



Ospedale  
"Sacro Cuore - Don Calabria"

# Incontri di aggiornamento del Dipartimento Oncologico

Responsabile Scientifico:  
Dott.ssa Stefania Gori

4° INCONTRO - Martedì 13 ottobre 2015

*Le mutazioni BRCA1-2:  
da fattore di rischio a target terapeutico*

SEDE

CENTRO FORMAZIONE

Ospedale "Sacro Cuore - Don Calabria"  
Via Don Angelo Sempredoni, 5 - 37024 Negrar (Verona)

## *Mutazioni BRCA1-2: il biologo molecolare*



Vienna Ludovini  
Laboratorio di biologia molecolare  
S.C. Oncologia Medica-Perugia

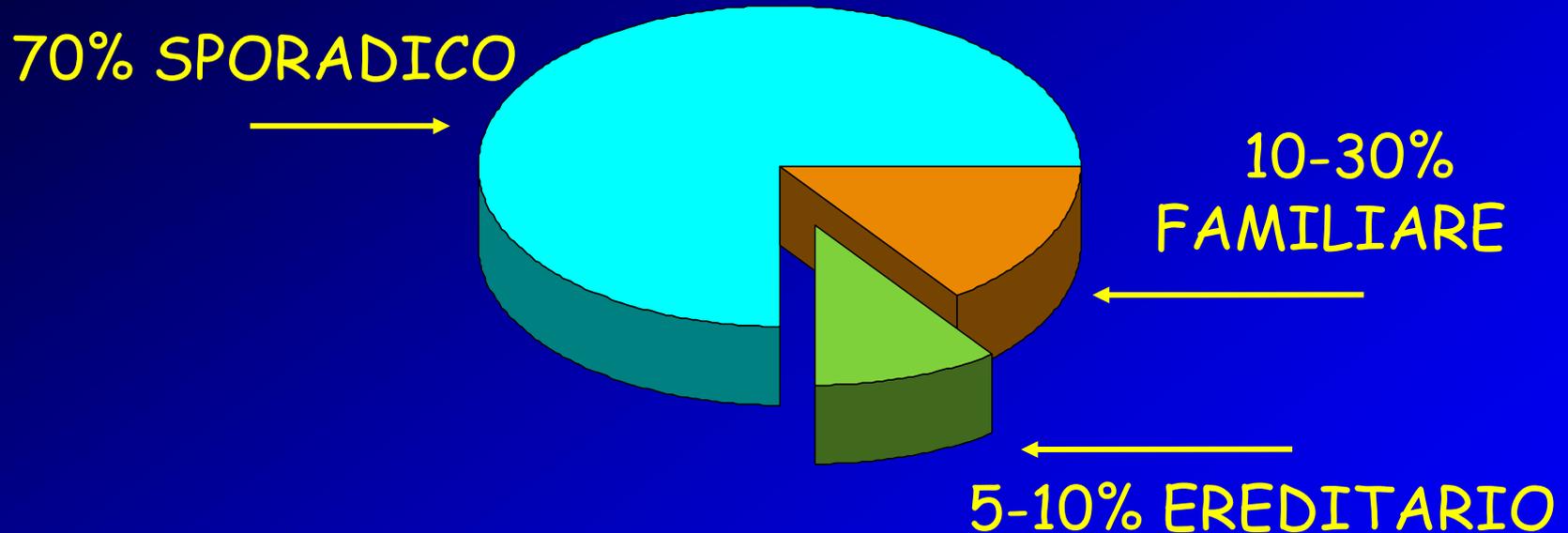
# IL CANCRO E' UNA MALATTIA GENETICA?!

**SI...** se si considera che alla base di tutti i tumori vi è un'alterazione del DNA che conferisce le caratteristiche proprie del comportamento maligno

**SI...** se si considera che in alcune famiglie la presenza di mutazioni costituzionali (in tutte le cellule dell'organismo) permette che la suscettibilità a certi tumori venga trasmessa da una generazione alla successiva => **CARCINOMI EREDITARI**

# PATOGENESI DEI TUMORI

Carcinomi ereditari...così rari?

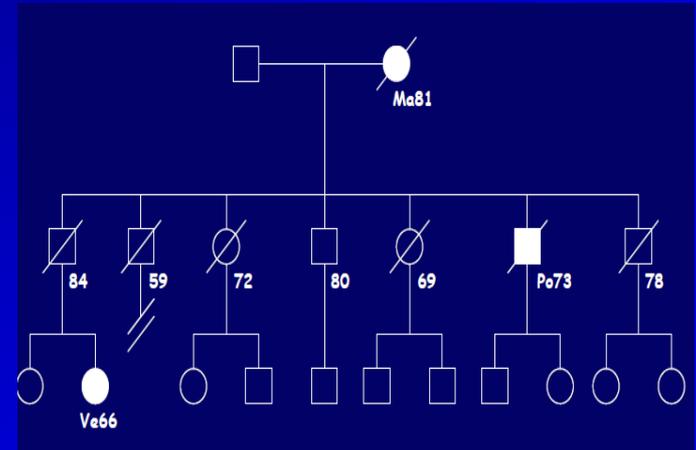


Carcinoma mammario: 48.000 nuovi casi/anno in Italia  
Fino a 4.800 nuovi casi di k mammella ereditari...  
... stessa incidenza del carcinoma ovarico!!

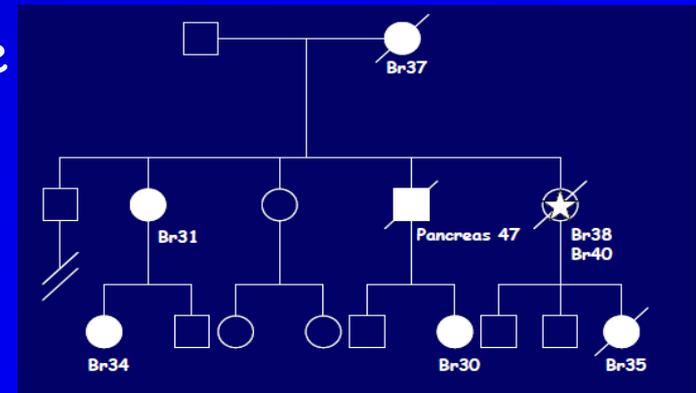


# IDENTIFICAZIONE.... FAMILIARITA' O EREDITARIETA'

**FAMILIARITA'**.. è la tendenza di alcune malattie ad aggregarsi in determinati nuclei familiari. Tale familiarità può essere dovuta a fattori ambientali, condivisi dai familiari, a fattori genetici (in buona parte non noti) o ad entrambi

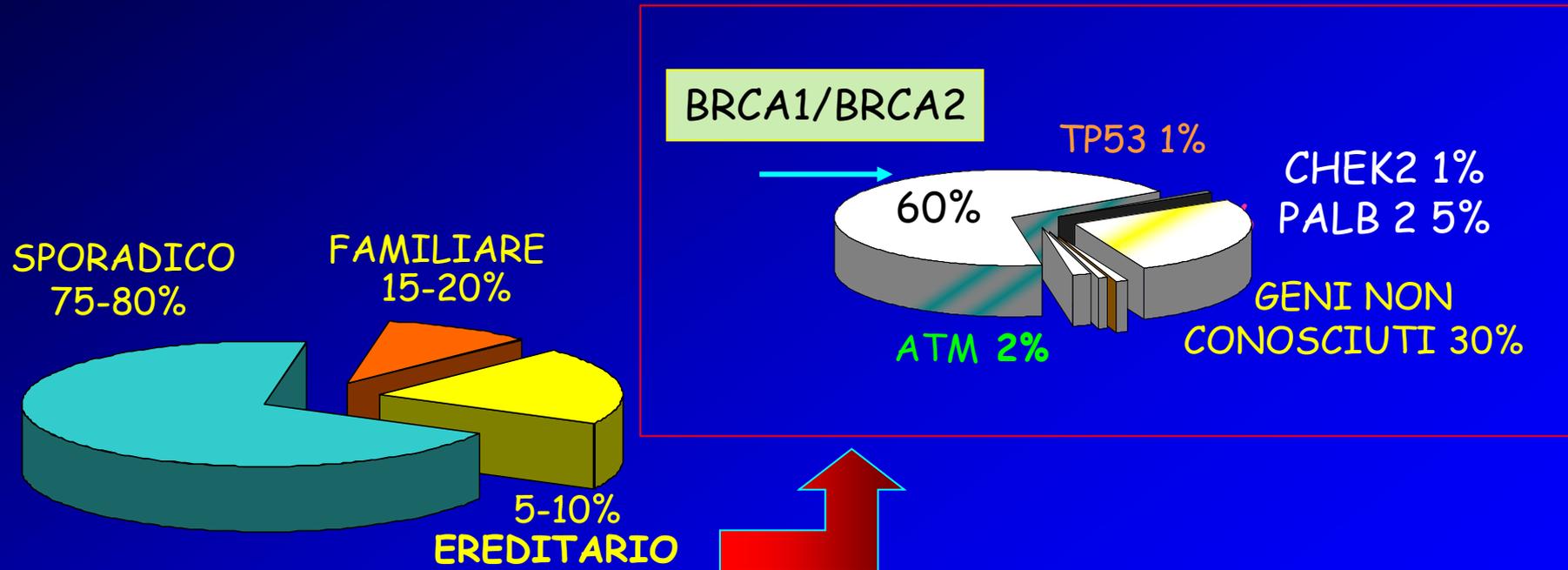


**EREDITARIETA'**.. è la trasmissione di un determinato carattere da una generazione alla successiva, ed è sempre dovuta a fattori genetici =>  
**PREDISPOSIZIONE AD AMMALARE!**



