



**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Rozprawa doktorska**

**Znaczenie biologiczne i kliniczne fibroblastów związanych z nowotworem  
oraz krążących fibroblastów w progresji raka piersi**

**mgr Anna Muchlińska**

Zakład Onkologii Translacyjnej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
i Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Anna Żaczek  
Kierownik Zakładu Onkologii Translacyjnej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
i Uniwersytetu Gdańskiego

**Gdańsk 2023**

**Dziękuję wszystkim osobom, dzięki którym możliwe było powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej.**

**Prof. dr hab. Annie Żaczek** za możliwość naukowego rozwoju w tak świetnym zespole, poświęcony czas i zaufanie.

**Obecnym i byłym Członkom zespołów Zakładu Onkologii Translacyjnej i Instytutu Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej** za cudowną atmosferę, godziny rozmów w socjalnym, wzajemne wsparcie i przyjaźnie.

**Natalii** za nieocenioną pomoc, zrozumienie i podnoszenie na duchu w naukowo trudnych momentach.

**Najbliższym – mężowi i rodzicom** za cierpliwość, miłość i niezachwianą wiarę, że ta praca kiedyś powstanie.

**Przyjaciołom** za gotowość wysłuchania i wsparcie w chwilach zwątpienia.

**Wszystkim chorym,** które zgodziły się wziąć udział w badaniach ujętych w tej pracy.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zostały opisane w następujących artykułach naukowych:

- **Muchlińska, A.**, Wenta, R., Ścińska, W., Markiewicz, A., Suchodolska, G., Senkus, E., Żaczek, A.J., Bednarz-Knoll, N. (2023) Improved characterization of circulating tumor cells and cancer-associated fibroblasts in breast cancer patients using imaging flow cytometry – preprint w medrxiv, (doi: 10.1101/2023.04.27.23289190).
  
- **Muchlińska, A.**, Nagel, A., Popęda, M., Szade, J., Niemira, M., Zielinski, J., Skokowski, J., Bednarz-Knoll, N., Zaczek, A.J. (2022) Alpha-smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts secreting osteopontin promote growth of luminal breast cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 27, 45. (doi: 10.1186/s11658-022-00351-7) IF: 8.712.

Badania przedstawione w niniejszej pracy były częścią projektów:

- SONATA BIS 6 „Udział mikrośrodowiska guza w regulacji fenotypu rozszianych komórek nowotworowych raka piersi – badania in vitro, in vivo i na materiale klinicznym” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2016/22/E/NZ4/00664, kierownik projektu: prof. dr hab. Anna J. Żaczek).
- Polsko-chiński HESCAP „Krążące komórki nowotworowe w medycynie spersonalizowanej – efektywna metoda izolacji” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (WPC/33/HESCAP/2018, kierownik projektu: prof dr hab. Anna Żaczek).

## Spis treści

<b>1</b>	<b>Streszczenie</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Wykaz skrótów</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Wstęp</b> .....	<b>13</b>
4.1	Rak piersi.....	13
4.2	Typy molekularne raka piersi.....	14
4.3	Mikrośrodowisko guza.....	16
4.4	Fibroblasty związane z nowotworem .....	17
4.5	Krążące komórki nowotworowe i krążące fibroblasty związane z nowotworem.....	19
4.6	Metody detekcji cCAFs i CTCs .....	19
<b>5</b>	<b>Cele pracy</b> .....	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Materiały</b> .....	<b>24</b>
6.1	Linie komórkowe .....	24
6.2	Pożywki i dodatki do pożywek stosowane w hodowli komórkowej.....	24
6.3	Przeciwciała .....	25
6.4	Bufory i roztwory .....	26
6.5	Inne odczynniki .....	26
6.6	Sprzęt laboratoryjny .....	27
6.7	Oprogramowanie:.....	27
<b>7</b>	<b>Metody</b> .....	<b>29</b>
7.1	Charakterystyka badanej grupy chorych .....	29
7.2	Oznaczenie poziomu białek w tkankach metodą immunohistochemiczną.....	32
7.3	Izolacja fibroblastów związanych z nowotworem .....	33
7.4	Hodowle komórkowe .....	34
7.5	Charakterystyka CAFs .....	34
7.6	Wzrost kolonii komórkowych w hodowli 3D .....	36
7.7	Analiza danych NanoString.....	37
7.8	Zbieranie krwi chorych i izolacja PBMC .....	38
7.9	Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia cCAFs i CTCs.....	38
7.10	Analizy za pomocą cytometru przepływowego z funkcją obrazowania .....	39
7.11	Analizy statystyczne.....	42
<b>8</b>	<b>Wyniki</b> .....	<b>44</b>
8.1	Kliniczne znaczenie ekspresji $\alpha$ -SMA w CAFs.....	44
8.2	Charakterystyka wyizolowanych CAFs.....	47
8.1	Analiza <i>in vitro</i> wpływu $\alpha$ -SMA <sup>high</sup> CAFs na komórki luminalnego raka piersi.....	50
8.2	Identyfikacja czynników odpowiedzialnych za promowanie wzrostu kolonii komórek raka piersi przez $\alpha$ -SMA <sup>high</sup> CAFs.....	52
8.3	Analiza <i>in vitro</i> wpływu OPN wydzielanej przez $\alpha$ -SMA <sup>high</sup> CAFs na komórki luminalnego raka piersi.....	56
8.4	Wykrywanie i charakterystyka krążących fibroblastów związanych z rakiem i różnych fenotypów krążących komórek nowotworowych .....	59
8.5	Rozkład cCAFs i różnych fenotypów CTCs wśród chorych z rakiem piersi.....	65
8.6	Znaczenie kliniczne cCAFs i różnych fenotypów CTCs .....	67

<b>9</b>	<b>Dyskusja.....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Podsumowanie .....</b>	<b>80</b>
<b>11</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>82</b>

## 1 Streszczenie

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem i główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów u kobiet na całym świecie. Uważa się, że mikrośrodowisko guza odgrywa kluczową rolę w kancerogenezie, rozprzestrzenianiu się guza i tworzeniu przerzutów. Najliczniejszymi komórkami w obrębie zrębu guza są fibroblasty związane z nowotworem (ang. *cancer associated fibroblasts*, CAFs). CAFs pozostają słabo zdefiniowane pod względem pochodzenia, podtypów i biologii ze względu na ich wysoką heterogenność i brak specyficznych markerów. Najczęściej wykorzystywanym markerem CAFs jest alfa-aktyna mięśni gładkich (ang. *alpha smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA). CAFs mogą być uwalniane z guzów pierwotnych do krwi i razem z krążącymi komórkami nowotworowymi (ang. *circulating tumor cells*, CTCs) służyć jako nieinwazyjny, prognostyczny biomarker. Krążące we krwi CAFs mogą również regulować tworzenie niszy dla przerzutu nowotworu, jednak wiedza ich temat jest wciąż niepełna.

Celem realizowanych w ramach pracy doktorskiej badań było zbadanie rolifibroblastów w guzie pierwotnym oraz krążących we krwi (ang. *circulating CAFs*, cCAF) chorych na raka piersi w biologicznych procesach zachodzących w guzie, takich jak wzrost, zdolność rozsiewu czy fenotyp komórek nowotworowych oraz ocena ich klinicznego znaczenia, w tym wpływ na przeżycie i odpowiedź na leczenie.

Materiał badawczy stanowiły próbki biologiczne i dane kliniczno-patologiczne pochodzące od 106 chorych z rakiem piersi, 4 linie pierwotne CAFs wyizolowane z guzów piersi oraz krew od 216 chorych z rakiem piersi. Poziom białka  $\alpha$ -SMA oznaczono immunohistochemicznie w CAFs na mikromacierzach tkankowych (ang. *Tissue Microarrays*, TMA) zawierających fragmenty tkanek utrwalonych w formalinie zatopionych w parafinie (ang. *formalin-fixed paraffin embedded*, FFPE) guzów chorych na raka piersi. Wyizolowane linie pierwotne CAFs sklasyfikowano ze względu na poziom białka  $\alpha$ -SMA. Pożywkę kondycjonowaną pobraną z hodowli CAFs wykorzystano do oceny wpływu CAFs na cechy kancerogenezy przy użyciu hodowli komórek nowotworowych 3D w Matrigelu. W celu charakterystyki CAFs  $\alpha$ -SMA-dodatnich i -ujemnych zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji transkryptomu oraz panel profilowania immunologicznego nCounter PanCancer (NanoString). Do detekcji cCAF w połączeniu z krążącymi komórkami nowotworowymi została wykorzystana

cytometria przepływową z funkcją obrazowania. Wyniki zostały skorelowane z danymi kliniczno-patologicznymi, czasem przeżycia oraz z wynikami morfologii tych chorych w programie SPSS z zastosowaniem testów log-rank (Mantel-Cox), chi-kwadrat, U-Manna-Whitneya lub Kruskala-Wallisa.

W luminalnym raku piersi obecność CAFs o wysokim poziomie białka  $\alpha$ -SMA korelowała ze skróconym czasem przeżycia ( $p=0,019$ ). W warunkach *in vitro*, kondycjonowana pożywka uzyskana z hodowli pierwotnych  $\alpha$ -SMA-dodatnich CAFs zwiększała wzrost kolonii komórek nowotworowych w hodowli 3D w Matrigelu. Wielogenowa analiza ekspresji wykazała, że osteopontyna (OPN) ulegała zwiększonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA-dodatnich CAFs zarówno w próbkach klinicznych, jak i w hodowli *in vitro*. Zwiększona ekspresja OPN była związana z wyższym odsetkiem komórek Ki67-dodatnich w guzach pierwotnych ( $p=0,012$ ), podczas gdy neutralizacja OPN w pożywkach kondycjonowanych pochodzących z  $\alpha$ -SMA-dodatnich CAFs osłabiła wzrost kolonii linii komórkowych w hodowli 3D. cCAFs wykryto u 7 (3,3%) chorych, co korelowało z obecnością przerzutów, zwłaszcza trzewnych. Wszystkie cCAFs wykryto w próbkach CTCs-pozytywnych. CTCs pojedyncze i w klastrach o różnej wielkości i fenotypach (tj. fenotyp epitelialny i związany z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT)) wykryto u 27,6% chorych z rakiem piersi. CTCs związane z EMT częściej wchodziły w interakcje z normalnymi komórkami i występowały zwykle u chorych z progresją podczas terapii.

Uzyskane wyniki pokazują, że CAFs  $\alpha$ -SMA-dodatnie mogą zwiększać wzrost guza poprzez wydzielanie OPN. Dodatkowo jednoczesna detekcja cCAFs i CTCs może poprawić identyfikację chorych z podwyższonym ryzykiem progresji i ich monitorowanie podczas terapii.



## 2 Abstract

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancers death in women worldwide. The tumor microenvironment is believed to play a key role in carcinogenesis, tumor spread and metastasis. The most numerous cells within the tumor stroma are cancer associated fibroblasts (CAFs). CAFs remain poorly defined in terms of their origin, subtypes, and biology due to their high heterogeneity and lack of specific markers. The most commonly used marker of CAFs is alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). CAFs can be released from primary tumors into the blood and together with circulating tumor cells (CTCs) serve as a non-invasive, prognostic biomarker. Circulating CAFs can also regulate the formation of a premetastatic niche, but knowledge about them is still incomplete.

The aim of the research carried out as part of the doctoral thesis was to examine the role of fibroblasts in the primary tumor and circulating CAFs (cCAFs) in breast cancer patients in the biological processes occurring in the tumor, such as growth, dissemination capacity or phenotype of cancer cells and to assess their clinical relevance, i.e. the impact on survival or response to treatment.

The research material consisted of biological samples and clinicopathological data from 106 patients with breast cancer, 4 primary lines of CAFs isolated from breast tumors and blood from 216 patients with breast cancer. The level of  $\alpha$ -SMA protein in CAFs was determined by immunohistochemistry on Tissue Microarrays (TMAs) containing fragments of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues from breast cancer patients. The isolated primary lines of CAFs were classified according to the level of  $\alpha$ -SMA protein. The conditioned medium collected from the culture of CAFs was used to assess the effect of CAFs on the features of carcinogenesis using 3D culture of tumor cells in Matrigel. The next generation transcriptome sequencing and nCounter PanCancer (NanoString) Immune Profiling Panel were used to characterize positive and negative  $\alpha$ -SMA CAFs. Flow cytometry with imaging function was used to detect cCAFs in combination with circulating tumor cells. The results were correlated with clinical and pathological data, survival time and morphology results of these patients in the SPSS program using log-rank (Mantel-Cox), Chi-square, U-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests.

In luminal breast cancer, the presence of CAFs with a high level of  $\alpha$ -SMA protein correlated with the shorter overall survival ( $p=0.019$ ). *In vitro*, the conditioned medium obtained from primary cultures of  $\alpha$ -SMA-positive CAFs increased the growth of tumor cell colonies in 3D culture in Matrigel. Multigene expression analysis showed that osteopontin (OPN) was upregulated in  $\alpha$ -SMA-positive CAFs both in clinical samples and *in vitro*. Increased expression of OPN was associated with the higher percentage of Ki67-positive cells in primary tumors ( $p=0.012$ ), while neutralization of OPN in conditioned media derived from  $\alpha$ -SMA-positive CAFs attenuated the growth of colonies of cell lines in 3D culture. cCAFs were detected in 7 (3.3%) patients, which correlated with the presence of metastases, especially visceral. All cCAFs were detected in CTCs-positive samples. Single and cluster CTCs of various sizes and phenotypes (i.e. epithelial and epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotypes) were detected in 27.6% of breast cancer patients. EMT-associated CTCs interacted more frequently with normal cells and tended to occur in the patients with progression during therapy.

The obtained results show that  $\alpha$ -SMA-positive CAFs can increase tumor growth by secreting OPN. In addition, the simultaneous detection of CTCs and cCAFs may improve the identification of patients with an increased risk of progression and their monitoring during therapy.

### 3 Wykaz skrótów

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alfa aktyna mięśni gładkich (ang. <i>alpha smooth muscle actin</i> )
<b>BF</b>	jasne pole (ang. <i>brightfield</i> )
<b>BSA</b>	albumina surowicy bydlęcej (ang. <i>bovine serum albumine</i> )
<b>CAFs</b>	fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>cancer associated fibroblasts</i> )
<b>cCAFs</b>	krążące fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>circulating cancer associated fibroblasts</i> )
<b>CI</b>	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i> )
<b>CM</b>	pożywka kondycjonowana (ang. <i>conditioned medium</i> )
<b>CTCs</b>	krążące komórki nowotworowe (ang. <i>circulating tumour cells</i> )
<b>E-cad</b>	e-kadheryna (ang. <i>E-cadherin</i> )
<b>ECM</b>	macierz pozakomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EGFR</b>	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	przejście epithelialno-mesenchymalne (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>EpCAM</b>	cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (ang. <i>epithelial cell adhesion molecule</i> )
<b>ER</b>	receptor estrogenowy (ang. <i>estrogen receptor</i> )
<b>FAP</b>	białko aktywacji fibroblastów (ang. <i>fibroblast activation protein</i> )
<b>FBS</b>	płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FFPE</b>	materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie (ang. <i>formalin-fixed paraffin embedded, FFPE</i> )
<b>HER2</b>	receptor dla naskórkopochodnego czynnika wzrostu typu 2 (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>HGF</b>	czynnik wzrostu hepatocytów (ang. <i>hepatocyte growth factor</i> )
<b>HR</b>	receptor hormonalny (ang. <i>hormone receptor</i> )
<b>IL-6</b>	interleukina-6 (ang. <i>interleukin-6</i> )
<b>IL-8</b>	interleukina-8 (ang. <i>interleukin-8</i> )
<b>IL-13</b>	interleukina-13 (ang. <i>interleukin-13</i> )

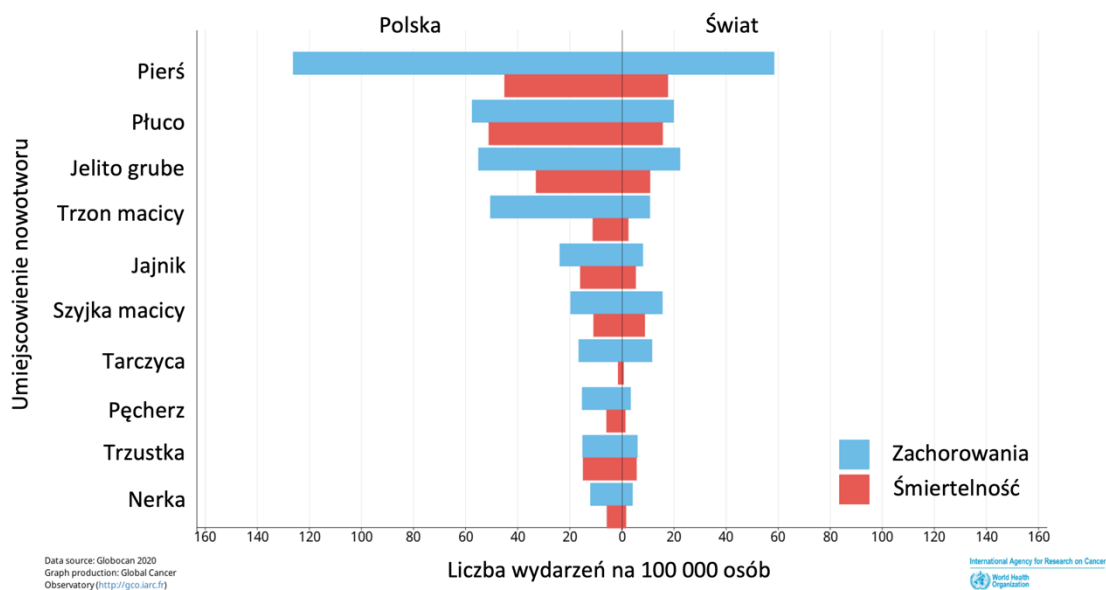
<b>imFC</b>	cytometria przepływowa z funkcją obrazowania (ang. <i>imaging flow cytometry</i> )
<b>logFC</b>	logarytmiczna zmiana krotności (ang. <i>logarithmic fold change</i> )
<b>MMP2</b>	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2 (ang. <i>matrix metalloproteinase-2</i> )
<b>lumA</b>	luminalny A (ang. <i>luminal A</i> )
<b>lumB</b>	luminalny B (ang. <i>luminal B</i> )
<b>lumBC</b>	luminalny rak piersi A i B (ang. <i>luminal breast cancer</i> )
<b>OPN</b>	osteopontyna (ang. <i>osteopontin</i> )
<b>OS</b>	przeżycie całkowite (ang. <i>overall survival</i> )
<b>Pan-K/K</b>	pan-keratyna (ang. <i>pan-keratin</i> )
<b>PBMC</b>	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
<b>PBS</b>	buforowana sól fizjologiczna (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PDGF-<math>\alpha</math></b>	płytkopochodny czynnik wzrostu alfa (ang. <i>platelet-derived growth factor alpha</i> )
<b>PgR</b>	receptor progesteronowy (ang. <i>progesteron receptor</i> )
<b>PSMA</b>	swoisty dla prostaty antygen błonowy (ang. <i>prostate-specific membrane antigen</i> )
<b>SSC</b>	rozproszenie boczne (ang. <i>side scatter channel</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor beta</i> )
<b>TMA</b>	mikromacierze tkankowe (ang. <i>Tissue Microarrays</i> )
<b>TNBC</b>	potrójnie-negatywny rak piersi (ang. <i>triple negative breast cancer</i> )
<b>VIM/V</b>	wimentyna (ang. <i>vimentin</i> )

## 4 Wstęp

### 4.1 Rak piersi

Nowotwory są drugą przyczyną śmierci na całym świecie, odpowiadając za prawie 10 milionów zgonów w 2020 roku<sup>1</sup>. Wśród kobiet rak piersi to najczęściej diagnozowany nowotwór, według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2020 roku stanowił 24,5% diagnozowanych nowotworów oraz 15,5% przyczyn zgonów związanych z nowotworem u kobiet<sup>1</sup> (**Ryc. 1**). Warto wspomnieć, że pandemia koronawirusa (COVID-19) spowodowała opóźnienia w diagnostyce i leczeniu nowotworów z powodu zamknięcia placówek służby zdrowia, zakłóceń w zatrudnieniu oraz strachu przed narażeniem na COVID-19. Chociaż wpływ był największy podczas szczytu COVID-19 w połowie 2020 r., świadczenie opieki zdrowotnej jeszcze przez długi czas nie powróciło do stanu przed pandemią. Opóźnienia w diagnozowaniu i leczeniu mogą prowadzić do wzrostu w zaawansowanych stadiach choroby i śmiertelności<sup>2</sup>. Te i inne wtórne skutki pandemii będą pojawiać się stopniowo w czasie, a ich ilościowe określenie na poziomie populacji będzie wymagało wielu lat ze względu na 2–3-letnie opóźnienie w monitorowaniu zachorowalności na raka w populacji i dane dotyczące śmiertelności<sup>3</sup>. W związku z tym ciężko uzyskać najbardziej aktualne i wiarygodne statystyki dotyczące zachorowalności i śmiertelności na nowotwory.

W Polsce nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów, natomiast u kobiet od kilku lat nowotwory są najczęstszą przyczyną zgonów przed 65. rokiem życia, stanowiąc 28,3% zgonów młodych (20-44 lat) i 41,6% zgonów kobiet w średnim wieku (45-65 lat)<sup>4</sup>. W populacji kobiet wiodącymi umiejscowieniami nowotworów są: piersi, płuco i jelito grube (**Ryc. 1**). Nowotwory płuca od ponad dekady utrzymują pierwszą pozycję wśród nowotworowych przyczyn zgonów kobiet (17,6%), wyprzedzając nowotwory piersi (15,3%), podczas gdy wśród zachorowań udział nowotworów piersi (24%) jest ponad dwukrotnie wyższy niż nowotworów płuca (10%). Jeśli jednak weźmie się pod uwagę tylko młode kobiety to nowotwór piersi dominuje w zachorowalności i śmiertelności (29% i 29%) (dane z Krajowego rejestru nowotworów z 2020)<sup>4</sup>.



**Rycina 1.** Epidemiologia raka piersi wśród kobiet w Polsce i na świecie. Dane ze strony internetowej WHO (baza Globocan)<sup>5</sup>.

#### 4.2 Typy molekularne raka piersi

Nowotwór piersi stanowi grupę heterogennych chorób charakteryzujących się różnym profilem molekularnym i cechami kliniczno-patologicznymi<sup>6</sup>. Różnice w ekspresji receptora estrogenowego (ang. *estrogen receptor*, ER), receptora progesteronowego (ang. *progesterone receptor*, PgR), receptora dla naskórkopochodnego czynnika wzrostu typu 2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) oraz indeksu proliferacyjnego Ki67 pozwalają na podział nowotworów piersi na 4 główne podtypy: luminalny A i B, HER2-pozytywny i potrójnie-negatywny (ang. *triple negative breast cancer*, TNBC). Każdy z nich cechuje inne rokowanie i umożliwia dobór innej terapii<sup>7</sup> (**Ryc. 2**).

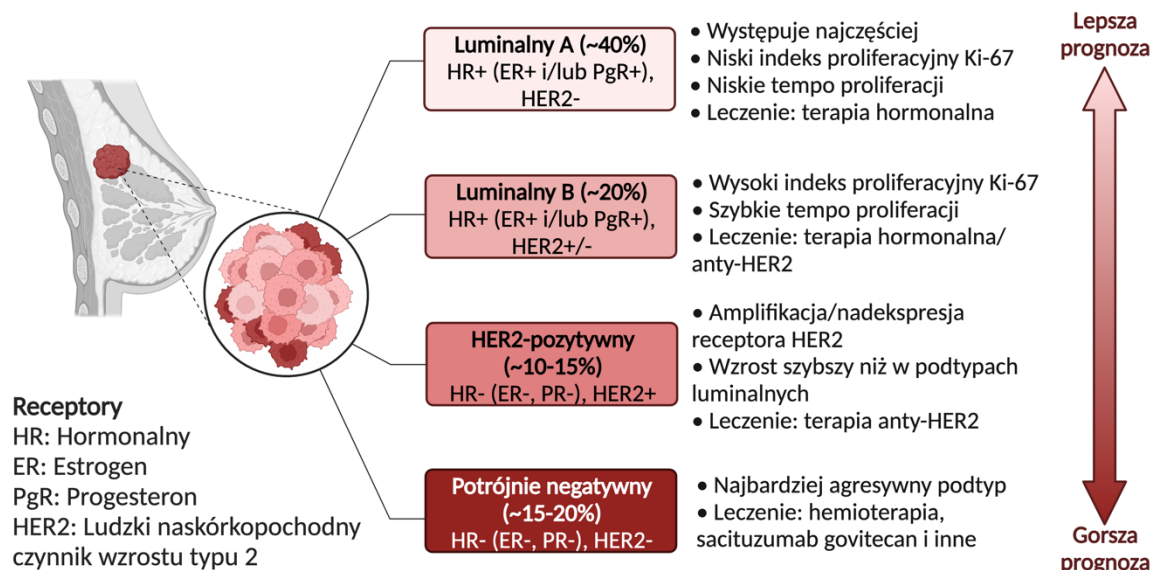
Podtyp luminalny A charakteryzuje się obecnością receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz niskim indeksem proliferacyjnym Ki67 (<14% wg St. Gallen). Ten podtyp występuje najczęściej, cechuje go niskie tempo proliferacji, zazwyczaj niższy stopień złośliwości i lepsze rokowanie. W leczeniu stosuje się najczęściej terapię hormonalną<sup>8</sup>.

Podtyp luminalny B dzieli się na dwie grupy, obie wykazują obecność receptorów estrogenowych. Podtyp luminalny B HER2 negatywny cechuje się niską ekspresją HER2,

wysokim indeksem proliferacyjnym Ki67 (>14%) i niższą niż w podtypie luminalnym A ekspresją PgR, natomiast podtyp luminalny B HER2 pozytywny charakteryzuje się wysoką ekspresją HER2, niezależnie od indeksu Ki67 i ekspresji PgR. W tym podtypie rokowania są nieco gorsze niż w podtypie luminalnym A. Leczenie oparte jest na hormonoterapii i na terapii anti-HER2 w przypadku podtypu HER2-pozytywnego<sup>9</sup>.

Podtyp HER2-pozytywny (nieluminalny) charakteryzuje się nadmierną ekspresją białka HER2, które stymuluje szybszy wzrost i podział komórek nowotworowych oraz brakiem ekspresji ER i PgR. Rak piersi HER2-pozytywny jest zwykle bardziej agresywny niż rak piersi luminalny i wymaga zastosowania terapii ukierunkowanych na białko HER2<sup>10</sup>.

Podtyp potrójnie negatywny nie wykazuje ekspresji receptorów ER i PgR ani nadmiernej ekspresji białka HER2. Rak piersi TNBC jest zwykle bardziej agresywny i ma gorsze rokowania niż inne podtypy raka piersi. W leczeniu raka piersi TNBC stosowano zwykle chemioterapię<sup>11,12</sup>, natomiast ostatnio zaakceptowane terapie ukierunkowane molekularnie, takie jak sacituzumab govitecan, pembrolizumab czy talazoparib dają nadzieje na poprawę efektów leczenia tego podtypu<sup>13</sup>.

