

#### METODICHE MOLECOLARI IN ANATOMIA PATOLOGICA: APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE E PROGNOSTICO-PREDITTIVE

#### INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI

#### A cura del Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

Coordinatori: Paola Francia di Celle, Tiziana Venesio

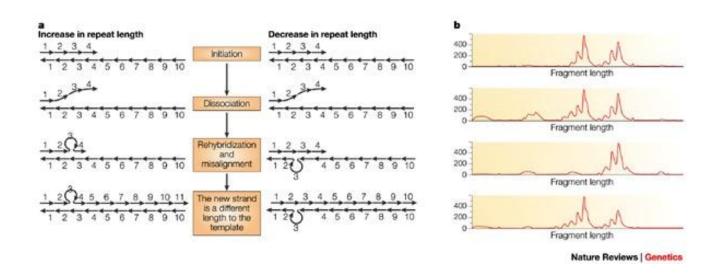
#### **Partecipanti:**

Renzo Boldrini, Susanna Cappia, Elda Feyles, Doriana Giustetto, Genny Jocollé, Antonella Maffè, Caterina Marchiò, Narciso Mariani, Raffaella Morettini, Sara Orecchia, Roberta Patetta, Anna Sapino, Stefano Taraglio, Silvana Ungari, Claudia Veggiani, Marco Volante.

#### I MICROSATELLITI

Sequenze ripetute mono-, di- e tetranucleotidiche sparse in regioni codificanti e non codificanti del genoma (es. poly A, poly T, dinucleotidi CA...)

Sequenze altamente polimorfiche, usate come marcatori

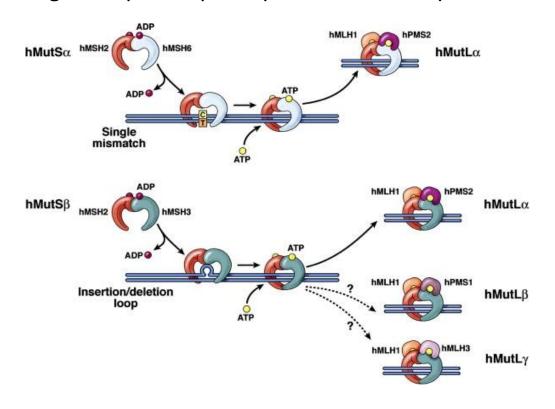


Alterazioni in queste sequenze sono coinvolte in diverse patologie, incluso il cancro

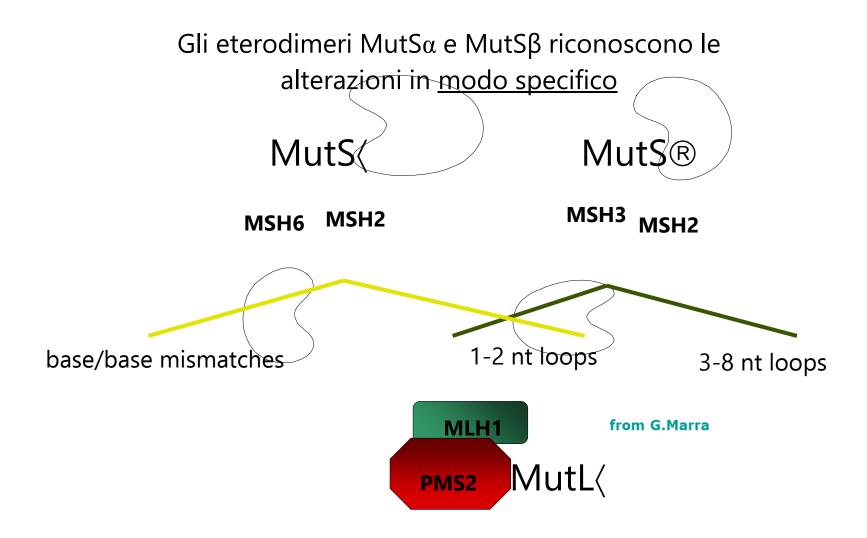
#### MISMATCH REPAIR (MMR)

Diversi sistemi multiproteici cooperano per riparare eventuali danni al DNA...