# CARCINOMI EREDITARI BRCA RELATI

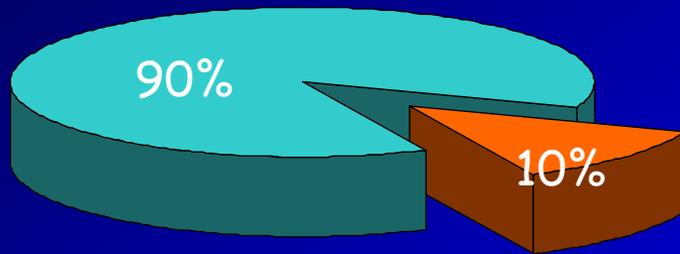
## CARCINOMA DELLA MAMMELLA



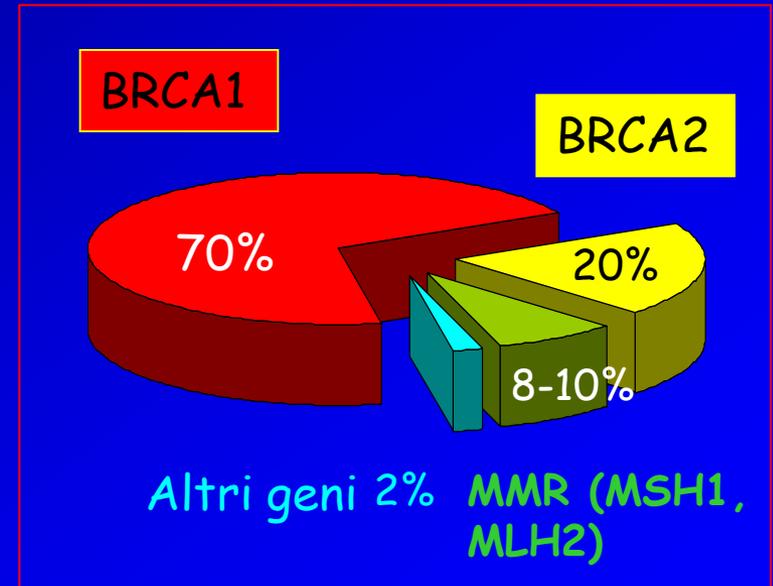
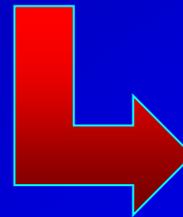
# CARCINOMI EREDITARI BRCA RELATI

In Italia, sono circa **5.000** i nuovi casi e **3.000** i decessi all'anno, vale a dire che 1 donna su 70 è destinata ad ammalarsi e 1 su 100 a morire per tale neoplasia.

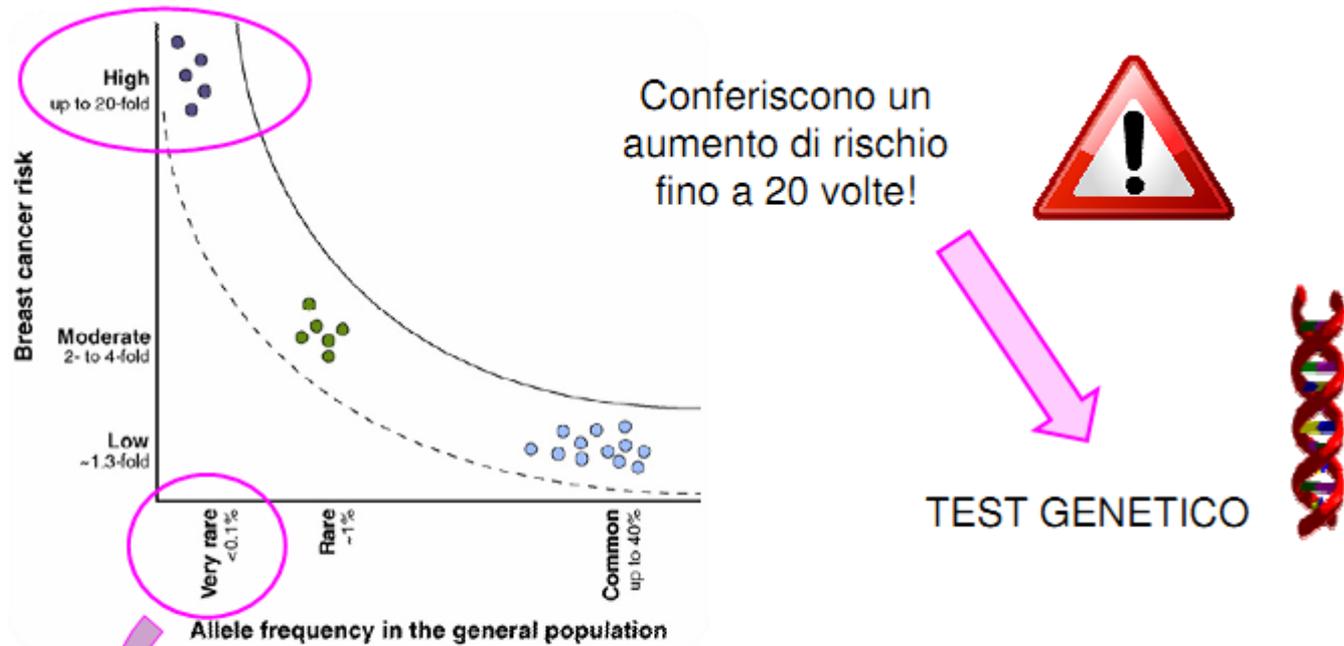
## CARCINOMA OVARICO



EREDITARIO

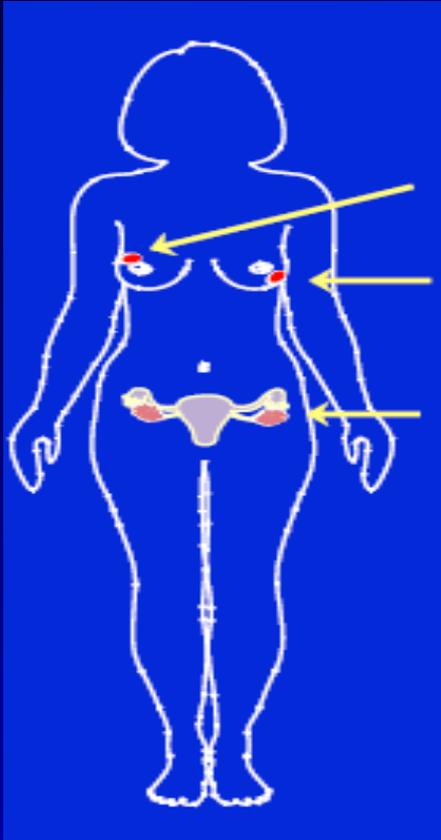


# BRCA1-2: GENI DI SUSCETTIBILITA' AD ALTA PENETRANZA



**BRCA1-BRCA2-TP53-PTEN**  
(frequenza dei portatori nella popolazione generale <0.1%)

# CARCINOMI ASSOCIATI A MUTAZIONE DEL GENE BRCA 1: rischio a 70 anni di età

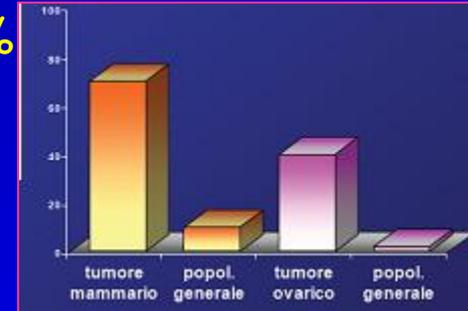


CARCINOMA DELLA MAMMELLA: 50-85%  
rispetto al 10% della popolazione generale

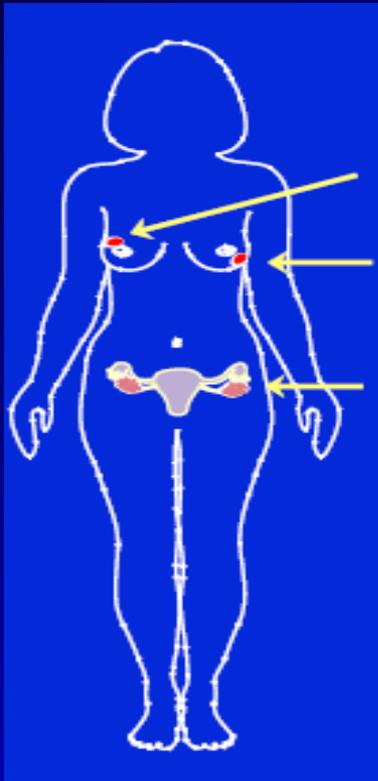
CARCINOMA DELL'OVAIO: 15-45%  
rispetto all'1,4% della popolazione generale

