

IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI RICORRENTI IN BRCA1 IN SOGGETTI RECLUTATI IN ABRUZZO E LAZIO

Sintesi	3
Capitolo 1	
1 Introduzione	5
1.1 Epidemiologia	5
1.2 Geni di suscettibilità per Cancro alla Mammella ed Ovaio	6
1.3 Non solo mammella ed ovaio	7
1.4 BRCA1	8
1.5 BRCA2	11
1.6 Funzioni delle proteine BRCA	16
1.6.1 Ricombinazione omologa (HR)	16
1.7 Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC)	18
1.8 Consulenza oncogenetica	21
1.9 Test genetico	24
1.10 Database utilizzati per lo studio delle varianti sui geni BRCA	25
1.11 Interpretazione delle Varianti BRCA	27
Capitolo 2	31
2 Materiali e Metodi	31
2.1 Pazienti	31
2.2 Tipologia campioni biologici	31
2.3 Studio della sequenza genica BRCA1 e BRCA	31
2.3.1 Estrazione del DNA	31
2.3.2 Amplificazione tramite PCR (Polimerasy Chain Reaction)	33

2.3.3 Elettroforesi su gel	40
2.3.4 Prima purificazione dell'amplificato	42
2.3.5 Reazione di sequenza	42
2.3.6 Seconda purificazione con Sephandex	44
2.3.7 Analizzatore genetico Applied Biosistem 3500	45
2.3.8 Analisi dell'elettroferogramma	46

Capitolo3

3.1 Risultati	47
3.2 Varianti trovate con sequenziamento diretto	47
3.3 Mutazione Founder	51
3.4 NGS Illumina	52
3.5 Discussione	52
3.6 Conclusioni e prospettive	61
Bibliografia	62

Sintesi

Circa il 5-10% delle neoplasie alla mammella e ovaio insorge perchè su base genetica si ereditano mutazioni patogenetiche predisponenti nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Si tratta di geni oncosoppressori conosciuti principalmente per la loro funzione di sorveglianza dell'integrità genomica attraverso la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA. La trasmissione delle mutazioni su di essi avviene con modalità autosomica dominante ed i soggetti che ne sono portatori hanno un'elevata probabilità nel tempo di sviluppare la neoplasia. L'importanza clinica per lo studio di *BRCA1* e *BRCA2* ha un duplice risvolto, si può garantire ai soggetti in corso di patologia una terapia personalizzata e mettere a punto dei protocolli di prevenzione per tutti i soggetti portatori di mutazione deleteria ma ancora sani. Il progetto di ricerca, articolato in due momenti, ha previsto nella prima parte lo studio su 100 pazienti selezionati dal 1/9/2017 al 31/7/2022 in cui sono stati analizzati i geni *BRCA1* e *BRCA2* andando a ricercare tramite sequenziamento diretto tutte le mutazioni puntiformi presenti, è stato possibile includere nello studio anche l'analisi di grandi delezioni tramite tecnica QMPSF. Dall'analisi sono emerse numerose varianti di classe 1,2,3 oltre che di classe 5. Sono riportate, in particolare, tutte le varianti trovate nei pazienti analizzati tra il 2020 ed il 2021, per *BRCA1*: 24 mutazioni di classe 1 di cui 2 mai riportate su database, per *BRCA2* 42 mutazioni di classe 1, una in particolare trovata in 5 pazienti in condizione di omozigosi e 2 mutazioni di classe 5. La prima sull'esone 11 in due pazienti correlati tra loro e la seconda situata sull'esone 14 emersa in 4 pazienti correlati.

La seconda parte del progetto è stata dedicata alla comparazione dei risultati ottenuti dal sequenziamento diretto con quelli ricavati, analizzando una parte degli stessi pazienti (nello specifico 5), ma con tecnologia NGS Illumina.

Durante gli anni di ricerca è stato possibile caratterizzare sul nostro territorio una mutazione founder non senso situata sull'esone 12 di *BRCA1*, c.4117G>T (p.Glu1373*) ed emersa in ben 17 famiglie originarie principalmente del comune di Tagliacozzo e lungo il decorso del fiume Liri.

Capitolo 1

1.INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia

Da oramai 25 anni sappiamo che varianti patologiche associate ai geni *BRCA1* e *BRCA2* aumentano il rischio di insorgenza di tumore alla mammella ed all'ovaio. Ad oggi si sa che le donne che ereditano la mutazione *BRCA1* hanno una probabilità dal 60 all'80% di ammalarsi di tumore mammario e del 40% di sviluppare un tumore ovarico nel corso della vita. Le percentuali sono inferiori per il gene *BRCA2*, rispettivamente pari dal 40 al 70% per la mammella e al 18% per l'ovaio (Figura1). In Italia dopo i carcinomi cutanei il tumore alla mammella è quello più frequentemente diagnosticato, in percentuale diversa a seconda dell'età, rappresentando circa il 33,3% di tutti i tumori femminili, quello ovarico il 3%. Mutazioni patogenetiche su questi geni giustificano solo il 10-20% dei CM ad insorgenza precoce a storia familiare positiva; sono coinvolti nell'insorgenza di questa patologia anche altri geni seppure con una penetranza molto minore comunque implicati nel controllo del ciclo cellulare, nella ricombinazione omologa messa in atto dalla cellula per riparare le rotture a doppio filamento.



Figura 1 Rischio di sviluppare la neoplasia mammella/ ovaio con e senza mutazione predisponente germinale su *BRCA1* e *BRCA2*

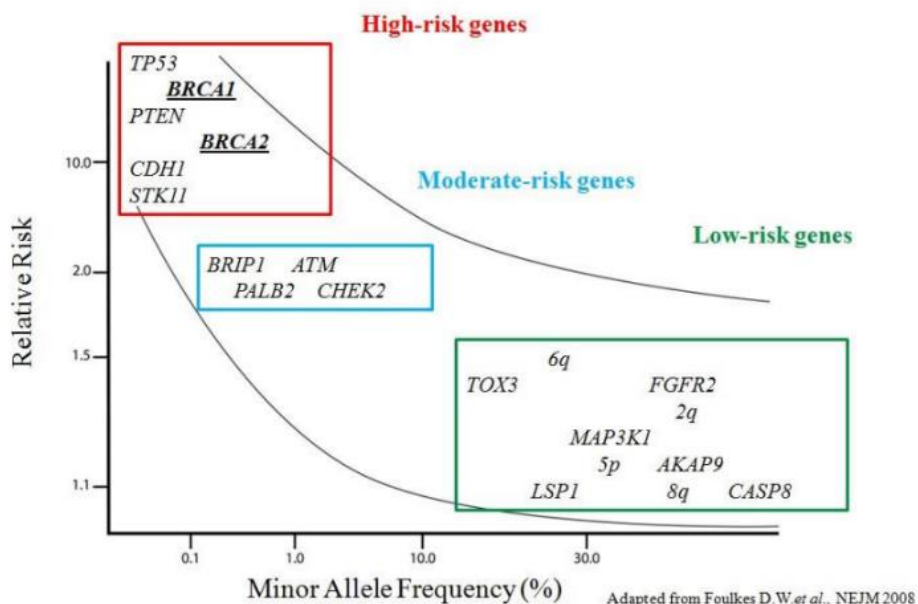
1.2 Geni di suscettibilità per Carcinoma alla Mammella ed Ovaio