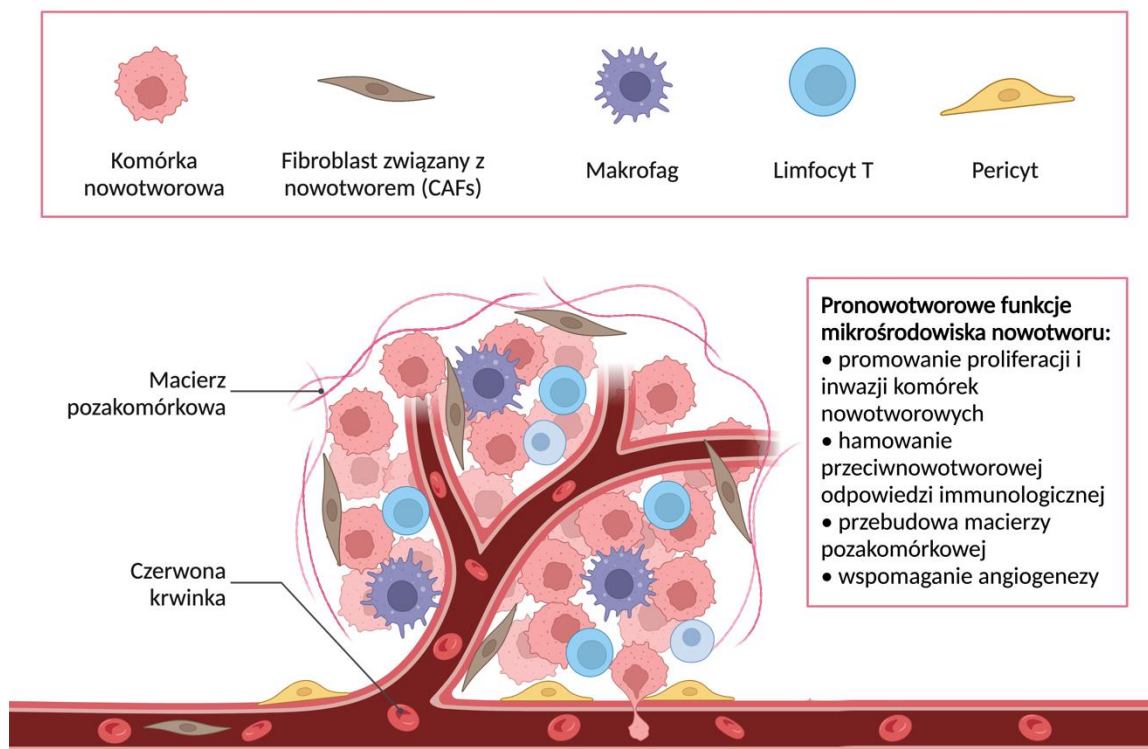


**Rycina 2.** Podtypy molekularne raka piersi.

### 4.3 Mikrośrodowisko guza

Komórki nowotworowe mają zdolność do wchodzenia w interakcje z otaczającymi je prawidłowymi komórkami, które tworzą swoiste mikrośrodowisko nowotworowe<sup>14,15</sup>. Tymi komórkami mogą być fibroblasty związane z nowotworem (ang. *cancer associated fibroblasts*, CAFs), komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, perycyty czy komórki układu odpornościowego (**Ryc.3**). W skład mikrośrodowiska wchodzi również macierz pozakomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM) oraz wydzielane przez komórki mikrośrodowiska cytokiny, chemokiny oraz metabolity<sup>16</sup>. Interakcje komórek nowotworowych z ich mikrośrodowiskiem są skomplikowane i mogą działać zarówno negatywnie, jak i pozytywnie na rozwój nowotworu<sup>17,18</sup>. Istnieją doniesienia, że na początkowym etapie rozwoju nowotworu mikrośrodowisko hamuje jego rozwój, jednak wraz z rozwojem nowotworu niektóre komórki nowotworowe są w stanie przeprogramować komórki mikrośrodowiska tak, aby wykazywały funkcje pronowotworowe<sup>19</sup>. Wsparcie rozwoju nowotworu może odbywać się przez wydzielanie czynników wzrostu, białek macierzy zewnątrzkomórkowej czy cytokin, które stymulują proliferację komórek nowotworowych i sprzyjają ich inwazji i migracji oraz przez hamowanie reakcji układu odpornościowego na nowotwór poprzez wydzielanie czynników immunosupresyjnych i tworzenie fizycznej bariery, która utrudnia dostępność komórek układu odpornościowego do guza<sup>17,20,21</sup>. Zrozumienie tych procesów czy czynników, które wpływają na mikrośrodowisko nowotworowe może prowadzić do identyfikacji nowych celów terapeutycznych i poprawy skuteczności terapii przeciwnowotworowych<sup>22-24</sup>.





**Rycina 3.** Schemat przedstawiający mikrośrodowisko nowotworowe i jego pronowotworowe funkcje.

#### 4.4 Fibroblasty związane z nowotworem

Jednym z dominujących komponentów mikrośrodowiska nowotworu są fibroblasty związane z nowotworem<sup>25</sup>. Populacja tych komórek charakteryzuje się wrzecionowatą morfologią. Niestety z racji swojej wysokiej heterogenności i braku specyficznych markerów nadal pozostaje słabo scharakteryzowana, jeśli chodzi o jej pochodzenie, podtypy czy biologię<sup>26</sup>. Heterogenność tych komórek może wynikać z ich różnych komórkowych prekursorów. CAFs mogą pochodzić od normalnych fibroblastów znajdujących się w okolicy guza, które zostały zaktywowane w procesach podobnych jak te zachodzące w gojącej się ranie (hipoksja, stres oksydacyjny, czynniki wzrostu wydzielane przez komórki nowotworowe czy inne komórki mikrośrodowiska)<sup>27–29</sup>. Oprócz tego część CAFs może różnicować się z linii niefibroblastycznej, takiej jak komórki nabłonkowe, adipocyty, pericyty i komórki mięśni gładkich<sup>30–32</sup>. Ponadto fibrocyty, populacja krążących komórek mezenchymalnych pochodząca z prekursorów monocytów, może zasilać pulę CAFs, jak to ma miejsce np. w raku piersi<sup>33</sup>. Wreszcie, CAFs mogą powstawać z typowych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze

szpiku kostnego w nowotworach jak glejak, rak piersi, żołądka i trzustki, czy z nowotworowych komórek macierzystych, które również mają potencjał różnicować się w CAFs<sup>34–36</sup>.

Różne pochodzenie CAFs przyczynia się do ekspresji różnych markerów przez te komórki. Istnieje kilka markerów, które mogą służyć do identyfikacji CAFs: alfa aktyna mięśni gładkich (ang. *alpha smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA), wimentyna (ang. *vimentin*, VIM), białko aktywacji fibroblastów (ang. *fibroblast activation protein*, FAP) czy płytkopochodny czynnik wzrostu alfa (ang. *platelet-derived growth factor alpha*, PDGF- $\alpha$ )<sup>32,37,38</sup>. Niestety żaden z nich nie jest wyłącznie ekspresjonowany przez CAFs, dlatego do identyfikacji CAFs powinno się brać pod uwagę również ich wrzecionowatą morfologię i brak ekspresji markerów epitelialnych (np. keratyny), endotelialnych (np. CD31) czy leukocytarnych (np. CD45)<sup>25,38</sup>.

Badania pokazują, że CAFs składają się z różnorodnych funkcjonalnie subpopulacji, które albo promują, albo hamują rozwój raka. Zbadano wiele czynników wydzielanych przez CAFs, takich jak metaloproteinaza macierzy 2 (ang. *matrix metalloproteinase-2*, MMP2), białka macierzy pozakomórkowej (kolageny, fibronektyna) czy białka błony podstawnej (kolagen IV, fibronektyna), które biorą udział w proteolitycznych modyfikacjach i przebudowie macierzy pozakomórkowej<sup>39–41</sup>. Czynniki wzrostu produkowane przez CAFs, np. transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) czy czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*, HGF) mogą promować proliferację i inwazję komórek nowotworowych<sup>42–46</sup>. Wydzielana przez CAFs CXCL12 promuje rekrutację komórek progenitorowych śródbłonna, które biorą udział w powstawaniu naczyń nowotworów<sup>20</sup>. CAFs mogą również promować rozwój nowotworu przez hamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, w czym biorą udział wspomniane wyżej TGF- $\beta$ , CXCL12 oraz interleukina-6 (ang. *interleukin-6*, IL-6), interleukina-8 (ang. *interleukin-8*, IL-8) czy interleukina-13 (ang. *interleukin-13*, IL-13)<sup>47–49</sup>. Dodatkowo CAFs przyczyniają się do zwiększonej sztywności ECM, co z kolei zmniejsza naciek efektorowych komórek T<sup>50,51</sup>.

Jedną z populacji CAFs są komórki wykazujące ekspresję  $\alpha$ -SMA. Kilka badań wykazało znaczenie  $\alpha$ -SMA-dodatnich CAFs w rozwoju i progresji różnych guzów litych. Wykazano, że ekspresja  $\alpha$ -SMA w mikrośrodowisku nowotworowym koreluje z dużą liczbą przerzutów do węzłów chłonnych i gorszym rokowaniem klinicznym u chorych na

raka piersi<sup>52,53</sup>.  $\alpha$ -SMA-dodatknie CAFs wzmacniały również angiogenezę i wpływały na wzrost guza *in vivo*<sup>54</sup> oraz korelowały z większą liczbą nowotworowych komórek macierzystych<sup>55</sup>.

Tak więc leczenie ukierunkowane na CAFs, które miałyby na celu modyfikację ich liczby, podtypu lub funkcji może doprowadzić do poprawy leczenia chorych na nowotwory w przyszłości.

#### 4.5 Krążące komórki nowotworowe i krążące fibroblasty związane z nowotworem

Jednym z ważniejszych procesów biorących udział w przerzutowaniu nowotworu jest przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT)<sup>56</sup>. Podczas tego procesu fenotyp komórek nowotworowych zmienia się, co ułatwia „ucieczkę” komórek z guza i przekształcenie ich w komórki bardziej inwazyjne<sup>57</sup>. Poprzez modyfikacje białek i zmiany na poziomie transkrypcji, komórki tracą polaryzację typową dla komórek nabłonkowych oraz zdolność przylegania na korzyść nowej morfologii, ułatwiającej przemieszczanie się komórek, które przedostają się do krążenia i mogą być wykrywane we krwi jako krążące komórki nowotworowe (ang. *circulating tumour cells*, CTCs)<sup>58</sup>. Mogą one pochodzić z guza pierwotnego lub z przerzutów. Ich obecność świadczy o agresywnym przebiegu choroby. Wykazano znaczenie prognostyczne CTCs zarówno we wczesnym, jak i przerzutowym raku piersi<sup>59,60</sup>. Również inne składniki uwalniane z mikrośrodowiska guzów pierwotnych lub wtórnych, takie jak krążące komórki śródbłonka, makrofagi lub fibroblasty związane z nowotworem, można znaleźć we krwi chorych na nowotwory<sup>61-63</sup>. Istnieje hipoteza, że biorą one udział w przygotowaniu specyficznej niszy dla przerzutu<sup>64</sup>. Krążące fibroblasty związane z nowotworem (ang. *circulating cancer associated fibroblasts*, cCAFs) obserwowano we krwi chorych na nowotwory, zarówno pojedynczo jak i w klastrach z CTCs<sup>63,65,66</sup>.

#### 4.6 Metody detekcji cCAFs i CTCs

Przez ostatnie dwie dekady dynamicznie rozwijała się tzw. płynna biopsja, dostarczając nowych rozwiązań (ultraczułych technologii i specyficznych markerów) do

wykrywania CTCs w celu wczesnej diagnostyki, prognozowania i monitorowania przebiegu choroby u chorych na nowotwory<sup>67</sup>. Do detekcji krążących komórek nowotworowych stosuje się kilka kluczowych metod. Zwykle pierwszym krokiem jest wzbogacenie próbki, co polega na zwiększeniu stężenia CTCs, dzięki czemu wykrycie pojedynczych komórek nowotworowych staje się łatwiejsze. Wzbogacenie może być przeprowadzone poprzez skupienie się na właściwościach biologicznych komórki, takich jak ekspresja markerów białkowych lub na właściwościach fizycznych, takich jak wielkość, gęstość, elastyczność komórek, a także ich ładunek elektryczny<sup>67</sup>. Kolejnym etapem jest identyfikacja CTCs przy użyciu testów immunologicznych, molekularnych lub funkcjonalnych<sup>68</sup>.

Aby skutecznie wzbogacić próbkę w CTCs wykorzystuje się różnice między komórkami nowotworowymi a komórkami krwi. W odniesieniu do technik zależnych od różnic w ekspresji białek powierzchniowych, często używanym markerem do pozytywnej selekcji CTCs jest cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (ang. *epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM)<sup>69</sup>. Jednakże inne antygeny powierzchniowe komórek nabłonkowych, takie jak receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR<sup>70</sup>) oraz antygeny tkankowo-specyficzne (w tym swoisty dla prostaty antygen błonowy (ang. *prostate-specific membrane antigen*, PSMA) dla komórek raka prostaty<sup>71</sup> i HER2 dla komórek raka piersi<sup>72</sup> zostały wykorzystane do tego celu. Warto zauważyć, że CTCs są fenotypowo bardzo heterogenne i mogą nie wyrażać wybranego markera, w związku z czym selekcja pozytywna może nie być skuteczna. Z kolei selekcja negatywna opiera się na wykluczeniu komórek krwi przy użyciu przeciwciał rozpoznających antygeny powierzchniowe komórek wyrażane na leukocytach (zwykle CD45) i innych komórkach krążących we krwi (na przykład komórkach śródbłonna – CD31). Wady selekcji negatywnej obejmują niższą czystość izolowanych populacji CTCs niż ta, która jest osiągalna przy użyciu strategii pozytywnego wzbogacania oraz ryzyko, że CTCs zostaną uwięzione w masie komórek krwi, a zatem wyłączone z dalszych analiz. Metody wzbogacania próbki oparte o fizyczne różnice między komórkami krwi a CTCs wykorzystują np. mikrofiltry, które przepuszczają przez pory mniejsze komórki krwi<sup>73</sup>, warto jednak zauważyć, że CTCs są bardzo zmienne pod względem wielkości i użycie tej metody może prowadzić do utraty mniejszych CTCs. Do wzbogacania próbki można również zastosować wirowanie w gradiencie gęstości, wykorzystując takie roztwory jak

Ficoll® czy Histopaque® co pozwala na izolację frakcji zawierającej CTCs i komórki jednojądrzaste krwi. Dielektroforeza umożliwia natomiast oddzielanie CTCs na podstawie odrębnych ładunków elektrycznych komórek nowotworowych i krwinek<sup>74</sup>.

Po etapie wzbogacania w CTCs, próbka może nadal zawierać setki do tysięcy leukocytów, co wymaga zastosowania wiarygodnych metod identyfikacji poszczególnych CTCs. Głównie stosuje się bezpośrednią detekcję przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom błonowym i cytoplazmatycznym, w tym markerom epitelialnym, mezenchymalnym, tkankowo-specyficznym i związanym z nowotworem<sup>75</sup>. Większość obecnych testów do detekcji CTCs wykorzystuje podobną metodologię, co zatwierdzony do zastosowania klinicznego przez FDA system CellSearch (Veridex, USA): epitelialne komórki CTCs wybarwione znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami przeciwko keratynom (8, 18, 19) są wizualizowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, podczas gdy barwienie anti-CD45 służy do wykluczania leukocytów<sup>76,77</sup>. CTCs można również zidentyfikować za pomocą testów molekularnych opartych na kwasach nukleinowych, głównie PCR. Wykrywanie CTCs na poziomie mRNA lub DNA wymaga zaprojektowania starterów dla transkryptów specyficznych tkankowo, narządowo lub nowotworowo lub dla mutacji genetycznych, translokacji lub wzorców metylacji unikalnych dla guza<sup>78</sup>. Opracowano również testy funkcjonalne do wykrywania CTCs, przykładowo test Epithelial ImmunoSPOT (EPISPOT)<sup>79</sup>. W tej technologii możliwa jest ocena liczby żywotnych CTCs w krótkoterminowych hodowlach komórkowych na podstawie wykrywania fluorescencyjnego białek uwalnianych z tych komórek (takich jak keratyna 19).

Do detekcji cCAFs dotychczas wykorzystywano metody oparte na mikrofiltrach<sup>63,66,80,81</sup> lub pozytywnej selekcji<sup>82</sup> połączonych z barwieniem immunofluorescencyjnym markerów fibroblastów związanych z nowotworem (FAP lub  $\alpha$ -SMA). W wyżej wymienionych badaniach zazwyczaj przeprowadzano jednoczesną detekcję CTCs i cCAFs.

Większość opisanych metod do detekcji krążących komórek nowotworowych, łącznie z jedynymi zatwierdzonymi do zastosowania klinicznego przez FDA systemami CellSearch oraz Parsortix® (Angle plc) opierają się na markerach epitelialnych (keratyny). Wiadomo, że we krwi chorych mogą krążyć różne populacje CTCs oraz cCAFs<sup>63,83,84</sup>, dlatego nowe technologie, pozwalające na jednoczesną detekcję wielu markerów różnych komórek, takie jak cytometria przepływowa z funkcją obrazowania (ang. *imaging*

*flow cytometry*, imFC), mogą umożliwić szczegółową analizę różnych subpopulacji komórek w jednej próbce w stosunkowo krótkim czasie<sup>85</sup>. ImFC oferuje połączenie cech klasycznej cytometrii przepływowej (w tym analizy wieloparametrowej i wysokoprzepustowej) oraz mikroskopii fluorescencyjnej o wysokiej rozdzielczości (pozwalającej na wgląd w morfologię każdego badanego obiektu), co może przyspieszyć i ułatwić badania nad rozsiewem guza.

## 5 Cele pracy

Interakcje między komórkami nowotworowymi a ich mikrośrodowiskiem, w szczególności z fibroblastami związanymi z nowotworem (CAFs), odgrywają kluczową rolę w procesie przerzutowania raka piersi. Biologiczne i kliniczne znaczenie CAFs, zarówno w guzie pierwotnym, jak i we krwi chorych z rakiem piersi, jednak wciąż nie jest w pełni poznane. W niniejszej pracy doktorskiej, głównym założeniem było zbadanie i zrozumienie wpływu fibroblastów w guzie pierwotnym oraz we krwi chorych na raka piersi na biologiczne procesy zachodzące w guzie, takie jak wzrost, zdolność rozsiewu czy fenotyp komórek nowotworowych oraz ich kliniczne znaczenie, czyli wpływ na przeżycie czy odpowiedź na leczenie.

### **Cele szczegółowe:**

1. Izolacja i profilowanie CAFs z guzów pierwotnych chorych na raka piersi pod kątem ekspresji genów i wydzielania czynników mogących wpływać na progresję nowotworu.
2. Ocena klinicznego znaczenia CAFs w guzach piersi oraz ocena wpływu wybranych czynników wydzielanych przez pierwotne linie CAFs na fenotyp i zachowanie komórek nowotworowych.
3. Opracowanie i walidacja metody pozwalającej na jednoczesną detekcję i charakterystykę CAFs oraz komórek nowotworowych krążących we krwi chorych na raka piersi.
4. Ocena znaczenia klinicznego CAFs i CTCs wykrytych opracowaną metodą we krwi chorych na raka piersi

Sformułowane cele pozwalają na pogłębione zrozumienie roli fibroblastów w progresji raka piersi, co może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych mających na celu modulację interakcji między komórkami nowotworowymi a ich mikrośrodowiskiem.

## 6 Materiały

### 6.1 Linie komórkowe

- MCF7 (HTB-22), T47D (HTB-133), BJ (CRL-2522), MDA-MB-231 (HTB-26), BT-474 (HTB-20), MDA-MB-361 (HTB-27), SKBR3 (HTB-30), HCC1806 (CRL-2335), zakupione z ATCC (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Linie komórkowe wykorzystane do badań.

Linia komórkowa	Tkanka	Choroba	Podtyp molekularny
MCF7	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	Luminalny A
T47D	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	Luminalny A
BT-474	Pierś, gruczoł sutkowy, przewód mlekowy	rak piersi	Luminalny B HER2+
MDA-MB-361	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	Luminalny B HER2+
SKBR3	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	HER2+
MDA-MB-231	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	Potrójnie negatywny
HCC1806	Pierś, gruczoł sutkowy	rak piersi	Potrójnie negatywny
BJ	Skóra, napletek	-	-

### 6.2 Pożywki i dodatki do pożywek stosowane w hodowli komórkowej

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (HyClone, GE Healthcare)
- FBS (Fetal Bovine Serum, płodowa surowica bydlęca) (HyClone, GE Healthcare)
- 100x Penicillin/Streptomycin Solution (Sigma Aldrich)
- 100x Antibiotic/Antimycotic solution (Sigma Aldrich)
- Trypsyna (Sigma-Aldrich)
- PBS (Phosphate Buffered Saline, buforowana sól fizjologiczna) (Sigma-Aldrich)
- Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced Matrigel (mieszanina białek błony podstawnej) (BD Bioscience)
- Kolagenaza (Sigma Aldrich)
- Hialuronidaza (Sigma Aldrich)



## 6.3 Przeciwciała

### *Przeciwciała pierwszorzędowe*

#### **Do immunohistochemii**

- anty- $\alpha$ -SMA (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 1A4) (Dako Agilent)
- anty-EpCAM (mysie przeciwciało monoklonalne, klon Ber-EP4) (Dako Agilent)
- anty-SNAIL (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 2G11) (Novus Biologicals)
- anty-OPN (królicze przeciwciało poliklonalne) (Abcam)

#### **Do immunofluorescencji**

- anty- $\alpha$ -SMA (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 1A4) (Dako Agilent)
- anty-wimentyna (królicze przeciwciało poliklonalne) (Novus Biologicals)
- anty-E-cadheryna (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 36) (BD)

#### **Do Western blot**

- anty- $\alpha$ -SMA (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 1A4) (Dako Agilent)
- anty-wimentyna (królicze przeciwciało poliklonalne) (Novus Biologicals)
- anty-E-cadheryna (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 36) (BD)
- anty-Akt (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 40D4) (Cell Signaling Technology)

#### **Inne**

- przeciwciało neutralizujące anty-OPN (R&D Systems)

### *Przeciwciała pierwszorzędowe skoniugowane do im FC:*

- anty-pan-keratyny (klon AE1/AE3 i C11, skoniugowane z AF488) (Thermo Scientific)
- anty-wimentyna (klon D21H3, skoniugowane z AF647) (Cell Signalling)
- anty- $\alpha$ -SMA (klon 1A4, skoniugowane z PE) (R&Dsystems)
- anty-CD29 (klon TS2/16, skoniugowane z SuperBright600) (Thermo Scientific)
- anty-CD45 (klon REA747, skoniugowane z APC-Vio770) (Miltenyi Biotec)
- anty-CD31 (klon WM59, skoniugowane z APC-Cy7) (BioLegend)

### *Przeciwciała drugorzędowe:*

- anty-królicze i anty-mysie przeciwciała skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP, horseradish peroxidase) (Sigma-Aldrich)
- anty-królicze przeciwciała skoniugowane z DyLight 488 (Thermo Scientific)
- anty-mysie przeciwciała skoniugowane z DyLight 549 (Thermo Scientific)

### 6.4 Bufory i roztwory

- PBS, 7,4 pH (10x stężony „stock” w wodzie destylowanej, 1000 ml):  
80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Bufor do elektroforezy SDS-PAGE (10x stężony „stock” w wodzie destylowanej, 1000 ml): 144,3 g glicyna, 10 g SDS, 30,3 g Tris-HCl
- Bufor Laemmli (4x stężony w wodzie destylowanej): 8% SDS, 0.25 M Tris-HCl, 20% glicerol, 20% β-merkaptoetanol, błękit bromofenolowy
- Bufor do transferu (w wodzie destylowanej, 1000 ml): 14,43 g glicyna, 3,03 g Tris-HCl, 10% metanol
- TBS (Tris-buffer solution) (10x stężony w wodzie destylowanej, 1000 ml): 60,3 g Tris-HCl, 87,6 g NaCl
- TBS-T: TBS + 0.2% Tween20
- 4% paraformaldehyd w 1xPBS

### 6.5 Inne odczynniki

- Zestaw do pomiaru stężenia białka – BCA Protein Assay (Thermo Scientific)
- APS (ammonium persulfate), 10% roztwór wodny (Sigma-Aldrich)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich)
- TGX PreCast Gels (BioRad)
- Marker białkowy, zakres 7-175 kDa (BioLabs)
- BSA (bovine serum albumine, albumina surowicy bydłowej) (Roth)
- Substrat do detekcji HRP - Amersham Western Blotting Substrate (GE Healthcare)
- Zestaw do ELISY – human OPN Quantikine ELISA (R&D Systems)
- 1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)

- Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)
- Fluoromount, mounting reagent (Sigma-Aldrich)
- Bufen RIPA 10x (Sigma-Aldrich)
- Antibody Diluent (Dako Agilent)
- Inhibitory proteaz i fosfataz (Thermo Fisher)
- Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich)
- Perm-Wash Buffer (BD Biosciences)
- DAPI (BD Biosciences)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies)

## 6.6 Sprzęt laboratoryjny

- komora laminarna – Heraeus HERAsafe Safety Cabinets HS18 (Thermo Fisher Scientific)
- inkubatory – Heraeus HERAccl 150, Jouan IGO150 CELLlife CO2 (Thermo Fisher Scientific)
- wirówka – Eppendorf Centrifuge 5410
- mikroskop - ZEISS PrimoVert
- mikroskop fluorescencyjny – Olympus IX83
- czytnik płytek - Synergy H1 (BioTek)
- spektrofotometr Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Amnis® ImageStream®X Mk II (Luminex)
- 4150 TapeStation System (Agilent)

## 6.7 Oprogramowanie:

- CellSens Imaging software (Olympus Life Science)
- SPSS Statistics (wersja 27; IBM)
- INSPIRE™ software (wersja 200.1.681.0; Luminex)
- IDEAS (wersja 6.2; Luminex)
- ImageJ (wersja 1.53a; National Institutes of Health)

- GraphPad Prism (wersja 9.5.1; LLC)
- BioRender

## 7 Metody

### 7.1 Charakterystyka badanej grupy chorych

Do poniższej pracy doktorskiej włączono trzy grupy chorych z rakiem piersi, z każdej grupy pobrany był inny rodzaj materiału badawczego, który posłużył do odmiennego zestawu badań:

- I. Pierwszą grupę stanowiło 106 chorych (kryteria włączenia: histologia niezrazikowa, stopień złośliwości histologicznej 1–3) leczonych w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku (2011–2013), od których pobrano fragmenty guzów pierwotnych oraz przerzutów, które zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie. Materiał został wykorzystany do analizy immunohistochemicznej białek  $\alpha$ -SMA i osteopontyny (OPN) oraz analizy NanoString. Dodatkowo analizowano dane kliniczno-patologiczne (wiek, stopień T, N, M, stopień złośliwości histologicznej, typ molekularny) tych chorych, czas przeżycia i wyniki barwień immunohistochemicznych w kierunku białek SNAIL, EpCAM, SLUG, CXCR4, TWIST1 uzyskane w zespole w ramach wcześniejszych badań<sup>86</sup>. W badanej grupie 11 ze 106 chorych zmarło, średnie przeżycie wyniosło 46,9 miesiąca; mediana wyniosła 49,1 miesiąca, natomiast maksymalny czas obserwacji trwał 64 miesiące. Szczegółowa charakterystyka chorych przedstawiona została w **Tabeli 2**. Badanie zostało zaakceptowane przez komisję bioetyczną GUMed (NKBBN 94/2017), wszystkie chore podpisały świadomą zgodę na udział w badaniach.

**Tabela 2.** Charakterystyka chorych w grupie I.

Zmienna	Liczba przypadków (%)
<b>Wiek</b>	
< 50	28 (26,4%)
≥ 50	78 (73,6%)
<b>Stopień T</b>	
T1-2	101 (95,3%)
T3-4	4 (3,8%)
Brak danych	1 (0,9%)
<b>Stopień N</b>	
0	50 (47,2%)
1	56 (52,8%)
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>	
1	14 (13,2%)
2	53 (50%)
3	39 (36,8%)
<b>Typ molekularny</b>	
Luminalny A	35 (33%)
Luminalny B HER2-	26 (24,5%)
Luminalny B HER2+	24 (22,7%)
Nie luminalny HER2+	5 (4,7%)
Potrójnie negatywny	16 (15,1%)

- II. Drugą grupę stanowiły 4 chore z luminalnym rakiem piersi leczone w Klinice Chirurgii Onkologicznej, w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku (2017-2018) od których pobrano fragmenty guzów wykorzystane do uzyskania linii pierwotnych fibroblastów związanych z nowotworem. Badania uzyskały zgodę komisji bioetycznej GUMed (NKBBN/94/2017), a od chorych została uzyskana świadoma pisemna zgoda.
- III. Trzecią grupę stanowiło 210 chorych leczonych w Centrum Chorób Piersi w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku (2019–2022) oraz 20 zdrowych kobiet z brakiem chorób onkologicznych a wykonujących badania w Centralnym Laboratorium Klinicznym w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku (2022) z innych powodów, od których pobrano krew obwodową do badań nad krążącymi komórkami nowotworowymi i fibroblastami związanymi z nowotworem. Udokumentowane zostały również dane kliniczno-patologiczne (wiek, stopień T, N, M, stopień złośliwości histologicznej, typ molekularny), wyniki morfologii krwi oraz odpowiedź na terapię. W przypadku stopnia T i N zastosowano klasyfikacje kliniczną (cT, cN) która opiera się na badaniu przedmiotowym, badaniach obrazowych oraz

badaniu mikroskopowym przed rozpoczęciem leczenia i patologiczną (pT, pN), gdzie dane pochodzą z badania histopatologicznego preparatu pooperacyjnego. Szczegółowa charakterystyka chorych przedstawiona została w **Tabeli 3**. Badanie zostało zaakceptowane przez komisję bioetyczną GUMed (NKBBN/748/2019-2020), wszystkie chore podpisały świadomą zgodę na udział w badaniach.