CARCINOMA DELLA MAMMELLA METACRONO: 20-60%

MAGGIOR RISCHIO DI INSORGENZA DI ALTRI  
TUMORI: ad es. GASTRO-INTESTINALI

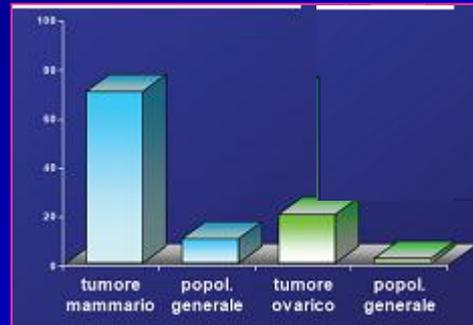


# CARCINOMI ASSOCIATI A MUTAZIONE DEL GENE BRCA 2: rischio a 70 anni di età



CARCINOMA DELLA MAMMELLA: 50-85%

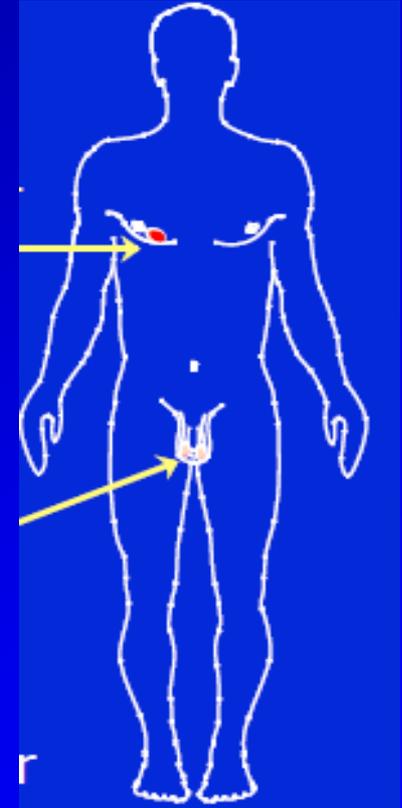
CARCINOMA OVARICO: 10-27%



CR MAMMARIO METACRONO: 20-60%

CARCINOMA MAMMELLA: 10%

CARCINOMA PROSTATICO: 20%



MAGGIOR RISCHIO DI INSORGENZA DI ALTRI TUMORI:  
PANCREAS, STOMACO, MELANOMA, VIE BILIARI

# BRCA 1-2: LA STORIA

Mary-Claire king, Science nel 1994: **BRCA1**

Richard Wooster, Nature nel 1995: **BRCA2**



## A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene **BRCA1**

SCIENCE • VOL. 266 • 7 OCTOBER 1994

## Identification of the breast cancer susceptibility gene **BRCA2**

*Nature* 378, 789–792 (1995)

# BRCA 1-BRCA2:LA STRUTTURA

## GENI ONCOSOPPRESSORI "caretakers"

geni autosomico dominante

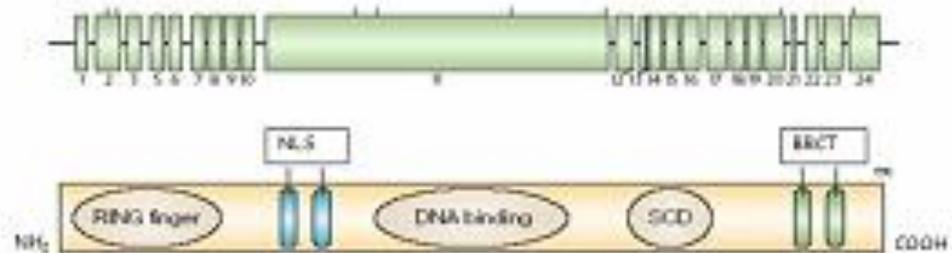
geni grandi circa 80Kb

### BRCA 1

cromosoma 17q21

24 esoni (5715 nucleotidi)

proteina nucleare 1863 aa

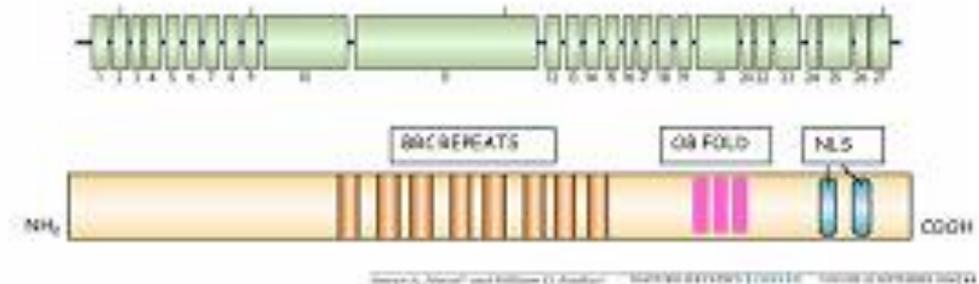


### BRCA 2

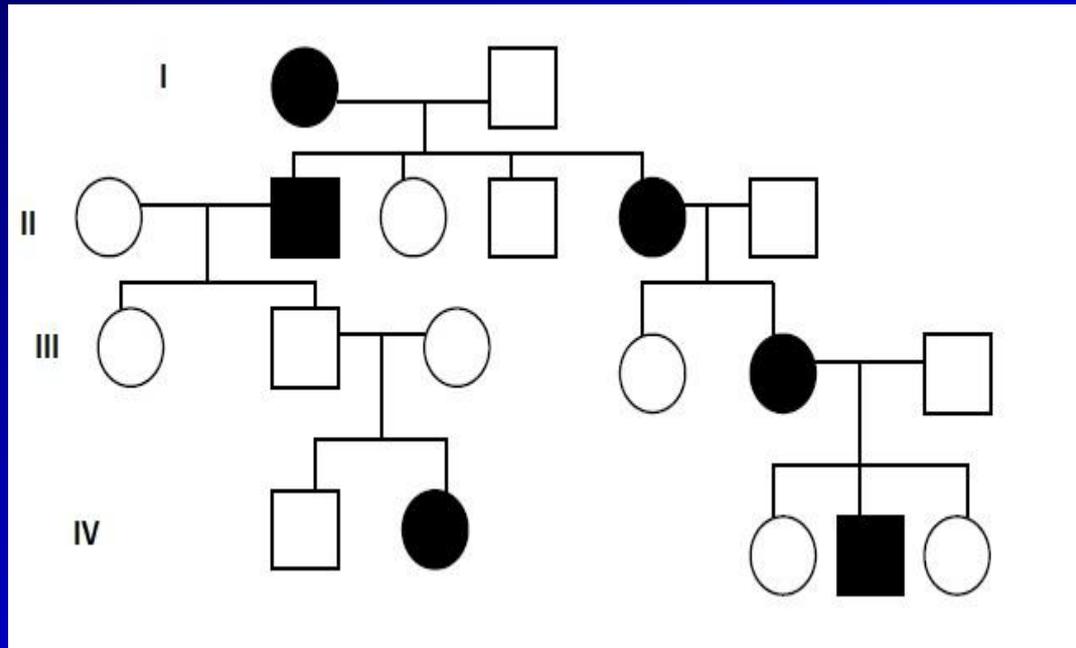
cromosoma 13q12.3

27 esoni (11385 nucleotidi)

proteina nucleare 3418 aa



# Eredità autosomica dominante

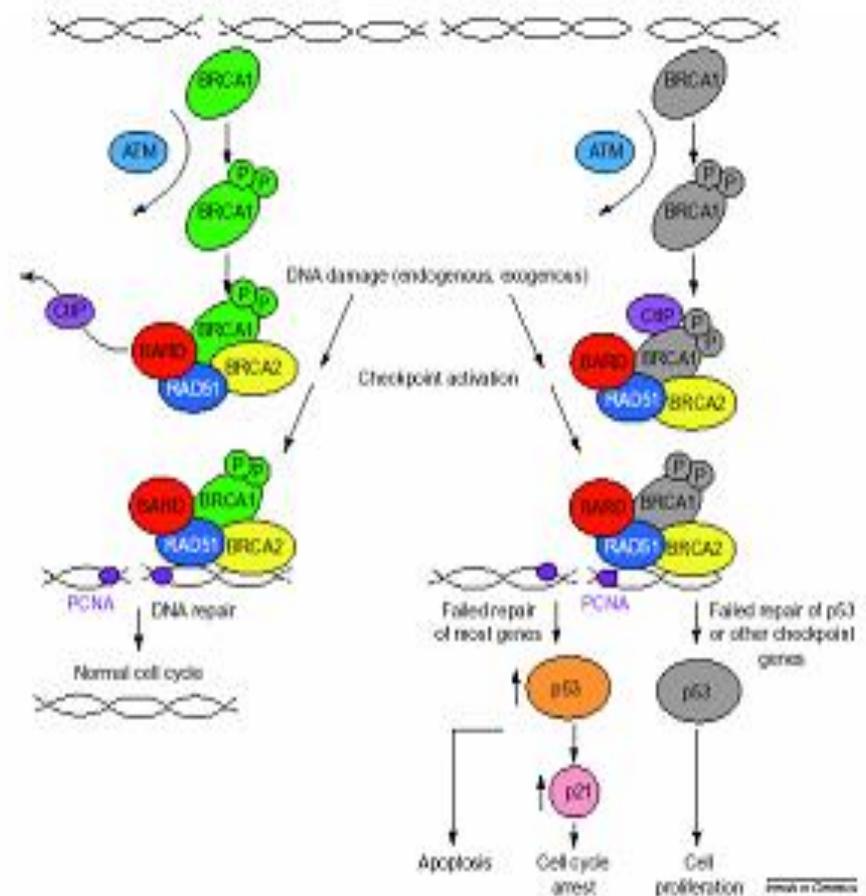


## Caratteristiche di trasmissione

- Probabilità del 50% di ereditare la mutazione
- Nessun salto di generazione (trasmissione verticale)
- Uguale rapporto maschi/femmine che ereditano l'allele mutato