I geni per la suscettibilità tumorale sono tutti quei geni in cui mutazioni deleterie portano alla predisposizione dell'insorgenza di uno specifico tipo di tumore. Possiamo distinguere il rischio a cui un paziente è esposto in seguito ad ereditarietà di una mutazione patogenetica in: elevato, moderato e lieve. Per quanto riguarda il tumore ereditario alla mammella e ovaio i due geni predisponenti alla patologia a più elevato rischio sono *BRCA1* e *BRCA2*.

Un'altro gruppo di varianti genetiche associate ad incremento del rischio di insorgenza di tumore mammario riguarda varianti con una minore frequenza allelica 0.005-0.01. Queste varianti sono state identificate in geni come *Varianti con Penetranza Moderata*. A causa dei modesti aumenti del rischio e della frequenza relativamente bassa di questa classe di varianti genetiche, si stima che il loro contributo al rischio relativo familiare sia inferiore al 3%. I geni interessati, in cui varianti di classe cinque possono avere carattere predisponente seppur a più bassa penetranza sono: *CHEK2* (con la mutazione c.1100 delC che porta alla produzione di una proteina tronca) [1], *PALB2*, [2], *BRIP1* [3] ed *ATM* [4]. Tutti questi geni sono coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA. *CHEK2* codifica per una proteina che regola il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA attraverso la fosforilazione di p53 e *BRCA1*. *PALB2* codifica per una proteina che facilita e promuove la funzione di riparo al

DNA *BRCA1*-mediata garantendone una maggiore stabilità. BRIP1 codifica per una elicasi che interagisce con *BRCA1* ed interviene durante il controllo nei checkpoint del ciclo cellulare. La proteina chinasi ATM ha come funzione quella di fosforilare svariate proteine tra cui p53, *BRCA1* e *BRCA2* (Figura2). Un'ultimo gene correlato ad un aumento di rischio moderato del tumore alla mammella ereditario è MRE11 (nel complesso MRE11-RAD50-NBS1) una proteina che gioca un ruolo critico nel mantenimento dell'integrità genomica [5]. Probabilmente uno dei vantaggi più rilevanti delle nuove metodiche analitiche, nei casi di tumore ereditario mammella/ovaio in cui si sospetta una componente germinale ma con esito negativo per la ricerca di mutazioni su *BRCA1* e *BRCA2* è proprio quella di poter analizzare nell'ambito di un pannello genico più geni contemporaneamente a diversa penetranza.

Figura 2 Contributo dei diversi geni all'insorgenza del Tumore alla mammella e ovaio ereditario. Da sinistra a destra quelli da maggiore penetranza a minore penetranza



1.3 Non solo mammella ed ovaio

Analisi effettuate su una casistica internazionale di 3.184 famiglie con mutazioni in *BRCA1* e di 2.157 famiglie con mutazioni in *BRCA2* hanno permesso di stimare con precisione la misura in cui una mutazione ereditaria su questi geni sia associata al rischio di sviluppare 22 diversi tipi di tumore, anche tenendo conto dell'età e del genere [6]. I risultati hanno confermato che le mutazioni in questi geni sono associate a una probabilità più alta di ammalarsi di cancro del pancreas e dello stomaco, così come di tumore alla mammella maschile. Proprio riguardo quest'ultimo, per esempio, gli autori hanno calcolato che una mutazione in *BRCA1* aumenta il rischio relativo di svilupparlo di circa 4 volte, rispetto a chi non è portatore della mutazione deleteria. Se invece la mutazione è in *BRCA2* il rischio aumenta molto di più, di oltre 40 volte. Nei portatori maschi, inoltre, una mutazione in *BRCA2* ma non in *BRCA1* è associata ad un aumento di rischio di tumore alla prostata, tale che le probabilità di sviluppare questa neoplasia entro gli 80 anni sarebbero pari a circa il 27% in più rispetto a chi non ha tale mutazione.

1.4 BRCA1 (Breast Cancer Gene 1)

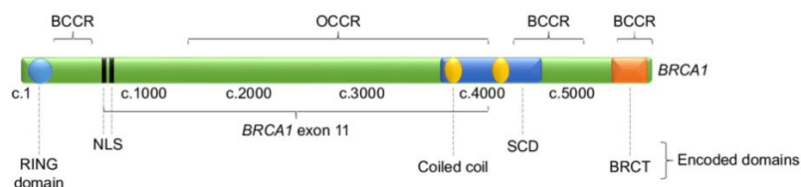


Figura 3 **Struttura del gene BRCA1**: si mostrano i suoi domini funzionali BCCRs e OCCRs. BCCRs (Breast Cancer Cluster Region), OCCR (Ovarian Cancer Cluster Region), NLS (Nuclear Localization Sequence), SCD (Serine Cluster Domain), BRCT (BRCA1 C-terminal Domain), OB (Oligonucleotide Binding)

BRCA1 viene associato per la prima volta a tumore ereditario della mammella nel 1994 e presentato sulla rivista scientifica *Science*, nel noto articolo *A strong candidate for the*

breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[7]. È un gene oncosoppressore codificante per una fosfoproteina di 210 Kda nota come proteina di suscettibilità al cancro della mammella tipo 1 (*Breast Cancer Type 1*), che presenta diverse varianti di splicing. Localizzato sul cromosoma 17q21, su una regione genica di circa 100 Kb, è composto da 24 esoni di cui il primo e parte del secondo sono trascritti ma non tradotti e l'esone 11 rappresenta oltre il 60% del gene. Dal punto di vista filogenetico, le due regioni più conservate sono la "zinc-finger" nella regione amino-terminale ed il dominio BRCT in quello carbossi-terminale. [8,9,10]. *BRCA1* codifica per una proteina di 1863 amminoacidi che può essere divisa, dal punto di vista funzionale, in 3 regioni [11] (Tabella1):

- 1) Dominio RING (Really Interesting New Gene) nella regione N-terminale
- 2) Una grande regione centrale codificata dall'esone 11 seguita da un dominio coiled-coil
- 3) Due domini BRCT in tandem al C-termiale

Il dominio "zinc-finger" possiede attività ubiquitina-ligasica, è costituito da 100 amminoacidi ed è sito di interazione con numerose proteine implicate nel riparo del DNA. A livello di questo dominio *BRCA1* forma un eterodimero con BARD, grazie all'interazione con il suo dominio zinc-finger. L'interazione reciproca tra le due proteine è necessaria in vivo per il mantenimento della loro stabilità [11].

