

Linee guida in medicina molecolare e prevenzione oncologica

S. Martinotti^{a,b}, M.B. Di Sciascio^a, E. Ricevuto^b, A. Rulli^a, E. Toniato^b

^aLaboratorio di Patologia Clinica, P.O. SS Annunziata, Università "D'Annunzio", Chieti

^bSezione di Patologia Molecolare, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi, L'Aquila

Introduzione

Il "cancro" come malattia genetica è un concetto che ricorre da tempo nell'inquadramento etio-patogenetico di questa patologia. Tuttavia fino a 20 o 30 anni fa si riteneva che soltanto il 5% di tutte le neoplasie avessero una componente genetica. Oggi dietro lo stimolo dei recenti progressi della medicina molecolare applicata allo studio della patogenesi dei tumori, la genetica del cancro è diventata una parte fondamentale nella gestione e cura del paziente oncologico. Questa *review* affronterà gli aspetti più importanti della genetica oncologica illustrando le principali sindromi di predisposizione tumorale, il ruolo dei geni che sono alla base del meccanismo d'induzione e progressione della malattia, le tecnologie biomolecolari avanzate utilizzate per la diagnosi delle micro e macro lesioni genomiche e soprattutto il ruolo che il consultorio genetico-oncologico (Genetic Counseling) sta avendo nella prevenzione delle sindromi oncologiche ereditarie.

Usare un campione di sangue per estrarre del DNA da sottoporre all'analisi molecolare e determinare il fattore di rischio di contrarre una neoplasia: questa è la base dell'applicazione diagnostico-clinica nella genetica dei tumori. Negli ultimi anni si è assistito a un enorme sviluppo della biologia molecolare con particolare riferimento alla scoperta e caratterizzazione di geni o complessi multigenici che sono alla base dell'insorgenza di certe sindromi tumorali a predisposizione familiare. Questi geni ereditati come lesioni eterozigote *germ-line* nei soggetti portatori del rischio possono essere diagnosticati già in fase pre-natale. Tecnicamente ogni alterazione genica può essere diagnosticata partendo dal DNA estratto da un campione di leucociti circolanti, in ogni momento della nostra esistenza e condizione fisica. Come ogni test diagnostico, anche in medicina molecolare l'esame deve soddisfare i seguenti criteri: 1) deve essere un test semplice da eseguire e altamente riproducibile; 2) deve saper calcolare il rischio di insorgenza di una neoplasia potenzialmente letale, la cui dia-

gnosi precoce influenza il tempo medio di sopravvivenza o l'efficacia della cura; 3) deve essere specifica e sensibile; 4) il risultato deve orientare in senso clinico.

L'intervento del medico deve essere, pertanto, un intervento preventivo a salvaguardia dello stato di salute della persona a rischio, attuato attraverso una serie di controlli clinici e test poco invasivi.

L'utilizzo della medicina preventiva al servizio non del malato, ma del "paziente" sano votato al rischio di malattia introduce anche un criterio di gestione collegiale della persona in cui l'aspetto psicologico gioca un ruolo essenziale, forse un ruolo centrale. La psicologia in medicina diventa uno degli aspetti clinici che permette il buon uso clinico della patologia ai fini del miglioramento della qualità di vita e dello stato psico-fisico del paziente.

Classificazione e sistematica delle sindromi onco-genetiche

Secondo un criterio di classificazione largamente accettato, le sindromi genetico-oncologiche a predisposizione familiare possono essere suddivise in tre categorie:

- la prima include sindromi associate a geni la cui alterazione determina nel 100% dei casi il carattere patognomonico della malattia; pertanto questi test genetici rappresentano lo standard dell'applicazione diagnostico-clinica (Tab. I);
- la seconda categoria racchiude sindromi a patogenesi più complessa, ma in cui nella maggior parte dei casi l'alterazione di uno o più geni è di chiaro aiuto per la diagnosi di predisposizione e consente un calcolo abbastanza preciso del rischio di contrazione (Tab. II);
- la terza categoria include invece sindromi in cui l'analisi delle lesioni geniche è ancora nella fase di sperimentazione e il cui significato patogenetico è ancora incerto e non del tutto caratterizzato dal punto di vista clinico (Tab. III).

Tabella I. Sindromi per le quali il test molecolare rappresenta una metodologia standard di significato diagnostico-clinico.

Sindrome	Incidenza	Gene responsabile	Frequenza di mutazione
MEN 2	1/500.000	RET	≥ 92%
VHL	1/36.000	VHL	≥ 95%
FAP	1/10.000	APC	80-90%
MEN1	1/100.000	MEN1	75-85%
RB	1/14.000	RB1	≥ 95%

Tabella II. Sindromi per le quali il test molecolare rappresenta un indice di calcolo di rischio per quella patologia.

Sindrome	Incidenza	Gene responsabile	Frequenza di mutazione
Breast/ovarian cancer syndrome	1/4000	BRCA1 BRCA2	15-45% 11-45%
Cowden syndrome	1/250.000	PTEN	80%
Li-Fraumeni syndrome	1/500.000	P53 CHK2	70-75%
HNPCC	1/1000	MSH2 MLH1, PMS6, MSH6	50-80%
Peutz-Jeghers syndrome	1/200.000	LKB1	50-70%

Tabella III. Sindromi per le quali il test genetico è ancora nella fase di sperimentazione.

