

vento di ECD ed HER-2 mRNA circolanti siano utili nel definire lo status di HER-2 nel tumore e che potrebbero identificare un sottogruppo di pazienti con tumore precoce da sottoporre ad una terapia mirata.

## INTRODUZIONE

Il gene HER-2 (chiamato anche HER-2/neu e c-erbB2) codifica una glicoproteina di 185 kDa appartenente alla famiglia di tipo I dei recettori per fattori di crescita, tra cui il recettore per l'EGF, c-erbB3 e c-erbB4. La fosforilazione del dominio intracellulare tirosin-chinasico provoca l'attivazione di un segnale intracellulare che porta all'accensione di diversi geni coinvolti nella proliferazione e crescita cellulare. HER-2 è costitutivamente attivato mediante overespressione e partecipa alla trasformazione tumorale attraverso diversi meccanismi quali la crescita, l'angiogenesi, la sopravvivenza cellulare e la capacità di metastatizzare (1). L'attivazione di questo oncogene è stata trovata nel 20-40% di tumori della mammella, risultando associata ad una cattiva prognosi, elevato rischio di recidive e ridotta sopravvivenza (2). E' stata notata anche una resistenza ad alcuni chemioterapici e terapie ormonali (3).

La definizione dello status di HER-2 nel tumore è ancora controversa a causa di discordanze fra i vari metodi di indagine. Alcuni ricercatori (4) hanno confrontato metodi di Southern Blotting, amplificazione tramite PCR e ibridazione in situ fluorescente (FISH) con la rivelazione dell'overespressione mediante tecniche immunostochimiche. Metodi di PCR ed RT-PCR sono ampiamente utilizzati per la valutazione dell'amplificazione ed overespressione di HER-2 nel tumore della mammella. Recentemente, anche la PCR quantitativa real time è stata introdotta per questo scopo. Questa metodica, basata sull'utilizzo di sonde fluorogeniche che vengono rilasciate in maniera proporzionale alla concentrazione del target in "tempo reale" durante l'amplificazione, sembra essere molto utile da un punto di vista clinico vista la sua semplicità, sensibilità, specificità ed alta riproducibilità (4, 5, 6, 7).

L'utilizzo di parametri ematici per la definizione dello status di HER-2 è basato sul fatto che la porzione extracellulare del recettore di 105 kDa viene rilasciata mediante taglio proteolitico. Numerosi studi hanno dimostrato che la concentrazione ematica di ECD/HER-2 è elevata in pazienti con tumore della mammella metastatico e può essere considerata un marker associato a metastasi ed incremento della massa tumorale. Di conseguenza, molti studi sono rivolti alla valutazione di questa proteina in pazienti con stadio avanzato di malattia; in questo lavoro abbiamo invece definito lo status di HER-2 in gruppo di pazienti con patologia allo stadio precoce.

Alcuni studiosi (8) hanno dimostrato che i livelli di mRNA associato a cellule circolanti nel sangue sono elevati nel 31% delle pazienti con tumore mammario invasivo rispetto ai controlli sani. Per indagare sul ruolo dell'mRNA di HER-2 come possibile marker in pazienti con stadio precoce di malattia abbiamo sviluppato una metodica di RT-PCR real-time per la misura di HER-2 mRNA nel sangue.

In sintesi, in questo lavoro abbiamo valutato il ruolo di

ECD/HER-2 ed HER-2 mRNA circolanti nel sangue per la definizione dell'espressione di HER-2 nel tessuto tumorale, ed abbiamo confrontato questi risultati con quelli ottenuti misurando l'espressione nel tumore mediante real-time RT-PCR ed immunostochimica.

## MATERIALI E METODI

50 pazienti sottoposte ad intervento chirurgico per tumore alla mammella sono state coinvolte in questo studio.

Sono stati raccolti per ciascuna paziente 10 ml di sangue prima dell'intervento e 10 ml un giorno dopo l'intervento.