La dimerizzazione con BARD permette l'interazione con l'Ubiquitina ligasi E3[44] e rende possibile la sua funzione di indirizzamento di specifiche proteine verso determinati pathway di degradazione.

La regione compresa tra i 200 ed i 300 amminocidi contiene due regioni NLS di localizzazione nucleare ed i siti di legame per le proteine: p53, Cmyc, RB e ZBRK1. Subito dopo, il sito implicato nel legame con SW1 ed SNF coinvolto nel rimodellamento della cromatina. Nella sua regione centrale, distribuito in circa 600 amminoacidi (aa 452-1079), troviamo il dominio che interagisce con il DNA, coinvolto nella riparazione delle rotture a doppio filamento mediante interazione con il complesso multiproteico BASC (*BRCA1-Associated genome Surveillance Complex*) sito di interazione con importanti proteine quali RAD50, MRE11, NBS1. Nella regione compresa tra gli amminoacidi 1280 e 1524 sono situate numerose sequenze SCD contenenti siti preferenziali di fosforilazione compiuta dalle chinasi ATM, CHC2, CDK2. La regione Carbossi-terminale, con un elevato contenuto di amminoacidi carichi negativamente [46,12] è costituita da due domini BRCT ripetuti in tandem, ognuno composto da circa 90 amminoacidi. Questa regione interagisce con *BRCA2*, p53, RNA polimerasi II [16], importante non solo nella funzione di sorvegliante dell'integrità cellulare ma anche per la funzione di co-attivazione trascrizionale della proteina [13,14,15]. La struttura di ciascun dominio BRCT prevede la presenza di un core centrale formato da quattro foglietti- β paralleli circondati da tre α -eliche. Questa particolare conformazione amminoacodica permette la creazione di una tasca di amminoacidi idrofobici che interagiscono con l'RNA Polimerasi II, p300, BACH1, HDAC1, HDAC2, p53, CtIP ed RB.

Tabella 1 *BRCA1*: exploring the link to transcription. Alvaro N.A. Monteiro

Interacting protein	BRCA1-binding site	Function of interacting protein	Refs
BARD1	RING finger ^a	Unknown; repair (?), mRNA processing (?)	37,44
CBP/p300	1–303 and 1314–1863 ^b	Transcriptional coactivator	24
CtIP	1651–1863 ^{a,c}	Binds to CtBP transcription repressor	33,34
HDAC1 and HDAC2	1536–1863 ^d	Histone deacetylases involved in chromatin remodeling	32
c-Myc	433–511 ^c	Helix-loop-helix transcription factor	31
p53	224–500 ^e	Transcription activation	25,26
Rb	1536–1863 ^f	Retinoblastoma tumor suppressor gene. Interacts with E2F and represses E2F-mediated transcription	32
RbAp46 and RbAp48	1536–1863 ^g	Rb-interacting protein. Component of histone deacetylase complexes involved in chromatin remodeling	32
RNA helicase A	1650–1800 ^h	Component of the RNA polymerase II holoenzyme. Also interacts with CBP/p300	21
RPB2	1560–1863 ⁱ	Component of the core RNA polymerase II. Homolog of bacterial RNA polymerase subunit	23
RPB10	1560–1863 ⁱ	Component of the core RNA polymerase II. Homolog of yeast ABC10	23
STAT1	502–802 ^j	Transcription activation induced by interferon	27

Test di localizzazione subcellulare evidenziano la presenza di *BRCA1* prevalentemente nel nucleo ed in minor parte nel citoplasma. A permettere e controllare la sua distribuzione nella cellula sono presenti sia segnali per la localizzazione nucleare (aa 503-508 e 606) che segnali per l'exportazione nucleare (aa 22-30 e 81-99).

1.5 BRCA2

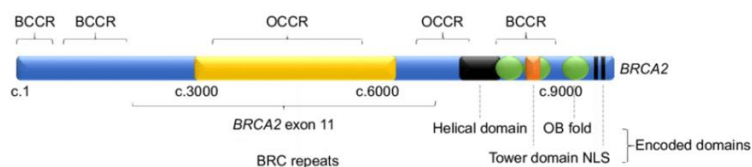


Figura 4 **Struttura del gene BRCA2**: si mostrano i suoi domini funzionali BCCRs e OCCRs. BCCRs (Breast Cancer Cluster Region), OCCR (Ovarian Cancer Cluster Region), NLS (Nuclear Localization Sequence), SCD (Serine Cluster Domain), BRCT (BRCA1 C-terminal Domain), OB (Oligonucleotide Binding)

BRCA2, secondo gene correlato all'insorgenza di tumore ereditario della mammella, scoperto nel 1995 è situato sul cromosoma 13 in posizione 13q12 ed è costituito da 27

esoni. Codifica per una proteina costituita da ben 3418 residui amminoacidici e del peso molecolare di 384 kDa, si possono individuare varie regioni e domini funzionali (Figura5, Tabella2):

- 1) La regione all' N-terminale contiene due siti di interazione proteica, per PALB2 e per EMSY, un sito per il legame al DNA (N-terminal DNA-binding domain o NTD)
- 2) Una regione centrale contenente otto ripetizioni BRC distribuite in circa un terzo della proteina. Queste ripetizioni sono i siti di interazione primari con RAD51
- 3) Nella regione C-terminale è presente il dominio CTD (C-terminal DNA-binding domain) in grado di legare ssDNA e dsDNA.

Sono presenti in questo sito regioni NLS di localizzazione nucleare ed un ulteriore sito di interazione per RAD51 (TR2).