# BRCA 1-BRCA2:La funzione nel riparo al DNA

- ❑ inibiscono la crescita delle ghiandole mammarie
- ❑ interagiscono con le proteine RAD (BRCA1-RAD50; BRCA2-RAD51)
- ❑ Coinvolti nella riparazione del DNA tramite ricombinazione omologa(HR)
- ❑ regolano l'attività di altri geni (p21)
- ❑ giocano un ruolo fondamentale nell'embriogenesi



# BRCA 1-BRCA2: Le mutazioni descritte sono moltissime



<http://research.nhgri.nih.gov/bic>

BRCA1 > 1560 mutazioni/polimorfismi

BRCA2 > 1880 mutazioni/polimorfismi

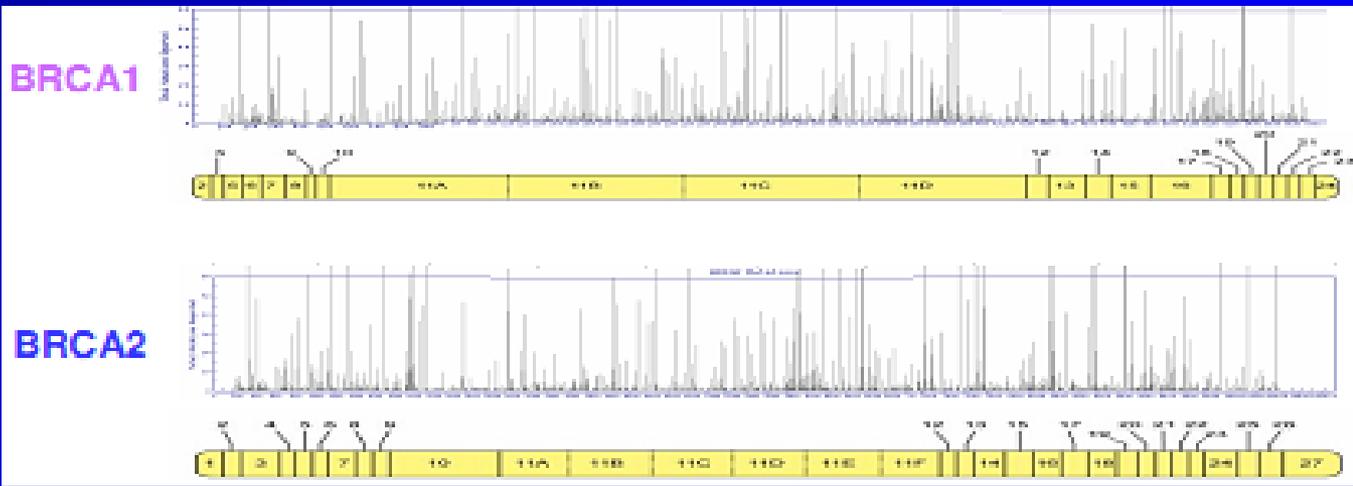
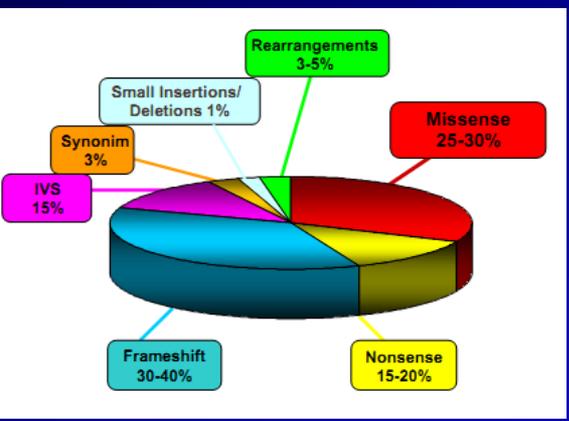
## Non esistono "hot spot" di mutazione

185delAG **BRCA1** Ashkenazi 41%  
 5382insC **BRCA1** Ashkenazi 6%  
 6174delT **BRCA2** Ashkenazi 6%

80% frameshift o nonsense  
 7% varianti di Spicing  
 10% riarrangiamenti genomici

**Patogenetiche**

? % VUS (missense intronic variant) = **Patogenetiche?**



# Mutazioni patogenetiche

**Sostituzione:** (mutations missense; mutations nonsense) che codifica per un diverso aminoacido e determina la comparsa di un codone di stop oppure un alterata funzione proteica.

**Inserzione o delezione** di un numero di nucleotidi diverso da 3 o da un suo multiplo (frameshift mutations) che determina la comparsa di un codone di STOP.

# BRCA 1-BRCA2: Metodiche di analisi sono di diverso tipo



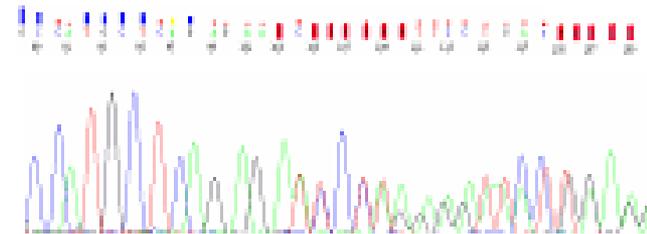
difficoltà tecniche = sono necessarie più metodiche per aumentare la **SENSIBILITA'** (95%~)



## GOLD STANDARD

### ⚡ Sequenziamento diretto degli esoni codificanti

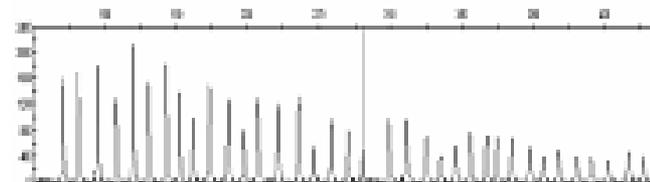
- 38 sequenze BRCA1
- 48 sequenze BRCA2



### ⚡ Valizione il sequenziamento di nuova generazione (Next generation sequencing-NGS)

### ⚡ MLPA per larghe delezioni o duplicazioni

- BRCA1 (kit P002-C2)
- BRCA2 (kit P045-B2)
- BRCA1 PROMOTORE (kit P239)



# BRCA 1-BRCA2: Analisi mediante sequenziamento

## ESTRAZIONE DNA E VALUTAZIONE QUALI/QUANTITATIVA



Prelievo di sangue



Metodi di estrazione del DNA:

- Kit commerciali
- Estrattore automatizzato (standardizzazione della procedura)



ESTRAZIONE DNA CON  
BIROBOT EZ1



Valutazione quali/quantitativa  
spettrofotometrica

Purezza DNA:  $A_{260}/A_{280}$  : 1.7-1.9



# BRCA 1-BRCA2: Analisi mediante sequenziamento

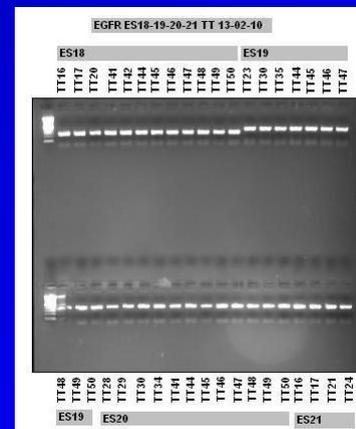
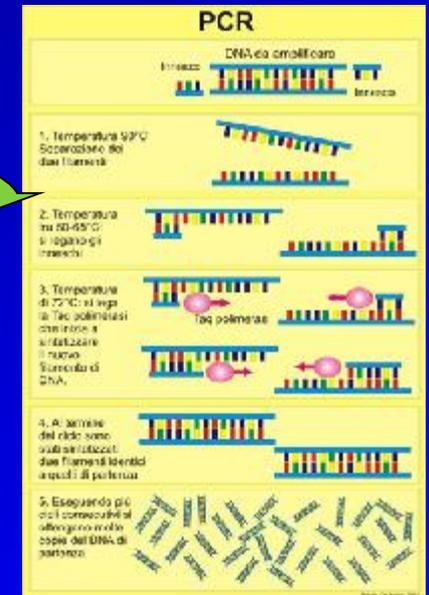
## AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR E VISUALIZZAZIONE DEL PRODOTTO

