

Strategie di medicina preventiva in genetica oncologica

E. Ricevuto^a, Z.C. Di Rocco^a, R. Bisegna^a, F. Casilli^a, T. Sidoni^a,
C. Ficorella^a, P. Marchetti^a, S. Martinotti^b

^a *Oncologia Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di L'Aquila*

^b *Patologia Clinica, Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università G. D'Annunzio, Chieti*

Scansione molecolare del gene BRCA1 mediante FAMA (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis) e QMPFSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments)

L'evidenza sperimentale del coinvolgimento specifico dei geni BRCA1 e BRCA2 nella patogenesi della maggior parte delle sindromi di predisposizione familiare al carcinoma della mammella e dell'ovaio^{1,2} e la prospettiva di poter individuare i soggetti predisposti, a rischio di sviluppare tali neoplasie e di elaborare strategie preventive innovative ha indotto negli ultimi 5 anni il nostro gruppo di ricerca a sviluppare una strategia diagnostico-molecolare idonea alle caratteristiche dei geni coinvolti, ovvero dotata, in primo luogo, di una ottimale accuratezza diagnostica.

Il panorama diagnostico-molecolare proponeva, allora, le seguenti metodiche manuali di prima generazione caratterizzate dall'effettuazione dell'analisi genetica su DNA o RNA³:

Sequenziamento Diretto - basata su una reazione di polimerizzazione alla quale è sottoposto il DNA da testare (genomico o retro-trascritto da mRNA per effetto di reazione con trascrittasi inversa), consente di leggere la sequenza nucleotidica del gene analizzato e di riconoscere una mutazione per confronto della sequenza del DNA campione rispetto alla sequenza di controllo del gene normale;

Metodiche di Scansione Molecolare (SSCP, DGGE, PTT) - basate sul riconoscimento del campione mutato per effetto della modificazione di specifiche caratteristiche fisiche e/o chimiche dell'acido nucleico o della proteina:

- Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP): polimorfismo di conformazione del DNA a singolo filamento;
- Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): modificazioni conformazionali del DNA a doppio filamento, in particolare delle molecole di DNA-heteroduplex (catene complementari di DNA appartenenti ad alleli differenti, uno dei quali portatore della mutazione);
- Protein Truncation Test (PTT): modificazioni del peso molecolare della proteina tradotta in vitro;
- Chemical Cleavage Mismatch (CCM): modificazio-

ni di reattività chimica dei nucleotidi coinvolti nella mutazione per effetto della alterata ibridizzazione (misappaiamento o "mismatch") delle catene di DNA-heteroduplex che espone maggiormente tali nucleotidi all'azione del reagente chimico.

Nell'ambito delle procedure di scansione molecolare, quelle basate sul CCM presentano il maggior livello di accuratezza diagnostica.

Negli ultimi anni lo sviluppo di procedure semiautomatiche per l'effettuazione dell'analisi genetica (sequenziamento o scansione), ha consentito l'automatizzazione diagnostica e analitica mediante strumenti, quali:

- Sequenziatori Automatici di DNA - basate sull'elettroforesi;
- Denaturant High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) - cromatografi specializzati nella separazione di DNA-heteroduplex su colonna;
- "Micro-Chip" - sistemi di sequenziamento genico automatizzato su micropiastre;
- MALDI-TOF, SELDI-TOF - spettrometri di massa.

L'identificazione dei geni BRCA1 e BRCA2 si è inserita in questo scenario di possibilità e di innovazioni diagnostiche molecolari.

Il nostro gruppo di ricerca ha considerato BRCA1 come modello di gene di grandi dimensioni ed elevata complessità strutturale sul quale sviluppare una strategia diagnostico-molecolare semiautomatizzata. L'obiettivo prioritario è stato quello di ottenere un'accuratezza diagnostica ottimale per consentire l'applicazione routinaria e clinica dell'analisi genetica, che potesse fornire garanzie di fattibilità su ampia scala, a costi limitati ed in tempi contenuti. Il gene BRCA1 presenta le seguenti caratteristiche strutturali:⁴ locus genomico, 81 kb; 23 esoni di cui l'esone 11 di grandi dimensioni (3426 nucleotidi, 63% della regione codificante); DNA codificante di 5592 nucleotidi; elevata densità di sequenze ripetitive *Alu* (41,5%).