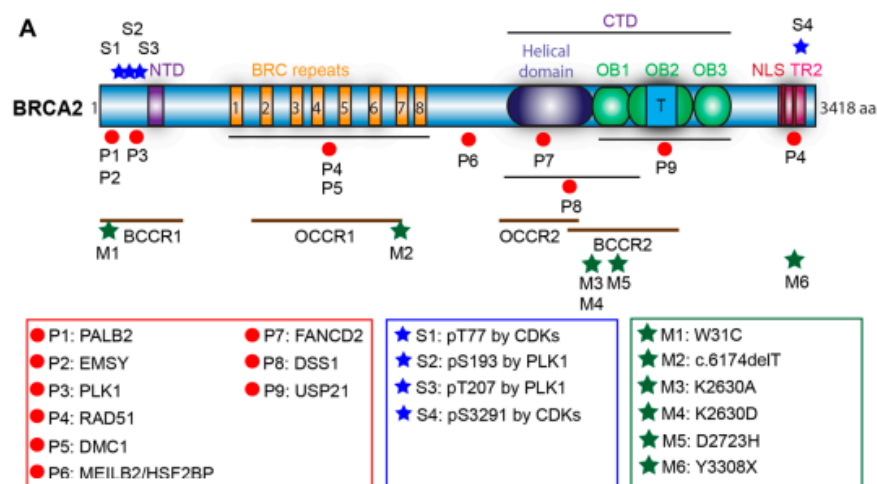


Figura5: **Struttura di BRCA2**: si evidenziano in figura i siti di interazione con diversi partner proteici e di fosforilazione. BRCA2 ha due domini di legame al DNA: N-terminal binding domain (NTD) ed il C-terminal binding domain (CTD), otto ripetizioni BRC che interagiscono con RAD51 e DMC1, il dominio TR2 (C-terminal RAD51 interaction domain) e due regioni NLS. I siti di interazione proteica sono indicati dai cerchi rossi ed i partner con i quali interagisce elencati nel riquadro in rosso, i siti di fosforilazione contrassegnati con stelle blu ed elencati nel riquadro dello stesso colore e con le stelle verdi e box verde sono indicati i più comuni siti di mutazione patogenetica.

I tumori alla mammella associati a mutazioni deleterie situate su questo gene si distinguono da quelli legati a mutazioni predisponenti *BRCA1* poiché solitamente sono del sottotipo luminale e sono spesso positivi per i recettori degli estrogeni [18]. Questa osservazione sembrerebbe legata all'evidenza che le mutazioni su *BRCA1* andrebbero ad alterare i progenitori delle cellule mammarie. Oltre che per il tumore alla mammella, mutazioni su

BRCA2 predispongono all'insorgenza di tumore ovarico e seppur a più bassa penetranza rispetto ai primi anche a tumore pancreatico e prostatico.

La proteina codificata dal gene *BRCA2* è organizzata in differenti domini funzionali ed i suoi partner più significativi sono PALB2 e RAD51.

Un sito chiave per l'interazione con RAD51 è la S3291[19].

Proteina	Sito di legame	Funzione correlata all'interazione con BRCA2	Funzione cellulare
RAD51	Ripetizioni BRC e regione TR2	Formazione del filameto di DNA medita da BRCA2 per ricercare in mitosi sequenze omologhe e stilmolare la formazione del filameto DMC1 in meiosi. Formazione di filameto BRCA2-mediata per inibire la degradazione nucleolitica delle forche di replicazione	HR RFP
DMC1	Ripetizioni BRC e regione TR2	Formazione di filameto BRCA2-mediata per la ricerca di sequenze di DNA omologhe in meiosi	HR durante la Meiosi
PALB2	Residui 21-39	Localizzatore BRCA2 al sito di DNA danneggiato	HR RFP
EMSY	Residui 23-44	Sconosciuto	HR? FATTORI DI TRASCRIZIONE?
DSS1	Helical+OB1+OB2	Stabilità di BRCA2, localizzazione nucleare, rimozione RPA	Riparo DNA, DEGRADAZIONE PROTEICA, METABILISMO DELL'RNA
MEILB2	Residui 2117-2339	Localizzazione di BRCA2 nei siti di danno al DNA in meiosi, Regolazione negativa BRCA-mediata nella riparazione ICL	HR Meiotica
SYCP3	Sconosciuto	Componenete del complesso sinaptonemale Regolazione negativa nella ricombinazione omologa	HR Meiotica
FANCD2	Residui 2350-2545	Reclutamento di BRCA2 nella riparazione ICL	Riparazione ICL ,RFP

Tabella 2: *Domini funzionali di BRCA2 con i relativi parten proteici*

1.6 Funzioni delle proteine BRCA

I geni *BRCA1* e *BRCA2* contengono le informazioni per la sintesi di due proteine coinvolte nella supervisione e nel controllo dell'integrità cellulare ed in particolar modo in quello di riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento. In ciascun individuo troviamo due copie di ciascun gene una di origine materna ed una paterna ed entrambe devono essere funzionanti per assolvere questo compito. La predisposizione tumorale si ha quando viene ereditata una delle due copie con una mutazione deleteria. La predisposizione tumorale si ha quando si eredita il gene mutato, lo sviluppo della neoplasia, quando si perde la funzionalità del secondo allele [47]. *BRCA2* agisce regolando la disponibilità e l'attività di funzione di *RAD51* l'omologo procariota di *RecA* molecola con attività catalitica centrale nella ricombinazione omologa (HR)[48]. *BRCA1* e *BRCA2* sono i due geni principali di suscettibilità per il tumore ereditario di ovaio e mammella, infatti, con la loro funzione di soppressori tumorale agiscono in differenti stadi dello stesso pathway di protezione dell'integrità genomica, specificatamente nella Ricombinazione Omologa (**H**omologous **R**ecombination). Questo processo permette una fedele riparazione delle rotture a doppio filamento che possono verificarsi nelle cellule proliferanti. Il tumore ereditario di ovaio e mammella può presentarsi, oltre che per deficit delle funzioni oncosoppressive *BRCA* anche per mutazioni deleterie site in altri geni coinvolti nella HR, né sono un'esempio quelle situate sui geni *RAD51* E *PALB2* [18][19]. In *BRCA1* la maggior parte delle mutazioni deleterie associate a patologia sono state identificate all'interno dei suoi due domini altamente conservati come il dominio Ring e BRCT [20]. Queste proteine intervengono in due diversi step della HR, l'accorciamento delle estremità al 5' ed al 3' del sito di rottura a doppio filamento ed il caricamento mediato da *PALB2/BRCA2* di *RAD51* sul singolo

filamento generato. *BRCA2* svolge un ruolo essenziale facilitando la polimerizzazione di RAD51 lungo il singolo filamento di DNA generato che in questo modo invade il DNA duplex e si accoppia con una la propria regione omologa [26,27].