Errori dovuti a scorretta incorporazione delle basi durante la sintesi del DNA vengono riparati principalmente dalle proteine del MMR

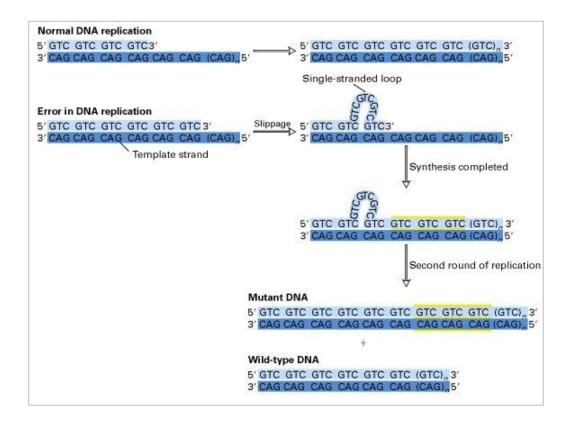


Le proteine del MMR formano dei complessi cooperanti nella riparazione del DNA

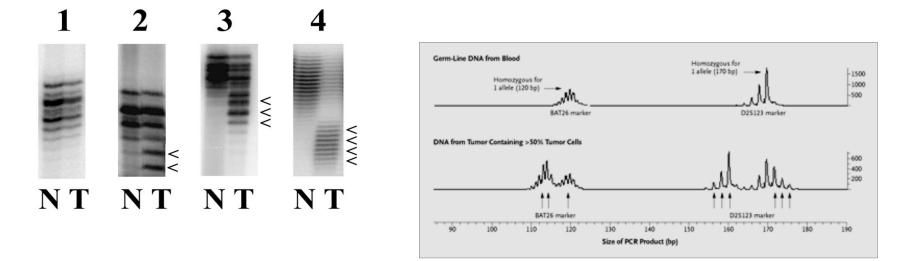


L'etrodimero MutL $\alpha$ , cooperando con PCNA, effettua il riparo muovendosi lungo la catena del DNA

La perdita di funzione di uno dei geni del MMR per mutazioni/alterazioni che coinvolgono entrambi gli alleli risulta in una perdita di funzione di uno degli eterodimeri rendendo inefficiente il MMR

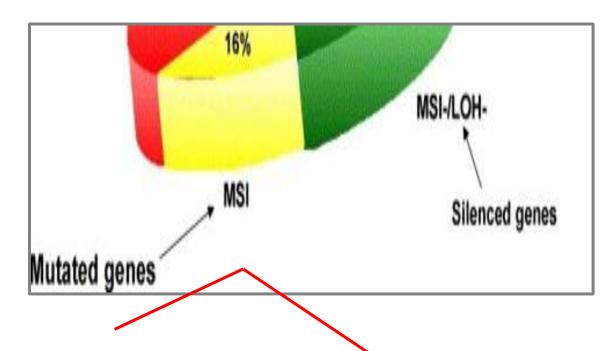


Un MMR inefficiente causa un alto tasso di errori nelle sequenze microsatelliti durante la duplicazione del DNA



Il fenotipo dei tumori instabili viene detto MSI Questa caratteristica è evidenziato per sequenza comparando il DNA tumorale (T) con quello normale del paziente (N)

# Instabilità microsatellitare è un fenotipo associato a diversi tipi di tumore Interessa il 15 % dei tumori del colon

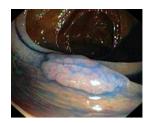


Sindrome di Lynch 20%

Inattivazione di uno degli alleli di un gene MMR per via germinale e successiva inattivazione somatica del secondo allele

Sporadici 80%

Inattivazione somatica di entrambi gli alleli di MLH1 per ipermetilazione







# ·E' la forma più comune di CCR ereditario (3-4%) ·Più generazioni colpite; sviluppo di CCR in età giovanile (<50 aa), prevalentemente localizzati nel colon destro

Sindrome di Lynch o HNPCC

·CCR sincroni e metacroni

 •Tumori extra-colici (c. endometrio, stomaco, apparato urinario e biliopancreatico)