### Raccomandazioni :

- lavorare sotto cappa a flusso laminare
- Controllo positivo e negativo
- Utilizzare 80-100 ng di DNA
- Effettuare un controllo qualitativo/quantitativo del prodotto su gel di agarosio



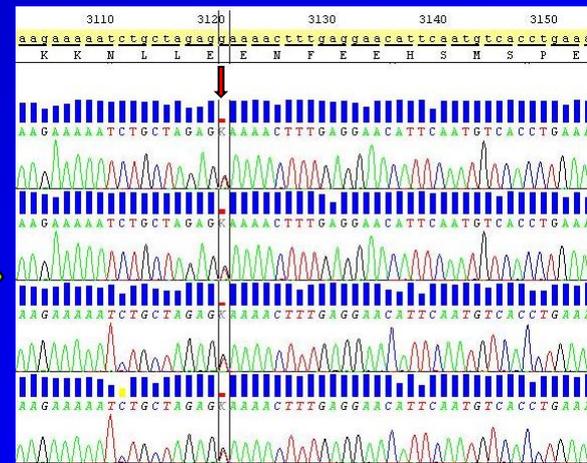
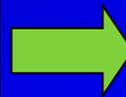
AMPLIFICAZIONE  
GENICA TRAMITE PCR



ELETTROFORESI SU  
GEL D'AGAROSIO

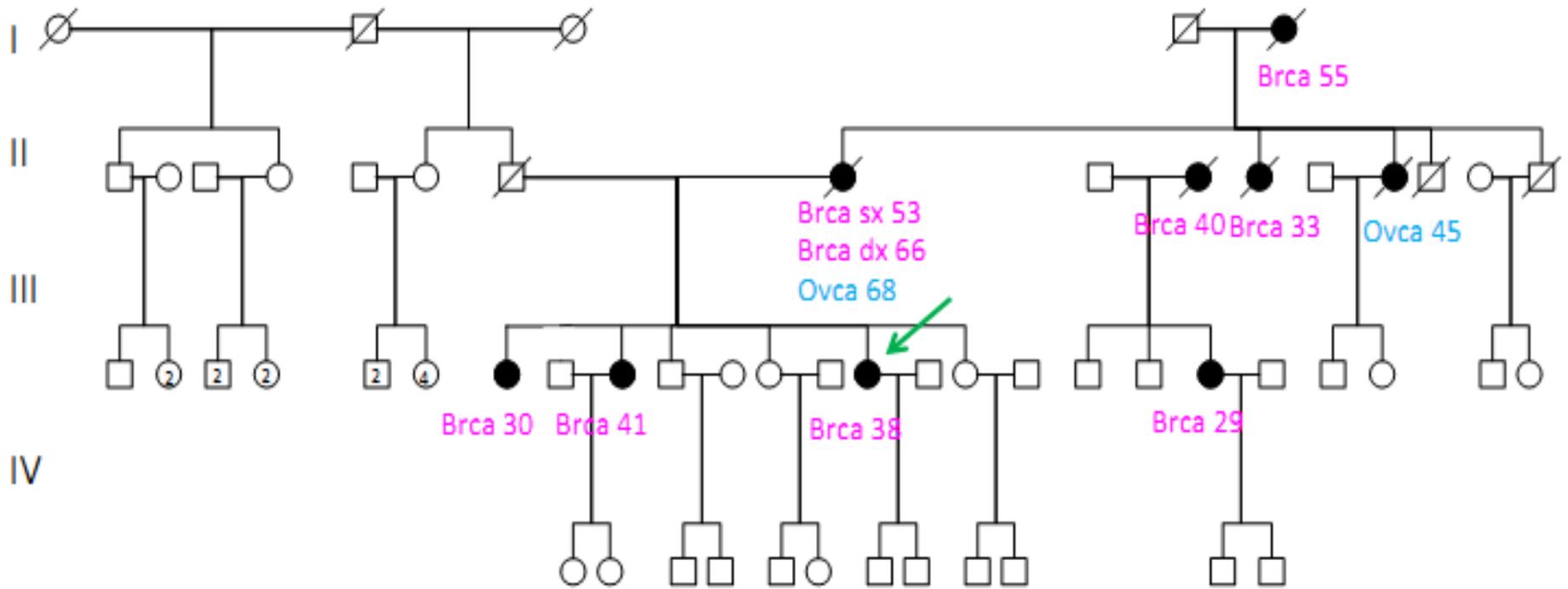
# BRCA 1-BRCA2: Analisi mediante sequenziamento

- Purificazione prodotto di PCR tramite Exosap
- Amplificazione di sequenza con Bigdye v3.1
- Purificazione (colonne centrisep)
- Denaturazione e risospensione del campione in Hi-Di Formamide
- Elettroforesi capillare su Genetic Analyzer 3500
- Elaborazione ed interpretazione dei dati ottenuti mediante SeqScape v.2.7 Software



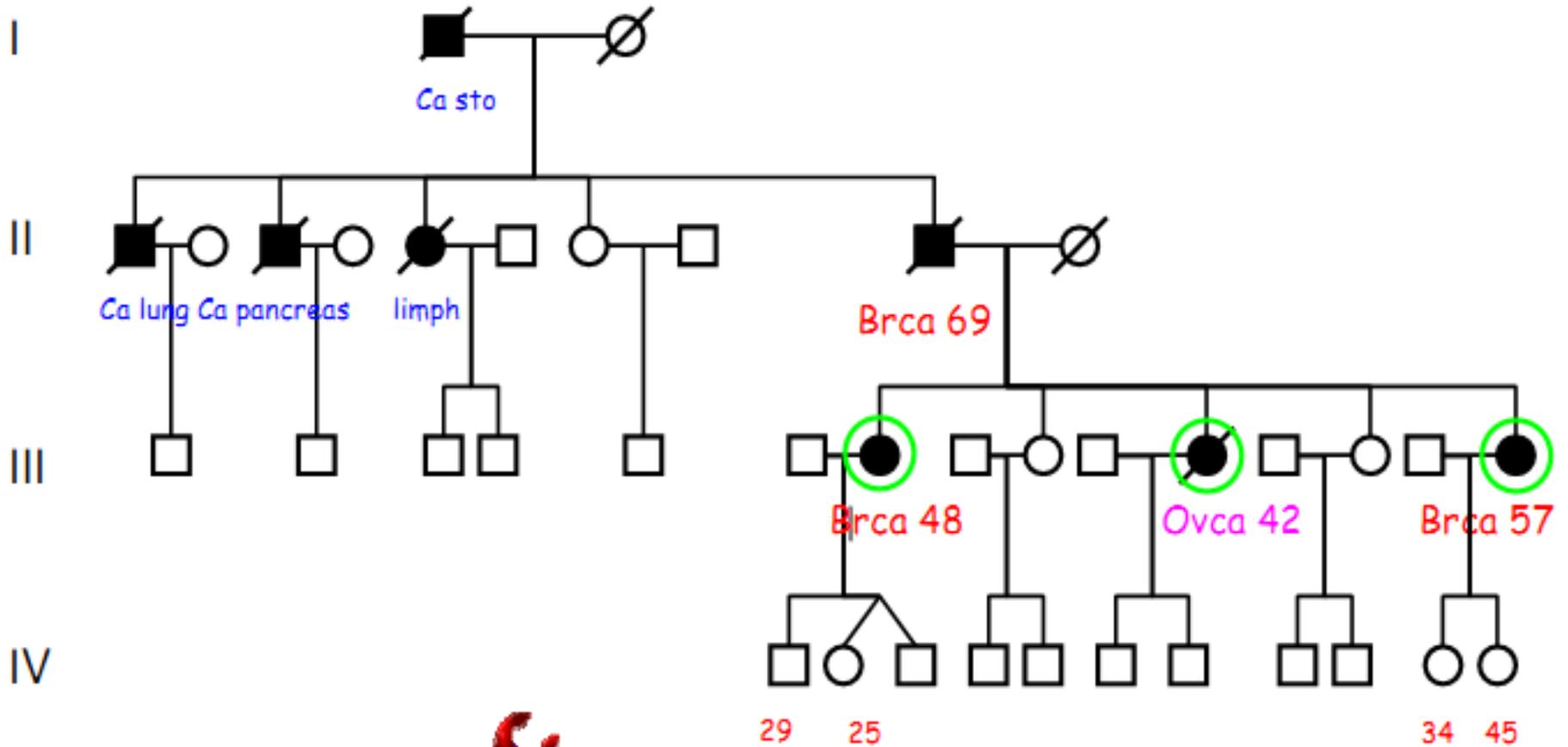
GAA>TAA  
Glu → Stop

# BRCA1+



BRCA1  
5382insC

# BRCA2+



**BRCA2 mut 432delA**

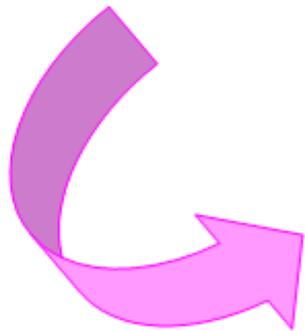
# BRCA1 e BRCA2: tipo di mutazione sito specifico