PALB2 è uno dei principali partner funzionali di *BRCA2* quando in associazione con *BRCA1* comportandosi esattamente da molecola “ponte” tra le due proteine oncosoppressive. Le ripetizioni WD-40 site al C-terminale di PALB2 si associano con l’N-terminale di *BRCA2*, il motivo coiled-coil all’N-terminale di PALB2 interagisce con il motivo coiled-coil di *BRCA1* [21]. In seguito a danno al DNA, *BRCA1* si localizza insieme al complesso di resezione MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) nei siti che necessitano di ricombinazione omologa [22] il modello più accreditato propone l’interazione di *BRCA1* attraverso il suo dominio BRCT al C-terminale con la proteina CTIP per cooperare con il complesso di nucleasi MRN e mediare la resezione nel sito specifico[5]. Nella stessa direzione di resezione *BRCA1* agisce come antagonista del soppressore della resezione 53BP1. Di contro *BRCA1* quando facente parte del macrocomplesso con Abraxas-RAP80 agisce come fattore anti-resezione. A differenza della pleiotropica funzione di questa proteina, *BRCA2* interviene principalmente nella ricombinazione omologa. La proteina è composta da un dominio DBD (DNA-binding domain), siti di legame per DNA a singolo e doppio filamento ed alle proeine DSS1 ed otto ripetizioni BRC che interagiscono con RAD51[24,25]. Il DNA- Binding-Domain è costituito cinque componenti che consistono in un dominio α -elicala di 190 amminoacidi, tre Oligonucleotide Binding (OB) siti di interazione con ssDNA ed un tower-domain (TD) che lega il dsDNA. I domini NLS su *BRCA2* sono coinvolti nel trasporto di RAD51 nel nucleo e nei siti di DSB (Double Strand Break) [26] in cellule con deficit di produzione di *BRCA2* non c’è la formazione di foci di RAD51 in seguito a danno al DNA [27].

BRCA2 interviene anche in un'altro modo nel processo di HR, in seguito a fosforilazione del residuo 3291 nella sua regione C-terminale e la conseguente modulazione dell'interazione con RAD51 [28]. In particolar modo il dominio elicastico interagisce con DSS1 che sembra agire nel mantenimento della stabilità della proteina stessa e funzionale supportando la HR nelle cellule [29,31,32]. Inoltre la fosforilazione della S988 in *BRCA1* da parte della chinasi CHK2 regola positivamente l'assemblamento del complesso BRCA1-PALB2-BRCA2 [30]. Nonostante la notevole importanza del dominio DBD mutazioni che ne causano l'intera delezione non annullano la funzione della proteina nel meccanismo della HR che viene comunque mediato da PALB2 [46]. PALB2 con i suoi 1186 amminoacidi è costituita da due domini, il primo coiled-coil all'Nterminale che lega BRCA1 ed il secondo WD40 al C-terminale che interagisce con BRCA2 [41,42,43]. Inoltre la fosforilazione della S988 in BRCA1 da parte della chinasi CHK2 regola positivamente l'assemblamento del complesso BRCA1-PALB2-BRCA2[33].

1.6.1 Ricombinazione omologa (HR)

Meccanismo volto a riparare le rotture a doppio filamento (Double- Strand Breaks) causate da farmaci, stress ossidativo o radiazioni. Quando la cellula si trova a fronteggiare un danno di questa entità la replicazione e trascrizione vengono bloccate nel sito della rottura a doppio filamento (DSB), le estremità esposte subiscono degradazione con perdita di materiale genetico. La Ricombinazione Omologa garantisce il mantenimento dell'integrità genomica utilizzando il cromatidio fratello come stampo per la riparazione della rottura, garantendo così protezione dagli errori.

La ricombinazione omologa (Figura 6) avviene quando i cromatidi fratelli si trovano tra di loro vicini, in tarda fase S o in G2 della meiosi. Il meccanismo secondo il quale avviene la riparazione BRCA1-2 dipendente prevede la polimerizzazione di RAD51 sul 3' libero del filamento danneggiato. RAD51 e RAD54 (elicasi) cercano sul cromatidio fratello la sequenza omologa, una volta trovata, invadono la doppia elica. A questo punto il filamento spaiato al 3' si appaia con il suo omologo. La DNA polimerasi allunga l'estremità 3' libera utilizzando come stampo il cromatidio fratello omologo. Evento conclusivo, l'appaiamento al 3' del filamento danneggiato al suo complementare appena riparato, la DNA ligasi consente la chiusura dei gap.