Sindrome	Incidenza	Gene responsabile	Frequenza di mutazione
Melanoma	1/5000	P16 CDK4	
Gastric Carcinoma	1/20.000	CDH1	30-50%
Nevoid basal cell carcinoma	1/56.000	PTC	50-60%

Di seguito, tralasciando le sindromi di tipo 3, affronteremo i casi clinici e le sindromi genetico-oncologiche più importanti con particolare riferimento alla sindrome di predisposizione del tumore dell'ovaio e della mammella.

Sindromi di tipo 1

L'aspetto clinico

Nella classificazione delle patologie tumorali a predisposizione familiare in cui la lesione genica è di fatto patognomonica del quadro clinico annoveriamo la sindrome MEN 1 e 2 (da Mendelian Inherited in Man), la malattia di Van Hippel Landau (VHL), la Poliposi Familiare (FAP).

MEN 1 e 2. Sono patologie autosomiche dominanti. Hanno poco in comune se non la nomenclatura e l'iperparatiroidismo come tratto comune. La MEN 2 è stata caratterizzata per prima e le conoscenze cliniche e genetiche al riguardo sono di gran lunga superiori rispetto alla MEN 1. La MEN 2 è caratterizzata dall'insorgenza di carcinoma midollare della tiroide (MTC), feocromocitoma e iperparatiroidismo. Sebbene il MTC rappresenti il 15% circa di tutti i tumori della tiroide, la MEN 2 si manifesta nel 25% dei casi di carcinomi midollari. A sua volta la MEN 2 si distingue in due sottoforme: la MEN 2A caratterizzata nel 99% dai carcinomi midollari, nel 50% dai feocromocitomi e nel 15-30% dei restanti casi dall'iperparatiroidismo; la MEN 2B meno comune e caratterizzata soltanto da MTC e feocromocitoma. Come la maggior parte, se non tutte, delle sindromi genetico-oncologiche, anche i tumori di tipo MEN 1 e 2 hanno una componente multifocale, con coinvolgimento bila-

terale degli organi interessati. La comparsa di lesioni bilaterali può essere concomitante o insorgente a distanza di tempo. Generalmente, la prima manifestazione è rappresentata dal carcinoma midollare della tiroide e quasi mai il primo segno di patologia si manifesta con il feocromocitoma o l'iperparatiroidismo.

VHL. Gli aspetti clinici sono ricollegabili al carcinoma a cellule chiare del rene (RCC) e all'associazione di questo con il feocromocitoma e l'emangioblastoma. I criteri clinici diagnostici richiedono la presenza di un emangioblastoma retinico o cerebellare, del RCC o del feocromocitoma se c'è una storia familiare di emangioblastoma retinico o a danno del sistema nervoso centrale. Alternativamente, in assenza di storia familiare, due manifestazioni sono necessarie, per esempio due emangioblastomi o un emangioblastoma in associazione a un fenomeno viscerale. La VHL presenta sia dipendenza dall'età che una assoluta penetranza tumore-specifica. Il rischio totale di contrarre un emangioblastoma e un RCC è superiore al 70% per ciascun tumore. Un emangioblastoma retinico è spesso il primo segno di insorgenza e la maggior parte di questi tumori sono diagnosticati tra i 10 e i 30 anni.

FAP. La patologia è caratterizzata dal rapido diffondersi di zone multifocali altamente poliposiche che interessano tutto il colon. La sindrome è rara nel senso che rappresenta solo l'1% di tutti i casi di tumore del colon. Tuttavia la quasi totalità di pazienti con FAP svilupperà un cancro del colon entro i 40 anni se non si sottoporrà a colectomia profilattica. La poliposi adenomatosa può svilupparsi anche nel tratto gastrointestinale e può portare ad un aumentato rischio (5-8%) di cancro duodenale. Individui con la FAP hanno anche un aumentato rischio durante l'adolescenza di contrarre l'epatoblastoma, il medulloblastoma e il carci-

noma papillare della tiroide. Infine sono da ricollegare alla sindrome FAP gli osteomi della mandibola, l'ipertrofia congenita dell'epitelio pigmentato della retina, le cisti epidermoidi (generalmente a livello del cuoio capelluto) e la presenza di insorgenze dentali supranumerarie. Non è infrequente la presenza di tumori desmoidi soprattutto a carico del sesso femminile che in questo caso rappresentano la causa ultima di mortalità. Tuttavia c'è un alto indice di eterogeneità in questa sindrome che colpisce individui nell'ambito dello stesso ceppo familiare tale spesso da complicare il quadro clinico e confondere i tratti patognomonic della patologia.

L'aspetto genetico

MEN 1 e 2. Dal punto di vista genetico, la MEN è una malattia autosomica dominante con penetranza età-associata. Studi di follow-up hanno dimostrato che circa il 65% degli individui anziani affetti da questa malattia sviluppano tumori. L'agente etiologico responsabile di questa sindrome familiare è stato individuato nel protooncogene RET, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 10 (10q11.2). L'analisi epidemiologica ha evidenziato che oltre il 95% degli individui affetti da MEN portano mutazioni *germ-line* a danno di questo gene considerato un marker clinico-diagnostico della malattia. Nella forma MEN 2B la mutazione predominante a danno del *locus* (95%) è una *point mutation* a livello dell'esone 16, M918T; mentre il restante 5% colpisce l'esone 15, A883F. L'alterazione determina una deficienza funzionale del *domain* extracellulare tirosinchinasico con alterazione del *pathway* trasduzionale all'interno della cellula. La variante clinica del feocromocitoma presenta un pattern mutazionale simile alla MEN 2A con alcune eccezioni date da mutazioni a livello del codone 768 e 804.