·In linkage con le mutazioni germinali dei geni del MMR

#### 1. Mutazione germinale

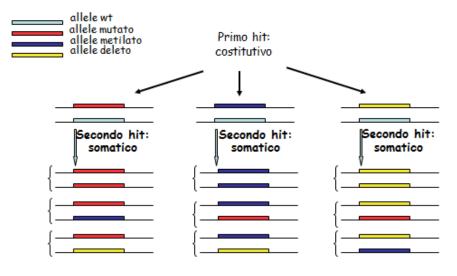
49% mutazioni di MLH1

39% mutazioni di MSH2

10% mutazioni di MSH6

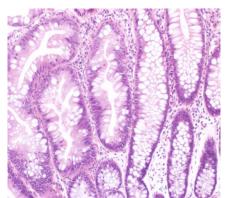
1-2% mutazioni di PMS2

#### 2. Mutazione somatica



### Tumori sporadici del colon caratterizzati da MSI





Presenza di <u>frequenti</u> adenomi serrati

Pathway Serrato

from J.Jass

- alta frequenza di mutazioni BRAF V600E
- alta frequenza di geni con promotori ipermetilati (CIMP)
- 1. Mutazione somatica

Metilazione del promotore di MLHI

2. Mutazione somatica Metilazione del promotore di MLHI

### Carcinogenesi dei tumori del colon con MMR inefficiente

Ereditario Vs. Sporadico

Ereditario ~ 20%

2nd mutational hit



Normal mucosa -> Adenoma -> Adenocarcinoma (HNPCC o Heterozygous MMR gene mutation Lynch Syndrome)

~ 18% mutazioni exon 3 di CTNBB1

Sporadico ~ 80%

**MLH1** silencing



Normal mucosa -> Serrated Adenoma -> Serrated adenocarcinoma

Inattivazione di MGMT

~ 50% mutazione BRAFV600E

## Carcinogenesi guidata dai geni del MMR-

Gene MMR inattivo

Alto tasso di mutazioni nelle regioni ripetute di geni bersaglio Progressione rapida

vantaggio proliferativo e diminuzione dell'apoptosi

#### TGF(Receptor II

AAG TGC ATT ATG AAG GAA AAA AAA AAG CCT GGT GAG Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu

BAX MSH3

TCF4 MSH6

Axin MBD4

IGF Receptor II MRE11

2-microglobulin ATR

POLD3 DNA-PK

1. I tumori MSI perdono l'espressione di β2 microglobulina e HLA I Incapacità di presentare come antigeni le nuove proteine mutate

<u>Diminuzione dell'immunosorveglianza</u> e accrescimento del tumore

2.I tumori MSI richiamano linfociti T citotossici (TIL)

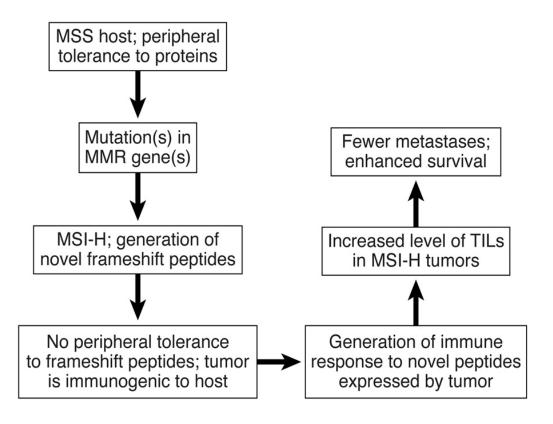


I pazienti con MSI presentano un'aumentato livello di linfociti CD3+ (b) in confronto ai non-MSI (a)

Vengono prodotti nuovi epitopi

Aumento dell'immunosorveglianza e contenimento del tumore

#### <u>Prognosi migliore</u> dei tumori MSI rispetto ai tumori non-MSI



Risposta immunitaria utilizzata in nuovi trials clinici sperimentali

Es. Utilizzo del MoAb anti PD1 o PDL-1:

blocco dell'attivazione della via apoptotica dei linfociti T

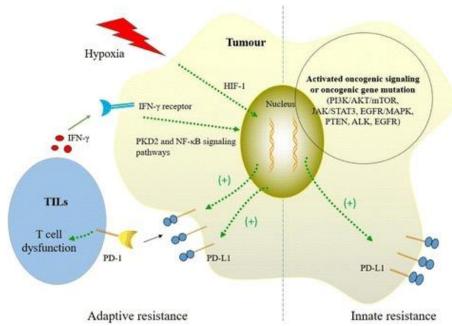


Esaurimento delle cellule T per apoptosi

Tumori MSI producono molti neoantigeni che richiamano TILs (CD4+/CD8+)