**Tabela 3.** Charakterystyka chorych w grupie III.

Zmienna	Liczba przypadków (%)
<b>Wiek</b>	
< 50	84 (40%)
≥ 50	126 (60%)
<b>Stopień cT</b>	
cT1-2	126 (60%)
cT3-4	50 (23,8%)
Brak danych	34 (16,2%)
<b>Stopień pT</b>	
pT1-2	148 (70,5%)
pT3-4	8 (3,8%)
Brak danych	54 (25,7%)
<b>Stopień cN</b>	
0	70 (33,3%)
1	104 (49,5%)
Brak danych	36 (17,2%)
<b>Stopień pN</b>	
0	103 (49%)
1	67 (32%)
Brak danych	40 (19%)
<b>Stopień M</b>	
0	184 (87,6%)
1	26 (12,4%)
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>	
1	11 (5,2%)
2	93 (44,3%)
3	89 (42,4%)
Brak danych	17 (8,1%)
<b>Typ molekularny</b>	
Luminalny A	21 (10%)
Luminalny B HER2-	65 (31%)
Luminalny B HER2+	49 (23,3%)
Nie luminalny HER2+	22 (10,5%)
Potrójnie negatywny	49 (23,3%)
Brak danych	4 (1,9%)
<b>Odpowiedź na leczenie</b>	
Stabilizacja choroby	21 (10%)
Odpowiedź całkowita	39 (18,5%)
Odpowiedź częściowa	69 (32,9%)
Progresja choroby	10 (4,8%)
Brak danych	71 (33,8%)

## 7.2 Oznaczenie poziomu białek w tkankach metodą immunohistochemiczną

Oznaczenie poziomu białek metodą immunohistochemiczną zostało wykonane we współpracy z patomorfologiem mgr Jolantą Szade w Zakładzie Patomorfologii GUMed. Mikromacierze tkankowe uzyskano przez pobranie próbek z pięciu niesąsiadujących rdzeni tkankowych o średnicy 1 mm. Skrawki barwiono przy użyciu komercyjnie dostępnych mysich przeciwciał monoklonalnych anti- $\alpha$ -SMA (klon 1A4, Dako Agilent), barwienie i detekcja odbywała się z wykorzystaniem systemu EnVision FLEX Dako Autostainer (Dako Agilent). Natomiast barwienie anti-OPN (królicze przeciwciało poliklonalne, Abcam) zostało przeprowadzone ręcznie w rozcieńczeniu 1:1600, przez 60 min w temperaturze pokojowej. Drugorzędowe przeciwciała anti-królicze skoniugowane z peroksydazą chrzanową zostały użyte razem z odczynnikiem Novolink Max-Polymer Detection System (Leica Novocastra) w celu detekcji sygnału.

Intensywność barwienia  $\alpha$ -SMA (0-negatywne, 1-słabe, 2-średnie, 3-silne) oraz procent wybarwionych komórek (0-100%) zostały ocenione w zrębie. Obliczony został również iloczyn intensywności barwienia i procentu zabarwionych komórek, dając wynik indeksu między 0 a 300. Status  $\alpha$ -SMA wysoki ( $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>) został nadany próbkom z wynikiem indeksu wyższym niż górny kwartył (Q3) całej grupy, natomiast status  $\alpha$ -SMA niski ( $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>) próbkom z wynikiem indeksu niższym niż górny kwartył (Q3). Dla barwienia OPN oceniona została tylko intensywność barwienia (0-negatywne, 1-słabe, 2-średnie, 3-silne) komórek w zrębie.

Barwienia immunohistochemiczne białek SNAIL i EpCAM i ich ocena zostały przeprowadzone wcześniej w Zakładzie Patomorfologii GUMed. Barwienie i detekcja białka EpCAM odbywała się z wykorzystaniem przeciwciała anti-EpCAM (mysie monoklonalne, klon Ber-EP4, Dako Agilent) oraz systemu EnVision FLEX Dako Autostainer (Dako Agilent). Natomiast barwienie białka SNAIL zostało przeprowadzone ręcznie z wykorzystaniem przeciwciała anti-SNAIL (mysie monoklonalne, klon 2G11, Novus Biologicals) w rozcieńczeniu 1:100, przez 60 min w temperaturze pokojowej. Drugorzędowe przeciwciała anti-mysie skoniugowane z peroksydazą chrzanową zostały użyte razem z odczynnikiem Novolink Max-Polymer Detection System (Leica Novocastra)



w celu detekcji sygnału. Podobnie jak w barwieniu  $\alpha$ -SMA intensywność barwienia tych białek została przedstawiona jako indeks dając wartości między 0 a 300 (iloczyn intensywności barwienia i procentu zabarwionych komórek).

### 7.3 Izolacja fibroblastów związanych z nowotworem

Fibroblasty związane z nowotworem (CAFs) zostały wyizolowane z fragmentu guza piersi zawierającego zręb, pobranego podczas zabiegu chirurgicznego usunięcia guza w Klinice Chirurgii Onkologicznej, UCK GUMed. Każda próbka, wielkości około 1-3 cm została pobrana przez doświadczonego chirurga w warunkach jałowych i umieszczona w probówce zawierającej zimną pożywkę DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, HyClone, GE Healthcare) suplementowaną 10% FBS (ang. *fetal bovine serum*, płodowa surowica bydlęca, HyClone, GE Healthcare) oraz mieszaniną antybiotyków i antymykotyków (Sigma-Aldrich). Fragmenty tkanki przechowywane były w temperaturze 2-8 °C do momentu dalszej obróbki, nie dłużej niż 4 godziny. Następnie pobrane próbki zostały przepłukane PBS (ang. *phosphate buffered saline*, buforowana sól fizjologiczna, Sigma-Aldrich), rozdrobnione mechanicznie skalpelem i trawione enzymatycznie w roztworze zawierającym 0,35 mg/ml kolagenazy (Sigma-Aldrich) i 0,35 mg/ml hialuronidazy (Sigma-Aldrich) w PBS przez godzinę z obracaniem probówek w 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Tak rozdrobniona tkanka została zwirowana w warunkach 400xg przez 5 min, a osad został zawieszony w świeżej pożywce DMEM wzbogaconej w 10% FBS, mieszaniną antybiotyków/antymykotyków i przeniesiony na naczynie do hodowli komórkowych. CAFs izolowano przy użyciu metody seryjnych trypsynizacji (Sigma-Aldrich) komórek, wykorzystując właściwości CAFs, które szybciej reagują na traktowanie trypsyną w porównaniu do komórek nowotworowych. Po dwóch – trzech pasażach, czystość hodowli CAFs była oceniana na podstawie charakterystycznej, wrzecionowatej morfologii oraz obecności markerów: wimentyny (VIM),  $\alpha$ -SMA oraz braku markerów charakterystycznych dla komórek nowotworowych – E-kadheryny (E-cad) w barwieniu immunofluorescencyjnym oraz dla potwierdzenia metodą Western blot. Wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem CAFs wykonano między trzecim a dziesiątym pasażem.

## 7.4 Hodowle komórkowe

Linie komórkowe MCF7 (HTB-22), T47D (HTB-133), BJ (CRL-2522), MDA-MB-231 (HTB-26), BT-474 (HTB-20), MDA-MB-361 (HTB-27), SKBR3 (HTB-30), HCC1806 (CRL-2335) (**Tabela 1, Materiały**) zostały zakupione z American Type Culture Collection (ATCC). Komórki były hodowane w pożywce DMEM suplementowanej 10% FBS i pasażowane 1-3 razy w tygodniu. Przeprowadzono rutynowe testy na obecność mykoplazmy z wykorzystaniem barwnika DNA – DAPI (BD Biosciences). Aby uniknąć wpływu FBS na wynik doświadczeń, dla wszystkich linii został użyty FBS z tego samego numeru partii. Pożywkę kondycjonowaną uzyskano z hodowli pierwotnej CAFs oraz linii fibroblastów BJ w następujący sposób. Gdy komórki osiągnęły około 80% konfluencji, pożywkę wymieniono na świeżą, po 72 godzinach zebrano ją z hodowli i przechowywano w -80 °C. Pożywkę kondycjonowaną z różnych pasaży mieszano razem i porcjowano w celu uniknięcia dysproporcji w późniejszych analizach. Do optymalizacji przeciwciał w testach z wykorzystaniem cytometru przepływowego z funkcją obrazowania wykorzystano linie komórkowe: MCF7, T47D, MDA-MB-231, BT-474, MDA-MB-361, SKBR3, HCC1806, które po osiągnięciu około 80% konfluencji, trypsynizowano, utrwalano w 4% formaldehydzie i przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

## 7.5 Charakterystyka CAFs

### *Barwienia immunofluorescencyjne*

Komórki zostały wysiane na wysterylizowane, mikroskopowe szkiełka nakrywkowe, a po 24 godzinach utrwalone i permeabilizowane przez 15 min z wykorzystaniem mieszaniny metanolu i acetonu w proporcjach 1:1. Do blokowania został użyty roztwór 5% BSA (ang. *bovine serum albumine*, albumina surowicy bydlęcej, Roth) w PBS. Przeciwciała pierwszorzędowe: anty- $\alpha$ -SMA (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 1A4, Dako Agilent), anty-wimentyna (królicze przeciwciało poliklonalne, Novus Biologicals), anty-E-cadheryna (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 36, BD) zostały przygotowane w rozcieńczeniach odpowiednio 1:1, 1:1000, 1:2000 w roztworze Antibody Diluent (Dako Agilent) i naniesione na wcześniej wyblokowane komórki, które inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Jako przeciwciała

drugorzędowe użyto: anty-królicze przeciwciała skoniugowane z DyLight 488 i anty-mysie przeciwciała skoniugowane z DyLight 549 (Thermo Scientific) w rozcieńczeniu 1:2000. Obrazowanie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX83 oraz oprogramowania CellSens Imaging Software (Olympus Life Science).

#### *Western blot*

Lizat komórkowy został uzyskany z użyciem buforu lizującego RIPA (Sigma-Aldrich) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz (Thermo Scientific). Stężenie białka zmierzono wykorzystując zestaw BCA assay kit (Thermo Scientific). Równej ilości białka rozdzielono na 12% żelu poliakrylamidowym firmy Bio-Rad (TGX FastCast Gels) w warunkach denaturujących SDS-Page przy napięciu 250V przez ok. 1 godzinę. Rozdzielone białka przeniesiono metodą półsuchego transferu na membranę PVDF (Bio-Rad). Błonę blokowano w roztworze 5% mleka w TBST (Tris-buffer solution z 0.2% Tween20) przez godzinę, a następnie inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc: anty- $\alpha$ -SMA (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 1A4, Dako Agilent) anty-wimentyna (królicze przeciwciało poliklonalne, Novus Biologicals), anty-E-cadheryna (mysie przeciwciało monoklonalne, klon 36, BD) w rozcieńczeniach 1:1, 1:2000, 1:500. Następnego dnia użyto przeciwciała drugorzędowe anty-mysie i anty-królicze, skoniugowane z peroksydazą chrzanową (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:10000. Do wizualizacji sygnału na kliszy fotograficznej użyto zestawu SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific).

#### *ELISA*

Stężenie osteopontyny w pożywce kondycjonowanej znad CAFs i komórek BJ zmierzono z wykorzystaniem zestawu human osteopontin (OPN) Quantikine ELISA (R&D Systems) zgodnie z instrukcją producenta. Każdy test został wykonany w trzech powtórzeniach eksperymentu i 3 powtórzeniach technicznych. Stężenie OPN w ng/ml zostało obliczone przez zmierzenie absorpcji na 450 nm z wykorzystaniem czytnika płytek Synergy H1 (BioTek).

### *Sekwencjonowanie nowej generacji*

RNA zostało wyizolowane z CAFs, używając zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie i czystość RNA zostały ocenione z wykorzystaniem 4150 TapeStation System (Agilent). Przygotowanie bibliotek RNA oraz sekwencjonowanie transkryptomu zostało wykonane przez firmę Macrogen. Do przygotowania bibliotek wykorzystano zestaw TruSeq mRNA stranded (selekcja poly-A, biblioteka kierunkowa) (Illumina). Sekwencjonowanie nowej generacji przeprowadzono na NovaSeq6000 (Illumina) w konfiguracji 2x150bp do uzyskania 40 mln odczytów całkowitych (20 mln par). Różnicowanie genów między próbkami  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> i  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> CAFs wykonano na podstawie logarytmicznej zmiany krotności (ang. *logarithmic fold change*, logFC) obliczonej dla mediany w porównywanych grupach. Geny z logFC > 1 uznano za geny o podwyższonej ekspresji; geny z logFC < -1 za geny o obniżonej ekspresji. Wszystkie dane były analizowane przy użyciu środowiska R (3.6.1) w Centrum Analiz Biostatystycznych i Bioinformatycznych GUMed. W celu ustalenia znaczenia biologicznego transkryptów, które wykazały obniżoną lub podwyższoną ekspresję przeanalizowano je z wykorzystaniem narzędzia DAVID Functional Annotation Tool ustalającego proces, w który zaangażowane są dane geny z bazy „Gene Ontology Biological Processes”.

### 7.6 Wzrost kolonii komórkowych w hodowli 3D

Linie komórkowe raka piersi MCF7 oraz T47D zostały wykorzystane do analizy wpływu kondycjonowanej pożywki z CAFs i BJ na wzrost kolonii w hodowli 3D w Matrigelu (Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced Matrigel, mieszanina białek błony podstawnej, BD Bioscience). Komórki raka piersi w ilości  $2 \times 10^3$  zostały zawieszane w pożywce DMEM i zmieszane z Matrigel w proporcji 1:1 a następnie naniesione na płytkę 12- dołkową. Tak przygotowana hodowla w 3D została inkubowana z pożywką kondycjonowaną z CAFs, komórek linii BJ oraz z samą pożywką DMEM. Pożywki zmieniano co 3 dni. Dla doświadczeń mających na celu neutralizację osteopontyny, użyto przeciwciała neutralizującego anty-OPN (R&D Systems) rozcieńczonego 3  $\mu$ g/ml. Po około 10 dniach wykonano zdjęcia, używając mikroskopu Olympus IX83 (powiększenie 10 $\times$ ). W celu obliczenia wzrostu kolonii zmierzono

powierzchnie minimum 40 kolonii dla każdego powtórzenia w programie ImageJ (U. S. National Institutes of Health). Wyniki zaprezentowano jako średnią odniesioną do średnich wyników inkubacji z DMEM (kontrola)  $\pm$  odchylenie standardowe z minimum trzech niezależnych powtórzeń (każde powtórzenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych).

## 7.7 Analiza danych NanoString

Analizy NanoString zostały wykonane we współpracy z dr Martą Popędą. RNA zostało wyizolowane z komórek CAFs, używając zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie i czystość RNA zostały ocenione z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Izolacja RNA z tkanek utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (ang. *formalin-fixed paraffin embedded*, FFPE) została szczegółowo opisana w pracy dr Marty Popędy<sup>87</sup>. RNA pochodzące z CAFs oraz próbek klinicznych analizowano oddzielnie. RNA poddano analizie panelem profilowania immunologicznego nCounter PanCancer (NanoString Technologies) zgodnie z procedurami producenta dotyczącymi hybrydyzacji, detekcji i skanowania. Dla każdej próbki korekcję tła i normalizację przeprowadzono przy użyciu oprogramowania nSolver 4.0. Dane znormalizowano dla globalnej średniej zliczeń kontroli pozytywnych zawartych w teście i dla najbardziej stabilnych genów metabolizmu podstawowego, 18 (zakres SD 2,9–66,9 zliczeń) i 4 (zakres SD 173,5–228,4 zliczeń) odpowiednio w zbiorach danych CAFs i próbkach klinicznych. Następnie geny o niskiej ekspresji ( $\log_2$  ze średniej zliczeń we wszystkich próbkach  $< 4$  dla zestawu danych CAFs i  $< 6$  dla zestawu danych FFPE) zostały wykluczone, pozostawiając 320 i 584 transkryptów odpowiednio w zestawie danych CAFs i FFPE włączonych do dalszej analizy. Różnicowanie genów między próbkami  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> i  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> wykonano na podstawie logarytmicznej zmiany krotności obliczonej dla mediany znormalizowanych zliczeń dla każdej sondy w porównywanych grupach. Geny z  $\log_{FC} > 1$  uznano za geny o podwyższonej ekspresji; geny z  $\log_{FC} < -1$  za geny o obniżonej ekspresji. Różnice były estymowane przy użyciu testu u Manna-Whitneya. Wszystkie dane były analizowane przy użyciu środowiska R (3.6.1). W celu ustalenia znaczenia biologicznego transkryptów, które wykazały obniżoną lub podwyższoną ekspresję, przeanalizowano je z wykorzystaniem narzędzia DAVID

Functional Annotation Tool ustalającego proces, w który zaangażowane są dane geny z bazy „Gene Ontology Biological Processes”.

## 7.8 Zbieranie krwi chorych i izolacja PBMC

Próbki krwi obwodowej o średniej objętości około 5 ml (zakres 4 - 5,5 ml) od chorych z rakiem piersi i zdrowych kobiet zebrano do probówek zawierających EDTA i poddano przetwarzaniu jak najszybciej po oddaniu krwi (68% próbek obrobiono w czasie do 3 godzin po pobraniu). Pierwsze 3 ml krwi odrzucano, aby uniknąć kontaminacji komórkami skóry (tj. keratynocytami, fibroblastami) i komórkami śródbłonna podczas nakłucia. Frakcję jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) wyizolowano, stosując wirowanie w gradiencie gęstości. Pokrótce, krew odwirowano przy 200xg przez 10 minut w temperaturze pokojowej w celu oddzielenia osocza bogatego w płytki krwi. Następnie pozostałą część próbki krwi rozcieńczono PBS do 9 ml, nałożono na Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) i wirowano przy 400xg przez 30 min z wyłączonym hamulcem. Zebraną frakcję PBMC utrwalono w 4% formaldehydzie i przechowywano w temperaturze -80°C w porcjach po 0,5 ml do dalszej analizy.

## 7.9 Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia cCAFs i CTCs

Barwienie immunofluorescencyjne próbek klinicznych przeprowadzono przy użyciu koktajlu przeciwciał mających na celu wykrycie markerów cCAFs: alfa-aktyny mięśni gładkich ( $\alpha$ -SMA, klon 1A4, skoniugowany z PE, R&Dsystems) i CD29 (klon TS2/16, skoniugowany z SuperBright600, Thermo Scientific); markerów CTCs: pan-keratyny (K, klon AE1/AE3, skoniugowany z AF488, Thermo Scientific + klon C11, skoniugowany z AF488, Thermo Scientific) i wimentyny (V, klon D21H3, skoniugowany z AF647, Cell Signalling); markera leukocytów: CD45 (klon REA747, skoniugowany z APC-Vio770, Miltenyi Biotec); a także markera komórek śródbłonna: CD31 (klon WM59, skoniugowany z APC-Cy7, BioLegend) rozcieńczonych odpowiednio 1:2500, 1:2500, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:50, 1:10 (przygotowanych w 1x Perm-Wash Buffer, BD Biosciences). Do optymalizacji rozcieńczeń przeciwciał i dobrania odpowiedniej mocy laserów a następnie kompensacji

użyto różnych linii komórkowych raka piersi i barwiono je każdym przeciwciałem z osobna a następnie koktajlem przeciwciał. Zoptymalizowane warunki barwienia i akwizycji przedstawiono w **Tabeli 4**. Badane komórki, zawieszono w 4% PFA rozmrożono i przemyto 1 ml PBS w celu usunięcia formaldehydu, a następnie inkubowano przez 30 min w temperaturze +4°C z koktajlem przeciwciał. Po jednym dodatkowym etapie przemywania w PBS, komórki ponownie zawieszono w 30 µl PBS, barwiono DAPI (BD Biosciences, 1 µg/ml) i natychmiast analizowano przy użyciu Amnis® ImageStream®X Mk II (Luminex).

**Tabela 4.** Rozcieńczenia przeciwciał i parametry laserów zoptymalizowanych do użytku w Amnis® ImageStream®X Mk II

Przeciwciało	Firma	Fluorofor	Rozcieńczenie	Laser	Moc laserów	Kanał
BF						1+9
pan-keratyna (AE1/AE3)	Thermo Scientific	Alexa 488	1:2500	488	100mW	2
pan-keratyna (C11)	Thermo Scientific	Alexa 488	1:2500	488	100mW	2
α-SMA (1A4)	R&Dsystems	PE	1:50	488	100mW	3
SSC	-	-	-	785	#	6
DAPI	BD Biosciences	DAPI	0,04ug/ml	405	100mW	7
CD29 (TS2/16)	Thermo Scientific	SuperBright600	1:1000	405	100mW	10
Vimentin (D21H3)	Cell Signaling	Alexa 647	1:100	647	150mW	11
CD45 (REA747)	Miltenyi Biotec	APC-Vio770	1:50	647	150mW	12
CD31 (WM59)	BioLegend	APC-Cy7	1:10	647	150mW	12

BF - jasne pole (ang. *brightfield*), SSC - rozproszenie boczne (ang. *side scatter channel*), # - ustawienia fabryczne

#### 7.10 Analizy za pomocą cytometru przepływowego z funkcją obrazowania

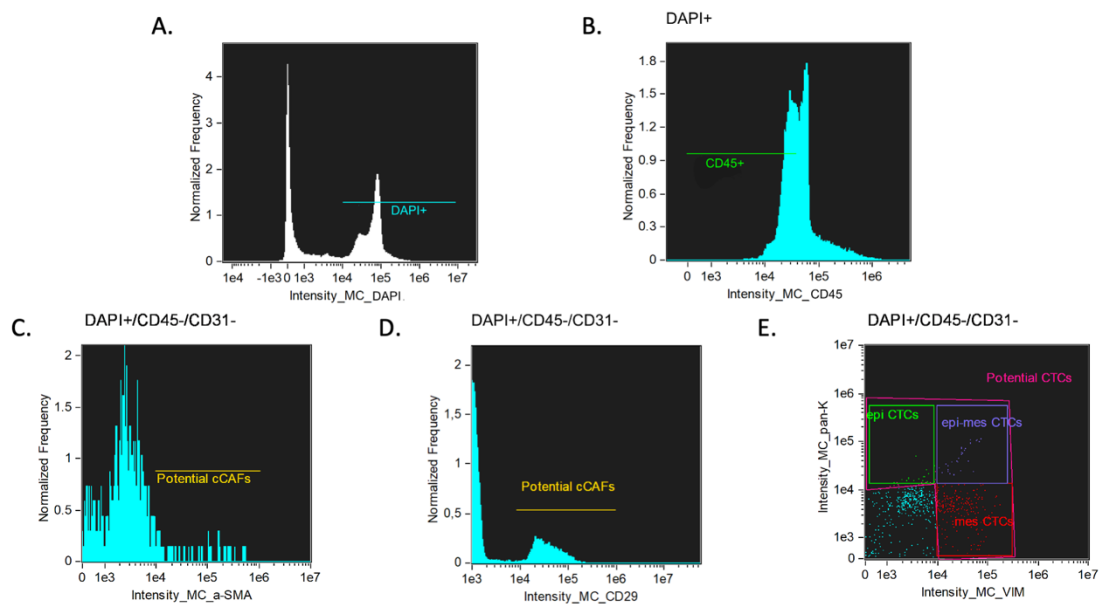
Amnis® ImageStream® X Mk II (Luminex), wyposażony w lasery o długości fali 405 nm, 488 nm i 642 nm oraz oprogramowanie INSPIRE™ (wersja 200.1.681.0; Luminex) wykorzystano do akwizycji próbek. Dalszą analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania IDEAS (wersja 6.2; Luminex). Komórki obrazowano przy 40-

krotnym powiększeniu przy niskiej prędkości przepływu (55mm/s) w celu uzyskania obrazów o wysokiej jakości.

Optymalną macierz kompensacyjną między poszczególnymi kanałami fluorescencji ustalono przy użyciu mieszaniny komórek MDA–MB–231, MCF7 i PBMC od zdrowego dawcy, wybarwionych przeciwciałami V, CD45, CD31 i DAPI oddzielnie lub w kombinacji. Do kompensacji nie wykorzystano przeciwciał anty-pan-keratyna i anty- $\alpha$ -SMA ze względu na inny wzór barwienia linii komórkowych i CTCs/cCAFs i potencjalne wyciszenie sygnału dla krążących we krwi komórek. Macierz kompensacyjna dla wimentyny została uzyskana na komórkach PBMC, aby skutecznie rozróżnić sygnał od tych komórek i cCAFs/CTCs. Zoptymalizowane ustawienie parametrów do akwizycji zastosowano dla wszystkich analizowanych próbek.

W trakcie akwizycji próbek ustalono pierwszą bramkę zawierającą komórki DAPI+, następnie ustalono drugą bramkę zawierającą komórki DAPI+CD45/CD31- (**Ryc. 4A, B**). Za każdym razem liczone wszystkie przepływające komórki zawierające jądro (DAPI+), podczas gdy zbierano sygnał tylko dla komórek DAPI+CD45/CD31-. W celu detekcji potencjalnych cCAFs, intensywność fluorescencji  $\alpha$ -SMA i CD29 wizualizowano na histogramach (**Ryc. 4C, D**). Aby wykrywać CTCs, intensywność fluorescencji K i V wizualizowano na dwuwymiarowym wykresie punktowym (**Ryc. 4E**). Potencjalne, wstępnie wybramkowane cCAFs i CTCs, zostały następnie potwierdzone na podstawie obrazów immunofluorescencyjnych pod kątem ich morfologii i szczegółów barwienia i zliczone ręcznie.





**Rycina 4.** Wykresy przedstawiające sposób bramkowania komórek analizowanych za pomocą Amnis® ImageStream® X Mk II **A-B** na etapie akwizycji w programie INSPIRE™ **C-E** podczas analizy w programie IDEAS.

Wykryte komórki zdefiniowano jako: cCAFs:  $\alpha$ -SMA+/K-/DAPI+/V- lub V+/CD45&CD31- lub CD29+/K-/DAPI+/V- lub V+/CD45&CD31-, a także CTCs epitelialne: K+/DAPI+/V-/CD45&CD31- (w skrócie K+V-), CTCs mezenchymalne: K-/DAPI+/V+/CD45&CD31- (K-V+), CTCs epitelialno-mezenchymalne: K+/DAPI+/V+/CD45&CD31- (K+V+), ujemne zarówno dla markerów epitelialnych, jak i mezenchymalnych: K-/DAPI+/V-/CD45&CD31- (zwane dalej negatywnymi, K-V-) (**Tabela 5**). Wymiary cCAFs i CTCs, takie jak średnica, obwód, powierzchnia i okrągłość, zostały zmierzone przy użyciu QuPath wersja 0.2.3 19 przez członka zespołu – mgr Roberta Wentę. Wypustki cytoplazmatyczne zdefiniowano jako fragmenty błony komórkowej wystające poza oszacowaną ogólną geometrię komórki.

**Tabela 5.** Wykaz wszystkich potencjalnych fenotypów cCAFs i CTCs możliwych do detekcji za pomocą opracowanego protokołu z wykorzystaniem Amnis® ImageStream.

Rodzaj krążącej we krwi komórki	Wzór markerów
cCAFs	$\alpha$ -SMA+/K-/DAPI+/V-/CD45&CD31-
	$\alpha$ -SMA+/K-/DAPI+/V+/CD45&CD31-
	CD29+/K-/DAPI+/V-/CD45&CD31-
	CD29+/K-/DAPI+/V+/CD45&CD31-
CTCs epitelialne	K+/DAPI+/V-/CD45&CD31- (K+V-)
CTCs epitelialno-mezenchymalne	K+/DAPI+/V+/CD45&CD31- (K+V+)
CTCs mezenchymalne	K-/DAPI+/V+/CD45&CD31- (K-V+)
CTCs negatywne	K-/DAPI+/V-/CD45&CD31- (K-V-)

Obecność, liczby, klastry i fenotypy cCAFs lub CTCs, a także ich szczegóły morfologiczne lub interakcje były dalej skorelowane z danymi kliniczno-patologicznymi (tj. podtyp molekularny, morfologia krwi przed leczeniem i odpowiedź na leczenie).

Dokładne liczby wykrytych cCAFs i CTCs obliczono na 1 milion PBMC, aby znormalizować wszystkie próbki. Chore sklasyfikowano w różny sposób w odniesieniu do ich statusu CTCs, np. w fenotypie wyłącznym fenotyp chorej określono, gdy w próbce znaleziono tylko CTCs jednego fenotypu, natomiast w fenotypie dominującym fenotyp określono na podstawie najczęściej występującego fenotypu CTCs. W obu rodzajach klasyfikacji, gdy wykryto CTCs o różnym fenotypie (w fenotypie dominującym równa ilość różnych CTCs) określono go jako fenotyp heterogenny. Uwzględniano również różne cut-offy dla liczby CTCs/1mln PBMC w odniesieniu do danych klinicznych (np.  $\geq 1$ CTC/1mln PBMC;  $\geq 5$ CTCs).