La MEN 1, nonostante il nome, rappresenta una sindrome autosomica dominante in cui il gene coinvolto, la Menin, mappa sul cromosoma 11, in posizione 11q13. Il gene codifica per una proteina, repressore di JUN D, un fattore trascrizionale coinvolto nella trasduzione del segnale di stimoli proliferativi. A differenza di MEN 2, le mutazioni riscontrate su Menin assommano a oltre 260. Benchè clusterizzate intorno all'esone 10, il test presenta difficoltà notevoli di esecuzione ed è eseguibile in strutture altamente specialistiche.

VHL. È una malattia autosomica dominante, causata da mutazioni *germ-line* nel gene oncosoppressore VHL, localizzato nel braccio corto del cromosoma 3, in posizione 3p25. L'analisi molecolare *germ-line* sui pazienti ha dimostrato la presenza di microlesioni intrageniche ed ampie delezioni lungo il *locus* genico, stabilendo per VHL un coinvolgimento del 100% nella etio-patogenesi della malattia. Analisi genotipiche e fenotipiche hanno dimostrato che la presenza di mutazioni missense si associa allo sviluppo del feocromocitoma; altresì delezioni intrageniche e mutazioni troncanti sono invece patognomonic della sua bassa incidenza. E' stata

inoltre dimostrata la co-presenza di paragangliomi che si localizzano in maniera tipica nei corpi carotidei. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che nella sindrome di VHL l'insorgenza di paragangliomi correla con una forma geneticamente distinta, sicuramente coinvolgente il *locus* del gene SDHD che codifica per una proteina mitocondriale dal significato funzionale ancora incerto. Tale gene è localizzato sul cromosoma 11, in posizione 11q23. È possibile che altri loci siano coinvolti sempre sul cromosoma 11, ma in posizione 11q11-13.

Sindromi di tipo 2

Aspetti clinici

Sindrome di predisposizione al cancro della mammella e dell'ovaio. Il 5-10% delle neoplasie della mammella presentano una suscettibilità genetica predisponente, trasmessa come tratto autosomico dominante, in cui i geni denominati BRCA1 e BRCA2 giocano un ruolo rilevante come fattori patogenetici della malattia. L'inattivazione dei geni BRCA1 e BRCA2 determina l'80% delle sindromi di predisposizione al carcinoma della mammella. L'inattivazione del gene BRCA1 determina il 45% delle sindromi di suscettibilità al carcinoma della mammella ed almeno l'80% delle sindromi di suscettibilità genetica al carcinoma dell'ovaio e della mammella. Viceversa BRCA2 si associa preferibilmente alla sindrome del carcinoma della mammella. La prevalenza di mutazioni del gene BRCA1 nei carcinomi della mammella e dell'ovaio è del 3% e la frequenza osservata di mutazioni BRCA1 in famiglie ad alta probabilità di suscettibilità genetica (criteri di familiarità associata a *linkage* molecolare positivo) è del 63% utilizzando differenti tecnologie di scansione molecolare (sequenza diretta, SSCP, PTT, DGGE, Heteroduplex analysis). In pazienti con familiarità per carcinoma della mammella (site-specific breast cancer) gli studi pubblicati evidenziano mediamente un 18% (53/294) di mutazioni BRCA1. Tuttavia, un numero sempre maggiore di pazienti con alta probabilità di predisposizione al carcinoma della mammella (familiarità e *linkage* positivo per BRCA1 e BRCA2) non presenta mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2. Ne consegue che in pazienti con familiarità esclusiva o prevalente per carcinomi della mammella (site-specific familial breast cancers), emerge una differenza evidente tra frequenza stimata e osservata di mutazioni BRCA1 (45% vs 18%). Tali risultati hanno due principali giustificazioni sulle quali la comunità scientifica concorda: a) i limiti di accuratezza delle tecnologie di diagnosi molecolare; b) la presenza di altri geni predisponenti al carcinoma della mammella. Attualmente le inattivazioni BRCA1/BRCA2 diagnosticabili con le tecniche molecolari disponibili in pazienti affette da carcinoma della mammella o dell'ovaio a rischio di predisposizione genetica sono approssimativamente il 3%, sebbene si ritenga che una predisposizione genetica trasmissibile caratterizzi almeno il 5%