6 ml di sangue pre e post intervento sono stati utilizzati per l'estrazione delle cellule nucleate tramite separazione su gradiente di densità e le cellule risospese in 500ul Trizol (Life Technologies). L'RNA totale è stato estratto secondo il protocollo fornito e risospeso in 30ul di acqua Rnase-free. 3ug di ciascun campione è stato retroscritto utilizzando il TaqMan RT-PCR kit (Applied Biosystems) in un volume finale di 60ul. 1ug di cDNA è stato utilizzato per la real-time PCR in un volume finale di 50ul contenente 1X TaqMan Universal Master Mix e 1X Target Primers and Probe. L'amplificazione è stata eseguita con l'apparecchio ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

La concentrazione plasmatica del dominio extracellulare della proteina HER-2 (ECD/HER-2) è stata misurata con tecnica ELISA da campioni di sangue pre- e post operatori delle stasse pazienti.

Per 38 delle stesse pazienti è stato raccolto al momento dell'intervento un frammento di tessuto tumorale e corrispondente tessuto sano, mantenuto in azoto liquido fino al momento dell'utilizzo. I campioni operatori sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA totale utilizzando il Rneasy Mini Kit (Qiagen). La concentrazione ottenuta è stata misurata spettrofotometricamente e 400 ng di ciascun campione sottoposti a retroscrittione con il TaqMan RT-PCR kit (Applied Biosystems). 50 ng di cDNA sono stati aggiunti a 15ul/tubo di PCR mix contenente 1X TaqMan Universal Master Mix e 1X Target Primers and Probe.

Parallelamente sul tessuto tumorale è stata eseguita un'analisi immunostochimica per la rivelazione di HER-2, mediante l'uso dell'anticorpo anti-HER-2 clone TAB 250 (Zymed, S. Francisco, CA).

## RISULTATI

Nonostante i livelli pre-intervento della proteina circolante ECD/HER-2 per tutte le pazienti fossero inferiori alla soglia di 15 ng/ml e quindi nel range di normalità, abbiamo notato una significativa riduzione di questo valore dopo l'intervento ( $p < 0.001$ ) (figura 1).

I livelli di HER-2 mRNA nel sangue misurati mediante

real time PCR sono risultati significativamente più elevati nelle pazienti pre-intervento che nei soggetti sani di controllo ( $p=0.001$ ). Dopo la rimozione del tumore abbiamo osservato una significativa riduzione di HER-2 mRNA circolante rispetto ai valori basali ( $p=0.04$ ) (figura 2), tanto che la concentrazione post-intervento non era significativamente diversa dal gruppo di controllo.

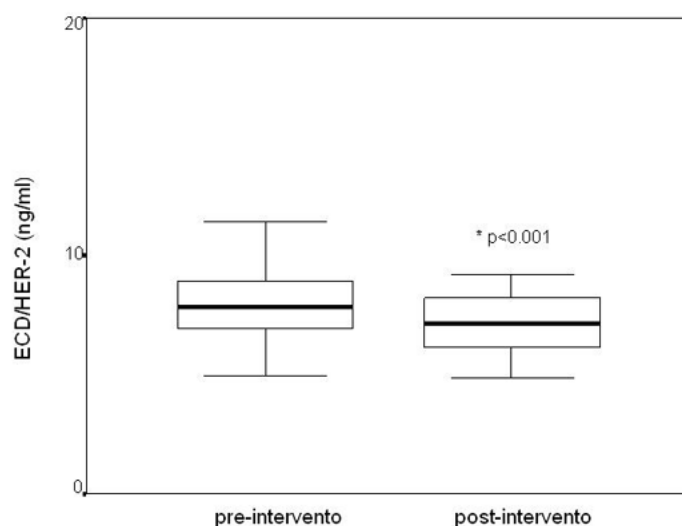
L'espressione di HER-2 nel tessuto è risultata significativamente più elevata nel tumore rispetto al corrispondente tessuto sano ( $p<0.001$ ), misurata mediante real time PCR (figura 3). Una overespressione di HER-2 è stata ottenuta con immunistochemica in 24/38 pazienti, con una mediana di positività del 70%.