### 7.11 Analizy statystyczne

Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera przedstawiające przeżycie całkowite (ang. *overall survival*, OS) u chorych z niskim i wysokim statusem  $\alpha$ -SMA porównano za pomocą testu log-rank (Mantel-Cox). Współczynniki ryzyka (ang. *Hazard ratio*, HR) z 95%

przedziałami ufności (ang. *confidence interval*, CI) obliczono przy użyciu regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w analizie jedno- i wieloczynnikowej. Do zbadania rozkładów wykorzystano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera. Do zbadania rozkładu statusu białka  $\alpha$ -SMA wśród cech kliniczno-patologicznych (wiek, stopień T, N, M, stopień złośliwości histologicznej, typ molekularny) zastosowano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera. Różnice w poziomach białka między grupami analizowano za pomocą testu u Manna-Whitneya.

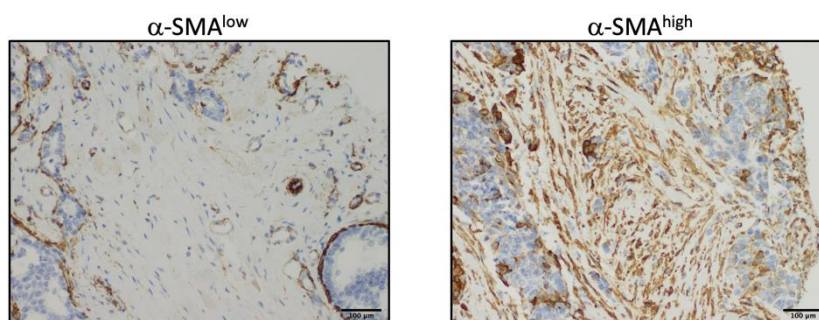
Testy Chi-kwadrat, dokładny test Fishera lub Fisher-Freeman-Haltman zostały użyte do porównania parametrów kliniczno-patologicznych (wiek, stopień T, N, M, stopień złośliwości histologicznej, podtyp molekularny i odpowiedź na leczenie) wśród chorych cCAFs i CTCs-dodatnich lub -ujemnych i chorych z różnymi fenotypami CTCs. Różnice w liczbie cCAFs i CTCs pomiędzy grupami chorych z różnymi parametrami kliniczno-patologicznymi oceniono testami u Manna-Whitneya lub Kruskala-Wallisa. Korelacje między CAFs a fenotypami CTCs analizowano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona.

Wartości  $p \leq 0,05$  uznano za istotne statystycznie. Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu programu SPSS Statistics (IBM) wersja 27. Dane z sekwencjonowania nowej generacji oraz z analizy NanoString analizowano przy użyciu środowiska R (3.6.1).

## 8 Wyniki

### 8.1 Kliniczne znaczenie ekspresji $\alpha$ -SMA w CAFs

Poziom białka  $\alpha$ -SMA został oceniony w komórkach zrębu o morfologii przypominającej fibroblasty za pomocą barwienia immunohistochemicznego tkanek zatopionych w parafinie (**Ryc. 5**). Wybarwionych zostało 106 próbek pochodzących z pierwotnych guzów piersi, z których wszystkie wykazywały ekspresję  $\alpha$ -SMA w CAFs. Zaobserwowano znaczne różnice w odsetku komórek pozytywnych na  $\alpha$ -SMA (5-90% komórek o morfologii przypominającej fibroblasty) i intensywności wybarwienia (średnie w 31,7%, wysokie w 68,3% próbek; nie zaobserwowano słabego wybarwienia).



**Rycina 5.** Przykładowe fotografie barwień immunohistochemicznych próbek guzów chorych na raka piersi z różnym statusem  $\alpha$ -SMA (low i high), powiększenie 20x

W celu dalszej analizy chore podzielono na dwie grupy,  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> (n=93) i  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> (n=13), zgodnie z górnym kwartylem indeksu barwienia  $\alpha$ -SMA (równym 240). Rozkład statusu  $\alpha$ -SMA w CAFs (niski vs. wysoki) porównano z danymi kliniczno-patologicznymi i danymi molekularnymi. W całej analizowanej kohorcie nie stwierdzono korelacji między poziomem  $\alpha$ -SMA a stopniem zaawansowania nowotworu czy zajęciem węzłów chłonnych (**Tabela 6**).

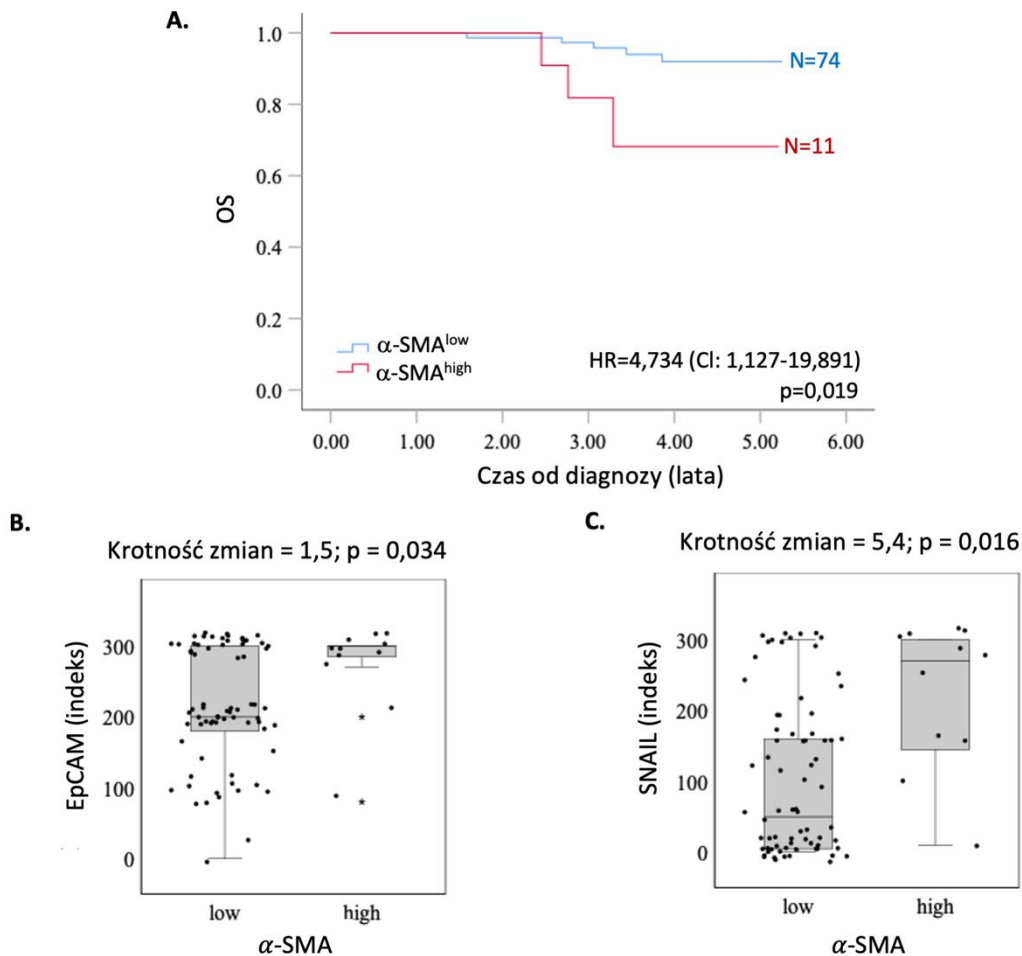
**Tabela 6.** Status  $\alpha$ -SMA w CAFs a cechy kliniczno-patologiczne chorych z rakiem piersi. Do analizy korelacji wykorzystano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera (F). Ze względu na braki danych nie wszystkie liczby sumują się do 106.

Zmienna	$\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	$\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	p
<b>Wiek</b>			
< 50	23 (21,7%)	5 (4,7%)	0,47 (F)
≥ 50	70 (66%)	8 (7,6%)	
<b>Stopień T</b>			
T1-2	88 (83,7%)	13 (12,5%)	1,00 (F)
T3-4	4 (3,8%)	0 (0%)	
<b>Stopień N</b>			
0	42 (40%)	7 (6,7%)	0,77 (F)
1	50 (54,3%)	6 (5,7%)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>			
1	12 (11,4%)	2 (1,9%)	0,96
2	46 (43,8%)	6 (5,7%)	
3	34 (32,4%)	5 (4,8%)	
<b>Typ molekularny</b>			
Luminalnv A	33 (31,1%)	2 (1,9%)	0,07
Luminalnv B HER2-	23 (21,7%)	3 (2,8%)	
Luminalnv B HER2+	18 (17%)	6 (5,7%)	
Nie luminalnv HER2+	5 (4,7%)	0 (0%)	
Potrójnie negatywny	14 (13,2%)	2 (1,9%)	

Co ciekawe, w grupie chorych z luminalnym rakiem piersi A i B (ang. *luminal breast cancer*, lumBC) (N=85) chore z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs miały znacznie gorszy całkowity wskaźnik przeżycia ( $p=0,019$ , log-rank; **Ryc. 6A**). W tej podgrupie nie znaleziono dalszych korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi (**Tabela 7**), natomiast analiza wieloczynnikowa wykazała, że  $\alpha$ -SMA pozostaje istotnym czynnikiem prognostycznym, HR 11,481;  $p=0,008$  (**Tabela 8**).

Pod względem markerów molekularnych ocenianych immunohistochemicznie,  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs korelowały dodatnio z poziomami białka SNAIL ( $p=0,034$ ) i EpCAM ( $p=0,016$ ) (**Ryc. 6B-C**) w komórkach nowotworowych, wskazując na ich potencjalnie bardziej agresywny fenotyp, podczas gdy nie zaobserwowano korelacji dla innych wcześniej scharakteryzowanych białek, tj. SLUG, CXCR4, TWIST1. W badaniach *in vitro* pożywką

znad CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> nie wywołała zwiększonej ekspresji SNAIL i EpCAM w komórkach lumBC, MCF7.



**Rycina 6.**  $\alpha$ -SMA-dodatnie CAFs korelują ze złym rokowaniem i bardziej agresywnym fenotypem komórek nowotworowych w luminalnym raku piersi. **A** Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera obrazujące przeżycie całkowite (ang. *overall survival*, OS) u chorych z rakiem piersi zależnie od poziomu białka  $\alpha$ -SMA w CAFs. Współczynniki ryzyka (ang. *Hazard ratio*, HR) z 95% przedziałami ufności (ang. *confidence interval*, CI) obliczono za pomocą regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Wykresy przedstawiające poziom białek **B** EpCAM i **C** SNAIL u chorych z niskim i wysokim poziomem  $\alpha$ -SMA. Zastosowano test u Manna–Whitneya. N – ilość chorych w grupie.

**Tabela 7.** Porównanie statusu  $\alpha$ -SMA w CAFs z cechami kliniczno-patologicznymi chorych z luminalnym rakiem piersi A i B. Do analizy korelacji wykorzystano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera (F). Ze względu na brak danych nie wszystkie liczby sumują się do 85.

Zmienna	$\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	$\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	p
<b>Wiek</b>			
< 50	14 (16,5%)	3 (3,5%)	0,69 (F)
≥ 50	60 (70,6%)	8 (11,8%)	
<b>Stopień T</b>			
T1-2	70 (82,4%)	11 (12,9%)	1,00 (F)
T3-4	4 (4,7%)	0 (0%)	
<b>Stopień N</b>			
0	36 (42,4%)	5 (5,9%)	1,00 (F)
1	38 (44,7%)	6 (7,1%)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>			
1	12 (14,1%)	2 (2,4%)	0,92
2	45 (52,9%)	6 (7,1%)	
3	17 (20%)	3 (3,5%)	

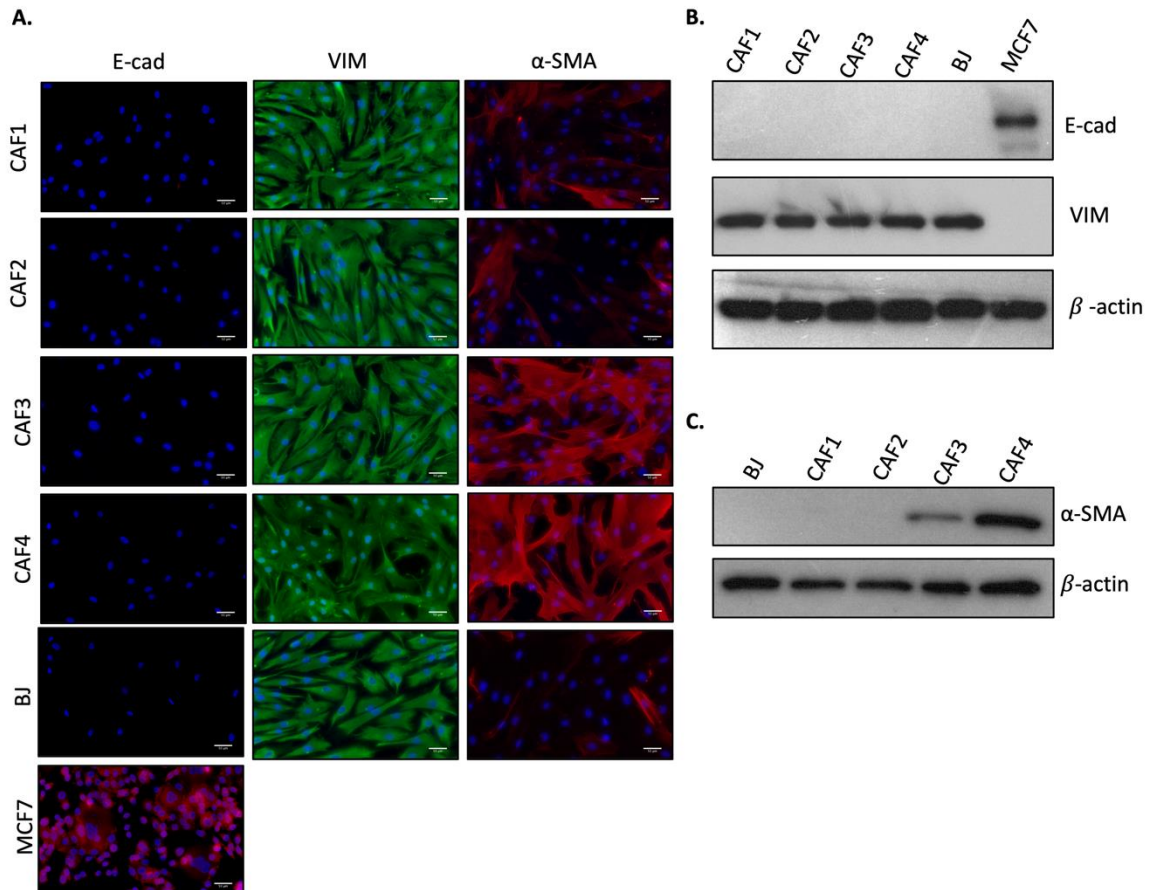
**Tabela 8.** Czynniki rokownicze dla czasu przeżycia – analiza jedno- i wieloczynnikowa wg modelu Cox'a

Zmienna	jednoczynnikowa			wieloczynnikowa		
	p	HR	CI 95%	p	HR	CI 95%
$\alpha$ -SMA	0,019	4,734	1,127-19,891	0,008	11,481	1,911-68,983
Wiek	0,609	1,727	0,212-14,042	-	-	-
T	<0,001	1,132	1,060-1,209	<0,001	1,175	1,082-1,275
N	0,217	2,738	0,553-13,571	-	-	-
Stopień złośliwości histologicznej	0,713	0,809	0,262-2,499	-	-	-

## 8.2 Charakterystyka wyizolowanych CAFs

CAFs wyizolowano z fragmentów guzów zawierających zrąb pobranych z pierwotnego luminalnego raka piersi od 4 chorych i przetestowano pod kątem ich wpływu na linie komórkowe raka piersi *in vitro*. Po 3 pasażach izolowane CAFs analizowano pod kątem obecności markerów charakterystycznych dla CAFs (VIM,  $\alpha$ -SMA) oraz markerów wykluczających (markerów dla komórek nowotworowych, t.j. E-cad) za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego i Western blot. Jako kontrole posłużyły linia komórkowa normalnych fibroblastów – BJ oraz linia komórkowa luminalnego raka piersi – MCF7. Wszystkie wyprowadzone linie komórkowe CAFs wybarwiały się

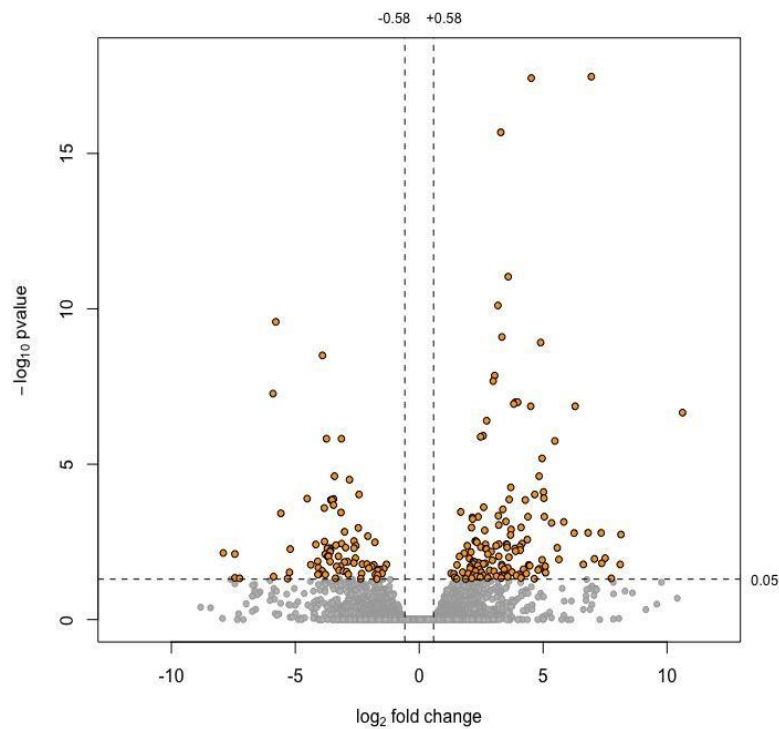
pozytywnie na VIM i negatywnie na E-cad i prezentowały morfologię wrzecionowatą, typową dla fibroblastów (**Ryc. 7A-B**). Na podstawie barwienia immunofluorescencyjnego oraz analizy Western blot, linie komórkowe CAFs sklasyfikowano jako  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> (CAF3 i CAF4), z większością komórek  $\alpha$ -SMA-dodatnich (tj. >90%) lub  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> (CAF1 i CAF2), z większością komórek  $\alpha$ -SMA-ujemnych (tj. > 80%) (**Ryc. 7A, C**).



**Rycina 7.** Charakterystyka CAFs izolowanych od chorych z rakiem piersi. **A.** Fotografie przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne dla E-kadheryny (E-cad, czerwony), wimentyny (VIM, zielony),  $\alpha$ -SMA (czerwony) i DAPI jako barwienie jądrowe (niebieski) wyprowadzonych hodowli pierwotnych CAFs 1-4 i linii komórkowych BJ lub MCF7 jako kontrola. Powiększenie 40x **B.** Analiza Western blot poziomu białka E-cad, VIM i **C.**  $\alpha$ -SMA w komórkach CAFs 1-4 i linii komórkowej normalnych fibroblastów BJ.

W celu dokładnej charakterystyki wyizolowanych CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> i  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> przeprowadzono sekwencjonowanie ich transkryptomu. Analizy wykazały 220 genów o zróżnicowanej ekspresji w tych dwóch grupach, 140 o wyższej ekspresji i 80 o niższej ekspresji w grupie CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> w stosunku do grupy  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> (**Ryc. 8, Tabela 9**).



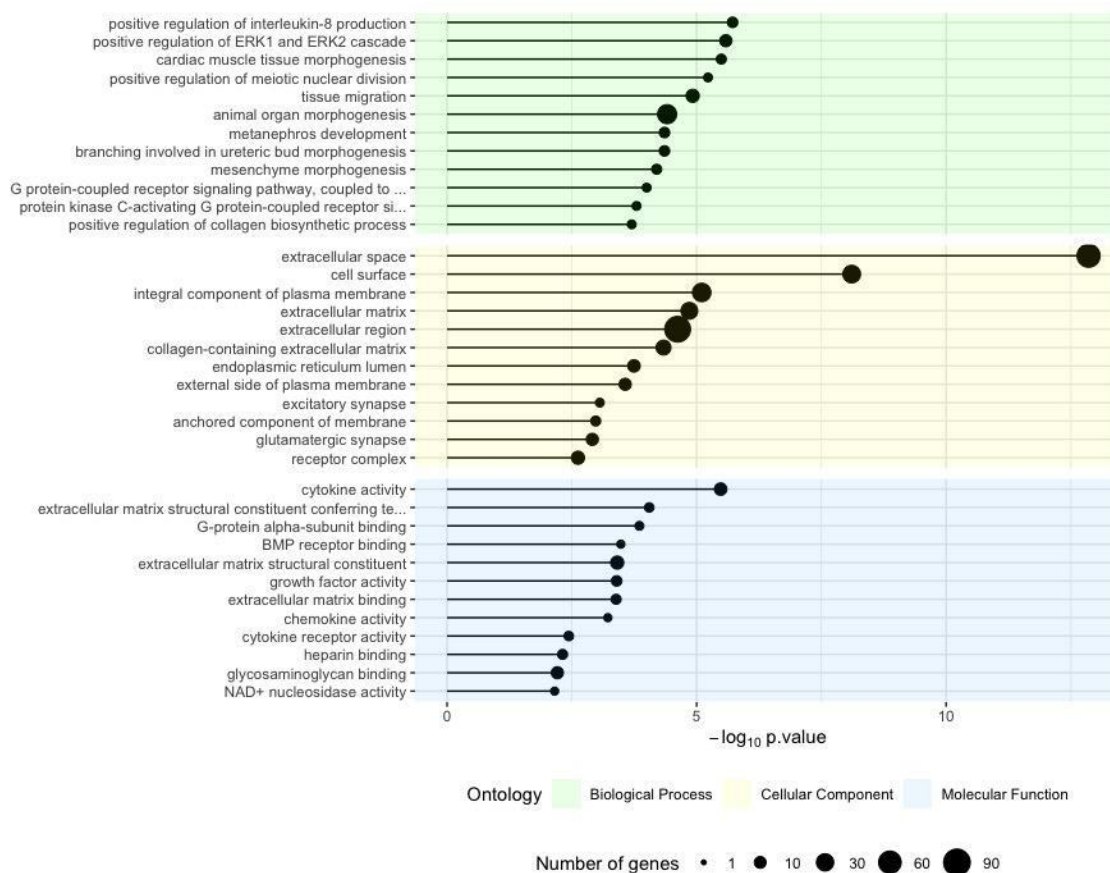


**Rycina 8.** Wyniki analizy zróżnicowanej ekspresji genów uzyskane przez sekwencjonowanie transkryptomu CAFs. Żółte punkty reprezentują geny o istotnie zmienionej ekspresji. Ujemne wartości log<sub>2</sub> fold change wskazują geny o obniżonej ekspresji w grupie CAFs α-SMA<sup>high</sup>, natomiast wartości dodatnie to geny o podwyższonej ekspresji w grupie CAFs α-SMA<sup>high</sup> (w stosunku do grupy α-SMA<sup>low</sup>).

**Tabela 9.** 10 genów o najwyższej istotności spośród 220 genów o zróżnicowanej ekspresji w CAFs α-SMA<sup>high</sup> i α-SMA<sup>low</sup>.

Gen	log <sub>2</sub> FC	p
<i>IGF2</i>	6,95	2,10E-22
<i>AGT</i>	4,52	4,67E-22
<i>PTGES</i>	3,29	3,90E-20
<i>ADGRL4</i>	3,59	2,31E-15
<i>RPL13P12</i>	3,18	2,42E-14
<i>NEFM</i>	-5,79	9,81E-14
<i>PTPRD</i>	3,34	3,50E-13
<i>SCUBE3</i>	4,90	6,04E-13
<i>ABTB3</i>	-3,90	1,77E-12
<i>HAPLN3</i>	3,04	8,76E-12

Analiza Gene Ontology wykazała, że geny o podwyższonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs są zaangażowane w procesy takie jak: organizacja macierzy zewnątrzkomórkowej (GO:0030198,  $p < 0,001$ ), pozytywna regulacja kaskady kinaz ERK1, ERK2 (GO:0070374,  $p = 0,01$ ) i produkcję interleukiny 8 (GO:0032757,  $p < 0,001$ ) (**Ryc. 9**). Natomiast procesy, w które zaangażowane były geny o obniżonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs to odpowiedź zapalna (GO:0006954,  $p < 0,001$ ), negatywna regulacja kaskady kinaz ERK1, ERK2 (GO:0070374,  $p < 0,001$ ) oraz przyleganie komórka-komórka (GO:0098609,  $p = 0,02$ ).

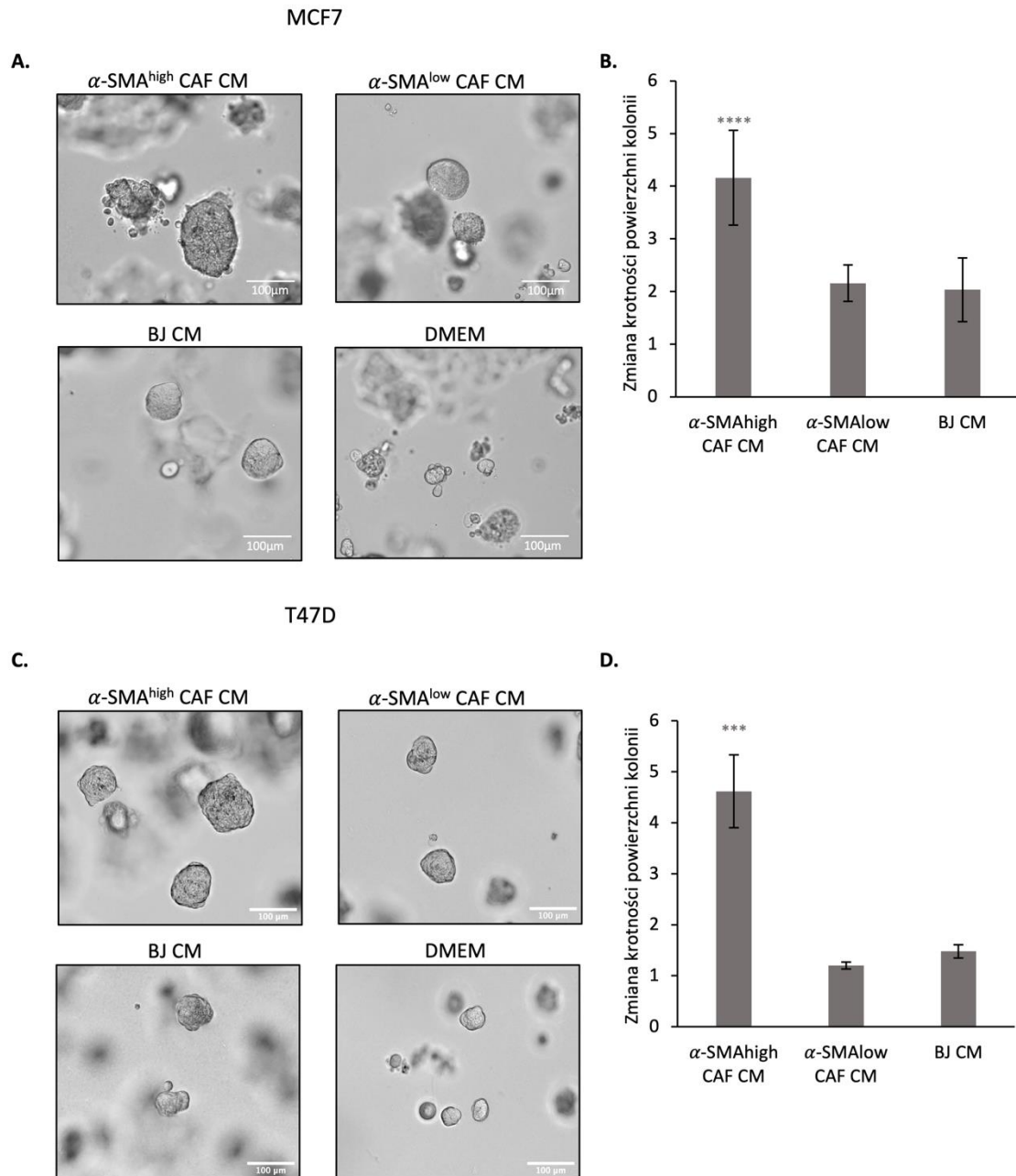


**Rycina 9** Procesy biologiczne, komponenty komórkowe i funkcje molekularne w które zaangażowane były geny o istotnie podwyższonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs. *Number of genes* – zwizualizowana liczba genów które zidentyfikowano w obrębie danego procesu.