delle suddette neoplasie. Resta tuttavia assodato che il *linkage* molecolare effettuato con sonde per le regioni cromosomiche specificamente coinvolte nella predisposizione genetica (17q21 e 13q12) su famiglie con sindrome di suscettibilità ereditaria al carcinoma della mammella e dell'ovaio (almeno 3 tumori della mammella nella stessa famiglia o 2 tumori della mammella ed uno dell'ovaio o 2 neoplasie della mammella con un tumore della mammella maschile) ha stimato che l'inattivazione dei geni BRCA1 e BRCA2 determina l'80% delle sindromi di predisposizione al carcinoma della mammella. L'inattivazione del gene BRCA1 determina il 45% delle sindromi di suscettibilità al carcinoma della mammella e l'80-90% delle sindromi di suscettibilità genetica al carcinoma dell'ovaio e della mammella. In famiglie con sindrome di suscettibilità al carcinoma della mammella e dell'ovaio, la presenza di una mutazione BRCA1 patologica (BRCA1 *carrier* o portatore sano) si associa ad un rischio di sviluppare il carcinoma della mammella entro i 70 anni del 56-81% e dell'ovaio del 44%. In famiglie con suscettibilità al carcinoma della mammella, il rischio di carcinoma della mammella è del 56%. L'analisi prospettica accurata dei meccanismi di inattivazione BRCA1/BRCA2 predisponente su casistiche selezionate di pazienti affette dalle suddette neoplasie e di donne appartenenti a famiglie a rischio in relazione a tipologie di rischio differenti (familiarità, multicentricità, precoce insorgenza) può permettere di individuare criteri di rischio specifico. Criteri prioritari di sospetto di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio sono la storia familiare per carcinoma della mammella e dell'ovaio, il riscontro di casi molteplici delle suddette neoplasie (carcinoma della mammella bilaterale, carcinoma della mammella e dell'ovaio, carcinoma della mammella o dell'ovaio associati ad altre neoplasie) in uno stesso individuo e la precoce età di insorgenza (<40 anni per il carcinoma della mammella) (Tab. IV).

Tabella IV. Linee guida per la diagnosi della sindrome di predisposizione al tumore dell'ovaio e della mammella.

Storia personale di cancro della mammella, si quadra come sindrome familiare se:

- A – diagnosticato entro i 40 anni con o senza familiarità;
- B – diagnosticato prima dei 50 anni con uno o più parenti di I grado affetti da tumore della mammella o dell'ovaio, oppure se bilaterale;
- C – diagnosticato indipendentemente dall'età con due o più parenti di I grado affetti;
- D – diagnosticato prima dei 50 anni in pazienti di origine ebraica-askenazita

Storia personale di cancro dell'ovaio, si inquadra come sindrome familiare se:

- A – si hanno uno o più casi in famiglia di cancro dell'ovaio;
- B – si hanno uno o più casi di parenti affetti da cancro della mammella diagnosticato entro i 50 anni, oppure affetti da cancro bilaterale della mammella;
- C – si hanno due o più casi familiari di cancro della mammella;
- D – si hanno uno o più casi familiari di cancro maschile della mammella;
- E – si ha anche un solo caso in pazienti di origine ebraica-askenazita

Genetica e strategia diagnostica su BRCA1 e BRCA2

La maggior parte dei geni che causano sindromi di suscettibilità genetica alle neoplasie solide presentano caratteristiche di particolare complessità genomica e lunghezza della regione codificante. Il gene BRCA1 ha una sequenza genomica di circa 81 chilobasi con il 41.5% di sequenze Alu-ripetitive; 22 esoni codificanti (5592 nucleotidi) ed un grande esone (esone 11, 3427 nucleotidi). Il gene BRCA2 presenta 27 esoni codificanti (10443 nucleotidi) e due grandi esoni (esone 10 e 11). L'inattivazione parziale dei geni BRCA1 e BRCA2 rappresenta attualmente il principale meccanismo di predisposizione familiare al carcinoma della mammella e dell'ovaio e si associa ad un rischio cumulativo di comparsa di tali neoplasie di oltre il 50%. I geni BRCA1 e BRCA2 possono essere inattivati da particolari alterazioni strutturali:

- alterazioni strutturali puntiformi o macro delezioni (cromosomiche interstiziali) che determinano l'inattivazione della proteina;
- alterazioni strutturali della regione regolatoria o silenziamento della trascrizione per metilazione che limitano l'espressione della proteina anche se strutturalmente normale;
- inattivazione di interattori proteici (BARD1) partecipi con BRCA1/BRCA2 dello stesso "network" funzionale ("machinery").

Tale complessità rende necessario lo sviluppo di procedure diagnostiche che garantiscano livelli di accuratezza ottimale, che siano automatiche o semiautomatizzate per favorire velocità di esecuzione su ampia scala ed a costi ridotti.

Una prima generazione di tecnologie per la diagnosi molecolare è stata caratterizzata dalla utilizzazione di sonde radiomarcate. La ricerca diagnostico-molecolare si è focalizzata sin dagli esordi, nello sviluppo di tecnologie a scansione molecolare in grado di rilevare la presenza di mutazioni.

Le tecnologie a scansione molecolare si possono suddividere in due gruppi:

- quelle che riconoscono una modificazione fisica del DNA determinata dalla presenza della mutazione (SSCP, DGGE, PTT);
- quelle basate sul clivaggio chimico od enzimatico dei misappaiamenti (*mismatches*) che si determinano per effetto della mutazione su molecole di DNA o RNA heteroduplex (CCM, chemical cleavage mismatch).