Inibizione dell'attività dei TILs



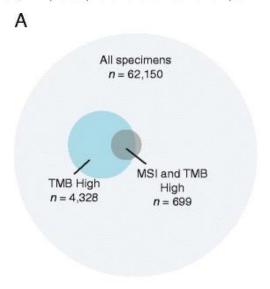
L'inibizione di PD-1 con i MoAbs causa l'attivazione dei TILs situati nelle zone marginali dei tumori

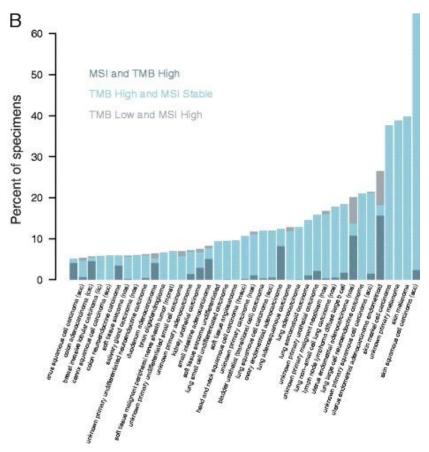
RESEARCH Open Access

# Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden



Zachary R. Chalmers<sup>1†</sup>, Caitlin F. Connelly<sup>1†</sup>, David Fabrizio<sup>1</sup>, Laurie Gay<sup>1</sup>, Siraj M. Ali<sup>1</sup>, Riley Ennis<sup>1</sup>, Alexa Schrock<sup>1</sup>, Brittany Campbell<sup>4</sup>, Adam Shlien<sup>4</sup>, Juliann Chmielecki<sup>1</sup>, Franklin Huang<sup>2</sup>, Yuting He<sup>1</sup>, James Sun<sup>1</sup>, Uri Tabori<sup>4</sup>, Mark Kennedy<sup>1</sup>, Daniel S. Lieber<sup>1</sup>, Steven Roels<sup>1</sup>, Jared White<sup>1</sup>, Geoffrey A. Otto<sup>1</sup>, Jeffrey S. Ross<sup>1</sup>, Levi Garraway<sup>2,3</sup>, Vincent A. Miller<sup>1</sup>, Phillip J. Stephens<sup>1</sup> and Garrett M. Frampton<sup>1\*</sup>





### Diagnosi dei tumori con MMR non funzionante

Analisi Instabilità Microsatellitare

Espressione proteine MMR: immunoistochimica

#### Analisi di instabilità microsatellitare

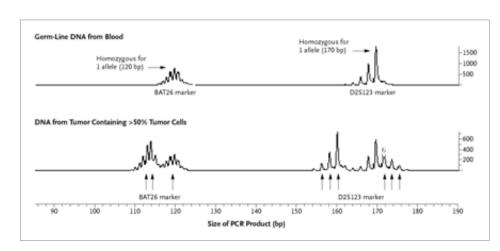
1998 Bethesda Consensus Conference

5 marcatori microsatellitari (mono- e dinucleotidici)

BAT25, BAT26 / D2S123, D5S346, D17S250

2/5 instabili MSI-H

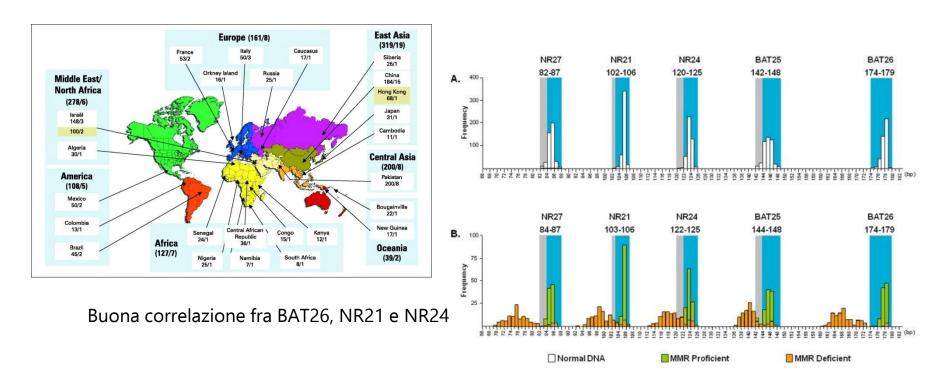
1/5 instabile MSI-L



#### <u>Limiti</u>

- ·Identifica il 70/75% degli instabili; poco specifico per l'instabilità dovuta a mutazioni su MSH6
  - ·I dinucleotidi, essendo polimorfici, necessitano del confronto con la linea germinale