La FAMA (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis) è una procedura di scansione molecolare semiautomatizzata del DNA (elettroforesi mediante sequenziatore automatico di DNA) basata sul clivaggio chimico del misappaiamento che si determina in molecole di DNA-heteroduplex per effetto di una mutazione. Rispetto al CCM, la differente marcatura fluorescente specifica

per ciascun filamento di DNA (catena senso marcata al 5' con fluorescenza FAM; catena anti-senso marcata al 5' con fluorescenza HEX); consente, non solo di riconoscere la presenza di una mutazione, ma anche di localizzarne la posizione e caratterizzarne la tipologia.⁵

L'applicazione della FAMA per il riconoscimento di mutazioni del gene BRCA1⁶ si caratterizza per due aspetti principali: 1) semplifica l'analisi mutazionale di geni con numerosi esoni (di piccole e grandi dimensioni) mediante l'applicazione di condizioni omogenee di amplificazione; 2) garantisce una accuratezza diagnostica ottimale per lo screening routinario di famiglie ad alto rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio.

Tale strategia diagnostica si caratterizza per: analisi di DNA genomico, previa doppia amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction); disegno di sonde oligonucleotidiche (primers) con code "universali" fluorescenti che consente l'utilizzazione di una sola coppia di primers per marcare in fluorescenza il campione; scansione dell'intera regione codificante del gene BRCA1 in 23 ampliconi (segmenti di DNA amplificati mediante PCR), comprendenti 7 ampliconi di dimensioni >1 kb; scansione dell'esone 11 mediante 4 ampliconi di dimensioni >1 kb.

La FAMA è stata di recente applicata anche al riconoscimento delle mutazioni del gene BRCA2.⁷

L'accuratezza diagnostica nel riconoscimento della mutazione avviene per: rilevazione visiva diretta (immagine computerizzata del gel elettroforetico) di segnali fluorescenti, in relazione alla catena di DNA ed alla tipologia della mutazione, che coinvolgono i nucleotidi mutati e quelli destabilizzati adiacenti alla mutazione; rilevazione di picchi ad elevata intensità di fluorescenza lungo la linea di corsa elettroforetica, previa sovrapposizione delle linee di corsa di differenti campioni (elettroferogrammi).

Elementi peculiari della FAMA da un punto di vista diagnostico sono: 1) la scansione analitica puntuale della sequenza genica che consente di localizzare e prevedere la tipologia della mutazione, limitando la sequenza di conferma all'analisi di una ristretta regione di DNA; 2) elevato potere di risoluzione diagnostica della mutazione, specie rispetto alla sequenza, di non poca rilevanza in un contesto clinico multidisciplinare per la migliore condivisione del dato clinico e lo sviluppo di una adeguata integrazione polispecialistica; 3) capacità di differenziare multiple mutazioni e polimorfismi lungo la scansione di una stessa regione di DNA; 4) discriminazione selettiva di singole mutazioni caratterizzate da specifici segnali fluorescenti, che differiscono per numerosità e catena di DNA coinvolta in relazione alla posizione ed alla tipologia della mutazione ("FAMA signatures").

La rilevanza della discriminazione selettiva della FAMA riguarda in particolare l'esone 11, frequentemente mutato, e l'esone 16, secondo in ordine di lunghezza (311 nucleotidi) nel gene BRCA1. Una recente analisi preliminare delle scansioni FAMA dell'esone 16 effettuate su probande a rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio selezionate presso l'U.O. Oncologia Medica dell'Università dell'Aquila ha permesso di distinguere selettivamente le seguenti mutazioni: la variante allelica A4956G

(Ser1613Gly) riscontrata con una frequenza del 23% (28/122 alleli); la missense rara G5075A (Met1652Ile), dal significato funzionale sconosciuto, riscontrata con una frequenza del 2,5% (3/122) ed osservata sempre in associazione con la variante allelica Ser1613Gly; la mutazione predisponente 5083del19 (stop1670), caratterizzata da un pattern specifico di segnali fluorescenti riproducibili in 5/7 probandi analizzati (1 affetta e 4 non affetti appartenenti alla stessa famiglia). Inoltre, mediante la propria FAMA signature, questa mutazione può essere univocamente identificata e differenziata, rispetto ad altre mutazioni, semplicemente osservando il gel elettroforetico.