La maggior parte delle tecniche di scansione molecolare di prima generazione (SSCP, DGGE, PTT) presentano livelli di accuratezza diagnostica non ottimali (<80%). Da qui la necessità di utilizzare più di un metodo di scansione per incrementare l'accuratezza diagnostica senza ricorrere direttamente alla sequenziazione diretta. Le tecnologie basate sul CCM riconoscono invece specificamente la mutazione e presentano livelli di accuratezza ottimali. Questa seconda generazione di tecnologie diagnostico-molecolare si basa sull'utilizzo di sonde fluorescenti e di sistemi di

analisi molecolare semiautomatizzata (sequenziatori automatici, programmi di analisi della scansione molecolare e della sequenza).

Le strategie diagnostiche attualmente a disposizione per il riconoscimento di mutazioni predisponenti BRCA1/BRCA2 garantiscono una accuratezza diagnostica <70% in famiglie ad alto rischio di predisposizione genetica (storia familiare associata a linkage BRCA1/BRCA2 positivo). Pertanto, almeno un 30% delle inattivazioni BRCA1/BRCA2 sfugge all'analisi molecolare per l'incapacità di riconoscimento di mutazioni o per la presenza di meccanismi di inattivazione differenti.

Linee guida per una corretta strategia diagnostica: utilizzo della FAMA

La FAMA (fluorescence assisted mismatch analysis) rappresenta una tecnologia di scansione genetica analitica semiautomatizzata fluorescente (sequenziatore automatico) basata sul clivaggio chimico-specifico del misappaiamento di nucleotidi che si determina su molecole di DNA-heteroduplex per la presenza della mutazione. Caratteristiche essenziali della FAMA sono la capacità di riconoscere, localizzare la posizione e contribuire notevolmente alla definizione della tipologia della mutazione identificata. L'utilizzazione di primers-sonde bifluorescenti permette di evidenziare la mutazione su entrambe le catene di DNA. La specificità per il riconoscimento di mutazioni allo stato eterozigote e la flessibilità, ovvero la capacità di analizzare frammenti di differente lunghezza (attualmente fino a 1300 nucleotidi), rappresentano i principali vantaggi della scansione molecolare mediante FAMA.

L'accuratezza diagnostica ottimale della scansione molecolare di mutazioni rappresenta la premessa alla possibilità di estendere la diagnosi molecolare preventiva a famiglie con probabilità media e bassa (comunque >10%) di predisposizione genetica al carcinoma della mammella ed avviare campagne di prevenzione molecolare dei tumori.

Inoltre, l'applicazione di tecnologie a scansione molecolare accurata e l'automazione completa delle procedure diagnostiche, permettono di evidenziare la presenza di meccanismi di inattivazione genica alternativi rispetto a piccole alterazioni strutturali (mutazioni intra-amplicon): delezioni cromosomiche interstiziali, potenzialmente coinvolgenti unità Alu-ripetitive; inattivazione funzionale della proteina BRCA1 a livello trascrizionale (metilazione della regione regolatoria) o post-traduzionale (mutazione di BRCA1-interattori come BARD1). Una strategia di scansione molecolare specifica per il gene BRCA1 mediante FAMA è stata di recente messa a punto dal nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con l'Unité Immunogénétique, Institut Pasteur di Parigi, ed ha mostrato livelli superiori di accuratezza diagnostica, velocità di esecuzione dell'indagine molecolare e bassi costi rispetto alle strategie diagnostiche convenzionali. Vantaggi della strategia FAMA per la ricerca di mutazioni BRCA1 sono:

- la semplificazione della strategia di amplificazione del DNA mediante PCR in due tappe utilizzando sonde oligonucleotidiche con code universali ("tailed-primers") e sonde universali fluorescenti (HUP: human universal primers);
- l'applicazione di una strategia unica in grado di effettuare la scansione dell'esone 11/BRCA1 da DNA genomico mediante 4 ampliconi;
- l'utilizzazione di una sola procedura di scansione per analizzare l'intera regione codificante BRCA1 (16244 nucleotidi);
- la capacità diagnostica di mantenere alti livelli di accuratezza per rilevare sostituzioni semplici ("mis-sense") e piccole delezioni/inserzioni che rappresentano il principale limite diagnostico delle procedure in uso.