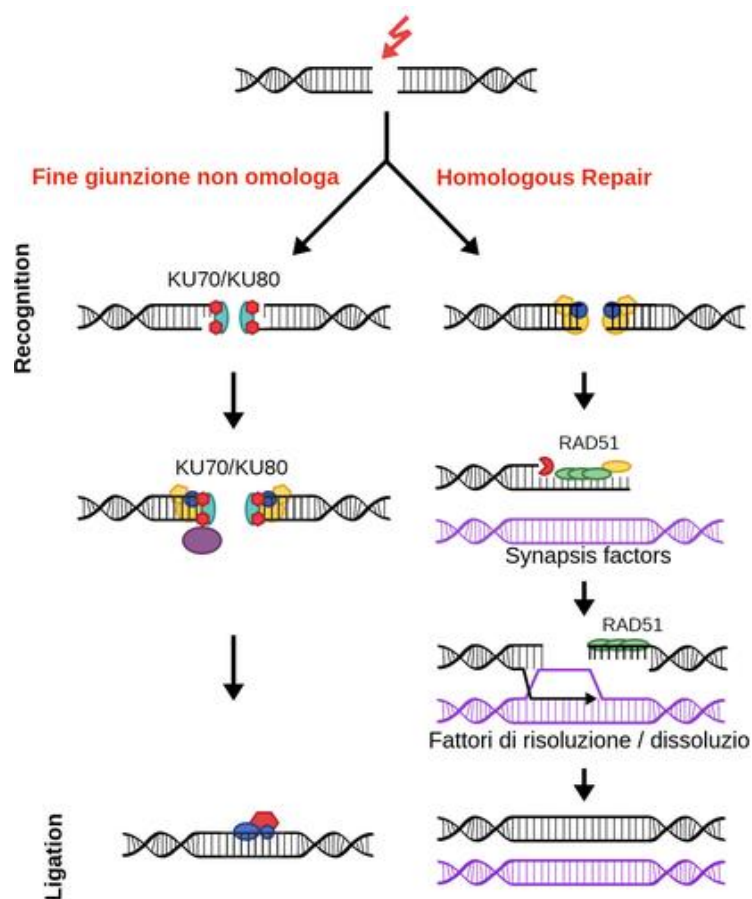


Figura 6: Ricombinazione Omologa

1.7 Hereditary Breast and Ovarian Cancer

Quando si parla di tumore si fa riferimento ad una condizione patologica caratterizzata dalla crescita cellulare deregolata e con capacità di infiltrarsi in organi e tessuti andandone ad alterare funzione e morfologia. A seconda dell'origine delle mutazioni che hanno portato a tale condizione si distinguono tumori sporadici e tumori ereditari. I primi, che si manifestano in un individuo in una famiglia in forma isolata, insorgono prevalentemente a causa di fattori ambientali che influiscono sulla comparsa di mutazioni somatiche su una singola cellula e che non verranno trasmesse nella generazione successiva. I secondi, insorgono in più soggetti della stessa famiglia i quali ereditano la mutazione predisponente alla manifestazione della neoplasia. In questo caso ciò che si eredita non è la malattia ma il background genetico favorevole alla sua insorgenza. Il primo ad ipotizzare una componente ereditaria del tumore alla mammella fu Le Dran nel 1755[3]. Il chirurgo francese descrisse il caso di una giovane donna affetta da tumore alla mammella e della manifestazione dello stesso tumore nella mamma e nella nonna. Più tardi, nel 1866 fu Broca a studiare e descrivere in una famiglia di 4 generazioni la manifestazione del tumore alla mammella in ben 10 donne. La svolta storica nello studio del tumore alla mammella ereditario si ebbe nel 1990 e pochi anni più tardi nel 1994 e nel 1995 con l'identificazione dei due geni responsabile dell'insorgenza del tumore ereditario della mammella il gene *BRCA1* ed il gene *BRCA2* [4]. Il cancro ereditario della mammella e dell'ovaio (HBOC) è una forma di neoplasia associata a mutazioni patologiche su determinati geni e queste vengono ereditate in modo autosomico dominante dalla progenie. I due geni principalmente correlati a tale sindrome sono *BRCA1* e *BRCA2*. Circa il 5-10% hanno origine genetica dovuta all'ereditarietà di una singola mutazione patologica. Più del 50% di questi casi sono correlati alla presenza di una mutazione patologica germinale nei geni oncosoppressori *BRCA1* e *BRCA2* (~ 25%) ed in altri geni a più bassa penetranza (~20-

30%). Il rimanente 20-30 % dei casi sembra essere dovuta da mutazioni su loci o geni predisponenti sconosciuti (Figura 7).



Figura 7: Percentuale di neoplasia mammella/ovaio sporadico ed ereditario

*

CDH1	Adenocarcinoma gastrico diffuso ereditario	Carcinoma mammella
CHEK2	Sindrome di Cowden	Carcinoma mammario/della prostata ereditario
ATM,PALB2	Sindrome di Lynch (HNPCC)	Carcinoma mammario
RAD50, RAD51C,RAD51D	Sindrome di Peutz-Jeghers	Carcinoma mammario e delle ovaie

Tabella 3: Altri geni in cui una mutazione deletaria, associata ad una sindrome, porta all'insorgenza di carcinoma mammella ovaio

Per l'identificazione dei soggetti a rischio di sviluppare cancro della mammella/ovaio sono state definite precise linee guida basate sull'analisi anamnestica familiare [5,6]. I soggetti che presentano HBOC hanno principalmente, rispetto a quelli in cui si hanno forme sporadiche dello stesso tumore:

- Giovane età di insorgenza
- Più donne affette da neoplasia mammaria in un ramo della famiglia
- Neoplasia mammaria e ovarica nella stessa donna
- Neoplasia ovarica

- Et  di insorgenza di tumore al seno < 40 anni
- -Neoplasia mammaria bilaterale
- Biologia particolare (TNBC, midollare)
- Neoplasia mammaria maschile
- Diagnosi di tumore alla mammella prima dei 50 anni

Altre condizioni ereditarie, con predisposizione al rischio di tumore sono (Tabella 3):

- *Sindrome di Li-Fraumeni* (mammella) legata a mutazione del gene **TP53**
- *Sindrome di Cowden* (mammella e ovaio), legata a mutazione del gene **PTEN**;
- Sindrome di Peutz-Jeghers legata a mutazione del gene **STK11**
- *Sindrome di Lynch (ovaio)*, che pu  essere dovuta a mutazione di pi  di un tipo di gene
- Adenocarcinoma gastrico diffuso ereditario (associato al carcinoma della mammella), causata da mutazione del gene **CDH1**.
- Atassia telangiectasia (mammella e ovaio), causata da mutazione del gene **ATM**
- Mutazione del gene **CHEK2** (mammella);
- Mutazione del gene **PALB2** (mammella)

1.8 Consulenza oncogenetica

La consulenza oncogenetica ricopre un ruolo di massima importanza poiché ha lo scopo di selezionare seguendo specifici parametri i pazienti a cui sottoporre il test genetico. Ha, inoltre, lo scopo di fornire tutte le informazioni del test concernente l'utilità ed i limiti, esprimere il consenso informato, aiutare il paziente a superare eventuali disagi provocati dal percorso diagnostico e pianificare un percorso di sorveglianza in caso in cui ci sia rischio oncologico. La dimostrazione che Varianti Patologiche nei geni *BRCA1* e *BRCA2* sono in grado di conferire predisposizione nello sviluppo di tumore ereditario mammella, ovaio, pancreas e prostata ha evidenziato la necessità di un test oncogenetico per l'identificazione dei pazienti a rischio e linee guida che lo regolassero (Tabella 4).