Recentemente è stato dimostrato, in collaborazione con i colleghi dell'Oncologia Medica dell'Università della Magna Grecia, dell'Istituto Tumori di Milano e del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, che le famiglie portatrici della mutazione 5083del19 condividono l'origine calabrese e la segregazione di uno stesso allele BRCA1.⁸ Ciò rende altamente probabile che tale mutazione predisponente possa riscontrarsi in una buona parte delle pazienti affette da carcinoma della mammella e dell'ovaio ed in una piccola parte della popolazione calabrese (effetto "founder"). Pertanto, il riconoscimento rapido, specifico, di tale mutazione può essere effettuato su ampia scala e consentire lo sviluppo di adeguate strategie di prevenzione del carcinoma della mammella e dell'ovaio.

Altro aspetto mutazionale importante è dato dai riarrangiamenti cromosomici interstiziali (ICD - Interstitial Chromosomal Deletions), che rappresentano il 5-10% delle alterazioni strutturali del gene BRCA1. Ad oggi sono circa una trentina i diversi riarrangiamenti di BRCA1 riportati in letteratura (Tabella I) distribuiti lungo l'intera sequenza del gene.

Tra le più diffuse metodiche convenzionali utilizzate per la loro identificazione, ricordiamo il *Southern Blot* e la *RT-PCR*. Entrambe queste tecniche risultano inadeguate alla diagnostica molecolare routinaria, di un gene grande e complesso come BRCA1, perché indagine e scarsamente riproducibili.

Negli ultimissimi anni si sono sviluppate altre tecniche di analisi per l'identificazione di ICD, quali la *Real-Time PCR* (metodo strettamente quantitativo, costi elevati), il *DNA Combing* (difficile esecuzione, potere di risoluzione superiore a 2 kb) e la *MAPH* (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation*) (complicata da mettere a punto su un nuovo gene, grandi quantità di DNA richieste).

In questo ambito, la nostra attenzione si è quindi focalizzata sullo sviluppo di una strategia di analisi molecolare, che fosse accurata, affidabile, riproducibile, rapida nell'applicazione ed economica. E' stata quindi messa a punto la QMPSF-PCR (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments), strategia semiautomatizzata che prevede l'analisi completa del gene BRCA1 per amplificazione simultanea di più esoni, utilizzando coppie di primers (uno dei quali marcato con un fluorocromo) in 4 set di amplificazione multipla.⁹ Utilizzando la QMPSF-PCR abbiamo identificato, in cieco, svariate alterazioni strutturali note (micro e macro-delezioni, inserzioni di diversa lunghezza). Inoltre, la QMPSF-PCR ha consentito l'identificazione di due nuove delezioni, una che porta alla

Tabella I. ICD riportate in letteratura.