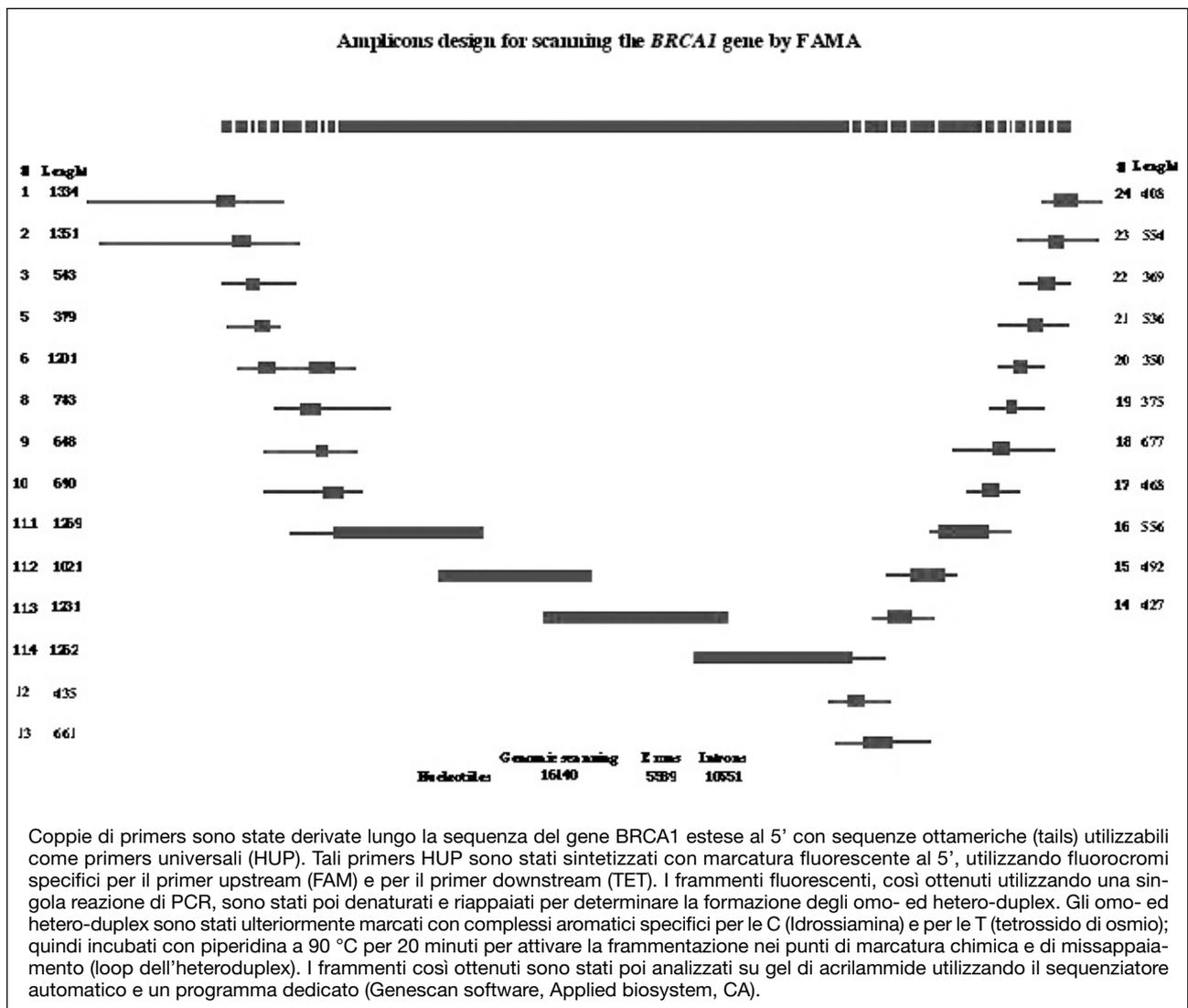
Alterazioni strutturali della regione regolatoria e delezioni cromosomiche interstiziali (DCI) rappresentano il 7-10% delle inattivazioni caratterizzanti BRCA1 e BRCA2. In particolare, le DCI sfuggono all'accertamento diagnostico molecolare indipendentemente dalla procedura utilizzata, dal momento che la regione genomica coinvolta nella delezione è quasi sempre più ampia della regione amplificata ed analizzata. La procedura diagnostica attualmente utilizzata per il riconoscimento di DCI richiede grandi quantitativi di DNA genomico da analizzare con tecniche differenti (Southern blot, "long-range" PCR, sequenza diretta), con risultati di accuratezza diagnostica limitati, tempi lunghi e costi elevati. Nell'ambito della collaborazione scientifica alla quale si è fatto riferimento, il nostro gruppo di ricerca ha in fase di avanzato sviluppo un test semiautomatico per il riconoscimento di delezioni cromosomiche interstiziali del gene BRCA1 mediante multiplex-PCR fluorescente.

Uno studio di selezione di famiglie a rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio condotto negli ultimi 3 anni presso la Divisione di Oncologia Medica dell'Università dell'Aquila nell'ambito di 328 pazienti consecutivamente afferenti con diagnosi di carcinoma della mammella ha permesso di trarre le seguenti considerazioni: il 50.6% delle pazienti affette da carcinoma della mammella presenta familiarità per neoplasie (almeno un altro caso con neoplasia entro il 2° grado di parentela); il 26.5% delle pazienti (87/328) presenta un rischio di predisposizione genetica >10% che potrebbe richiedere l'effettuazione di una analisi genetica. Tali famiglie a rischio sono rappresentate da differenti tipologie caratterizzate dalle seguenti frequenze specifiche: carcinoma familiare della mammella (≥ 3 BC), 4.2% (14/328 pazienti); carcinoma familiare della mammella e dell'ovaio, 1.1% (4/328); carcinoma della mammella bilaterale, 4.3% (12/328); carcinoma della mammella a precoce insorgenza, 7.0% (23/328); carcinoma della mammella maschile, 0.6% (2/328). Tale studio sembra confermare la consistente numerosità delle pazienti a rischio e la variabilità delle tipologie di rischio.