**Table 3.** BRCA genes in hereditary and sporadic ovarian cancer - a comparative approach.

BRCA1 chromosom location: 17q21		BRCA2 chromosom location: 13q12-13	
high penetrance: a single allelic mutation initiates carcinogenesis			
incidence in general population: 1/500 - 1/1000		incidence in general population: still imprecisely delimited	
HEREDITARY TYPE	SPORADIC TYPE	HEREDITARY TYPE	HEREDITARY TYPE
Mechanism: genetic → mutation • risk correlated with location of mutation: high, for central position (nucleotides 2401-4190)	Mechanism: epigenetic and somatic alterations: → hypermethylation promotion → loss of heterozygosity → haploinsufficiency AKT pathway PTEN pathway	Mechanism: genetic → mutation • risk correlated with location of mutation: high, for ovarian cancer cluster region - OCCR (nucleotides 3059-6629)	WNT2, SFP4 pathways
risk for carriers: 40-50%	no carriers	risk for carriers: 20-30%	
age of diagnosis: 50 years	age of diagnosis: 60 years	age of diagnosis: 60 years	
genetic syndromes • ovarian cancer syndrome • hereditary breast-ovarian cancer syndrome	no genetic syndromes	genetic syndromes • ovarian cancer syndrome • hereditary breast-ovarian cancer syndrome	
histology: type II • high-grade serous OC • high-grade endometrioid OC • mixed malignant mesodermal tumors • carcinosarcomas • undifferentiated OC	histology "silent" BRCA1 profile can be correlated with a histologic subtype	histology: type II • high-grade serous OC • high-grade endometrioid OC • mixed malignant mesodermal tumors • carcinosarcomas • undifferentiated OC	



Il test genetico viene proposto dal genetista,  
dal medico oncologo o ginecologo secondo  
specifici criteri di eleggibilità



in un contesto di  
Consulenza Genetica  
Oncologica (CGO)



# Test genetico: quale utilità?

Per la paziente



**TEST DIAGNOSTICO**



- diagnosi di ereditarietà
- stima del rischio
- modificazione del trattamento

Per i famigliari



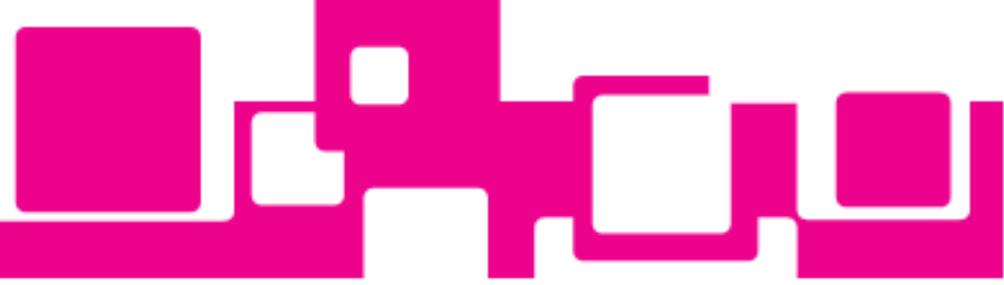
**TEST PREDITTIVO**



- identificazione dei portatori
- inclusione dei portatori nei percorsi di prevenzione **alti rischi**

**Nel 2014 EMA approva l'inibitore di PARP.....**

**TEST PREDITTIVO** di risposta al trattamento con inibitori di PARP in pazienti con **carcinoma dell'ovaio metastatico**



# Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nei percorsi assistenziali e terapeutici delle pazienti con carcinoma ovarico

*A cura del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP*

*Maria Angela Bella, Ettore Capoluongo, Paola Carrera, Claudia Clemente,  
Nicoletta Colomba, Laura Cortesi, Gaetano De Rosa, Maurizio Genuardi,  
Stefania Gari, Valentina Guarneri, Antonio Marchetti, Paola Marchetti,  
Nicola Normanna, Barbara Pasini, Sandra Pignata, Carmine Pinto,  
Paolo Radice, Enrico Aicevuto, Antonio Russo, Pierosandra Tagliaferri,  
Pierfrancesco Tassone, Mauro Truini, Liliana Varesco*

Luglio 2015



Test BRCA come test predittivo  
di efficacia alle terapie  
antitumorali

Tipologie di Test BRCA

Interpretazioni delle varianti  
geniche BRCA

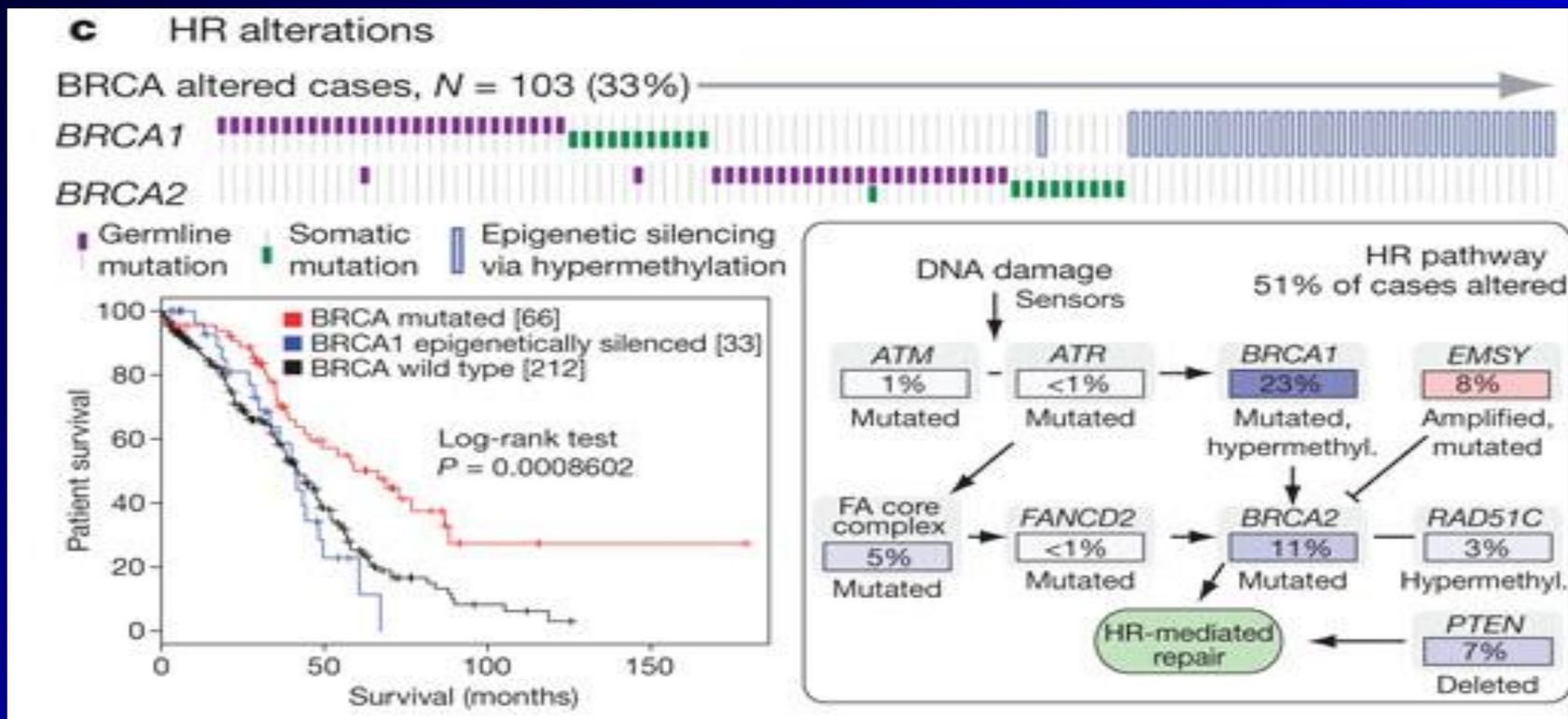
Disponibilità del test BRCA e  
gestione dei risultati nel percorso  
assistenziale/ terapeutico.

Elementi indispensabili del  
consenso informato

# Test genetico: quale è il campione da analizzare ?

- ❑ Il test **BRCA su sangue** periferico è in grado di evidenziare le varianti costituzionali/ereditarie, cioè trasmissibili ai figli (50% di probabilità per ogni figlio/a).
- ❑ Il test **BRCA eseguito su tessuto tumorale** è in grado di evidenziare sia le varianti acquisite per mutazione somatica sia quelle costituzionali; la natura della variante identificata (costituzionale o somatica) deve essere stabilita analizzando un tessuto normale (sangue, altro tessuto).

# Test genetico: mutazioni somatiche o germinali?



## Germline:

BRCA1:9%

BRCA2:8%

## Somatic:

BRCA1:3%

BRCA2:3%



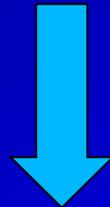
## Promoter methylation:

BRCA1:11%

# Test genetico: tipologia di test

Attualmente, il test BRCA su sangue periferico per la ricerca di mutazioni ereditarie è eseguito in molti laboratori attraverso metodologie ampiamente validate quale il **sequenziamento Sanger** o in **fase di validazione** come il sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing-NGS).