Esoni	Tipologia e Lunghezza ICD	Autore	Riferimento
1-2	Del. di 5 kb	Brown MA et al.	Hum Mutat 2002; 19:435-42
1-2	Del. di 37 kb	Puget N et al.	Am J Hum Genet 2002; 70:858-65
1-2	Del. di 3 kb	Montagna M et al.	Hum Mol Genet 2003; 12:1055-61
1-2	Del. di 14 kb	Swensen J et al.	Hum Mol Genet 1997; 6:1513-7
1-2	Del di ? kb	Unger MA et al.	Am J Hum Genet 2000; 67:841-50
1-22	Del di 161kb	Casilli F et al.	Hum Mutat 2002; 20:218-26
3	Del di 1kb	Payne SR et al.	Genes Chromosomes Cancer 2000; 29:58-62
3-8	Dupl di 17 kb	Gad S. et al. Casilli F et al.	Genes Chromosomes Cancer 2001; 31:75-84 Hum Mutat 2002; 20:218-26
8	Del di 1.5 kb	Hogervorst FBL et al.	Cancer Res 2003; 63: 1449-53
8-9	Del di 7 kb	Rohlf s EM et al.	Genes Chromosomes Cancer 2000; 28:300-7
8-13	Del di 23.8 kb	Puget N et al. Casilli F et al.	Cancer Res 1999; 59:455-61 Hum Mutat 2002; 20:218-26
9-19	Del di 36.4 kb	Montagna M et al.	Hum Mol Genet 2003; 12:1055-61
13	Del di 3.8 kb	Petrij-Bosch A. et al.	Nat Genet 1997; 17:341-5
13-15	Del di 11.6 kb	Gad S. et al.	J Med Genet 2001; 38:388-92
13-16	Del di 14 kb	Petrij-Bosch A. et al.	Nat Genet 1997; 17:341-5
13	Dupl di 6 kb	Puget N et al. Robinson MD et al. Hogervorst FB et al.	Am J Hum Genet 1999; 64:300-2 Genet Test 2000; 4:49-54 Cancer Res 2003; 63: 1449-53
15	Del di 3 kb	Puget N et al.	Cancer Res 1999; 59:455-61
15-16	Del di 5.6 kb	Casilli F et al.	Hum Mutat 2002; 20:218-26
17	Del di 3 kb	Montagna M et al.	Oncogene 1999; 18:4160-5
17	Del di 1 kb	Puget N et al.	Cancer Res 1997;57:828-31
17-19	Del di ? kb	Unger MA et al.	Am J Hum Genet 2000; 67:841-50
17-20	Del di 11.5 kb	Rohlf s EM et al.	Hum Genet 2000; 107:385-90
17-19	Dupl di 8.3 kb	Hogervorst FBL et al.	Cancer Res 2003; 63:1449-53
18-19	Del di 4.8 kb	Montagna M et al.	Hum Mol Genet 2003; 12:1055-61
18-20	Dupl di 5.6 kb	Casilli F et al.	Hum Mutat 2002; 20:218-26
20	Del di ~ 4 kb	Carson N et al.	Am J Hum Genet 1999; 65:A1610
20	Del 4.3 kb	Montagna M et al.	Hum Mol Genet 2003; 12:1055-61
20-22	Del 11 kb	Hogervorst FBL et al.	Cancer Res 2003; 63:1449-53
21-22	Del di 3.4 kb	Rohlf s EM et al.	Hum Genet 2000; 107:385-90
21-23	Dupl di 7.6 kb	Hogervorst FBL et al.	Cancer Res 2003; 63:1449-53
22	Del di 0.5 kb	Petrij-Bosch A. et al.	Nat Genet 1997; 17:341-5

perdita degli esoni 15 e 16, e l'altra che risulta essere la delezione più grande, finora riportata, a carico di BRCA1 e che si estende dall'esone 1 all'esone 22.

Sia la FAMA (analisi mutazionale puntiforme) che la QMPSF-PCR (riconoscimento di ICD) sono tecniche certamente indicate in un contesto di diagnostica clinica e molecolare per lo screening di geni di particolare complessità in considerazione dei risultati ottenuti in termini di accuratezza ed affidabilità, valutando la rapidità e l'economicità con cui queste tecniche di scansione molecolare ci permettono l'analisi del gene BRCA1. L'applicazione di entrambe queste tecniche conclude un iter di standardizzazione della diagnosi di inattivazione strutturale del gene BRCA1 e rappresenta una premessa sostanziale per l'identificazione sistematica ed accurata del coinvolgimento BRCA1 nella predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio.

Bibliografia

- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378:789-92.
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, *et al.* Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 1996; 6:1029-49.
- Cotton RG. Slowly but surely towards better scanning for mutations. *Trends Genet* 1997; 13:43-6.
- Verpy E, Biasotto M, Meo T, Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1873-7.
- Ricevuto E, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Gulino A, Marchetti P, Ficarella C, *et al.* Diagnostic strategy for analytical scanning of BRCA1 gene by Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis using large bifluorescently labeled amplicons. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1638-46.
- Pages S, Caux V, Stoppa-Lyonnet D, Tosi M. Screening of male breast cancer and of breast-ovarian cancer families for BRCA2 mutations using large bifluorescent amplicons. *Br J Cancer* 2001; 84:482-8.
- Baudi F, Quaresima B, Grandinetti C, Cuda G, Faniello C, Tassone P, *et al.* Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. *Hum Mutat* 2001; 18:163-4.
- Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, *et al.* Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutation* 2002; 20:218-26.