I dati epidemiologici e le considerazioni economiche e socio-sanitarie connesse sono recentemente oggetto di grande attenzione da parte dei responsabili della sanità e dell'opinione pubblica. In risposta a queste esigenze la Commissione Oncologica Nazionale ha approvato un programma operativo teso a definire gli interventi prioritari previsti dal Piano Sanitario Nazionale relativamente all'azione programmata di Prevenzione e Cura delle Malattie Oncologiche. Linee guida concernenti l'organizzazione della prevenzione e dell'assistenza in Oncologia sono pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 42 del 20 febbraio 1996 - serie generale, e sul Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 127 del 1 giugno 1996 - serie generale. Le linee guida individuano tra i settori prioritari lo screening genetico nelle famiglie ad alto rischio. Secondo le indicazioni della Commissione Oncologica Nazionale, le strategie operative comprendono:

- la diagnosi presintomatica dello stato di portatore della malattia, particolarmente nelle categorie a rischio genetico, ove è possibile l'identificazione di mutazioni ereditarie responsabili di forme di predisposizione al cancro;
 - l'affinamento della diagnostica oncologica, basato sulla individuazione di specifiche alterazioni genetiche caratteristiche di determinati tipi e sottotipi di neoplasia;
 - la predittività, basata sulla identificazione di alterazioni genetiche associate a determinati comportamenti biologici della neoplasia.
- Il nostro studio si è proposto di sviluppare ed applicare su una casistica selezionata accertamenti diagnostici globali di inattivazione dei geni BRCA1 e BRCA2 miranti ad individuare:
- mutazioni predisponenti puntiformi delle regioni codificanti e regolatorie mediante FAMA;
 - delezioni cromosomiche interstiziali mediante multiplex-PCR fluorescente.

Figura 1. Strategia di derivazione degli ampliconi lungo il locus BRCA1 per l'analisi FAMA.



Descrizione della ricerca e fattibilità

Il progetto si è proposto di approfondire lo sviluppo dei meccanismi di inattivazione strutturale e funzionale di geni predisponenti al carcinoma della mammella (BRCA1, BRCA2) e di valutare la presenza di tali meccanismi di inattivazione sulla casistica di carcinomi della mammella selezionata sulla base di criteri di familiarità, multicentricità ed insorgenza precoce della neoplasia. La ricerca dei meccanismi di inattivazione genica strutturale e funzionale ha utilizzato come modello il gene BRCA1; tale modello di ricerca diagnostica globale sarà quindi esteso al gene BRCA2. La ricerca di alterazioni strutturali della regione codificante e regolatoria è stata effettuata mediante FAMA. Pazienti e familiari a rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella sono stati selezionati nell'ambito dei pazienti afferenti al nostro Ambulatorio e assegnati a categorie di rischio differenziato sulla base di criteri noti di familiarità, multicentricità ed insorgenza precoce della neoplasia della mammella. I probandi delle famiglie a rischio selezionate sono stati sottoposti a *counseling* genetico e prelievo di sangue, previo consenso informato scritto. I soggetti saranno sottoposti successivamente ad una consulenza genetica per valutare, nel caso di mutazione patologica, il programma degli esami diagnostici per la prevenzione delle neoplasie.

Gli accertamenti diagnostico-molecolari BRCA1 e BRCA2 sono stati effettuati sulla casistica di 101 famiglie a rischio di carcinoma della mammella e dell'ovaio selezionate negli ultimi 3 anni da 374 pazienti affette da carcinoma della mammella o dell'ovaio osservate consecutivamente.

Metodologia

La scansione molecolare di mutazioni BRCA1 e BRCA2 mediante FAMA è stata effettuata previa estrazione del DNA genomico dai linfociti circolanti ed amplificazione di frammenti di DNA <1.3 kb di lun-

ghezza. Una strategia di doppia-PCR è stata utilizzata per amplificare e marcare a fluorescenza i singoli frammenti di DNA (ampliconi) (Fig. 1). Nella prima amplificazione si sono utilizzate coppie di sonde oligonucleotidiche con coda universale (tailed-primers); nella seconda amplificazione si sono utilizzate sonde oligonucleotidiche universali fluorescenti che si ibridizzano con le code dei primers sequenza-specifici. I primers sequenza-specifici sono stati selezionati principalmente sulla base della frequenza dell'ottamero-3' (software PC-rare, Griffais, Pasteur). La reazione di FAMA sul prodotto di amplificazione si sviluppa, previa formazione di molecole di DNA-heteroduplex, mediante modificazione chimica di nucleotidi specifici (idrossilamina che modifica nucleotidi citidilici e tetrossido di osmio che modifica i nucleotidi timidilici), clivaggio del DNA a doppia catena con piperidina. La fase automatica prevede l'elettroforesi denaturante su sequenziatore automatico (Perkin-Elmer, ABI 377 DNA Sequencer) e l'analisi con programmi specifici per la scansione molecolare (Genescan™). Le mutazioni sospettate mediante FAMA sono state poi confermate per sequenziazione diretta automatizzata utilizzando un software specifico (Sequencescan™).

Risultati

Per procedere all'analisi delle eventuali lesioni dei geni BRCA1 e BRCA2 presenti nella popolazione, sono stati prima analizzati i DNA derivati dalle lesioni neoplastiche di pazienti con indicazioni anamnestiche di familiarità alla malattia. Il DNA estratto è stato analizzato per FAMA senza aggiunta di DNA normale, assumendo che nel prelievo biotipico la presenza di stroma o di infiltrato cellulare garantisce una quantità di templatato non tumorale sufficiente per la formazione dell'eventuale eteroduplex. Dall'analisi dei risultati risulta evidente che in almeno il 46% dei tumori a linkage positivo di familiarità sono presenti alterazioni del gene BRCA1, mentre alterazioni spe-

Tabella V. Analisi molecolare del gene BRCA1 su famiglie con alto indice di rischio per il cancro ereditario della mammella/ovaio.