Non esistono ad oggi metodiche standardizzate per l'esecuzione e l'interpretazione dell'analisi **BRCA sui tessuti tumorali**.



Per un'adeguata esecuzione del test è necessaria per i laboratori una comprovata validazione ed un **controllo di qualità esterno** del test proposto.

# BRCA nel Tessuto: KIT DISPONIBILI



## Tumour *BRCA* mutation testing methods

Few *BRCA* service labs offer routine clinical testing for tumour *BRCA* screening<sup>1-3</sup>

Germline *BRCA* testing methods may need to be redeveloped to function on low-quality DNA from FFPE tumour tissue<sup>4</sup>

DNA from tumour samples may be of a poor quality and low yield<sup>4</sup>

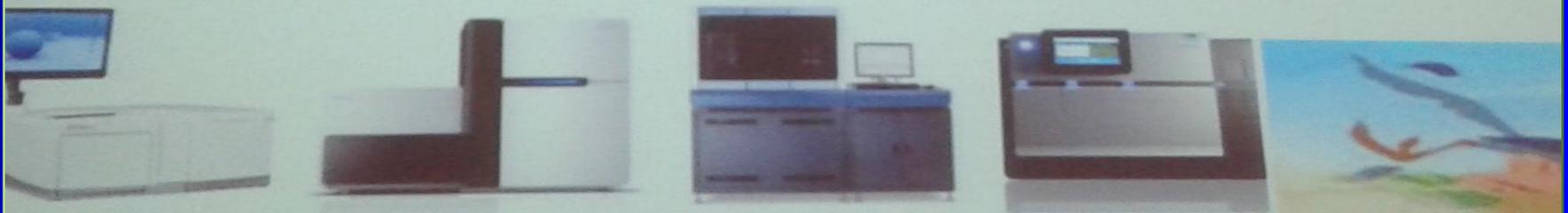
NGS is a suitable technology for the analysis of tumour material<sup>4</sup>

### Commercially available *BRCA* kits developed for use on tumour samples

Method	Details
<i>BRCA</i> Mastr Dx for frozen tumour material (CE-KIT) <sup>1</sup>	Supplier: Multiplicom NGS method for frozen tissue only
GeneRead DNaseq Targeted Exon Enrichment Breast Panel (RUO) <sup>2</sup>	Supplier: QIAGEN NGS method for use on FFPE material The Human Breast Cancer GeneRead DNaseq Targeted Panel is a collection of multiplexed PCR primer assays for targeted enrichment of the coding (exonic) regions of the 44 genes most commonly mutated in human breast cancer samples
Ion AmpliSeq™ <i>BRCA</i> 1 and <i>BRCA</i> 2 Panel (RUO-IVD) <sup>3</sup>	Supplier: Life Technologies NGS method

1. [www.multiplicom.com/products](http://www.multiplicom.com/products); 2. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com); 3. [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com); 4. Bourgon R, et al. Clin Cancer Res 2014;20:2080-91.

## RAPID GENETIC TESTING BY NGS



# Test genetico:criteri per interpretazione

Criteri specifici per l'interpretazione del significato clinico delle varianti costituzionali dei geni BRCA sono stati recentemente sviluppati dall'Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (**ENIGMA**) e sono disponibili sul sito Internet del consorzio (<http://enigmaconsortium.org>).

Raccolta sistematica e centralizzata delle varianti BRCA osservate, al fine di contribuire alla miglior classificazione delle stesse.

Inoltre i laboratori devono indicare **nel referto il significato clinico della variante genetica BRCA** identificata e elencare le informazioni essenziali utilizzate per la classificazione.

# Test genetico: criteri per interpretazione

Classe	Descrizione	Strategie di Sorveglianza
1	Non patogena (nessun significato clinico) $p < 0.001$	Sorveglianza come da risultato negativo
2	Bassa patogenicità (Basso significato clinico) $0.001 < p > 0.049$	Sorveglianza come da risultato negativo
3	Significato clinico incerto $0.05 < p > 0.949$	Strategia scelta in base alla storia familiare ed altri fattori di rischio
4	Potenzialmente patogena $0.95 < p > 0.99$	Sorveglianza per pazienti ad alto rischio
5	Alta Patogenicità $p > 0.99$	Sorveglianza per pazienti ad alto rischio

# TEST GENETICO: COME INTERPRETARE IL RISULTATO.....

**POSITIVO** = mutazione "patogenetica" identificata  
(informativo)



## **Penetranza incompleta**

non tutti i portatori di mutazione svilupperanno la malattia

## **Fenotipo variabile**

la storia clinica della malattia può essere molto diversa tra portatori della stessa mutazione germinale

Mutazioni diverse nello stesso gene possono conferire differente rischio di malattia

# TEST GENETICO: COME INTERPRETARE IL RISULTATO.....

**"UV"** di significato ignoto  
(non informativo)

- controlli "normali" (centinaia !)
- test o "ipotesi" funzionali
- analisi di co-segregazione
- Software di predizione basati sul modelling molecolare o sulla conservazione del residuo
- analisi di co-occorrenza con una mutazione deleteria (consultare i database: BIC, LOVD, UMD)

# TEST GENETICO: COME INTERPRETARE IL RISULTATO.....

**NEGATIVO** =nessuna mutazione patogenica identificata (non conclusivo)

Ma.....

- errore di reclutamento ?
- mutazione in un gene diverso ?

# Test genetico rapido in NGS: eterogeneità genetica

- Illumina GAIx platform
- 708 pazienti scrinati
- Identificati 14 nuovi geni coinvolti nello sviluppo di BHOC

European Journal of Human Genetics (2014), 1–9  
 © 2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved 1018481314  
 www.nature.com/ejhg

ARTICLE

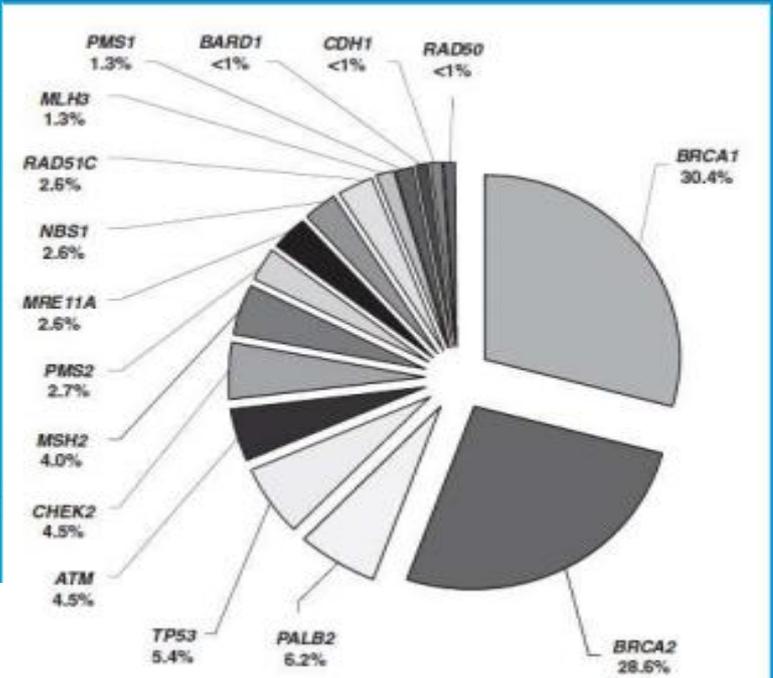
## Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes

Laurent Castéra<sup>1,2</sup>, Sophie Krieger<sup>1,2,3</sup>, Antoine Rousselin<sup>1</sup>, Angéline Legros<sup>1</sup>, Jean-Jacques Baumann<sup>1</sup>, Olivia Bruet<sup>1</sup>, Baptiste Brault<sup>1</sup>, Robin Fouillet<sup>1</sup>, Nicolas Goardon<sup>1</sup>, Olivier Letac<sup>1</sup>, Stéphanie Baert-Desurmont<sup>2,4</sup>, Julie Tinat<sup>2,4</sup>, Odile Bera<sup>5</sup>, Catherine Dugas<sup>6</sup>, Pascaline Berthet<sup>7</sup>, Florence Polycarpe<sup>7</sup>, Valérie Layet<sup>8</sup>, Agnes Hardouin<sup>1,2</sup>, Thierry Frebourg<sup>2,4,9</sup> and Dominique Vaur<sup>1,2</sup>