### 8.1 Analiza *in vitro* wpływu $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs na komórki luminalnego raka piersi

Kondycjonowane pożywki (ang. *conditioned medium*, CM) zebrane z warunków wyprowadzonych linii CAFs zastosowano do zbadania wzrostu komórek linii komórkowych luminalnego raka piersi - MCF7 i T47D w hodowli 3D w Matrigelu.

Kondycjonowana pożywka z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs spowodowała znaczące zwiększenie wzrostu kolonii komórek MCF7 w Matrygelu (krotność zmiany powierzchni kolonii w porównaniu z kontrolą wyniosła 2,16 dla  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> CAFs vs. 4,16 dla  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs,  $p=0,0001$ ) (**Ryc. 10A-B**). Podobne obserwacje uzyskano dla linii komórkowej T47D (**Ryc. 10 C-D**).



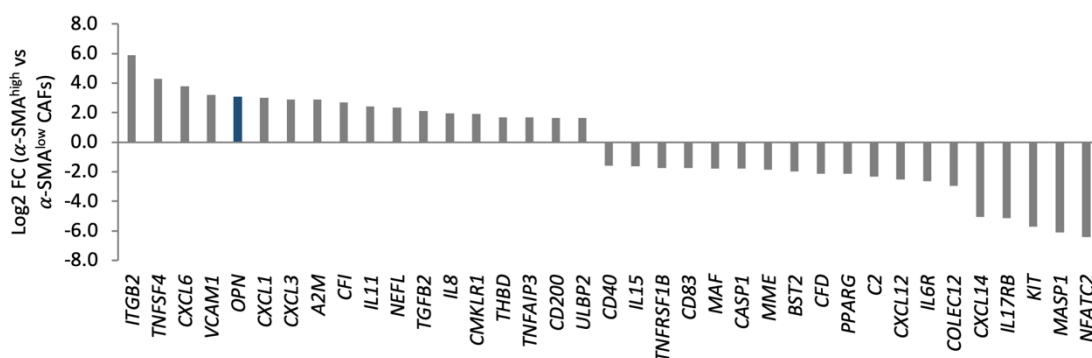
**Rycina 10.**  $\alpha$ -SMA-dodatnie CAFs zwiększają wzrost komórek raka piersi. Reprezentatywne fotografie kolonii komórek **A.** MCF7 i **C.** T47D rosnących w hodowlach 3D-Matrygel, traktowanych kondycjonowaną pożywką (ang. *conditioned medium*, CM) z  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> lub  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs i BJ lub DMEM jako kontrola. Wykres przedstawiający zmianę krotności powierzchni kolonii linii komórkowych **B.** MCF7 i **D.** T47D. Powierzchnię kolonii określono za pomocą oprogramowania

ImageJ. Przedstawione wartości to średnie  $\pm$  odchylenie standardowe z 3 niezależnych eksperymentów (n=2 powtórzenia techniczne). Zastosowano test t-Studenta, \*\*\*p<0,0001 obliczone względem kontroli (DMEM).

Ponieważ wyniki te sugerowały, że kondycjonowana pożywka z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs promuje proliferację komórek nowotworowych, przeanalizowana została fosforylacja dwóch białek zaangażowanych w szlaki aktywujące proliferację komórek, AKT i ERK. Niestety nie zaobserwowano znaczących różnic w ekspresji i fosforylacji tych białek, gdy komórki MCF7 hodowano w 2D i traktowano pożywką kondycjonowaną z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> lub  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> CAFs.

## 8.2 Identyfikacja czynników odpowiedzialnych za promowanie wzrostu kolonii komórek raka piersi przez $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs

W celu zidentyfikowania potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za promowanie wzrostu guza przez  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs, przeprowadzono wielogenową analizę ekspresji przy użyciu panelu profilowania immunologicznego nCounter PanCancer (NanoString). Dla zwiększenia wiarygodności analizy i umożliwienia porównania wyników ze sobą do analiz wykorzystano 4 wyizolowane linie komórkowe CAFs (2  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs. 2  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>) oraz materiał pochodzący z utrwalonych w formalinie zatopionych w parafinie próbek klinicznych, jako że NanoString jest uważany za złoty standard analiz transkryptomycznych w tego typu materiale. Różnicowa analiza ekspresji genów w pierwotnych liniach komórkowych CAFs, zidentyfikowała 29 genów o podwyższonej ekspresji ( $\log_{2}FC > 1$ ; m.in. ITGB2, TNFSF4, CXCL6, VCAM1 i OPN) w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> w porównaniu z wyizolowanymi  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> CAFs. Są one np. związane z pozytywną regulacją aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, jak ujawniono w analizie Gene Ontology. Z kolei obniżenie poziomu ekspresji odnotowano dla 25 genów ( $\log_{2}FC < -1$ ; m.in. NFATC2, MASP1, KIT, IL17RB i CXCL14) zaangażowanych w szlak sygnałowy, w którym pośredniczy czynnik martwicy nowotworów (**Ryc. 11, Tabela 10**).



**Rycina 11.** Wykres przedstawia wyniki analizy ekspresji genów uzyskanych w ramach profilowania immunologicznego nCounter PanCancer w wyizolowanych komórkach CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> (przedstawiono geny o obniżonej i podwyższonej ekspresji).

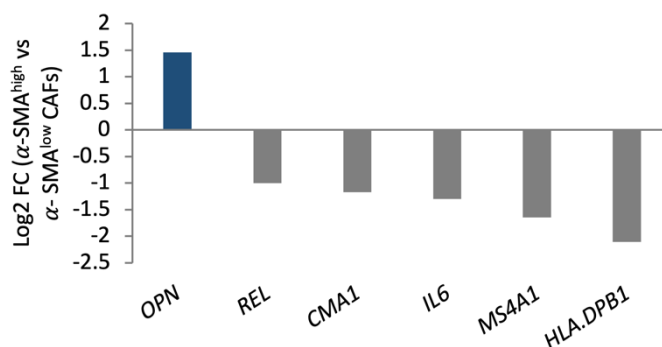
**Tabela 10.** nCounter PanCancer Immune Profiling panelowa analiza ekspresji genów w wyizolowanych CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>, geny z  $\log_{2}FC > 1$  były uznane za geny o podwyższonej ekspresji, geny z  $\log_{2}FC < -1$  uznano za geny o obniżonej ekspresji.

Gen	mediana $\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	mediana $\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	$\log_{2}FC$	Gen	mediana $\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	mediana $\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	$\log_{2}FC$
<b>Podwyższona ekspresja</b>				<b>Obniżona ekspresja</b>			
<i>ITGB2</i>	0,00	57,95	5,88	<i>OAS3</i>	24,23	11,63	-1,00
<i>TNFSF4</i>	32,56	648,16	4,27	<i>IL7R</i>	475,92	236,42	-1,01
<i>CXCL6</i>	66,82	941,76	3,80	<i>IL1R1</i>	956,96	465,83	-1,04
<i>VCAM1</i>	5,69	60,81	3,21	<i>PSMB9</i>	274,79	125,82	-1,12
<i>OPN</i>	6,16	60,26	3,10	<i>TNFRSF14</i>	132,43	59,90	-1,13
<i>CXCL1</i>	145,16	1184,9	3,02	<i>DPP4</i>	1332,82	530,04	-1,33
<i>CXCL3</i>	9,00	73,88	2,90	<i>CD40</i>	102,95	33,45	-1,59
<i>A2M</i>	23,04	178,17	2,90	<i>IL15</i>	96,66	30,45	-1,63
<i>CFI</i>	7,11	50,86	2,68	<i>TNFRSF1B</i>	32,49	8,95	-1,75
<i>IL11</i>	9,95	57,16	2,41	<i>CD83</i>	27,92	7,54	-1,76
<i>NEFL</i>	9,00	49,44	2,33	<i>MAF</i>	58,29	16,37	-1,77
<i>TGFB2</i>	44,05	192,04	2,10	<i>CASP1</i>	129,89	37,13	-1,78
<i>IL8</i>	88,68	343,43	1,94	<i>MME</i>	639,54	174,71	-1,87
<i>CMKLR1</i>	6,83	28,87	1,93	<i>BST2</i>	36,78	8,48	-1,99
<i>THBD</i>	48,67	157,98	1,68	<i>CFD</i>	157,55	35,48	-2,12
<i>TNFAIP3</i>	35,04	113,59	1,67	<i>PPARG</i>	28,96	5,82	-2,14
<i>CD200</i>	35,06	112,25	1,65	<i>C2</i>	64,63	12,22	-2,31
<i>ULBP2</i>	28,88	91,63	1,63	<i>CXCL12</i>	7014,29	1212,54	-2,53
<i>IL13RA2</i>	191,09	523,14	1,45	<i>IL6R</i>	51,98	7,56	-2,63
<i>EGR2</i>	11,37	32,67	1,44	<i>COLEC12</i>	526,04	66,60	-2,96
<i>IFIT2</i>	28,45	78,91	1,44	<i>CXCL14</i>	32,58	0,00	-5,07
<i>IL1A</i>	27,48	74,46	1,41	<i>IL17RB</i>	33,55	0,00	-5,11
<i>CD9</i>	270,62	708,64	1,39	<i>KIT</i>	52,02	0,00	-5,73

Tabela 10. (kontynuacja)

Gen	mediana $\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	mediana $\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	log2FC	Gen	mediana $\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	mediana $\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	log2FC
<b>Podwyższona ekspresja</b>				<b>Obniżona ekspresja</b>			
<i>IL32</i>	98,70	253,98	1,35	<i>MASP1</i>	67,02	0,00	-6,09
<i>IL6</i>	237,55	576,21	1,27	<i>NFATC2</i>	84,60	0,00	-6,42
<i>IL1B</i>	28,43	67,48	1,22				
<i>CXCL2</i>	28,99	68,06	1,20				
<i>LRRN3</i>	17,53	38,85	1,10				
<i>ICAM1</i>	72,84	155,49	1,08				

Następnie zbadano, czy te same różnice w ekspresji genów występują w klinicznych próbkach tkanek guzów  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> i  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>. Aby podkreślić najbardziej znaczące różnice między tymi dwiema grupami, wynik niższy niż dolny kwartyl (Q1) wyniku indeksu uznano za  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>, podczas gdy status  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> uznano dla tkanek z wynikiem powyżej górnego kwartyla (Q3). Ekspresja tylko jednego genu – osteopontyny, była znacząco podwyższona ( $\log_{2}FC > 1$ ), a 5 genów – *HLA-DPB1*, *MS4A1*, *IL6*, *CMA1* i *REL*, miało obniżoną ekspresję ( $\log_{2}FC < -1$ ) u chorych  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> (Ryc. 12, Tabela 11).

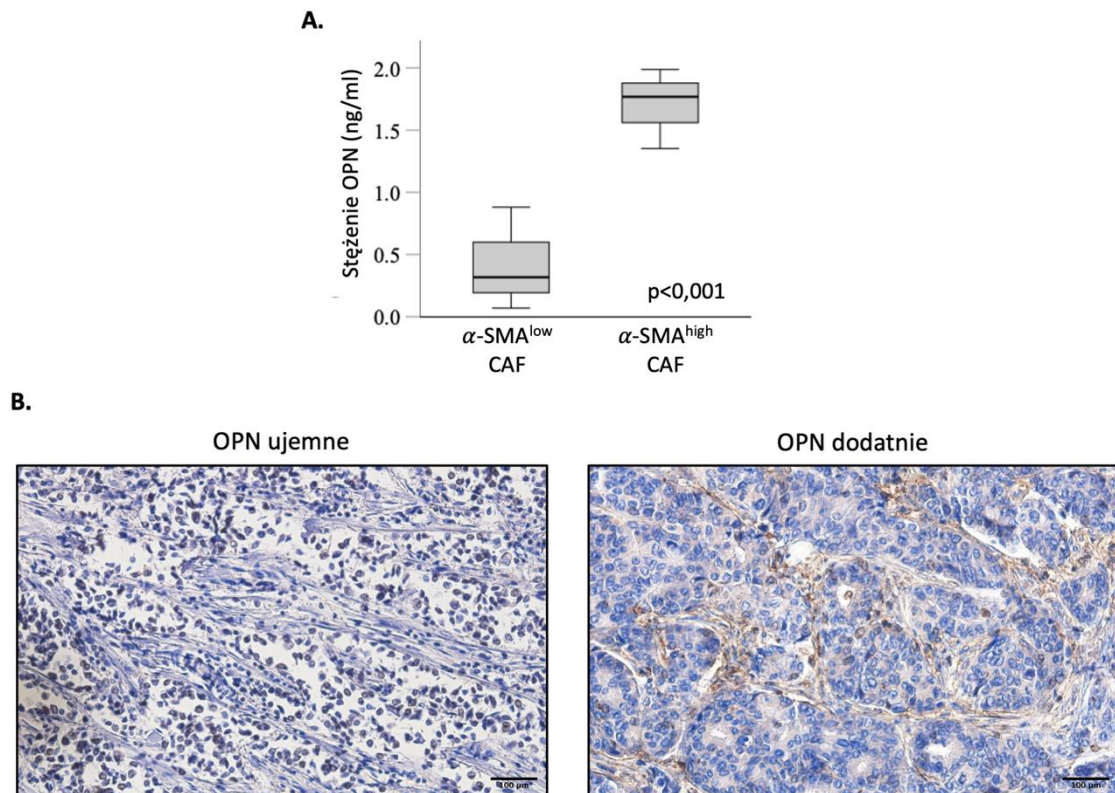


**Rycina 12.** Wykres przedstawia wyniki analizy ekspresji genów uzyskanych w ramach profilowania immunologicznego nCounter PanCancer w klinicznych próbkach tkanek od chorych  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>, geny z  $\log_{2}FC > 1$  były uznane za geny o podwyższonej ekspresji, geny z  $\log_{2}FC < -1$  były uznane za geny o obniżonej ekspresji.

**Tabela 11.** nCounter PanCancer Immune Profiling panelowa analiza ekspresji genów u chorych z lumBC  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>. geny z logFC > 1 były uznane za geny o podwyższonej ekspresji, geny z logFC < -1 uznano za geny o obniżonej ekspresji.

Gen	mediana $\alpha$ -SMA <sup>low</sup>	mediana $\alpha$ -SMA <sup>high</sup>	p	log2FC
<b>Podwyższona ekspresja</b>				
<i>OPN</i>	2812	7731	0,03	1,46
<b>Obniżona ekspresja</b>				
<i>REL</i>	941	471	0,01	-1,00
<i>CMA1</i>	198	88	0,03	-1,17
<i>IL6</i>	115	47	0,03	-1,30
<i>MS4A1</i>	440	141	0,05	-1,65
<i>HLA.DPB1</i>	27001	6274	0,01	-2,11

Co ciekawe, OPN była jedynym genem o podwyższonej ekspresji zarówno w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs wyizolowanych z raka piersi, jak i w próbkach klinicznych guzów z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs. W związku z tym oceniono wydzielanie OPN przez CAFs *in vitro*. Test ELISA ujawnił znacznie wyższy poziom białka OPN w pożywkach kondycjonowanych z wyizolowanych CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> w porównaniu z  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> (FC = 4; p < 0,001) (**Ryc. 13A**). Natomiast podczas analizy immunohistochemicznej w materiale tkankowym pochodzącym z luminalnego raka piersi wykazano, że białko OPN było obecne w cytoplazmie CAFs i ich otoczeniu w 51% próbek, w większości ocenianych jako barwienie słabe – 1 (41,8%), średnie – 2 (38,1%) i silne - 3 (20,1%) (**Ryc. 13B**). Ekspresję OPN odnotowano również w komórkach nowotworowych jako barwienie cytoplazmatyczne lub jądrowe (odpowiednio w 30% i 19% próbek).



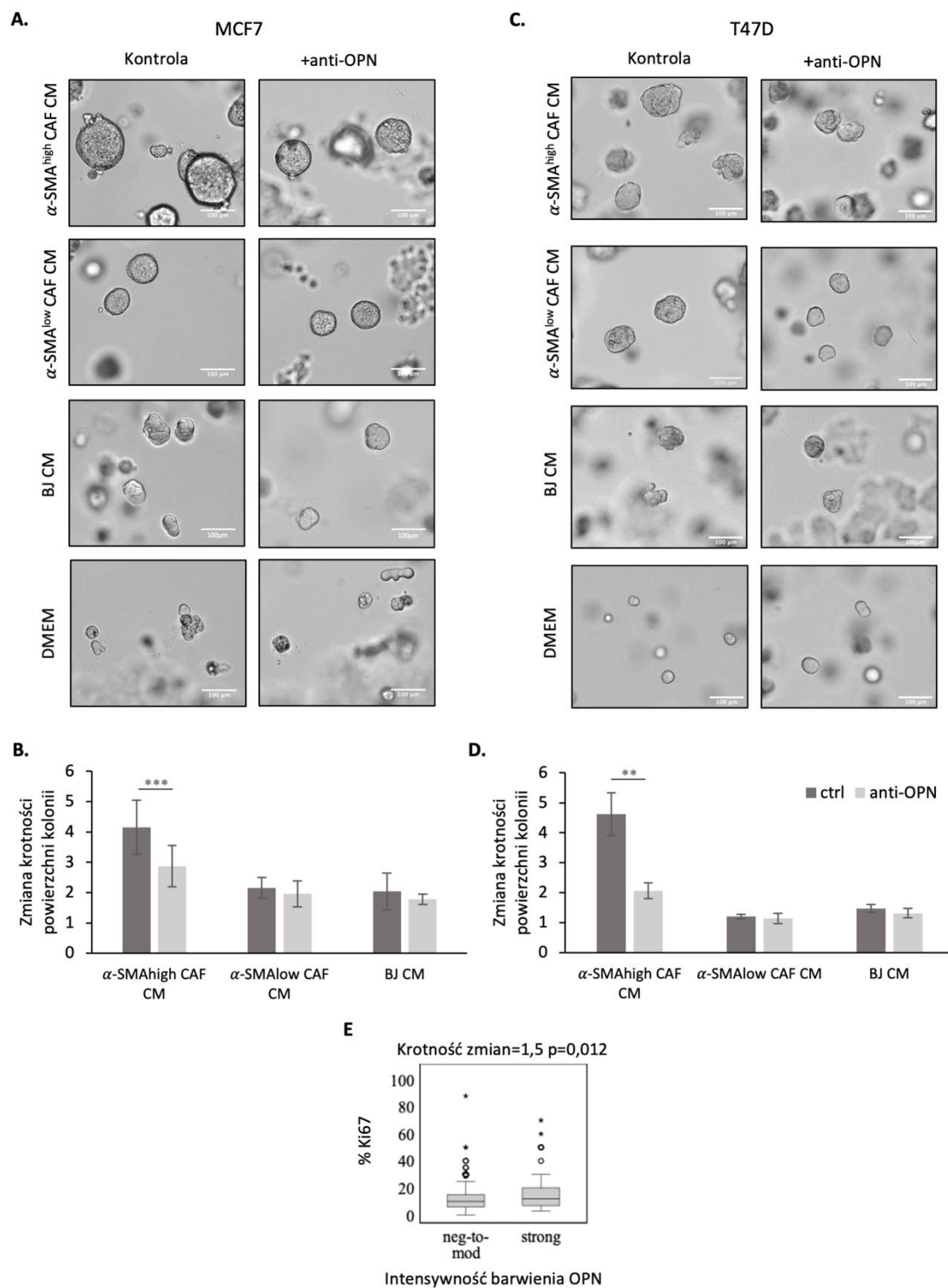
**Rycina 13. A.** Stężenie OPN w CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> vs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> mierzone w pożywce kondycjonowanej pochodzącej z hodowli CAFs za pomocą testu ELISA. Wykres przedstawia dane z trzech niezależnych eksperymentów (n=2 powtórzeń technicznych), a słupki błędów pokazują odchylenie standardowe. Zastosowano test t-Studenta. **B.** Reprezentatywne fotografie przedstawiające barwienie immunohistochemiczne OPN w CAFs w fragmentach raka piersi, powiększenie 20x.

### 8.3 Analiza *in vitro* wpływu OPN wydzielanej przez $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs na komórki luminalnego raka piersi

Aby dokładniej ocenić funkcjonalne znaczenie OPN wydzielanej przez CAFs w luminalnym raku piersi, wykonano test hodowli 3D w Matrigelu. Komórki MCF7 i T47D hodowano w Matrigelu i inkubowano z różnymi pożywkami kondycjonowanymi pochodzącymi z CAFs lub BJ uzupełnionymi lub nie przeciwciałem neutralizującymi OPN. Zaobserwowano, że dodanie przeciwciała neutralizującego OPN znacząco zmniejszyło wzrost kolonii MCF7 w Matrigelu tylko w komórkach traktowanych pożywką kondycjonowaną pochodzącą z  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs (krotność zmiany powierzchni kolonii w porównaniu z kontrolą 4,16 dla CAFs bez przeciwciał neutralizujących OPN vs 2,87 dla CAFs z przeciwciałami neutralizującymi OPN,  $p < 0,001$ ) (**Ryc. 14A-B**). W przypadku



pożywki z  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup> CAFs i linii komórkowej BJ obszar kolonii pozostał niezmienny (**Ryc. 14A-B**). Podobne wyniki uzyskano dla linii komórkowej T47D (**Ryc. 14C-D**). Dodatkowo, silne barwienie OPN w CAFs korelowało dodatnio z większą liczbą komórek nowotworowych Ki67-dodatnich ocenianych immunohistochemicznie w próbkach klinicznych ( $p=0,012$ , **Ryc. 14E**).

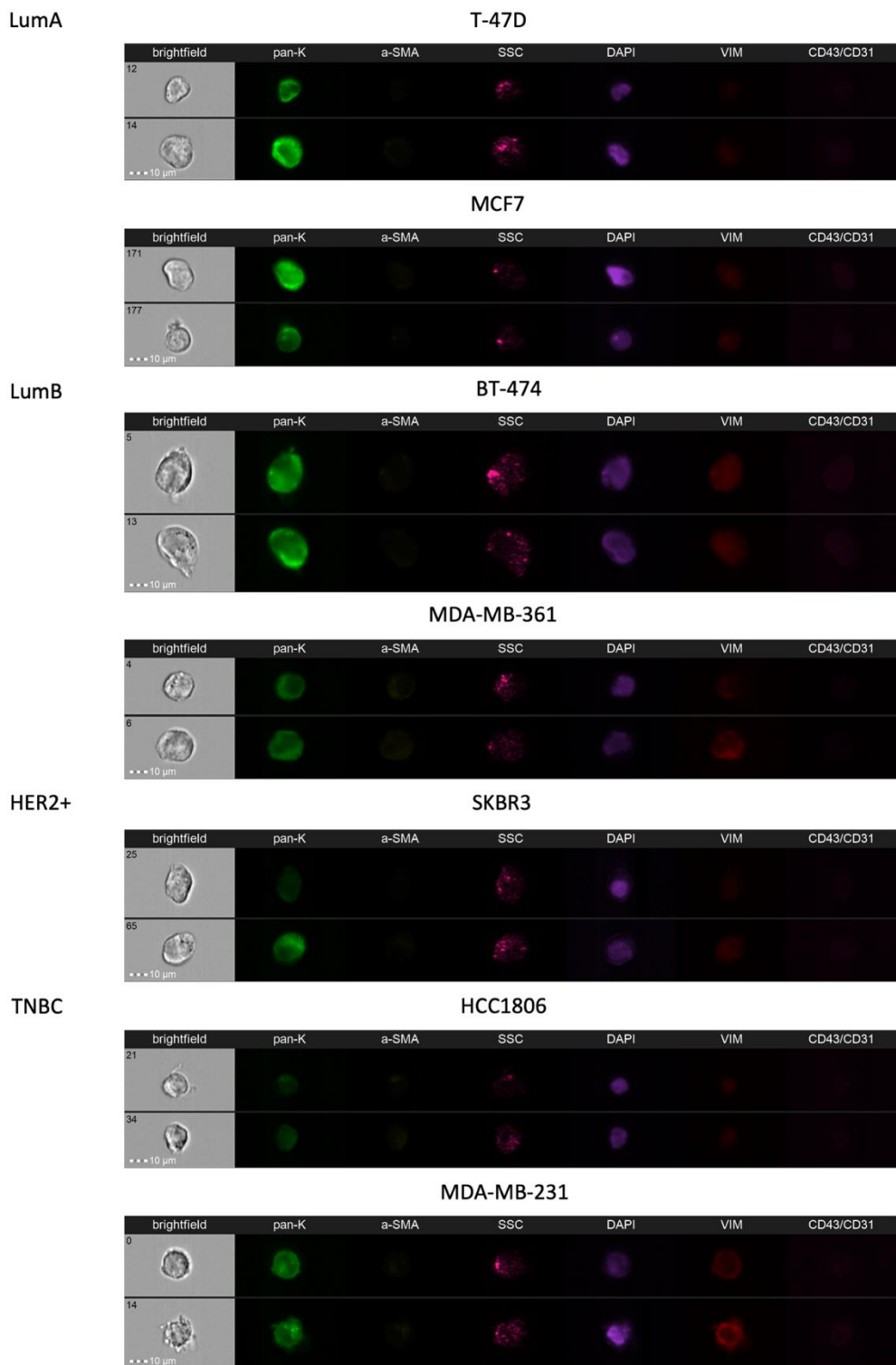


**Rycina 14.** Osteopontyna wydzielana przez  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs zwiększa wzrost guza. Reprezentatywne zdjęcia kolonii komórek **A.** MCF7 i **C.** T47D rosnących w hodowlach 3D-Matrigel traktowanych kondycjonowaną pożywką z  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs, BJ i DMEM z dodatkiem lub bez przeciwciał neutralizujących OPN. Wykres przedstawiający zmianę krotności powierzchni kolonii linii komórkowych **B.** MCF7 i **C.** T47D. Powierzchnię kolonii określono za pomocą oprogramowania ImageJ. Przedstawione wartości to średnie  $\pm$  SD z 3 niezależnych

eksperymentów (n=2 powtórzenia techniczne). Zastosowano test t-Studenta, \*\*\*p<0,0001 obliczone względem kontroli (DMEM). **D.** Wykres przedstawiający procentową zawartość białka Ki67 u chorych z różną intensywnością barwienia OPN – negatywną do średniej (neg-to-mod) i silną (strong), ocenianą immunohistochemicznie. Zastosowano test u Manna–Whitneya.

#### 8.4 Wykrywanie i charakterystyka krążących fibroblastów związanych z rakiem i różnych fenotypów krążących komórek nowotworowych

Przeciwciała mające wykrywać jednocześnie, w jednej próbce, fibroblasty związane z rakiem i różne fenotypy CTCs (epitelialny, mezenchymalny i epitelialno-mezenchymalny), zostały zoptymalizowane na liniach komórkowych raka piersi. W celu potwierdzenia, że zoptymalizowany koktajl przeciwciał prawidłowo wykryje fenotypy CTCs, testowano go na wykazujących cechy różnych podtypów molekularnych liniach komórkowych raka piersi. Uzyskano oczekiwane fenotypy, tj. linie komórkowe o podtypie luminalnym oraz HER2+ wykazywały fenotyp epitelialny (pan-K+/VIM-), natomiast linia komórkowa o podtypie potrójnie negatywnym – MDA-MB-231 zgodnie z literaturą<sup>88</sup> wykazywała obecność markerów epitelialnych i mezenchymalnych (panK+/VIM+) (**Ryc. 15**).