Abbiamo quindi studiato la relazione esistente tra lo status di HER-2 nel tumore, misurati con IHC e real time

PCR, con i parametri circolanti. Dividendo le pazienti in base alla espressione di HER-2 nel tumore, abbiamo notato che solo quelle in cui HER-2 risultava overespresso tramite real time PCR, mostravano una riduzione significativa dei livelli di ECD/HER-2 ed HER-2 mRNA circolanti. Risultati simili si ottenevano selezionando le pazienti in base alla positività verso la colorazione immunistochemica dei loro frammenti tumorali: solo quelle IHC-positivo mostravano una riduzione significativa della concentrazione di HER-2 mRNA ed ECD/HER-2 dopo l'intervento.

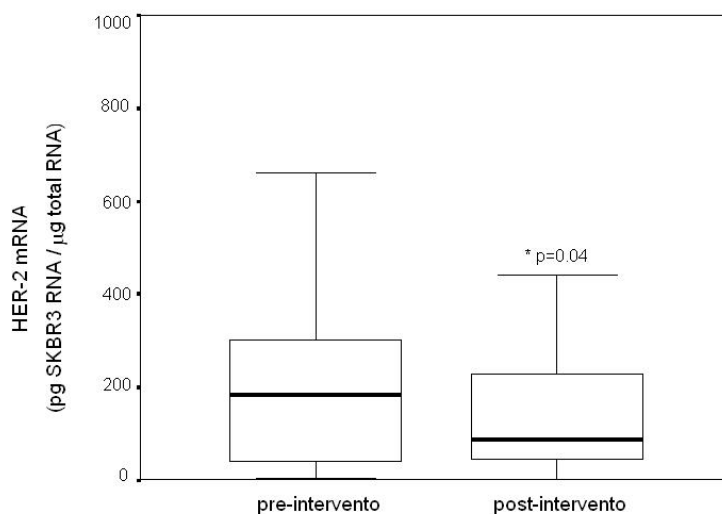
## DISCUSSIONE

La valutazione dello status di HER-2 è importante per il clinico dal momento che procura informazione prognostica.



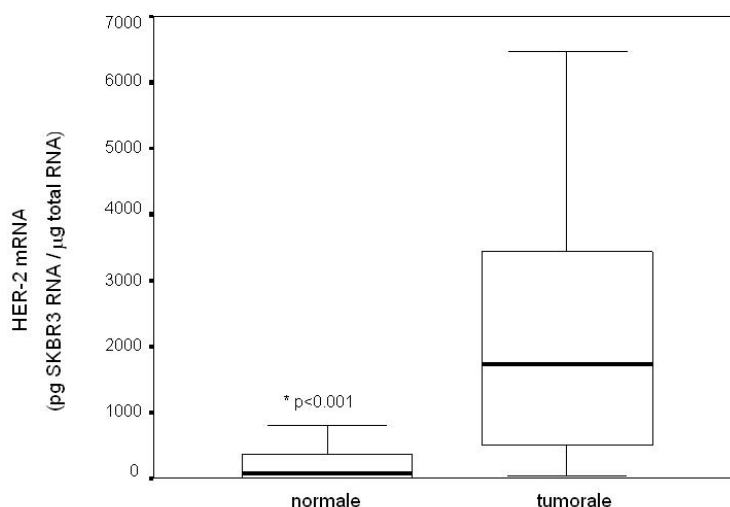
**Figura 1**

Significativa riduzione dei livelli di proteina circolante ECD/HER-2 dopo l'intervento chirurgico



**Figura 2**

Significativa riduzione dei livelli di mRNA di HER-2 associato a cellule circolanti dopo l'intervento chirurgico

**Figura 3**

Differenza di espressione di HER-2 nel tessuto normale e tumorale della stessa paziente.