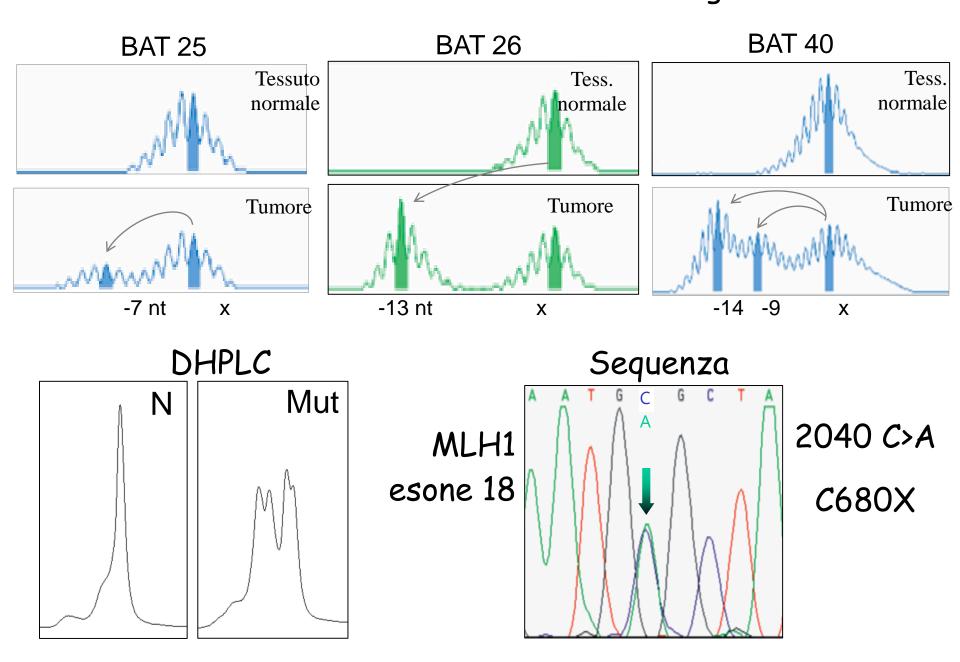
# 2004- 2006 Proposto un pannello con 5 mononucleotidi quasi-monomorfici BAT25 e BAT26 NR21, NR24 e NR27



#### <u>Vantagg</u>i

- •Identifica il 90-95% degli instabili, inclusa l'instabilità dovuta a mutazioni di MSH6
  - Non è necessario il confronto confronto con la linea germinale
     Limiti Non rileva i casi MSI-L