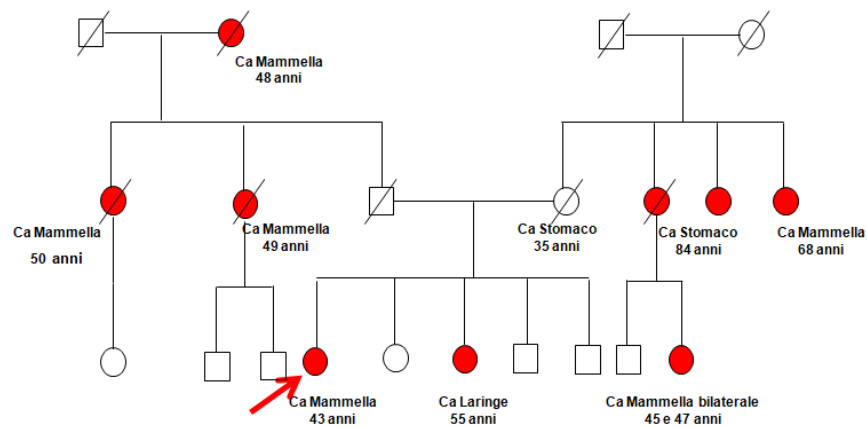
Le fasi principali della consulenza oncogenetica sono:

1. valutazione della storia personale e familiare del paziente tramite la costruzione dell'albero genealogico (Figura 8)
2. valutazione dei potenziali vantaggi e dei limiti del test
3. esecuzione del test genetico
4. scelta migliore concernete prevenzione e approccio terapeutico

La positività germinale al test BRCA permette ai collaterali del soggetto risultato positivo per una mutazione patologica l'accesso alla consulenza oncogenetica ed al test genetico a scopo preventivo, finalizzato a verificarne la presenza. Qualora il risultato del test genetico abbia esito positivo si attiveranno tutte i percorsi di prevenzione e diagnosi precoce del tumore.

CRITERI PER ACCEDERE ALLA CONSULENZA ONCOGENETICA : STORIA PERSONALE
1.Carcinoma mammario maschile
2. Donna con carcinoma mammario e carcinoma ovarico
3.Donna con carcinoma mammario <36
4.Donna con carcinoma mammario triplo negativo<60
5.Donna con carcinoma mammario bilaterale <50
6.Donna con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline a qualsiasi età
7. Adenocarcinoma pancreatico metastasico
8. Carcinima prostatico metastatico

Tabella 4: *Criteri per accedere alla consulenza oncogenetica*



LEGENDA

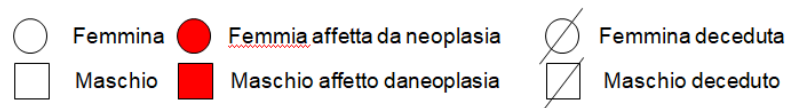


Figura 8 *Albero genealogico di una famiglia con mutazione germinale deleteria*

1.9 Test genetico

I test genetici sono classificati in diverse tipologie in base alla loro finalità clinica, quello BRCA ha una duplice funzione, preventiva e predittiva di risposta a trattamenti oncologici specifici. I primi permettono di confermare in seguito al ritrovamento della mutazione deleteria un sospetto clinico in pazienti affetti da patologia. I secondi, vengono effettuati in pazienti asintomatici ed hanno lo scopo di verificare se il soggetto ha ereditato la mutazione predisponente alla patologia. BRCA ha entrambe queste funzioni poiché:

1. la sua effettuazione in pazienti selezionati previo counseling genetico ed in corso di patologia con lo scopo di individuazione di VP ed il loro indirizzamento a specifiche terapie antitumorali
2. la sua effettuazione in pazienti sani ma possibili portatori di VP costituzionali (germinali) nei geni BRCA ha scopo **preventivo**, cioè volto alla ricerca di VP su questi geni che andranno ad indicare la predisposizione verso una condizione patologica. Qualora emergessero in questi pazienti VP su questi geni, la possibilità di intraprendere percorsi di prevenzione primaria e/o secondaria oncologica personale e familiare, e riduzione del rischio di insorgenza della patologia. Si parla, in questo caso di test genetico preclinico o presintomatico.

Un momento chiave nella consulenza genetica è la ricostituzione della storia familiare, una chiara comprensione dell'albero genealogico può agevolare la diagnosi e consentire una migliore predizione di malattia.

Secondo un recente studio prospettico la presenza di una Variante Patologica in donne sane al momento del test, la stima del rischio cumulativo medio di sviluppare la patologia mammaria o ovarica ad 80 anni corrisponde per carcinoma mammario al 72% quando la mutazione è a carico di BRCA1 e al 69% quando si trova su BRCA2, mentre per la neoplasia ovarica le percentuali di rischio sono del 44% per BRCA1 e del 17% per BRCA2 [16] (Tabella5).

Tabella 5 **Rischio cumulativo medio di carcinoma mammario e dell'ovaio a 80 anni in donne con VP BRCA1**

	VP BRCA ₁	VP BRCA ₂
Rischio di carcinoma mammario	72% (95% CI, 65% - 79%)	69% (95% CI, 61% - 77%)
Rischio di carcinoma ovarico	44% (95% CI, 36% - 53%)	17% (95% CI, 11% - 25%)

Il test genetico può produrre principalmente **tre tipi di risultati**: esito **positivo**, esito **negativo** o **non informativo**. L'esito positivo identifica la presenza di una Variante Patologica, quello negativo l'assenza di una Variante Patologica. L'esito non informativo si manifesta in un soggetto malato appartenente ad una famiglia ad alto rischio, ma nel quale non si riesce a trovare una mutazione BRCA. In questo caso non si può escludere la natura ereditaria del tumore in quanto la mutazione patologica potrebbe trovarsi su di un altro gene, può inoltre essere trovata una mutazione non patologica ma con significato incerto al quale non si riesce ad attribuire un valore di rischio. La presenza di una VUS identifica una variante di cui non si hanno sufficienti informazioni per la sua classificazione nel primo o nel secondo gruppo e per questo motivo tramite il calcolo dello score si può dire quanto questa variante può avere carattere potenzialmente patologico.