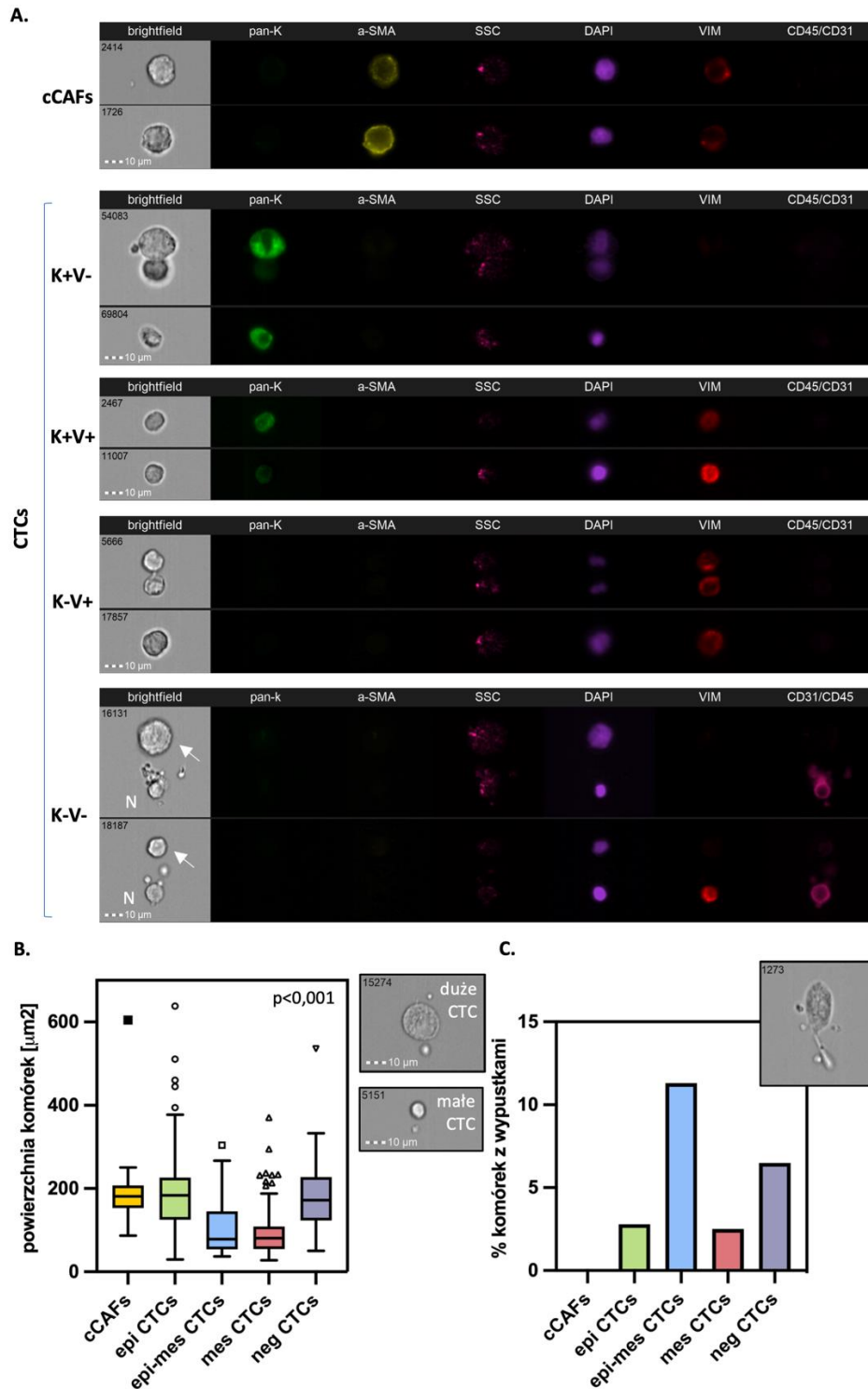
**Rycina 15.** Reprezentatywne fotografie różnych linii komórkowych raka piersi (BC) odpowiadających różnym podtypom molekularnym BC wykonane z wykorzystaniem Amnis® ImageStream®X Mk II (Luminex). BF oznacza jasne pole, pan-K – pan-keratyny, a-SMA – alfa-aktyna mięśni gładkich, SSC – rozproszenie boczne, Vim – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/komórek śródbłonna, N – prawidłowa komórka, strzałki – CTCs; wszystkie fotografie są wykonane obiektywem 40x.

W żadnej z 20 próbek krwi od zdrowych kobiet (przedział wiekowy 18-77, mediana 40) nie wykryto cCAFs ani CTCs.

Wszystkie próbki od 210 chorych z rakiem piersi miały charakter informatywny. Przeanalizowano krew 183 chorych przed terapią, 24 przed kolejną linią terapii, natomiast u 3 chorych brakowało tych danych. Wyizolowane PBMC były początkowo bramkowane jako DAPI+ i CD45/CD31- i w tej populacji identyfikowano cCAFs i różne fenotypy CTCs.

cCAFs sklasyfikowane jako  $\alpha$ -SMA+/K-/DAPI+/V- lub V+/CD45&CD31- (**Ryc. 16A**) były obecne u 7 (3,3%) z 210 chorych z rakiem piersi (zakres 7–56 cCAFs/1 mln PBMC i mediana 25 cCAFs/1 mln PBMC). Scharakteryzowano je jako V+ (13%) i V- (87%) i żaden z wykrytych cCAFs nie wykazywał obecności CD29. Średnia powierzchnia tych komórek wynosiła 188,2  $\mu\text{m}^2$  (mediana 181,3  $\mu\text{m}^2$ ), nie zaobserwowano wypustek cytoplazmatycznych (**Ryc. 16B**). cCAFs występowały jednocześnie z CTCs, w szczególności epitelialnymi i negatywnymi CTCs (odpowiednio  $R^2=0,165$ ,  $p=0,017$  i  $R^2=0,250$ ,  $p<0,001$ , **Tabela 12**). Obserwowano je również częściej w próbkach krwi z większą liczbą CTCs ( $R^2=0,198$ ,  $p=0,004$ ).

Krążące komórki nowotworowe wykryto w 58 (27,6%) z 210 próbek krwi. Ich liczebność wahała się od 1 do 459/1 mln PBMC (mediana 10/1 mln PBMC). Wśród nich zidentyfikowano 4 fenotypy (**Ryc. 16A**): CTCs epitelialne (epi, K +/V-) i CTCs związane z EMT, takie jak CTCs epitelialno-mezenchymalne (epi/mes, K+/V+), mezenchymalne (mes, K-/V+) i negatywne zarówno dla markerów epitelialnych, jak i mezenchymalnych (neg, K-V-). Wystąpiły one odpowiednio u 30 (14,3%), 26 (12,4%), 12 (5,7%), 21 (10%) z 210 chorych. Epitelialno-mezenchymalne i mezenchymalne CTCs wydawały się być mniejsze niż epitelialne lub negatywne CTCs (**Ryc. 16B**), podczas gdy epitelialno-mezenchymalne i negatywne CTCs wykazywały wypustki częściej niż epitelialne lub mezenchymalne CTCs (**Ryc. 16C**).



**Rycina 16.** Charakterystyka cCAFs i CTCs w raku piersi. **A.** przykłady cCAFs i różnych fenotypów CTCs, **B.** porównanie ich rozmiarów określonych jako obszar cytoplazmy (zastosowano test Kruskala-Wallisa) oraz **C.** różnice w występowaniu między nimi wypustek. BF oznacza jasne pole, pan-K – pan-keratyny, a-SMA – alfa-aktyna mięśni gładkich, SSC – rozproszenie boczne, Vim – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/komórek śródbłonna, N – prawidłowa komórka, strzałki – CTCs; wszystkie fotografie są wykonane obiektywem 40x.

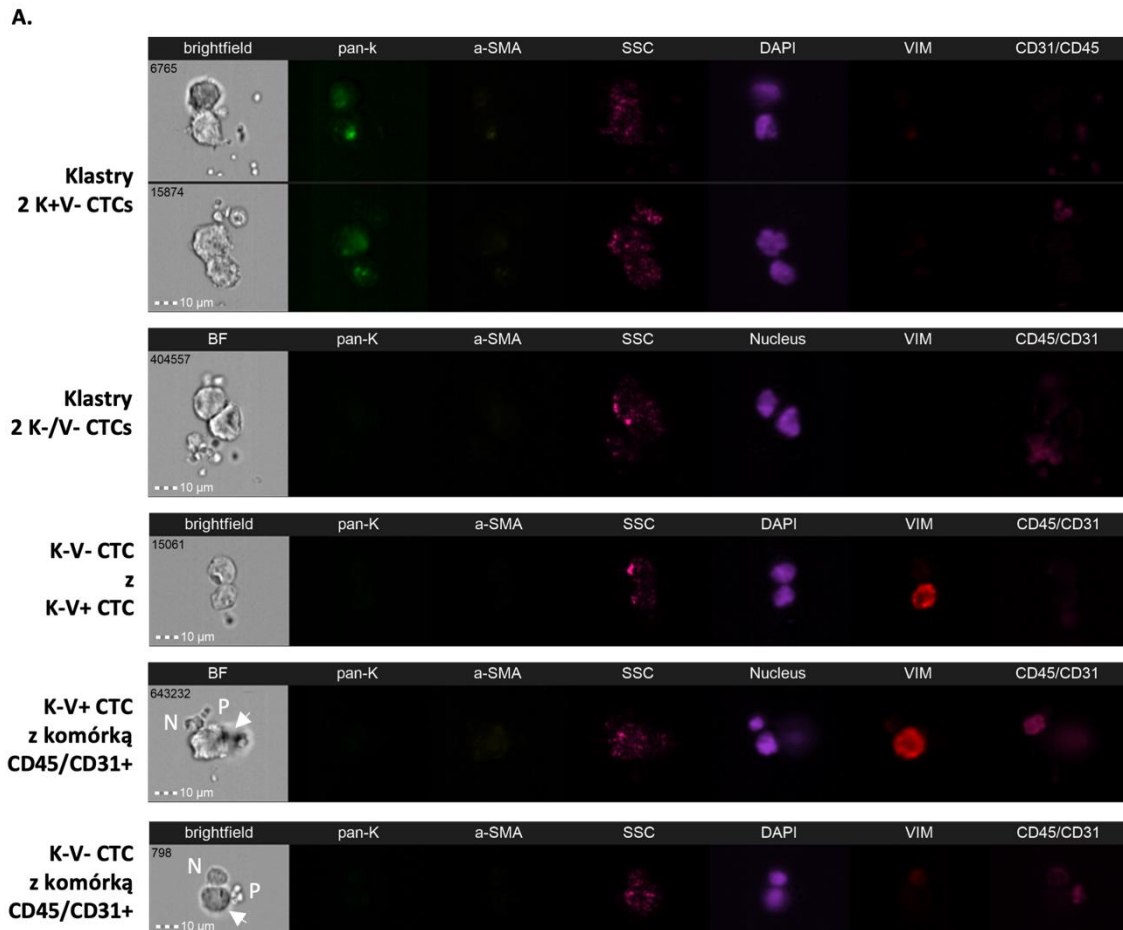
**Tabela 12.** Korelacje fenotypów CTCs z cCAFs. Zastosowano analizę korelacji R-Pearsona. R<sup>2</sup>-współczynnik korelacji.

		epi CTCs	epi-mes CTCs	mes CTCs	neg CTCs	cCAFs
epi CTCs	R <sup>2</sup>	1	-0,015	<b>0,259</b>	<b>0,772</b>	<b>0,165</b>
	p		0,813	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,017</b>
	n	210	210	<b>210</b>	<b>210</b>	<b>210</b>
epi-mes CTCs	R <sup>2</sup>		1	0,086	0,105	0,086
	p			0,215	0,128	0,214
	n		210	210	210	210
mes CTCs	R <sup>2</sup>			1	<b>0,314</b>	0,097
	p				<b>&lt;0,001</b>	0,163
	n			210	<b>210</b>	210
neg CTCs	R <sup>2</sup>				1	<b>0,250</b>
	p					<b>&lt;0,001</b>
	n				210	<b>210</b>
cCAFs	R <sup>2</sup>					1
	p					
	n					210

U żadnej z chorych liczba cCAFs, CTCs oraz liczba CTCs o różnym fenotypie nie korelowała z czasem między oddaniem próbki krwi a jej przetwarzaniem (zakres 18-1488 minut, mediana 65 minut), całkowitą liczbą PBMC w analizowanej próbce, ani liczbą jakichkolwiek frakcji leukocytów, które były określane podczas morfologii krwi przed leczeniem.

Nie wykryto żadnych klastrów cCAFs oraz cCAFs z CTCs. Natomiast klastry 2-3 CTCs (zakres 2-11) wystąpiły u 8 (3,81%) chorych. Składały się w większości z wyłącznie i) epitelialnych, ii) epitelialno-mezenchymalnych lub iii) negatywnych CTCs (**Ryc. 17A-B**). Heterogenne klastry CTCs mezenchymalnych i negatywnych wykryto u jednej chorej (**Ryc. 17A-B**), a u dwóch chorych obecne były dwa jednorodne klastry CTCs o różnych fenotypach (komórki epitelialne i negatywne). Ponadto u 4 (1,9%) chorych zidentyfikowano klastry CTCs (tylko mezenchymalne lub negatywne) z normalnymi komórkami (**Ryc. 17A-B**). Większość tych klastrów z normalnymi komórkami zawierała również płytki krwi (**Ryc. 17A-B**). U wszystkich tych 4 chorych jednocześnie występowały klastry samych CTCs oraz klastry CTCs i normalnych komórek. Występowanie klastrów nie korelowało z danymi kliniczno-patologicznymi chorych, tylko u dwóch chorych u których wykryto klastry występowały przeżuty (do płuca i skóry) (**Ryc.17B**). Wśród chorych

z klastrami dominował podtyp luminalny B HER2+ (n=4), natomiast nie występował podtyp luminalny A i luminalny B HER2- (**Ryc.17B**). Odpowiedź na terapię również nie korelowała z występowaniem klastrów u chorych. Z powodu braku danych ta informacja pojawiła się tylko dla 3 chorych z klastrami (**Ryc.17B**).



**B.**

		Chore							
		BC008	BC024	BC025	BC031	BC034	BC084	BC122	BC154
liczba klastrów	2 K+V- CTCs	5	1	9	2		2		
	2 K-V- CTCs		1	1					2
	2 K+V+ CTCs					1			
	K-V- z K-V+							1	
	CTC z kom. CD45/CD31+			1 (K-V+)		1 (K-V-)	1 (K+V-)	1 (K-V-)	
dane klin-pat	stopień M	0	0	1	0	1	0	0	0
	miejsce przerzutu	-	-	skóra	-	płuco	-	-	-
	podtyp molekularny	TNBC	HER2+	TNBC	LumB/HER2+	LumB/HER2+	LumB/HER2+	TNBC	LumB/HER2+
	odpowiedź na terapię	PR	CR	-	-	-	PD	-	-

PR, odpowiedź częściowa; CR, odpowiedź całkowita; PD, progresja choroby

**Rycina 17.** Klastry CTCs oraz CTCs z normalnymi komórkami w raku piersi wykrywane za pomocą obrazowej cytometrii przepływowej. **A.** Klastry homogenne, heterogenne i klastry CTCs z prawidłową komórką. **B.** Dane kliniczno-patologiczne chorych z pozytywnym wynikiem klastrów. BF oznacza jasne pole, pan-K – pan-keratyny, a-SMA – alfa-aktyna mięśni gładkich, SSC



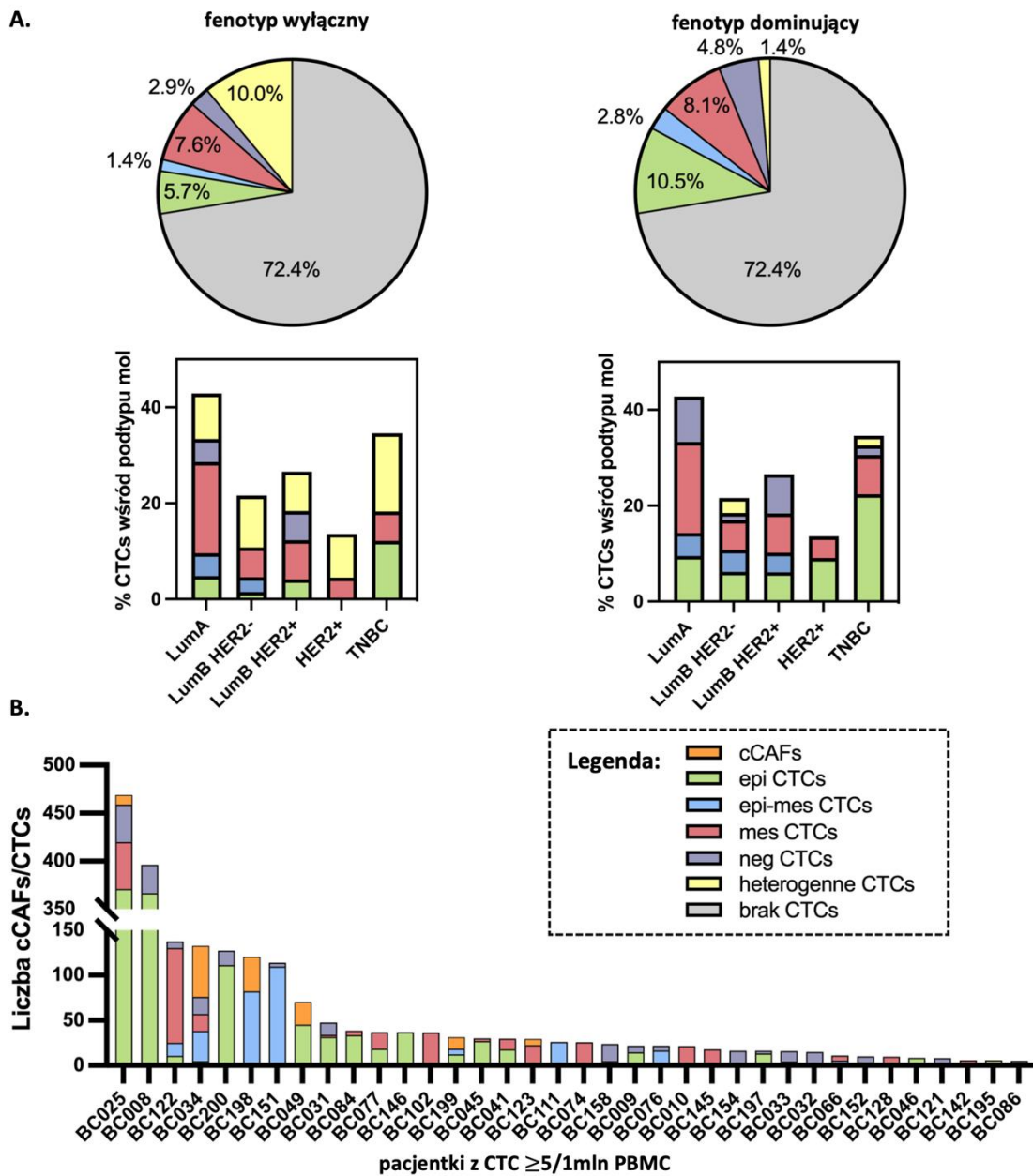
– rozproszenie boczne, Vim – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/komórek śródbłonna, N – prawidłowa komórka, P – płytki krwi, strzałki – CTCs; wszystkie obrazy wykonano obiektywem 40x.

## 8.5 Rozkład cCAFs i różnych fenotypów CTCs wśród chorych z rakiem piersi

cCAFs wystąpiły głównie u chorych z LumB/HER2+ (n=3) i TNBC (n=3). Klastry CTCs występowały częściej w próbkach z większą liczbą CTCs, heterogennym rozprzestrzenianiem się i obecnością cCAFs (wszystkie  $p < 0,001$ ), niezależnie od podtypu molekularnego.

Jedną CTC na 1 mln PBMC wykryto tylko u 2 (1%) chorych, podczas gdy 56 (26,6%) chorych miało 2 lub więcej CTCs/1 mln PBMC (w tym 36 (17,1%) chorych z 5 lub więcej CTCs/1 mln PBMC). Wśród próbek z więcej niż jedną CTCs, u 33 (58,9% CTCs-dodatnich i 15,7% wszystkich chorych) wykryto CTCs jednego fenotypu (rozszew homogeny), podczas gdy u 23 (41,1% CTCs-dodatnich i 11% wszystkich chorych) CTCs różnych fenotypów (rozszew heterogeny). Do dalszych analiz wprowadzono dwa rodzaje klasyfikacji fenotypów chorych z CTCs: fenotyp wyłączny - gdy w próbce danej chorej znaleziono tylko jeden fenotyp CTCs, fenotyp dominujący - określony na podstawie najczęściej występującego fenotypu CTCs. Gdy w próbce danej chorej znaleziono więcej niż jeden fenotyp CTCs określono go jako fenotyp heterogeny (w fenotypie dominującym równa ilość różnych CTCs). Analizując fenotypy wyłączne, najczęściej obserwowano fenotypy epitelialne i mezenchymalne, przy czym CTCs epitelialno-mezenchymalne i negatywne występowały bardzo rzadko. Podobne wyniki obserwowano dla fenotypu dominującego, z tym że tutaj fenotypy epitelialny i mezenchymalny występowały jeszcze liczniej (**Ryc. 18A-B**).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w dystrybucji fenotypów poszczególnych CTCs wśród podtypów molekularnych raka piersi, gdy rozważano wyłączną lub dominującą klasyfikację fenotypu. Jednak można zauważyć, że epitelialne CTCs występowały częściej u chorych z TNBC, podczas gdy CTCs o fenotypie związanym z EMT występowały częściej w podtypie luminalnym (**Ryc. 18A**).



**Rycina 18.** Dystrybucja fenotypów CTCs u chorych na raka piersi. **A.** Dystrybucja wyłącznych i dominujących fenotypów CTCs w całej kohorcie chorych i wśród różnych podtypów molekularnych raka piersi oraz **B.** Liczba cAFs i różnych fenotypów CTCs u poszczególnych chorych z CTCs $\geq$ 5.

## 8.6 Znaczenie kliniczne cCAFs i różnych fenotypów CTCs

Obecność, liczbę cCAFs i CTCs oraz klastry i fenotypy CTCs analizowano w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych i odpowiedzi na terapię w całej badanej grupie chorych (**Tabela 13, 14, 15**).

**Tabela 13.** Porównanie statusu CTCs i cCAFs z cechami kliniczno-patologicznymi i odpowiedzią na leczenie u chorych na raka piersi. F oznacza dokładny test Fishera, w przeciwnym razie przeprowadzono test chi-kwadrat. Ze względu na brak danych nie wszystkie liczby sumują się do 210.

Zmienna	N	CTCs			cCAFs		
		brak CTCs	CTCs	p	brak cCAFs	cCAFs	p
<b>Wiek</b>							
<50	84	68 (44,7%)	16 (27,6%)	<b>0,02</b>	83 (40,9%)	1 (14,3%)	0,25 (F)
>>50	126	84 (55,3%)	42 (72,4%)		120 (59,1%)	6 (85,7%)	
<b>Stopień cT</b>							
cT1-2	126	99 (72,8%)	27 (67,5%)	0,51	125 (71,8%)	1 (50%)	0,49 (F)
cT3-4	50	37 (27,2%)	13 (32,5%)		49 (28,2%)	1 (50%)	
<b>Stopień cN</b>							
cN0	70	55 (41%)	15 (37,5%)	0,69	70 (40,7%)	0 (0%)	0,52 (F)
cN1	104	79 (59%)	25 (62,5%)		102 (59,3%)	2 (100%)	
<b>Stopień M</b>							
M0	184	138 (90,8%)	46 (79,3%)	<b>0,02</b>	180 (88,7%)	4 (57,1%)	<b>0,04 (F)</b>
M1	26	14 (9,2%)	12 (20,7%)		23 (11,3%)	3 (42,9%)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>							
1	11	8 (5,5%)	3 (6,3%)	0,58	11 (5,8%)	0 (0%)	0,54
2	93	67 (46,2%)	26 (54,2%)		90 (47,6%)	3 (75%)	
3	89	70 (48,3%)	19 (39,6%)		88 (46,6%)	1 (25%)	
<b>Typ molekularny</b>							
Luminalny A	21	12 (8%)	9 (16,1%)	0,13	20 (10,1%)	1 (14,3%)	0,25
Luminalny B HER2-	65	51 (34%)	14 (25%)		65 (32,7%)	0 (0%)	
Luminalny B HER2+	49	36 (24%)	13 (23,2%)		46 (23,1%)	3 (42,9%)	
Nie luminalny HER2+	22	19 (12,7%)	3 (5,4%)		22 (11,1%)	0 (0%)	
Potrójnie negatywny	49	32 (21,3%)	17 (30,4%)		46 (23,1%)	3 (42,9%)	
<b>Odpowiedź na leczenie</b>							
stabilizacja choroby	21	15 (13,6%)	6 (20,7%)	0,62	21 (15,2%)	0 (0%)	0,8

**Tabela 13. (kontynuacja)**

Zmienna	N	CTCs			cCAFs		
		brak CTCs	CTCs	p	brak cCAFs	cCAFs	p
odpowiedź całkowita	39	30 (27,3%)	9 (31%)		39 (28,3%)	0 (0%)	
odpowiedź częściowa	69	56 (50,9%)	13 (44,8%)		68 (49,3%)	1 (100%)	
progresja choroby	10	9 (8,2%)	1 (3,4%)		10 (7,2%)	0 (0%)	

**Tabela 14.** Porównanie wyłącznych fenotypów CTCs wśród cech kliniczno-patologicznych i odpowiedzi na leczenie chorych na raka piersi. Przeprowadzono test chi-kwadrat. Ze względu na brak danych nie wszystkie liczby sumują się do 210.

Zmienna	N	Wyłączny fenotyp CTCs					p
		epi	mes	epi-mes	neg	heterogenn y	
<b>Wiek</b>							
<50	16	2 (18,2%)	2 (12,5%)	2 (66,75)	0 (0%)	10 (43,5%)	<b>0,02</b>
>>50	42	9 (81,8%)	14 (87,5%)	1 (33,3%)	5 (100%)	13 (56,5%)	
<b>Stopień cT</b>							
cT1-2	27	5 (62,5%)	8 (72,7%)	2 (100%)	2 (50%)	10 (66,7%)	0,8
cT3-4	13	3 (37,5%)	3 (27,3%)	0 (0%)	2 (50%)	5 (33,3%)	
<b>Stopień cN</b>							
0	15	5 (62,5%)	4 (40%)	2 (100%)	0 (0%)	4 (25%)	0,11
1	25	3 (37,5%)	6 (60%)	0 (0%)	4 (100%)	12 (75%)	
<b>Stopień M</b>							
0	46	7 (63,6%)	12 (75%)	3 (100%)	5 (100%)	19 (82,6%)	0,05
1	12	4 (36,4%)	4 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (15,4%)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>							
1	3	1 (11,1%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0,46
2	26	3 (33,3%)	7 (58,3%)	3 (100%)	4 (100%)	9 (45%)	
3	19	5 (55,6%)	4 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (50%)	
<b>Typ molekularny</b>							
Luminalny A	9	1 (10%)	4 (25%)	1 (33,3%)	1 (25%)	2 (8,7%)	0,1
Luminalny B HER2-	14	1 (10%)	4 (25%)	2 (66,7%)	0 (0%)	7 (30,4%)	
Luminalny B HER2+	13	2 (20%)	4 (25%)	0 (0%)	3 (75%)	4 (17,4%)	
Nie luminalny HER2+	3	0 (0%)	1 (6,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8,7%)	
Potrójnie negatywny	17	6 (60%)	3 (18,8%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (34,8%)	
<b>Odpowiedź na leczenie</b>							
stabilizacja choroby	6	0 (0%)	2 (25%)	1 (100%)	2 (50%)	1 (8,3%)	0,45
odpowiedź całkowita	9	2 (50%)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (25%)	5 (41,7%)	
odpowiedź częściowa	13	2 (50%)	5 (62,5%)	0 (0%)	1 (25%)	5 (41,7%)	
progresja choroby	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)	

**Tabela 15.** Porównanie dominujących fenotypów CTCs wśród cech kliniczno-patologicznych i odpowiedzi na leczenie chorych na raka piersi. Przeprowadzono test chi-kwadrat. Ze względu na brak danych nie wszystkie liczby sumują się do 210.