stica e predittiva. La tecnica immunostochimica è quella maggiormente usata per questa misurazione, ma anche la FISH e la PCR quantitativa sono largamente utilizzate. Altri approcci sono stati proposti, come la misura di ECD/HER-2 plasmatico mediante ELISA. Questa metodologia possiede il potenziale vantaggio di permettere la determinazione rapida di cambiamenti seriali dell'antigene HER-2 in risposta a cambiamenti fisiologici o terapeutici (9). Recentemente, ha suscitato molto interesse la ricerca di cellula tumorali circolanti. Martin et al (8), mediante microarray per la ricerca di un pattern di mRNA circolanti, ha notato che HER-2 mRNA è generalmente molto basso nel sangue di soggetti sani ma risulta elevato nel 31% delle pazienti con tumore della mammella metastatico. Nonostante la vasta gamma di metodi utilizzati allo scopo di determinare l'attivazione di HER-2, la standardizzazione dei metodi e i criteri interpretativi sono spesso discordanti. L'approccio descritto in questo studio è finalizzato alla ricerca di correlazioni fra parametri ematici e quelli determinati nel tessuto tumorale di pazienti affette da patologia allo stadio precoce. Come evidenza indiretta del contributo del tumore alla presenza dei parametri circolanti, li abbiamo misurati prima dell'intervento chirurgico ed il giorno dopo. Questo potrebbe spiegare la riduzione statisticamente significativa dei livelli di HER-2 mRNA e di ECD/HER-2 dopo la rimozione del tumore, ma, interessante a nostro giudizio, queste diminuzioni sono risultate significative solamente nei casi di overespressione nel tumore, misurata sia con IHC sia con real time PCR. Questi dati necessitano di studi ulteriori ma suggeriscono chiaramente un ruolo potenzialmente importante delle misurazioni ematiche pre e post intervento della proteina ECD/HER-2 e del suo mRNA: le differenze di questi parametri circolanti sono correlate allo status di HER-2 nel tumore. Mediante questo approccio sarebbe possibile individuare un sottogruppo di pazienti con tumore della mammella ad uno stadio relativamente più avanzato e che

potrebbero beneficiare di una terapia selezionata.

## BIBLIOGRAFIA

- Hait, W. N. The prognostic and predictive values of ECD-HER2. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2601-04, 2001.
- Eppenberger-Castori, S., Kueng, W., Benz, C., Caduff, R., Varga, Z., Bannwart, F., Fink, D., Diererich, H., Hohl, M., Muller, H., Paris, K., Schoumacher, F., and Eppenberger, U. Prognostic and predictive significance of erbB-2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. *J. Clin. Oncol.*, 19: 645-56, 2001.
- De Cremoux, P., Martin, E. C., Vincent-Salomon, A., Dieras, V., Barbaroux, C., Liva, S., Pouillart, P., Sastre-Garau, X., and Magdelenat, H. Quantitative PCR analysis of c-erb B2 (HER2/neu) gene amplification and comparison with p185 HER2/neu protein expression in breast cancer drill biopsies. *Int. J. Cancer*, 83: 157-161, 1999.
- Ross, J. S., and Fletcher, J. A. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 112: 53-67, 1999.
- Bieche, I., Onody, P., Laurendeau, I., Olivi, M., Vidaud, D., Lidereau, R., and Vidaud, M. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin. Chem.*, 45: 1148-1156, 1999.
- Bieche, I., Olivi, M., Champeme, M. H., Vidaud, D., Lidereau, R., and Vidaud, M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int. J. Cancer*. 78: 661-666, 1998.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distanze, V., Pazzagli, M., Bustin, S. A., and Orlando, C. Quantitative real-time RT-PCR: normalisation to rRNA of single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.* 309: 293-300, 2002.
- Martin, K. J., Graner, E., Li, Y., Price, L. M., Kritzman, B. M., Fournier, M. V., Rhei, E., and Pardee, A. B. High sensitivity array analysis of disseminated breast tumor cells in peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2646-2651, 2001.
- Stearns, V., Yamauchi, H., and Hayes, D. F. Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res. Treat.* 52: 239-59, 1998.