# Instabilita' microsatelliti nel tumore e mut. germinale MLH1



### Espressione proteine MMR: analisi immunoistochimica

La mancanza di espressione di una delle proteine indirizza l'analisi genetica



•hMLH1 e hMSH2 stabili in assenza di hPMS2 e hMSH6

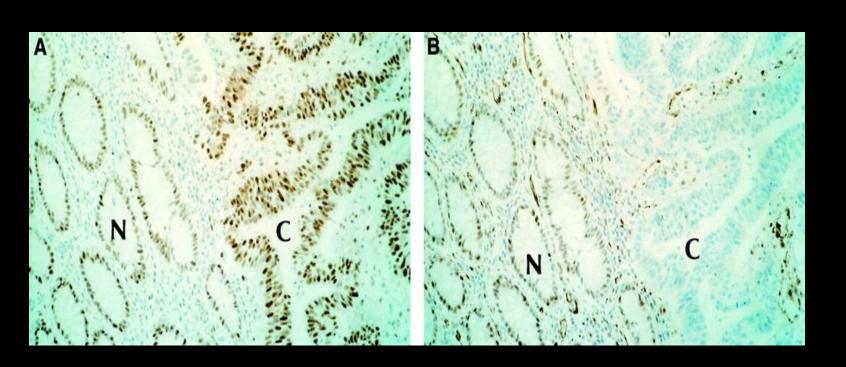


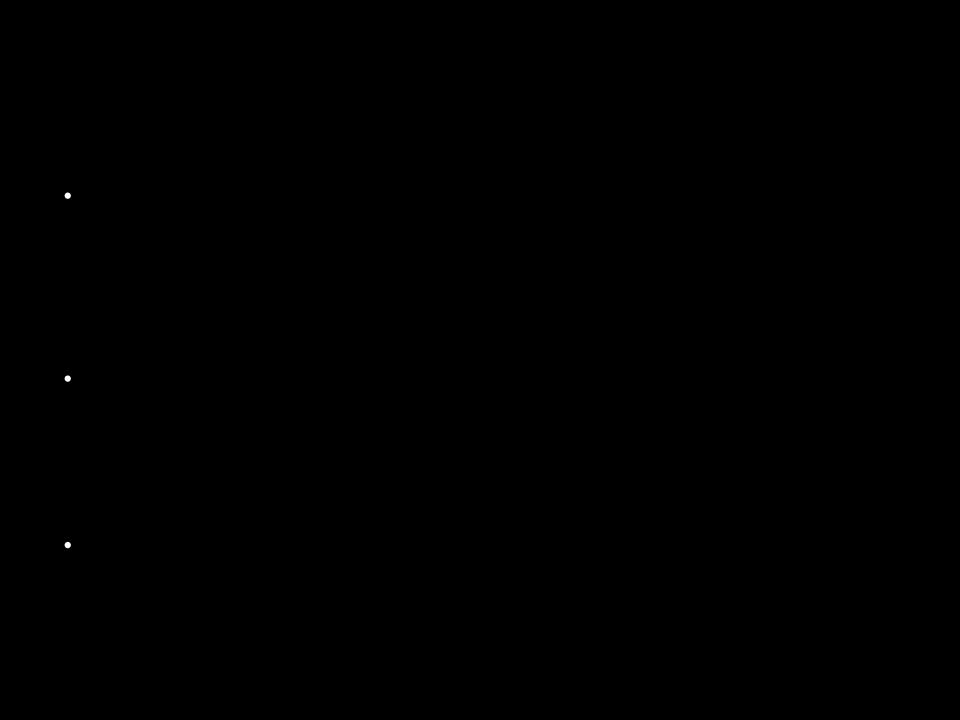
•Non è vero il contrario

hMSH2

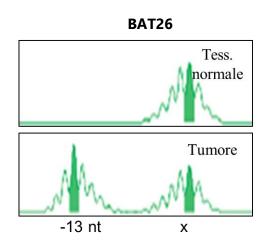
hMSH6

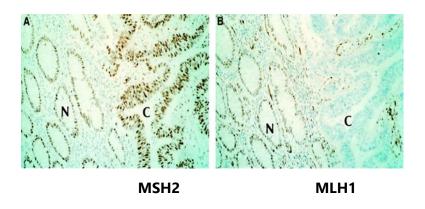
from G.Marra





#### MSI vs. Immunoistochimica





Alcune mutazioni possono risultare in una proteina "full-length" (o quasi "full length"), che puo' essere rilevata con l'mmunoistochimica oppure produrre dei frammenti proteici che non sono evidenziabili con l'immunocolorazione.

La scelta di utilizzare una sola tecnica o l'approccio combinato dipende molto dallo scopo

1. Analisi a scopo genetico per identificare mutazione germinale (Sindrome di Lynch) (richiesta normalmente dal Genetista Medico)

Analisi MSI + analisi IIC delle 4 proteine (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)

- MSI può essere valutato con pentaplex quasi-monomorfico,
- •Nei casi dubbi è meglio testare anche il pannello di Bethesda (necessario il controllo di DNA normale oltre a quello tumorale)

# 2. Analisi a scopo oncologico per indirizzare la terapia (richiesta normalmente dall'Oncologo)

#### Analisi MSI

MSI valutato agevolmente con pentaplex quasi-monomorfico nei tumori appartenenti allo spettro della Sindrome di Lynch (colon, endometrio, gastrico..).
Nei casi dubbi e nei tumori non spettro Lynch utilizzare pannello di Bethesda