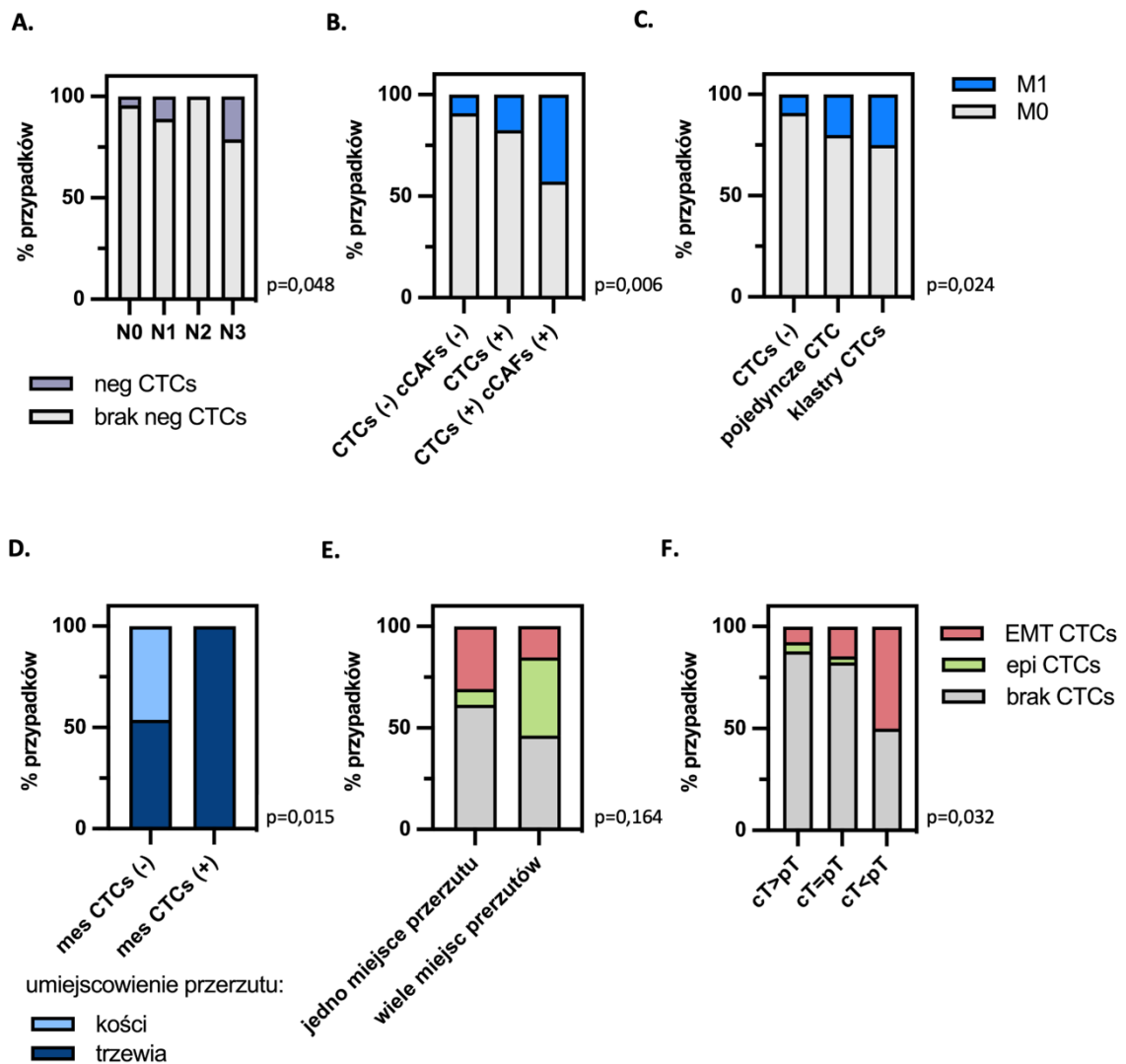
Zmienna	N	Dominujący fenotyp CTCs					p
		epi	mes	epi-mes	neg	heterogeny	
<b>Wiek</b>							
<50	16	6 (27,3%)	3 (17,6%)	4 (66,7%)	2 (20%)	1 (33,3%)	0,08
>>50	42	16 (73,7%)	14 (82,4%)	2 (33,3%)	8 (80%)	2 (66,7%)	
<b>Stopień cT</b>							
cT1-2	27	10 (71,4%)	8 (66,7%)	3 (100%)	4 (50%)	2 (66,7%)	0,65
cT3-4	13	4 (28,6%)	4 (33,3%)	0 (0%)	4 (50%)	1 (33,3%)	
<b>Stopień cN</b>							
0	15	6 (40%)	4 (36,4%)	2 (66,7%)	2 (25%)	1 (33,3%)	0,88
1	25	9 (60%)	7 (63,6%)	1 (33,3%)	6 (75%)	2 (66,7%)	
<b>Stopień M</b>							
0	46	16 (72,7%)	13 (76,5%)	4 (66,7%)	10 (100%)	3 (100%)	<b>0,03</b>
1	12	6 (23,1%)	4 (23,5%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Stopień złośliwości histologicznej</b>							
1	3	2 (11,1%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,84
2	26	8 (44,4%)	7 (53,8%)	4 (80%)	6 (66,7%)	1 (33,3%)	
3	19	8 (44,4%)	5 (38,5%)	1 (20%)	3 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>Typ molekularny</b>							
Luminalny A	9	2 (9,5%)	4 (23,5%)	1 (16,7%)	2 (22,2%)	0 (0%)	0,17
Luminalny B HER2-	14	4 (19%)	4 (23,5%)	3 (50%)	1 (11,1%)	2 (66,7%)	
Luminalny B HER2+	13	3 (14,3%)	4 (23,5%)	2 (33,3%)	4 (44,4%)	0 (0%)	
Nie luminalny HER2+	3	1 (4,8%)	1 (5,9%)	0 (0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	
Potrójnie negatywny	17	11 (52,4%)	4 (23,5%)	0 (0%)	1 (11,1%)	1 (33,3%)	
<b>Odpowiedź na leczenie</b>							
stabilizacja choroby	6	0 (0%)	2 (25%)	2 (100%)	2 (28,6%)	0 (0%)	0,19
odpowiedź całkowita	9	4 (44,4%)	1 (12,5%)	0 (0%)	3 (42,9%)	1 (33,3%)	
odpowiedź częściowa	13	4 (44,4%)	5 (62,5%)	0 (0%)	2 (28,6%)	2 (66,7%)	
progresja choroby	1	1 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

cCAFs i CTCs wykrywano częściej u starszych chorych (CTCs, >50 lat; p=0,023,

**Tabela 13).** cCAFs i klastry CTCs obserwowano w guzach  $\geq$ cT2, podczas gdy wszystkie fenotypy CTCs wykryto na wszystkich etapach rozwoju nowotworu (cT1-4) i niezależnie od stopnia zajęcia węzłów chłonnych (cN0-3). Negatywne CTCs korelowały z większą liczbą zajętych węzłów chłonnych (Fisher-Freeman-Haltman, p=0,048) (**Ryc. 19A**).

Zarówno obecność cCAFs, jak i CTCs korelowała z obecnością przerzutów (odpowiednio test Fishera,  $p=0,042$  i test Chi2,  $p=0,024$ ) (**Tabela 13**). Szczególnie obecność epitelialnych CTCs była związana ze statusem M1 ( $p=0,033$ , **Tabela 15**). Częstość występowania przerzutów wzrastała stopniowo pomiędzy i) chorymi CTCs-ujemnymi < chorymi CTCs-dodatnimi < chorymi dodatnimi zarówno pod względem CTCs, jak i cCAFs, jak również ii) chorymi CTCs-ujemnymi < chorymi dodatnimi pod względem pojedynczego CTCs < chorymi dodatnimi pod względem klastrów CTCs, pomimo małej liczby przypadków w ostatnich podgrupach chorych w każdej klasyfikacji (test Fishera-Freemana-Haltmana, odpowiednio  $p=0,006$  i  $p=0,024$ , **Ryc. 19B-C**). Warto podkreślić, że cCAFs oraz klastry CTCs i mezenchymalne CTCs obserwowano wyłącznie u chorych z przerzutami trzewnymi (ale nie o określonej lokalizacji) (cCAFs i klastry CTCs: oba  $p>0,05$  mezenchymalne CTCs: dokładny test Fishera,  $p=0,015$ , **Ryc. 19D**); natomiast CTCs epitelialne – częściej u chorych z licznymi miejscami przerzutów ( $p>0,05$ , **Ryc. 19E**), obejmującymi przerzuty trzewne lub współistniejące z przerzutami do kości.

Żaden z badanych parametrów (tj. obecność, liczba, klastry i fenotypy CTCs lub cCAFs) nie korelował z odpowiedzią na leczenie ani w całej kohorcie chorych, ani tylko u chorych leczonych neoadiuwantowo ( $n=122$ ). Natomiast CTCs związane z EMT najczęściej występowały u chorych z progresją choroby podczas leczenia (test Chi2,  $p=0,032$ , **Ryc. 19F**), która określona została jako wzrost wielkości guza podczas leczenia względem jego oceny w preparacie ocenianym przed leczeniem (cT < pT).



**Rycina 19.** Kliniczne znaczenie różnych fenotypów CTCs i cCAFs. **A.** Dystrybucja negatywnych (neg) CTCs według statusu N. **B.** Obecność przerzutów w zależności od obecności CTCs/cCAFs i **C.** od pojedynczego/klastrowego statusu CTCs. **D.** Korelacja mezenchymalnych (mes) CTC z miejscem przerzutów **E.** Korelacja fenotypów CTCs z liczbą miejsc przerzutów i **F.** odpowiedzią na terapię.

## 9 Dyskusja

Mikrośrodowisko guza odgrywa kluczową rolę w rozwoju i progresji nowotworów. Jedne z najliczniejszych komórek zrębu w guzie, fibroblasty związane z nowotworem (CAFs), wydzielają wiele czynników, które wpływają na wzrost i migrację komórek nowotworowych w guzie pierwotnym, przyczyniając się tym samym do progresji choroby. CAFs mogą również uczestniczyć w tworzeniu niszy dla przerzutów nowotworowych, co ma kluczowe znaczenie w procesie przerzutowania raka piersi. W niniejszej pracy głównym celem było lepsze zrozumienie roli CAFs w mikrośrodowisku guza pierwotnego jak również we krwi chorych z rakiem piersi, co stanowi ważny obszar badań, który może przyczynić się do identyfikacji nowych celów terapeutycznych i biomarkerów prognostycznych w leczeniu raka piersi.

W pierwszej części przedstawionej pracy doktorskiej udowodniono, że CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> mogą stymulować wzrost komórek nowotworowych w luminalnym raku piersi (lumBC) poprzez wydzielanie osteopontyny (OPN). W tym badaniu CAFs zostały sklasyfikowane zgodnie z obecnością białka  $\alpha$ -SMA, a ich wpływ na lumBC badano w kontekście tego markera w próbkach klinicznych i *in vitro*. Wykazano heterogenną ekspresję  $\alpha$ -SMA w CAFs w mikrośrodowisku guza w pierwotnym raku piersi. Wysoki poziom tego markera w CAFs był związany ze złym rokowaniem u chorych z lumBC, co potwierdzono w analizie jedno- i wieloczynnikowej. Chociaż istnieją badania, które łączą obecność CAFs  $\alpha$ -SMA-dodatnich w zrębie z gorszym wynikiem klinicznym w raku piersi<sup>89,90</sup> lub konkretnie w raku piersi podtypu TNBC<sup>91</sup>, po raz pierwszy wykazano tę korelację w lumBC.

CAFs  $\alpha$ -SMA dodatnie mogą potencjalnie wpływać na gorsze rokowanie chorych poprzez indukcję lub regulację komórek nowotworowych o bardziej agresywnym fenotypie (charakteryzującym się m.in. zwiększoną proliferacją, macierzystością lub przejściem epitelialno-mezenchymalnym, EMT). W przedstawionej pracy pożywka kondycjonowana znad CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> indukowała wzrost linii komórkowych lumBC *in vitro* w hodowli 3D. Jednak nie zaobserwowano indukcji fosforylacji AKT i ERK, białek zaangażowanych w proliferację komórkową, gdy inkubowano linię komórkową MCF7 z pożywką znad CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>. Może to oznaczać, że w ten proces zaangażowany był inny szlak sygnałowy lub pozytywny wpływ CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> na wzrost komórek



nowotworowych występuje tylko w kulturach 3D, które dokładniej odzwierciedlają warunki wzrostu nowotworu *in vivo*.

W kohorcie chorych z luminalnym rakiem piersi stwierdzono istotnie wyższy poziom cząsteczki adhezyjnej komórek nabłonkowych (EpCAM) i SNAIL w guzach, gdzie zaobserwowano wyższy poziom  $\alpha$ -SMA w zrębie. W raku piersi EpCAM koreluje z niekorzystnym rokowaniem w podtypach molekularnych luminalnym i bazalnym<sup>92</sup>. Istnieją nieliczne badania korelacji CAFs z EpCAM. W jednym z nich wykazano, że komórki nowotworowe (niedrobnokomórkowego raka płuca) z wysoką ekspresją EpCAM aktywują w normalnych fibroblastach fenotyp podobny do CAFs, poprzez sygnalizację  $\text{avb6/TGF}\beta$ <sup>93</sup>. Z kolei SNAIL, czynnik transkrypcyjny, który bierze udział w indukcji EMT oraz promuje inwazję komórek nowotworowych<sup>94</sup>, jest pozytywnie regulowany w komórkach nowotworowych przez CAFs w raku piersi<sup>95</sup>. Co ciekawe, EpCAM również może brać udział w indukowanym przez  $\text{TGF-}\beta$ 1 przejściu epitelialno-mezenchymalnym, co wykazano w linii komórkowej lumBC, MCF7<sup>96</sup>. Nawiązując do powyższych badań, wykazany w obecnej pracy podwyższony poziom białka EpCAM i SNAIL w komórkach nowotworowych chorych z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> może prawdopodobnie indukować EMT, co skutkuje zwiększoną ruchliwością tych komórek i może być uzasadnieniem dla gorszego rokowania tych chorych. W badaniach *in vitro* omówionych w tej pracy nie została jednak potwierdzona indukcja EMT wywołana przez CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>. Pożywka z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> nie wywołała zwiększonej ekspresji SNAIL i EpCAM w komórkach lumBC. Takie wyniki mogą być spowodowane wykonaniem eksperymentów w hodowli 2D lub indukcja EMT przez te CAFs nie jest zależna od sekretomu, ale raczej zależy od bezpośredniego kontaktu oddziałujących ze sobą komórek.

Pogłębiona charakterystyka wyizolowanych CAFs uzyskana podczas sekwencjonowania nowej generacji wykazała, że geny o podwyższonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs są zaangażowane w procesy takie jak: organizacja macierzy zewnątrzkomórkowej, pozytywna regulacja kaskady kinaz ERK1, ERK2 i produkcja interleukiny 8. Wszystkie te procesy udokumentowane zostały jako przyczyniające się do progresji nowotworu. Jak wspomniano we wstępie czynniki wydzielane przez CAFs biorą udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej<sup>39</sup>. Zwiększenie sztywności ECM, głównie poprzez zwiększenie ilości kolagenu, krzyżowanie włókien i ich równoległą reorientację stymuluje inwazję komórek nowotworowych. Z kolei degradacja ECM

prowadzi do zwiększenia mobilności komórek nowotworowych<sup>97</sup>. Znaczenie kaskady kinaz ERK1/2, będącej częścią ścieżki sygnałowej MAPK, również zostało opisane w kontekście progresji nowotworów, jej nadmierna aktywacja może prowadzić do nasilonej proliferacji, unikania apoptozy czy angiogenezy<sup>98</sup>. Podwyższona ekspresja IL-8 natomiast zwiększa proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych oraz nasila migrację komórek nowotworowych, komórek śródbłonna i naciekających neutrofilów w miejscu guza<sup>99</sup>. Procesy, w które zaangażowane były geny o obniżonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs to m.in. negatywna regulacja wspomnianej już wyżej kaskady kinaz ERK1, ERK2 oraz przyleganie komórka-komórka, którego zmniejszenie jest kluczowe dla migracji komórek nowotworowych. W badaniach *in vitro* przedstawionych w tej pracy nie zaobserwowano jednak indukcji fosforylacji ERK, gdy inkubowano linię komórkową MCF7 z pożywką z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>. Choć geny o podwyższonej ekspresji w  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs są zaangażowane w pozytywną regulację kaskady kinaz ERK1 i ERK2, możliwe, że linia komórkowa MCF7 używa innej ścieżki sygnałowej, która nie angażuje ERK, dodatkowo warunki hodowli komórek 2D, w której przeprowadzony był eksperyment, nie zawsze odzwierciedlają warunki *in vivo*<sup>100,101</sup>. Powyższa charakterystyka  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> CAFs uzupełnia wiedzę, w jaki sposób te komórki mogą przyczyniać się do gorszego rokowania u chorych z rakiem piersi.

W celu identyfikacji czynników odpowiadających za indukcję wzrostu komórek lumBC za pośrednictwem CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> i gorsze rokowanie u chorych z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>, przeanalizowano transkryptomy CAFs. W odróżnieniu od przedstawionego wyżej sekwencjonowania w tym wypadku użyto nie tylko materiał z wyizolowanych CAFs, ale również materiał pochodzący z utrwalonych w formalinie zatopionych w parafinie próbek klinicznych. Ze względu na wiek próbek FFPE (próbki z lat 2010-2013) oraz potencjalną degradację kwasów nukleinowych związaną z utwaleniem w formalinie, zdecydowano się na metodę NanoString, która jest uważana za złoty standard analiz transkryptomicznych w tego typu materiale<sup>102,103</sup>. Dla zwiększenia wiarygodności analizy i umożliwienia porównania wyników ze sobą, oba rodzaje próbek: materiał uzyskany z FFPE i z hodowli pierwotnych CAFs przebadano tą samą metodą. Analiza ekspresji genów panelu immunologicznego z wykorzystaniem modelu ontologii (GO) procesów biologicznych ujawniła, że geny o podwyższonej ekspresji w CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> (*IL6*, *IL1B*, *ITGB2*, *ICAM1*) powiązane z dodatnią regulacją aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-

κB, który został wcześniej opisany przez nasz zespół jako mechanizm promujący EMT w raku piersi<sup>87</sup>. Z kolei geny, o obniżonej ekspresji w CAFs α-SMA<sup>high</sup> (np. *CD40*, *TNFRSF14*, *TNFRSF1B*, *PSMB9*) były zaangażowane w szlaku sygnałowym, w którym pośredniczy czynnik martwicy nowotworu. Co ciekawe, tylko osteopontyna miała ekspresję wyższą w CAFs α-SMA<sup>high</sup> wyizolowanych z lumBC, jak i w próbkach tkanki nowotworowej z lumBC które charakteryzowały się obecnością CAFs α-SMA<sup>high</sup>. Niestety podobnych wyników nie zaobserwowano w analizie sekwencjonowania transkryptomu pierwotnych linii CAFs, różnice w ekspresji osteopontyny nie były istotne między α-SMA<sup>high</sup> a α-SMA<sup>low</sup> CAFs. Pomimo relatywnie dużej zgodności w profilowaniu ekspresji genów między tymi platformami (NanoString i sekwencjonowanie transkryptomu)<sup>104,105</sup> istnieją różnice w przygotowaniu materiału, które mogą prowadzić do rozbieżności w wynikach. Technologia NanoString nie opiera się na amplifikacji i odwrotnej transkrypcji jak ma to miejsce w sekwencjonowaniu. Te dwa procesy mogą wprowadzać błędy oparte na składzie zasad transkryptów genów, co może mieć wpływ na ilościową ocenę tych transkryptów<sup>105</sup>. Ponadto obecne technologie wymagają, aby cząsteczki cDNA reprezentowały tylko fragmenty RNA o odpowiedniej wielkości do sekwencjonowania. Dodatkowo badania pokazują, że zgodność między platformami zmniejsza się, jeśli wprowadza się analizę zmiany krotności<sup>105</sup>, która używana jest w celu normalizacji wyników między próbkami, jak to miało miejsce w przedstawionej pracy.

OPN jest wydzielaną, wiążącą integrynę fosfoproteiną zaangażowaną w sygnalizację anty-apoptotyczną i zwiększenie proliferacji komórek nowotworowych, proces angiogenezy oraz indukcję EMT<sup>30,106–109</sup>. Warto zauważyć, że większość badań dotyczy OPN pochodzenia nowotworowego, a niewiele wiadomo na temat OPN wydzielanej przez CAFs. OPN wydzielana przez komórki nowotworowe indukuje ekspresję markerów związanych z CAFs (α-SMA i VIM) w mezenchymalnych komórkach zrębu poprzez pozytywną regulację TGF-β1<sup>110</sup>. OPN odgrywa również kluczową rolę w przeprogramowaniu normalnych fibroblastów na prozapalne CAFs promujące nowotwór<sup>111</sup>. W raku piersi podwyższona ekspresja OPN została po raz pierwszy zidentyfikowana w zrębie od chorych ze złym rokowaniem oraz w CAFs w mysim modelu raka piersi MMTV-PyMT<sup>48,112</sup>. W obecnej pracy zaobserwowano co prawda pozytywne barwienie OPN w cytoplazmie i jądrze komórki nowotworowej, ale głównie OPN była obecna w cytoplazmie CAFs i w ich otoczeniu i korelowała z wyższym odsetkiem komórek

nowotworowych Ki67-dodatnich. W badaniach *in vitro* wykazano, że CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> wydzielają OPN do pożywki oraz że pożywka kondycjonowana, pochodząca z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> powoduje zwiększenie wzrostu komórek nowotworowych, a proces ten może być hamowany przez przeciwciała neutralizujące OPN. Jednym z wcześniej zaproponowanych mechanizmów jak OPN pochodząca ze zrębu może wpływać na proliferację i przeżycie komórek nowotworowych jest aktywacja kaskady MAPK poprzez receptor błonowy CD44<sup>113</sup>.

W drugiej części przedstawionej pracy doktorskiej skupiono się na optymalizacji nowej metody jednoczesnej detekcji krążących fibroblastów związanych z nowotworem (cCAFs) oraz komórek nowotworowych (CTCs) przy użyciu cytometru przepływowego z funkcją obrazowania (imFC). Komórki nowotworowe izolowane z krwi obwodowej chorych w małych ilościach, takie jak CTCs, ale także cCAFs, są uważane za silny marker niekorzystnego rokowania u tych chorych<sup>59,60,65</sup>.

W obecnej pracy cCAFs, scharakteryzowane jako komórki  $\alpha$ -SMA+/K-/V- lub V+/CD45&CD31-, wykryto razem z CTCs, zwłaszcza tymi o fenotypie epitelialnym i negatywnym, u 7 (3%) chorych głównie ze statusem M1. W przeciwieństwie do przedstawionych badań, cCAFs zostały wcześniej zidentyfikowane u 88,2% chorych z przerzutowym i 23,1% chorych z miejscowym rakiem piersi<sup>63</sup>, podczas gdy Ortiz-Otero i in. wykryli cCAFs u wszystkich chorych z przerzutowym rakiem piersi<sup>82</sup>. Występowały one również w wyższych liczbach na chorą niż w niniejszej pracy. Jednym z wyjaśnień takiej różnicy w wydajności detekcji cCAFs w dotychczas opublikowanych pracach oraz w przedstawionej pracy mogą być różnice w badanej kohorcie chorych i w metodologii. W obecnej pracy włączono tylko 26 chorych ze statusem M1 oraz w przedstawionej metodologii komórki były barwione w zawiesinie, co mogło generować hipotetycznie większą utratę komórek w przeciwieństwie do barwienia wykonywanego na mikrofiltrze<sup>63</sup> lub na szkiełkach mikroskopowych<sup>82</sup>. Co ciekawe, większość cCAFs wykrytych w przedstawionej pracy była negatywna na obecność wimentyny. Zgodnie z tą obserwacją, niektóre badania wykazały, że utrata wimentyny zwiększa ruchliwość fibroblastów przez mikrokanaly<sup>114</sup>, zmniejsza liczbę i rozmiar połączeń między komórkami a macierzą<sup>115</sup> oraz sztywność komórek<sup>116</sup>, co może potencjalnie umożliwić im wejście do krwioobrotu. Nie znaleziono cCAFs pozytywnych na CD29. Ten podtyp CAFs był obserwowany głównie w guzach pierwotnych w luminalnym raku piersi<sup>117</sup>, jednak w

dotychczas opublikowanych badaniach nie próbowano wykrywać krążących CAFs za pomocą tego białka, głównie stosowanymi markerami były FAP i  $\alpha$ -SMA<sup>63,66,81</sup>. Ze względu na niewielką liczbę chorych cCAFs-dodatnich, statystyki przeprowadzone na tych próbkach nie miały mocy statystycznej. Niemniej jednak zauważono, że częstość przerzutów była większa u chorych ze współwystępującymi CTCs i cCAFs w porównaniu do chorych bez CTCs lub tylko z CTCs. cCAFs występowały również u chorych z przerzutami wyłącznie do narządów trzewnych, podczas gdy dotychczas nie ma badań łączących obecności cCAFs z rodzajem przerzutów.

CTCs występowały odpowiednio u ok. 25% i 46% chorych ze statusem M0 i M1 w ilości 1-459/1 mln PBMC, co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi uzyskanymi przy użyciu innej metodologii, w tym zatwierdzonej przez FDA, jako „złoty standard” technologii detekcji CTCs, CellSearch<sup>118-121</sup>. Warto zauważyć, że zidentyfikowano cztery, a nie typowo obserwowane trzy fenotypy (tj. epitelialny, mezenchymalny i epitelialno-mezenchymalny<sup>75,122</sup>) związane ze statusem markerów epitelialnego (K) i mezenchymalnego (V), w tym po raz pierwszy opisany fenotyp negatywny na obecność tych markerów (K-V-). Fenotyp ten był dotychczas niewykrywalny dla obecnych metod detekcji opartych na mikroskopii fluorescencyjnej, natomiast brak obecności markerów takich jak, CD45, CD31 i  $\alpha$ -SMA oraz wielkość i morfologia pozwalają zaklasyfikować je jako potencjalne CTCs. K-V- CTCs były rzeczywiście wielkości epitelialnych CTCs, częściej wykazywały wypustki i były skorelowane z większą liczbą zajętych węzłów chłonnych. Warto byłoby w przyszłości przeprowadzić dalsze badania, aby zrozumieć ich biologię, zidentyfikować markery umożliwiające ich wykrycie i potwierdzić ich znaczenie kliniczne. Co ciekawe, dwa inne fenotypy CTCs związane z EMT, tj. epitelialno-mezenchymalny i mezenchymalny, były mniejsze niż epitelialne CTCs, co warto wziąć pod uwagę w metodach wykrywania CTCs opartych na wielkości i dokładnie zbadać pod kątem kryteriów włączenia tych komórek do klasyfikacji CTCs. CTCs związane z EMT korelowały z progresją nowotworu u chorych pomimo wprowadzenia leczenia systemowego. Ponieważ udowodniono, że markery EMT współwystępują z markerami związanymi z macierzystością w CTCs, może to potencjalnie wyjaśniać oporność tych konkretnych klonów komórek nowotworowych na terapię<sup>123</sup>.

W obecnym badaniu zaobserwowano różne wzorce rozprzestrzeniania się nowotworu. Znalaziono pojedyncze CTCs, jak i CTCs w klastrach, a także klastry CTCs

z normalnymi komórkami o nieokreślonym typie i pochodzeniu. Chociaż klastry te zidentyfikowano tylko u 8% chorych, były one związane z większą liczbą miejsc przerzutów w porównaniu z chorymi z ujemnym wynikiem CTCs i chorymi z pojedynczymi CTCs. Potwierdzają to dostępne dane pokazujące, że CTCs w klastrach i w klastrach z normalnymi komórkami, np. neutrofilami mają większą zdolność do tworzenia przerzutów<sup>124,125</sup>.

Około 40% próbek chorych z pozytywnym wynikiem CTCs charakteryzowało się wykrytymi CTCs o więcej niż jednym fenotypie. Fenotyp epitelialny występował najczęściej w TNBC oraz w przypadkach występowania wielu przerzutów do kości i narządów wewnętrznych. CTCs związane z EMT były częściej wykrywane w podtypie luminalnym, a mezenchymalne CTCs znajdowano wyłącznie w przypadkach z przerzutami trzewnymi. Można postawić hipotezę, że mechanizm rozsiewu nowotworu jest różny wśród różnych podtypów molekularnych raka piersi i luminalny rak piersi może być bardziej podatny na EMT. Podobne wnioski zostały przedstawione wcześniej, gdzie zauważono liczniejsze występowanie komórek o fenotypie mezenchymalnym u chorych z zajęciem węzłów chłonnych w luminalnym raku piersi, tej korelacji nie obserwowano dla podtypu TNBC<sup>126</sup>. Pomimo, że fenotyp mezenchymalny komórek nowotworowych częściej występuje TNBC<sup>127</sup>, to przedstawione w tej pracy dane mogą sugerować, że w tym podtypie aktywacja procesu EMT nie jest tak znacząca dla rozprzestrzeniania się przerzutów jak w luminalnym raku piersi. Podobnie różne miejsca przerzutów mogą przyciągać lub wysiewać CTCs o różnym fenotypie. Jednak wszystkie te obserwacje wymagają weryfikacji w większych kohortach badawczych.

Analizy wyników morfologii krwi chorych, pobranej przed leczeniem, nie wykazały korelacji liczby cAFs ani CTCs z liczbą żadnej z frakcji leukocytów, co wskazuje, że wykryte w niniejszej pracy różne populacje krążących komórek, a zwłaszcza negatywne CTCs, które ze względu na brak markerów mogły być zaklasyfikowane jako komórki krwi, nie są żadną frakcją leukocytów. Nie wykazano też korelacji liczby CTCs i cAFs z czasem między oddaniem próbki a jej przetwarzaniem, co wskazuje, że próbki przetwarzane nawet po dłuższym czasie od pobrania (maksymalnie 1488 minut) mogą być nadal analizowane bez wpływu na wiarygodność wyników a wykryte populacje są rzeczywistym efektem, a nie efektem technicznym.