Kindred	Familial cancers		LOD score	Mutations				Allelic variants		
	Ovarian	Breast		Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Functional relevance	BIC report ^a	Region	Nucleotide change
F153	1	4	0.55	11	4184del4	ter1364	Truncating	Y	Intron 9	A G
F519	2	4	0.37	-	-	-	-	-	-	-
F326	2	4	0.98	5	259insA	Cys47stop	Truncating	N	-	-
F338	2	3	0.66	18	5215 G A	Arg1699Gln	Missense	Y	Intron 21	T C
				22	5468 G A	Met1783Ile	Missense	N		
F1028	0	6 ^b	1.47	-	-	-	-	-	-	-
F245	5	1	0.48	20	5335 A T	Asp1739Val	Missense	N	-	-
F322	2	3	0.56	12	4302 C T	Gln1395stop	Truncating	Y	Exon 11	1184 G A (Lys355Lys)
									Intron 20	C T

Tutte le mutazioni e i punti di *splicing junctions* sono stati analizzati per sequenza. Il *linkage* molecolare verso il *locus* BRCA1 è stato effettuato con marker microsatelliti. ^a Mutazioni riportate dal sito BIC: Y, riportate; N, non riportate; ^b 5 femminili e 1 caso maschile di cancro della mammella.

cifiche per BRCA2 assommano a circa il 20% nello stesso campione analizzato. Tutte le mutazioni positive per FAMA sono state ri-analizzate amplificando di nuovo il template con i primer specifici per BRCA1 o BRCA2 a livello della presunta lesione e confermati per sequenziazione automatica. Una volta associata la mutazione BRCA1 o BRCA2, sono stati adottati i criteri stabiliti per poter estendere il test genetico sui familiari. Ogni potenziale candidato è stato sottoposto a valutazione psicologica pre-test per saggiarne la capacità reattiva e lo stato di emotività; quindi i volontari, previo consenso scritto informato, sono stati sottoposti a prelievo e a valutazione diagnostica per i geni BRCA. La Tabella V mostra i dati analitici sulle caratteristiche molecolari delle alterazioni riscontrate in BRCA1.

Il riquadro è uno schema riassuntivo della tipologia di lesione che interessa il gene. Come si può notare la maggior parte delle alterazioni rappresentano mutazioni già note e riportate sul Breast Information Consortium (BIC). Tuttavia 3 distinte lesioni, la mutazione troncante Cisteina47-stop sull'esone 5, la mutazione Metionina 1783-Leucina sull'esone 22 e la mutazione Asparagina1739-Valina sull'esone 20 rappresentano alterazioni *de-novo* che potrebbero correlare con le caratteristiche geografiche ed etniche della nostra regione o rappresentare mutazioni di difficile diagnosi, riscontrabili per utilizzo di una tecnologia più sensibile (FAMA).

Come infatti si nota dall'analisi della Figura 2, la tecnologia FAMA mostra il suo carattere di ridondanza diagnostica e di accuratezza. L'immagine del gel mostra in scansione automatica il profilo della frammentazione del DNA con il segnale senso ed antisenso a livello dell'eteroduplex del DNA che orienta immediatamente per una alterazione eterozigote di mismatch.

Conclusioni

Alla luce di tutte le argomentazioni trattate, la genetica del cancro si pone oggi nella prospettiva di predire l'insorgenza di un tumore e permettere un protocollo clinico di prevenzione della patologia. In questo senso il test genetico è un'arma fondamentale per l'identificazione del fattore rischio. Con la scoperta delle mutazioni del gene onco-soppressore RET nella sindrome di MEN 2 e la sua rapida applicazione verso la diagnosi clinica, la vera era dell'oncologia molecolare è nata. Tuttavia come abbiamo imparato non tutte le sindromi si associano in maniera automatica a mutazioni su un singolo *locus* di facile interpretazione e diagnosi. Già nella sindrome di predisposizione al cancro della mammella e dell'ovaio, il coinvolgimento di BRCA1 e BRCA2 sottintende una non completa penetranza e la possibilità che altri geni o altre lesioni siano coinvolte nel meccanismo patogenetico della malattia. E' vero altresì che la stessa tecnologia molecolare potrebbe e può già offrire dei protocolli diagnostici più avanzati per lo screening routinario di lesioni su loci genici complessi. L'applicazione della FAMA per lo screening di BRCA1 o di altri geni complessi, potrebbe garantire una maggiore sensibilità e soprattutto una sufficiente ridondanza diagnostico-molecolare. L'analisi e l'anamnesi attenta che rispondono a linee guide ormai ben sperimentate sono sicuramente il supporto migliore per una definitiva accettazione del test di predisposizione alla malattia oncologica e per l'utilizzo di tutti quegli screening di monitoraggio fondamentali in un programma di prevenzione.

Figura 2. Analisi elettroforetica e applicazione Genescan dei prodotti FAMA.