BRCA1/2 testing

Multigene testing

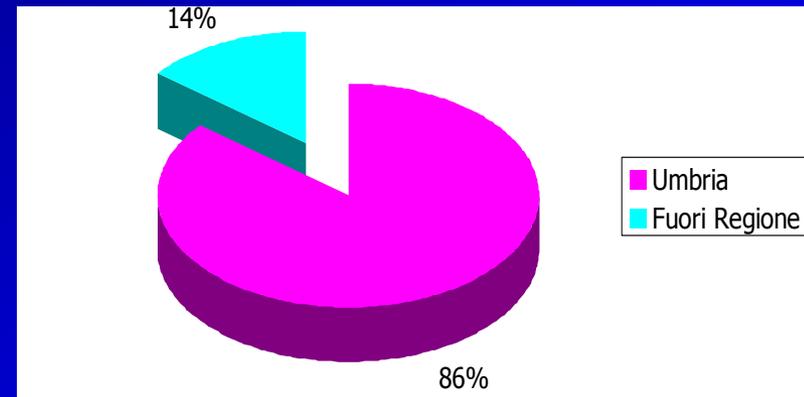
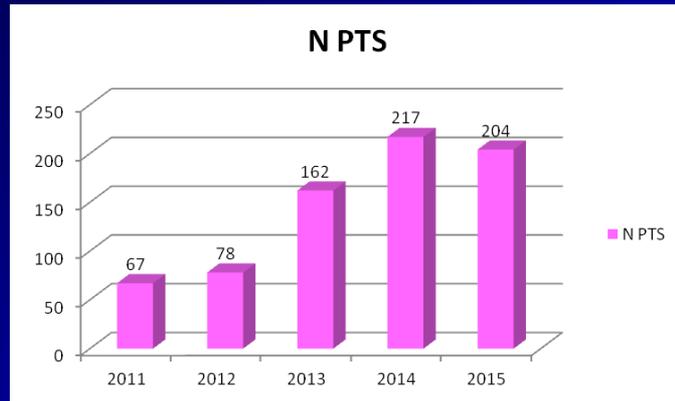
Legend:  
 ■ Non pathogenic  
 ■ Pathogenic  
 ■ VUS



# LA NOSTRA ESPERIENZA IN UMBRIA....

**728 pazienti** sottoposte ad analisi mutazionale dei geni BRCA 1 e 2 (2011-2015)

**Laboratorio certificato:**accreditamento istituzionale (D.D.n.1067 del 13-2-14)



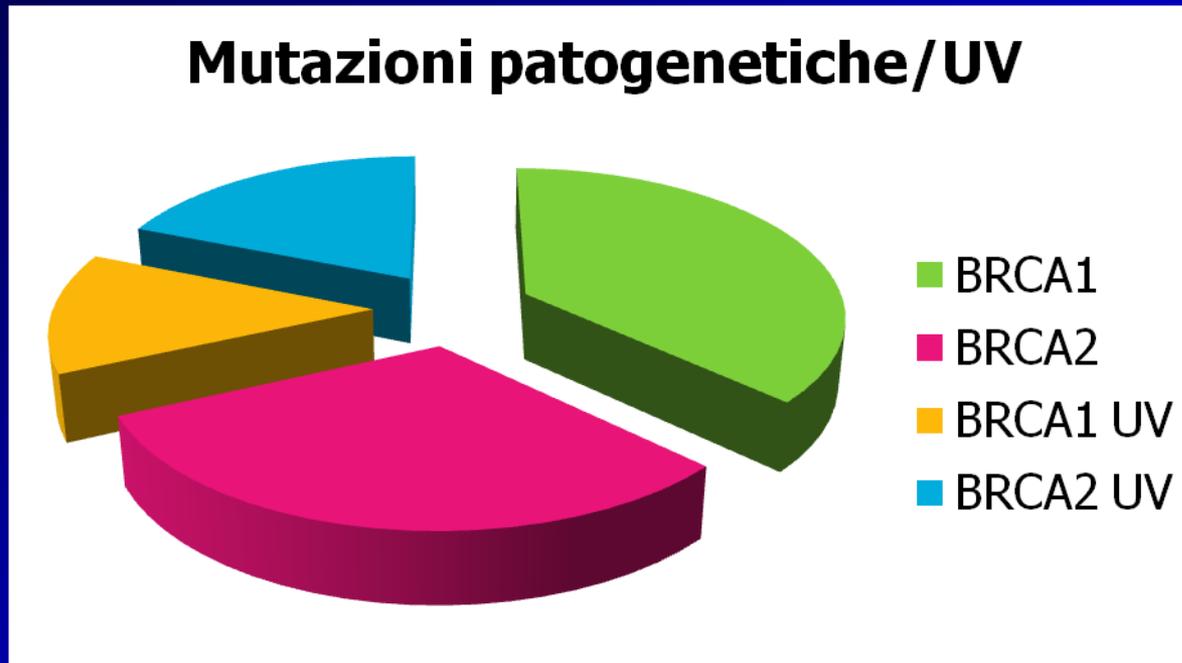
512 pz: Cr. Mammella

86pz: Cr. Ovaio

17 pz: Cr mammella+Cr Ovaio

113 pz: senza malattia con storia familiare (33 famiglie)

# LA NOSTRA ESPERIENZA IN UMBRIA....



Sono state identificate **154** (21%) mutazioni di cui 105 mutazioni significative (**57 BRCA1+** e **48 BRCA2+**) e 49 mutazioni UV (**20 BRCA1+** e **29 BRCA2+**)

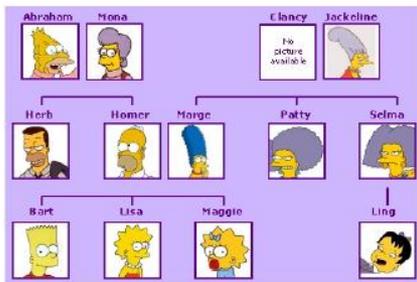
# BRCA1: TIPO DI MUTAZIONI

Esone	Frameshift	Non sense	Missense	Intron (IVS)	UV
2	68_69delAG, p.Glu23Val fs (5)				
3				c. 134+2T>C (splice) (1)	p.Cys39Tyr (1)
5			p.Cys61Gly (7)		
11	c.2296-2297delAG p.Ser766Terfs (3) c.843_846delCTCA p.Ser282Terfs (1) c.737delT p.Leu246Terfs (1) c.1953dupG p.Lys652Glu fs(1)				p.His888Tyr (4) p.Ile591Thr (1) p.Asp245Val(1) p.Ile1237Met(1) p.Ile591Thr(1)
12		p.Glu1373Ter(1)			p.Val1378Ile(1)
14			p.Arg1495Met (2)		
16	c.4964del19 (stop1670)(2)				p.Ala1615Thr (1)
17					c.5062_5064delGTT p.Val1688del(4)
18			p.Ala1708Glu(2) p.Arg1699Trp(1)		p.Arg1699Glu (2)
19				c.5193+2delT (splice)(1)	
20	5266dupC p.Gln1756Profs (5)				p.Val1736Gly (2)
21					p.Phe1761ser (1)
23		p.Trp1815Ter (1)			

# BRCA2: TIPO DI MUTAZIONI

Esone	Frameshift	Non sense	Missense	Intron (IVS)	UV
2				c.67+2T>A (splice) (1)	c.67+1G>A (1) c.-39-12_-39-10delTCT(1) c.67+62T>G (1)
3					c.68-7T>A (3)
10					c.1909+12delT(2) p.Glu394Ala (1)
11	c.6468_6469delTC p.Gln2157Ilefs (1) c.4284dupT p.GlnSerfs(1) c.3680_3681delTG p.Leu1227Glnfs(1)	p.Ser1970Ter (1)			p.Leu2106Pro (1) p.Glu1879Lys(2) p.Tyr2154Ser(2) p.Gly2044Ala(2) p.Asn1784fs(1) p.Lys1226Gln(1) p.His2147Gln(1)
13			p.Arg2336His (1)		
14					C7435+6G>A(2)
15		p.Arg2520Ter(1)			p.Arg2494Gln(1) p.Arg2502His(3) p.Arg2520Gln(2)
16	c.3680_3681delTG p.Leu1227Glnfs(1)				
18		p.Trp2725Ter(1)			
19				c.8487+1G>A(1)	
25					p.Tyr3092Cys(1)
26					p.Ala3205Leu(1)

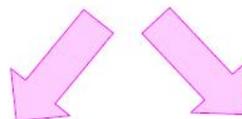
# LA NOSTRA ESPERIENZA IN UMBRIA....



33 Famiglie  
con mutazione  
BRCA



86 test predittivi nei famigliari



50

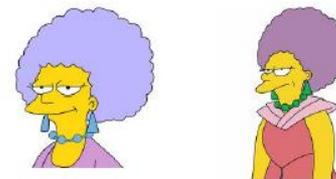
Test predittivi positivi

36 donne e 6 maschi



36

Test predittivi wt



# Conclusioni

- ❑ Il test richiede la collaborazione di tutte le professionalità coinvolte: Oncologo medico, genetista, biologo molecolare, patologo.
- ❑ L'attuale standard prevede l'analisi delle mutazioni germinali, ma lo sviluppo di metodiche di analisi del tessuto tumorale è indispensabile per garantire l'accesso al trattamento con inibitori di PARP e tutte le pazienti potenzialmente sensibili
- ❑ La metodica di riferimento è il sequenziamento di Sanger che probabilmente sarà sostituito nel prossimo futuro dalla NGS
- ❑ E' necessario che le società scientifiche aggiornino costantemente le linee guida e che organizzino controlli di Qualità a cui i laboratori sono chiamati a partecipare.

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE



[oncolab@hotmail.com](mailto:oncolab@hotmail.com)