Do tej pory tylko kilka badań oceniało przydatność systemu wykorzystującego cytometr przepływowy z funkcją obrazowania do wykrywania CTCs<sup>128-132</sup> i tylko jedno zostało zastosowane u chorych z rakiem piersi, jednak w małej liczbie przypadków (n=8)<sup>133</sup>. Zatem przedstawiona praca jest pierwszą, w której wykorzystano imFC do detekcji cCAFs i CTCs na stosunkowo dużej populacji chorych, gdzie skupiono się na wieloparametrowej analizie tych nielicznie występujących komórek. Warto zauważyć, że dzięki wysokiej rozdzielczości imFC, w porównaniu z CellSearch, można było nie tylko zdefiniować cCAFs i CTCs, ale także zbadać ich szczegóły morfologiczne, co w przyszłości może nawet podnieść kryteria identyfikacji cCAFs czy CTCs<sup>134</sup>.

Pomimo względnie dużej liczby chorych, zaklasyfikowanych do przedstawionego w niniejszej pracy badania nad detekcją cCAFs i CTCs (n=210), grupa cechowała się dużą heterogennością w stopniu zaawansowania nowotworu, podtypach molekularnych czy zastosowanym leczeniu. W związku z tym liczebności w poszczególnych grupach były małe i nie zawsze pozwalały na uzyskanie wyników istotnych statystycznie. Dodatkowo chore zostały włączone do badania względnie niedawno (lata 2019-2022), czego konsekwencją jest brak danych dotyczących przeżycia, co uniemożliwiało analizę przeżycia. Dodanie tej informacji niewątpliwie zwiększyłoby wartość kliniczną niniejszej pracy. Warto jednak wspomnieć, że te badania są nadal kontynuowane w zespole i planowane jest zebranie jeszcze większej grupy chorych oraz analizy przeżycia w przyszłości.

## 10 Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było pogłębienie zrozumienia biologicznego i klinicznego znaczenia fibroblastów związanych z nowotworem w raku piersi. Badania obejmowały analizę materiału klinicznego z guzów pierwotnych, izolację, charakterystykę i wpływ CAFs pochodzących z guzów pierwotnych raka piersi na biologiczne procesy zachodzące w guzie oraz opracowanie metody jednoczesnej detekcji cCAFs i CTCs i zbadanie jej klinicznego zastosowania.

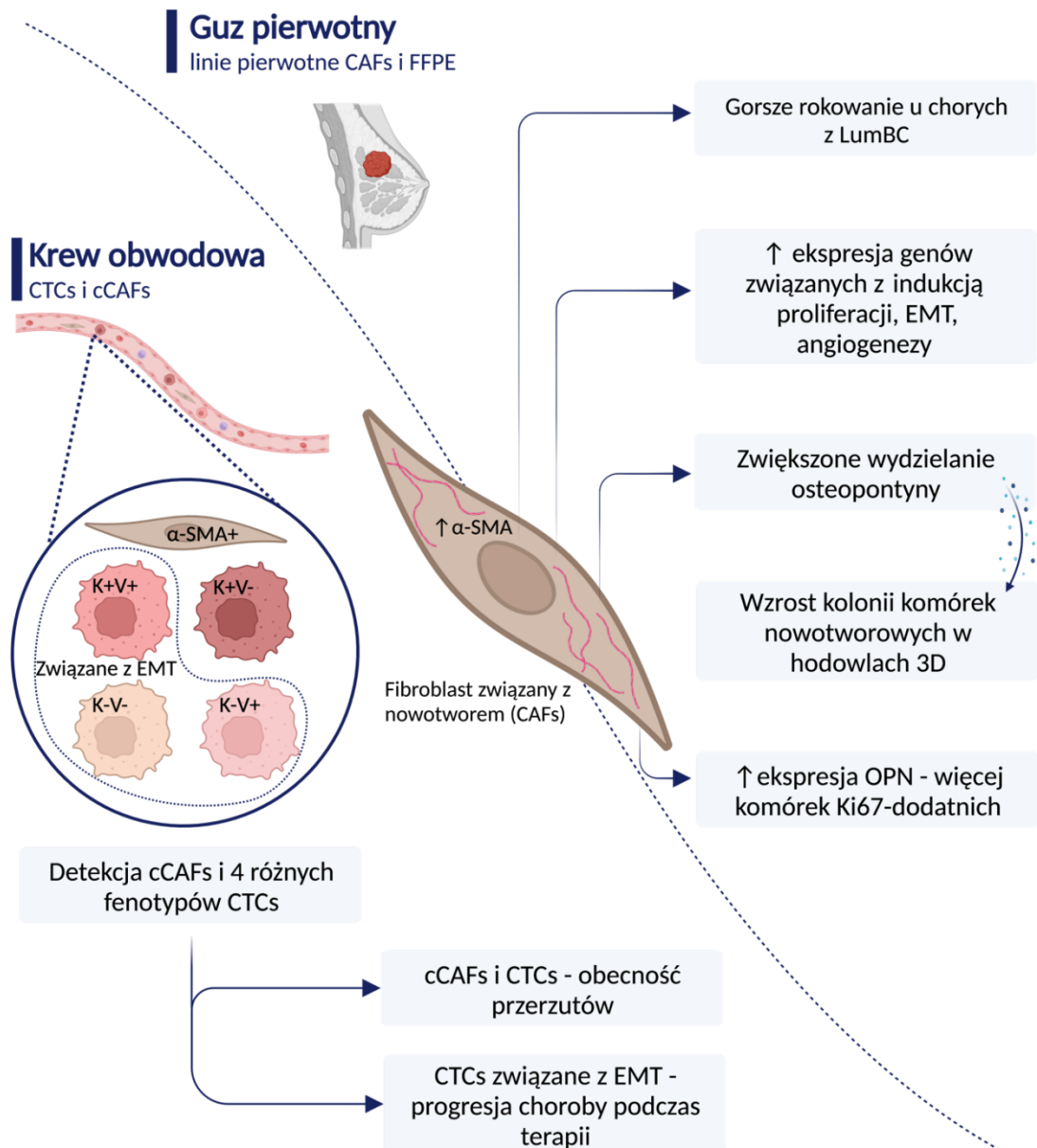
Nawiązując do pierwszego celu szczegółowego, scharakteryzowano dwie populacje CAFs, pod względem ekspresji białka  $\alpha$ -SMA i zidentyfikowano podwyższoną ekspresję genów związanych z indukcją proliferacji, EMT czy angiogenezy w CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>. Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu osteopontyny w próbkach klinicznych i w liniach pierwotnych CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> oraz zwiększone wydzielanie produktu tego genu w hodowlach CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup>.

Podczas realizacji drugiego celu szczegółowego analizy przeżycia chorych z CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> wykazały korelacje z gorszym rokowaniem u tych chorych. Ponadto w badaniach *in vitro* CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> stymulowały wzrost komórek nowotworowych a proces ten był hamowany przez przeciwciała neutralizujące osteopontynę.

Badania skierowane na wykonanie trzeciego i czwartego celu szczegółowego, czyli opracowanie metody do jednoczesnej detekcji cCAFs i różnych fenotypów CTCs wykazały skuteczność zastosowania cytometru przepływowego z funkcją obrazowania do tego celu. Wykryte cCAFs i CTCs korelowały z obecnością przerzutów, natomiast CTCs o fenotypie związanym z EMT występowały zwykle u chorych z progresją choroby podczas terapii.

Podsumowując, wykazano, że CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> korelują z gorszym rokowaniem w luminalnym raku piersi i mogą być związane z bardziej agresywnym fenotypem komórek raka piersi. Wydzielanie OPN przez te komórki może być jednym z mechanizmów wyjaśniających to zjawisko. Dodatkowo pokazano pierwsze badanie wykazujące zdolność imFC do współwykrywania cCAFs i CTCs we krwi obwodowej pobranej od chorych z rakiem piersi. cCAFs, współwykrywane z CTCs o różnym fenotypie, mogą wskazywać na bardziej zaawansowaną chorobę, co zasługuje na dalsze badania w większych kohortach chorych.





**Rycina 20.** Graficzne podsumowanie wyników ujętych w rozprawie doktorskiej. CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> oznaczone w guzie pierwotnym na materiale FFPE korelują z gorszym rokowaniem w luminalnym raku piersi oraz charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów związanych z indukcją proliferacji, EMT i angiogenezy. Wyizolowane z guzów pierwotnych linie komórkowe CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>high</sup> wykazują zwiększone wydzielanie osteopontyny w porównaniu do CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>low</sup>, która powoduje wzrost kolonii komórek w hodowlach 3D. Wyższa ekspresja osteopontyny w CAFs w próbkach guza pierwotnego koreluje z większą liczbą komórek nowotworowych Ki67-dodatnich. We krwi obwodowej chorych z rakiem piersi zidentyfikowano cCAFs oraz cztery fenotypy CTCs: epitelialny (K+V-), oraz związane z EMT: epitelialno-mezenchymalny (K+V+), mezenchymalny (K-V+) i negatywny (K-V-). cCAFs i CTCs korelują z obecnością przerzutów, natomiast CTCs o fenotypie związanym z EMT korelują z progresją choroby podczas terapii.

## 11 Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
2. Yabroff KR, Wu X-C, Negoita S, Stevens J, Coyle L, Zhao J, Mumphrey BJ, Jemal A, Ward KC. Association of the COVID-19 Pandemic With Patterns of Statewide Cancer Services. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2022;114:907–9.
3. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73:17–48.
4. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M, Didkowska JA. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. *Kraj Rejestr Nowotworów 2022*;
5. Cancer Today [Internet]. [cited 2023 May 5]; Available from: <https://gco.iarc.fr/>
6. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61–70.
7. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn H-J, Albain KS, André F, Bergh J, Bonnefoi H, Bretel-Morales D, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206–23.
8. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:494–506.
9. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, Viale G, Sotiriou C, Piccart M. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J Clin Oncol* 2014;32:2794–803.
10. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *The Lancet* 2017;389:2415–29.
11. Foulkes WD, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938–48.
12. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 2012;23:vi7–12.
13. Bou Zerdan M, Ghorayeb T, Saliba F, Allam S, Bou Zerdan M, Yaghi M, Bilani N, Jaafar R, Nahleh Z. Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and

Treatment in 2021. *Cancers* 2022;14:1253.

14. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol* 2012;21:172–7.
15. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21:309–22.
16. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:5591–6.
17. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19:1423–37.
18. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010;316:1324–31.
19. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 2011;17:320–9.
20. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* 2005;121:335–48.
21. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013;14:1014–22.
22. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gaborilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018;24:541–50.
23. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 2019;79:4557–66.
24. Klemm F, Joyce JA. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol* 2015;25:198–213.
25. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:582–98.
26. Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;99:186–96.
27. Desmouliere A, Darby IA, Laverdet B, Bonté F. Fibroblasts and myofibroblasts in

wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014;301.

28. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med* 2014;211:1503–23.
29. Arina A, Idel C, Hyjek EM, Alegre M-L, Wang Y, Bindokas VP, Weichselbaum RR, Schreiber H. Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:7551–6.
30. Zhang X, Zhang L, Tan X, Lin Y, Han X, Wang H, Ming H, Li Q, Liu K, Feng G. Systematic analysis of genes involved in oral cancer metastasis to lymph nodes. *Cell Mol Biol Lett* 2018;23:53.
31. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, Dray C, Guet R, Maridonneau-Parini I, Le Gonidec S, Couderc B, Escourrou G, et al. Adipocyte-Derived Fibroblasts Promote Tumor Progression and Contribute to the Desmoplastic Reaction in Breast Cancer. *Cancer Res* 2013;73:5657–68.
32. Bartoschek M, Oskolkov N, Bocci M, Lötvrot J, Larsson C, Sommarin M, Madsen CD, Lindgren D, Pekar G, Karlsson G, Ringnér M, Bergh J, et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat Commun* 2018;9:5150.
33. Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002;440:298–303.
34. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, Baik GH, Shibata W, DiPrete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, et al. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* 2011;19:257–72.
35. Direkze NC, HodiVala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone Marrow Contribution to Tumor-Associated Myofibroblasts and Fibroblasts. *Cancer Res* 2004;64:8492–5.
36. Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumura C, Okuhara Y, Magae J, Emura M, Ochiya T, et al. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:232–40.
37. Lee YT, Tan YJ, Falasca M, Oon CE. Cancer-Associated Fibroblasts: Epigenetic

- Regulation and Therapeutic Intervention in Breast Cancer. *Cancers* 2020;12:2949.
38. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T, Hynes RO, Jain RK, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 2020;20:174–86.
  39. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res* 2012;10:1403–18.
  40. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9–34.
  41. Carey SP, Kraning-Rush CM, Williams RM, Reinhart-King CA. Biophysical control of invasive tumor cell behavior by extracellular matrix microarchitecture. *Biomaterials* 2012;33:4157–65.
  42. Calon A, Tauriello DVF, Batlle E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2014;25:15–22.
  43. Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, Huang R, Yan J, Guo H. TGFβ1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep* 2015;5:11924.
  44. De Wever O, Nguyen Q, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 2004;18:1016–8.
  45. Jedezsko C, Victor BC, Podgorski I, Sloane BF. Fibroblast Hepatocyte Growth Factor Promotes Invasion of Human Mammary Ductal Carcinoma *In situ*. *Cancer Res* 2009;69:9148–55.
  46. Tyan S-W, Kuo W-H, Huang C-K, Pan C-C, Shew J-Y, Chang K-J, Lee EY-HP, Lee W-H. Breast Cancer Cells Induce Cancer-Associated Fibroblasts to Secrete Hepatocyte Growth Factor to Enhance Breast Tumorigenesis. *PLoS ONE* 2011;6:e15313.
  47. Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I. Cancer Associated Fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;437:397–402.
  48. Erez N, Truitt M, Olson P, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-κB-

Dependent Manner. *Cancer Cell* 2010;17:135–47.

49. Maxwell PJ, Neisen J, Messenger J, Waugh DJJ. Tumor-derived CXCL8 signaling augments stroma-derived CCL2-promoted proliferation and CXCL12-mediated invasion of PTEN-deficient prostate cancer cells. *Oncotarget* 2014;5:4895–908.

50. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* 2009;139:891–906.

51. Chirivì M, Maiullari F, Milan M, Presutti D, Cordiglieri C, Crosti M, Sarnicola ML, Soluri A, Volpi M, Świążkowski W, Prati D, Rizzi M, et al. Tumor Extracellular Matrix Stiffness Promptly Modulates the Phenotype and Gene Expression of Infiltrating T Lymphocytes. *Int J Mol Sci* 2021;22:5862.

52. Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W. Clinicopathological Significance of Stromal Myofibroblasts in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Tumor Biol* 2004;25:290–5.

53. Toullec A, Gerald D, Despouy G, Bourachot B, Cardon M, Lefort S, Richardson M, Rigaiil G, Parrini M, Lucchesi C, Bellanger D, Stern M, et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med* 2010;2:211–30.

54. Benyahia Z, Dussault N, Cayol M, Sigaud R, Berenguer-Daizé C, Delfino C, Tounsi A, Garcia S, Martin P-M, Mabrouk K, Ouafik L. Stromal fibroblasts present in breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through adrenomedullin secretion. *Oncotarget* 2017;8:15744–62.

55. Patel AK, Vipparthi K, Thatikonda V, Arun I, Bhattacharjee S, Sharan R, Arun P, Singh S. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis* 2018;7:78.

56. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–54.

57. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21–45.

58. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer* 2015;1:44–52.

59. Matikas A, Kotsakis A, Apostolaki S, Politaki H, Perraki M, Kalbakis K, Nikolaou M,

- Economopoulou P, Hatzidaki D, Georgoulas V. Detection of circulating tumour cells before and following adjuvant chemotherapy and long-term prognosis of early breast cancer. *Br J Cancer* 2022;126:1563–9.
60. Cristofanilli M, Stopeck A, Reuben JM. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2004;
61. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, Ogden IM, Catalona W, Chumsri S, Tang C-M, Cristofanilli M. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:3514–9.
62. Lin PP. Aneuploid Circulating Tumor-Derived Endothelial Cell (CTEC): A Novel Versatile Player in Tumor Neovascularization and Cancer Metastasis. *Cells* 2020;9:1539.
63. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, Parajuli R, Miller PC, Rawal S, Williams AJ, Cote RJ, Lippman ME, Datar RH, El-Ashry D. Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* 2015;75:4681–7.
64. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, Snuderl M, Steller EJA, Fukumura D, Jain RK. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:21677–82.
65. Jones ML, Siddiqui J, Pienta KJ, Getzenberg RH. Circulating fibroblast-like cells in men with metastatic prostate cancer. *The Prostate* 2013;73:176–81.
66. Sharma U, Medina-Saenz K, Miller PC, Troness B, Spartz A, Sandoval-Leon A, Parke DN, Seagroves TN, Lippman ME, El-Ashry D. Heterotypic clustering of circulating tumor cells and circulating cancer-associated fibroblasts facilitates breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2021;189:63–80.
67. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:409–24.
68. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov* 2021;11:858–73.
69. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells* 2020;9:1836.
70. Ohnaga T, Takei Y, Nagata T, Shimada Y. Highly efficient capture of cancer cells expressing EGFR by microfluidic methods based on antigen-antibody association. *Sci Rep*

2018;8:12005.

71. Santana SM, Liu H, Bander NH, Gleghorn JP, Kirby BJ. Immunocapture of prostate cancer cells with anti-PSMA antibodies in microdevices [Internet]. In: 2011 IEEE 37th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC). Troy, NY, USA: IEEE, 2011 [cited 2023 May 26]. 1–2. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5778604/>
72. Hyun K-A, Lee TY, Lee SH, Jung H-I. Two-stage microfluidic chip for selective isolation of circulating tumor cells (CTCs). *Biosens Bioelectron* 2015;67:86–92.
73. Sun N, Li X, Wang Z, Li Y, Pei R. High-purity capture of CTCs based on micro-beads enhanced isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) method. *Biosens Bioelectron* 2018;102:157–63.
74. Gascoyne P, Shim S. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. *Cancers* 2014;6:545–79.
75. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med* 2017;95:133–42.
76. Riethdorf S, O’Flaherty L, Hille C, Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;125:102–21.
77. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol* 2016;10:395–407.
78. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki E, Voutsina A, Psyrris A, Georgoulas V, Lianidou E. *ESR1* Methylation: A Liquid Biopsy–Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res* 2018;24:1500–10.
79. Soler A, Cayrefourcq L, Mazel M, Alix-Panabières C. EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay [Internet]. In: M. Magbanua MJ, W. Park J, eds. *Circulating Tumor Cells*. New York, NY: Springer New York, 2017 [cited 2023 May 26]. 263–76. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7144-2\\_22](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7144-2_22)
80. Agarwal A, Balic M, El-Ashry D, Cote RJ. Circulating Tumor Cells: Strategies for Capture, Analyses, and Propagation. *Cancer J* 2018;24:70–7.
81. Jiang R, Agrawal S, Aghaamoo M, Parajuli R, Agrawal A, Lee AP. Rapid isolation of circulating cancer associated fibroblasts by acoustic microstreaming for assessing metastatic propensity of breast cancer patients. *Lab Chip* 2021;21:875–87.



82. Ortiz-Otero N, Marshall JR, Lash B, King MR. Chemotherapy-induced release of circulating-tumor cells into the bloodstream in collective migration units with cancer-associated fibroblasts in metastatic cancer patients. *BMC Cancer* 2020;20:873.
83. Topa J, Grešner P, Żaczek AJ, Markiewicz A. Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features—an unreachable target? *Cell Mol Life Sci* 2022;79:81.
84. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:673–87.
85. Muchlińska A, Smentoch J, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry—A Perspective Study. *Cancers* 2022;14:4178.
86. Markiewicz A, Książkiewicz M, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Seroczyńska B, Skokowski J, Szade J, Żaczek AJ. Mesenchymal Phenotype of CTC-Enriched Blood Fraction and Lymph Node Metastasis Formation Potential. *PLoS ONE* 2014;9:e93901.
87. Popeda M, Stokowy T, Bednarz-Knoll N, Jurek A, Niemira M, Bielska A, Kretowski A, Kalinowski L, Szade J, Markiewicz A, Zaczek AJ. NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer. *Cancers* 2019;11:1961.
88. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006;25:2273–84.
89. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* 2012;19:170–6.
90. Hu G, Xu F, Zhong K, Wang S, Huang L, Chen W. Activated Tumor-infiltrating Fibroblasts Predict Worse Prognosis in Breast Cancer Patients. *J Cancer* 2018;9:3736–42.
91. Zhou J, Wang X-H, Zhao Y-X, Chen C, Xu X-Y, sun Q, Wu H-Y, Chen M, Sang J-F, Su L, Tang X-Q, Shi X-B, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Correlate with Tumor-Associated Macrophages Infiltration and Lymphatic Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Patients. *J Cancer* 2018;9:4635–41.
92. Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G, Oertli D, Viehl CT, Obermann EC, Gillanders WE. EpCAM expression varies significantly and is differentially

associated with prognosis in the luminal B HER2+, basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *Br J Cancer* 2013;108:1480–7.

93. Eberlein C, Rooney C, Ross SJ, Farren M, Weir HM, Barry ST. E-Cadherin and EpCAM expression by NSCLC tumour cells associate with normal fibroblast activation through a pathway initiated by integrin  $\alpha v \beta 6$  and maintained through TGF $\beta$  signalling. *Oncogene* 2015;34:704–16.

94. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:178–96.

95. Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *Br J Cancer* 2014;110:724–32.

96. Gao J, Yan Q, Wang J, Liu S, Yang X. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by TGF- $\beta$ 1 Is Mediated by AP1-Dependent EpCAM Expression in MCF-7 Cells: EpCAM INVOLVED IN EMT. *J Cell Physiol* 2015;230:775–82.

97. Belhabib I, Zaghdoudi S, Lac C, Bousquet C, Jean C. Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? *Cancers* 2021;13:3466.

98. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med [Internet]* 2020 [cited 2023 May 16]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8454>

99. Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735–41.

100. Lorgier M, Lee H, Forsyth JS, Felding-Habermann B. Comparison of in vitro and in vivo approaches to studying brain colonization by breast cancer cells. *J Neurooncol* 2011;104:689–96.

101. Hum NR, Sebastian A, Gilmore SF, He W, Martin KA, Hinckley A, Dubbin KR, Moya ML, Wheeler EK, Coleman MA, Loots GG. Comparative Molecular Analysis of Cancer Behavior Cultured In Vitro, In Vivo, and Ex Vivo. *Cancers* 2020;12:690.

102. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, Gullane P, Irish J, Jurisica I, Kamel-Reid S. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC Biotechnol* 2011;11:46.

103. Northcott PA, Shih DJH, Remke M, Cho Y-J, Kool M, Hawkins C, Eberhart CG, Dubuc

- A, Guettouche T, Cardentey Y, Bouffet E, Pomeroy SL, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol (Berl)* 2012;123:615–26.
104. Bondar G, Xu W, Elashoff D, Li X, Faure-Kumar E, Bao T-M, Grogan T, Moose J, Deng MC. Comparing NGS and NanoString platforms in peripheral blood mononuclear cell transcriptome profiling for advanced heart failure biomarker development. *J Biol Methods* 2020;7:e123.
105. Zhang W, Petegrosso R, Chang J-W, Sun J, Yong J, Chien J, Kuang R. A large-scale comparative study of isoform expressions measured on four platforms. *BMC Genomics* 2020;21:272.
106. Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies. *Clin Cancer Res* 2004;10:184–90.
107. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004;90:1877–81.
108. Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *Int J Mol Med* 2017;39:1327–37.
109. Zhao H, Chen Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, Eguchi S, Gu J, Ma D. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis* 2018;9:356.
110. Weber CE, Kothari AN, Wai PY, Li NY, Driver J, Zapf MAC, Franzen CA, Gupta GN, Osipo C, Zlobin A, Syn WK, Zhang J, et al. Osteopontin mediates an MZF1–TGF- $\beta$ 1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene* 2015;34:4821–33.
111. Sharon Y, Raz Y, Cohen N, Ben-Shmuel A, Schwartz H, Geiger T, Erez N. Tumor-Derived Osteopontin Reprograms Normal Mammary Fibroblasts to Promote Inflammation and Tumor Growth in Breast Cancer. *Cancer Res* 2015;75:963–73.
112. Xu BJ, Yan W, Jovanovic B, Shaw AK, An QA, Eng J, Chytil A, Link AJ, Moses HL. Microdialysis Combined with Proteomics for Protein Identification in Breast Tumor Microenvironment In Vivo. *Cancer Microenviron* 2011;4:61–71.
113. Luo X, Ruhland MK, Pazolli E, Lind AC, Stewart SA. Osteopontin Stimulates Preneoplastic Cellular Proliferation Through Activation of the MAPK Pathway. *Mol Cancer Res* 2011;9:1018–29.

114. Patteson AE, Pogoda K, Byfield FJ, Mandal K, Ostrowska-Podhorodecka Z, Charrier EE, Galie PA, Deptuła P, Bucki R, McCulloch CA, Janmey PA. Loss of Vimentin Enhances Cell Motility through Small Confining Spaces. *Small* 2019;15:1903180.
115. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 2015;6:15966–83.
116. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin Enhances Cell Elastic Behavior and Protects against Compressive Stress. *Biophys J* 2014;107:314–23.
117. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, Sirven P, Magagna I, Fuhrmann L, Bernard C, Bonneau C, Kondratova M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 2018;33:463-479.e10.
118. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga J-Y, Taran F-A, Fehm T, Hall C, de Groot MR, Bidard F-C, Friedl TWP, Fasching PA, Brucker SY, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:2583–93.
119. Pierga J-Y, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Diéras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C, Bidard F-C. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2012;23:618–24.
120. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TWP, Lorenz R, Tesch H, Fasching PA, Fehm T, Schneeweiss A, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival in Early Average-to-High Risk Breast Cancer Patients. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2014;106.
121. Strati A, Zavridou M, Kallergi G, Politaki E, Kuske A, Gorges TM, Riethdorf S, Joosse SA, Koch C, Bohnen A-L, Mueller V, Koutsodontis G, et al. A Comprehensive Molecular Analysis of in Vivo Isolated EpCAM-Positive Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Clin Chem* 2021;67:1395–405.
122. Markiewicz A, Żaczek AJ. The Landscape of Circulating Tumor Cell Research in the Context of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Pathobiology* 2017;84:264–83.
123. Papadaki MA, Kallergi G, Zafeiriou Z, Manouras L, Theodoropoulos PA, Mavroudis

- D, Georgoulas V, Agelaki S. Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2014;14:651.
124. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, Krol I, Gkountela S, Landin J, Scheidmann MC, Donato C, Scherrer R, Singer J, Beisel C, Kurzeder C, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature* 2019;566:553–7.
125. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* 2014;158:1110–22.
126. Markiewicz A, Topa J, Popęda M, Szade J, Skokowski J, Weñicka-Jaśkiewicz M, Żaczek A. Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression – the impact of molecular subtype and stromal composition. *Acta Biochim Pol [Internet]* 2021 [cited 2023 May 29]; Available from: <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/5719>
127. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 2014;6:1279–93.
128. López-Riquelme N, Minguela A, Villar-Permuoy F, Ciprian D, Castillejo A, Álvarez-López M-R, Soto J-L. Imaging cytometry for counting circulating tumor cells: comparative analysis of the CellSearch vs ImageStream systems. *APMIS* 2013;121:1139–43.
129. Mourtzikou A, Stamouli M, Karakitsos P, Athanasas A. Colorectal Cancer CTCs Detection Using Two FCM Protocol Approaches. *Clin Lab* 2019;65(6).
130. Merugu S, Chen L, Gavens E, Gabra H, Brougham M, Makin G, Ng A, Murphy D, Gabriel AS, Robinson ML, Wright JH, Burchill SA, et al. Detection of Circulating and Disseminated Neuroblastoma Cells Using the ImageStream Flow Cytometer for Use as Predictive and Pharmacodynamic Biomarkers. *Clin Cancer Res* 2020;26:122–34.
131. Carter TJ, Jeyaneethi J, Kumar J, Karteris E, Glynn-Jones R, Hall M. Identification of Cancer-Associated Circulating Cells in Anal Cancer Patients. *Cancers* 2020;12:2229.
132. Semaan A, Bernard V, Kim DU, Lee JJ, Huang J, Kamyabi N, Stephens BM, Qiao W, Varadhachary GR, Katz MH, Shen Y, San Lucas FA, et al. Characterisation of circulating tumour cell phenotypes identifies a partial-EMT sub-population for clinical stratification of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2021;124:1970–7.

133. Staudte S, Klinghammer K, Jurmeister PS, Jank P, Blohmer J-U, Liebs S, Rhein P, Hauser AE, Tinhofer I. Multiparametric Phenotyping of Circulating Tumor Cells for Analysis of Therapeutic Targets, Oncogenic Signaling Pathways and DNA Repair Markers. *Cancers* 2022;14:2810.
134. Ligthart ST, Coumans FAW, Bidard F-C, Simkens LHJ, Punt CJA, de Groot MR, Attard G, de Bono JS, Pierga J-Y, Terstappen LWMM. Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. *PLoS ONE* 2013;8:e67148.