1.10 Database utilizzati per lo studio delle varianti sui geni BRCA

La notevole grandezza dei geni e le numerosissime varianti con diverso significato biologico trovate nei geni BRCA rendono indispensabile l'utilizzo di più database per il loro studio e per rendere l'interpretazione delle varianti più semplice ed efficiente. Oltretutto la presenza di database comuni rende possibile la condivisione dei risultati analitici a 360 gradi. Il primo database a trattare i dati BRCA ed a contenere l'intera serie di mutazioni è il Database BIC (BIC database, www.research.nhgri.nih.gov/bic/). Grazie alla collaborazione di più istituti di ricerca sono riportate circa 4000 mutazioni complessive per i due geni: 1790 per BRCA1 e 2000 per BRCA2 e di queste 1300 mutazioni patologiche. Le differenti varianti sono classificate come *Neutrali*, *VUS* e *Deleterie* e per ciascuna variante si trova: la designazione, numero di record, posizione nel gene, cambiamento nucleotidico, tipo di mutazione, effetto previsto su proteine, importanza clinica, classificazione clinica e dati funzionali quando presenti (Tabella6). Un' importante database associato a BIC è CIRCOS il quale è una risorsa di visualizzazione che compila e visualizza i dati funzionali su tutte le varianti missenso *BRCA1* documentate. Questa risorsa fornisce una visualizzazione interattiva dei dati degli studi funzionali *BRCA1* pubblicati che aiuteranno i ricercatori a interpretare le conseguenze funzionali delle varianti *BRCA1*.

Un altro valido aiuto allo studio delle varianti è fornito da ClinVAR presso il sito web del National Center of Biotechnology (NCBI), in questo database sono riportate varianti BRCA germinali/ sporadiche associate al loro significato clinico e supportate da dati provenienti da laboratori di ricerca, database locus-specifici, significato clinico associato supportato da dati di OMIM®, GeneReviews™, UniProt. Specificatamente incentrato sullo studio delle VUS c'è poi il database LOVD [Unique variants in the BRCA1 gene - Global Variome shared](#)

[LOVD per BRCA1](#) [Unique variants in the BRCA2 gene - Global Variome shared LOVD](#) per BRCA2. Questo database include solo quelle VUS consultabili in letteratura e pubblicazioni, tutte le sottomissioni sono aggiornate da personale esperto[34].

Tabella 6 : Descrizioni delle informazioni fornite dal database BIC per i geni BRCA1 e BRCA2

Type of information	Description
# of times recorded	Number of family members carrying mutation
Accession number	Unique identifier generated at the time mutation is entered into database
Exon	BRCA1 or BRCA2 exon in which mutation has been identified
NT	Nucleotide number in the transcript (cDNA) at which mutation occurs
Codon	Triplet codon in which mutation occurs
Base Change	Nucleotide difference compared to reference sequences
AA change	Resulting change in the encoded amino acid sequence
BIC Designation	Designation of described mutation according to BIC nomenclature guidelines
HGVS cDNA	Designation of described mutation according to HGVS nomenclature guidelines for cDNA sequence
HGVS Protein	Designation of described mutation according to HGVS nomenclature guidelines for protein sequence
HGVS Genomic	Designation of described mutation according to HGVS nomenclature guidelines for genomic sequence
dbSNP	NCBI accession number of described mutation
Mutation Type	Type of described mutation: 3'UTR 3-prime Untranslated Region 5'UTR 5'UTR 5-prime Untranslated Region F Frameshift IFI In Frame Insertion IFD In Frame Deletion IVS Intervening Sequence M Missense N Nonsense P Polymorphism S Splice Syn Synonymous UV Unclassified Variant
Clinically Importance	Clinically significance based on available data: Yes Clinically Important No Not Clinically Important Unknown Undetermined Clinically Significance
Clinical Classification	Class of BIC Classification based on a combination of systems ^a
Functional Data	When available, data from functional studies and <i>in silico</i> analysis, collected in CIRCOS database

^a Plon SE et al. 2008 Hum Mutat; Spurdle AB et al. 2008 Hum Mutat; Walker LC et al. 2013 Hum Mutat; InSiGHT 2014 Nat Genet

1.11 Interpretazione delle Varianti BRCA

Criteri per l'interpretazione delle varianti sono stati sviluppati dall'ENIGMA (*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*)[39] disponibili sul sito del consorzio. ENIGMA classifica le varianti in cinque categorie secondo le indicazioni IARC [40] (Tabella 7) :

- Benigne
- Probabilmente Benigna
- Incerta
- Probabilmente Patogenetica
- Patogenetica

Il risultato di più facile interpretazione è quello di POSITIVITA' (classe 5) in quanto, dopo aver effettuato un secondo controllo su secondo prelievo ed aver dimostrato l'effettiva presenza della mutazione, non lascia adito a dubbi. In presenza di una variante benigna (classe 1) o probabilmente benigna (classe 2) il risultato del test è considerato normale. Un risultato negativo però può essere una vera negatività, ma anche frutto di un errore analitico o l'analisi di un gene sbagliato ipotizzando la mutazione patogenetica su di un gene diverso. Qualora il risultato sia un VERO NEGATIVO il rischio del soggetto di sviluppare una neoplasia è la stessa dell'intera popolazione a parità degli stessi fattori di rischio. La presenza di una VUS (classe 3) identifica una variante di cui non si hanno sufficienti informazioni per la sua classificazione nel primo o nel secondo gruppo e per questo motivo tramite il calcolo dello score si può solo dire quanto questa variante può avere carattere potenzialmente patologica. Durante l'effettuazione del test *BRCA1* e *BRCA2* l'identificazione di Varianti a significato sconosciuto (VUS ovvero *Variant of Uncertain Significance*) risulta essere abbastanza comune, infatti, circa il 7% di pazienti testati per la ricerca di mutazioni su *BRCA1/BRCA2* ne presenta almeno una [35]. Le VUS sono tipicamente mutazioni missenso o mutazioni

puntiformi a livelli di siti di splicing appena a ridosso della prima regione intronica o a ridosso di domini funzionali altamente conservati. Senza dubbio la classificazione delle varianti risulta essere il momento analitico più difficile durante il processo dello studio dei due geni. Ad oggi sono riportate più di 1560 mutazioni/ polimorfismi per il gene BRCA1 ed un numero maggiore di 1880 mutazioni/polimorfismi rilevati sul gene BRCA2, della totalità più di 1800 sono classificate come VUS. Un recente studio del consorzio ENIGMA ha osservato che, su 1395 VUS identificate nei geni BRCA1 e BRCA2 solo il 6,7 % sono risultate patogenetiche contro il 32% classificate come benigne. Lo studio di queste varianti e di come e se influenzino la funzione delle proteine BRCA è un campo di notevole interesse scientifico ed ancora in costante evoluzione e date le possibili conseguenze diagnostiche sempre più al centro dell'interesse scientifico. Di per sé l'identificazione di VUS da origine ad un test senza carattere diagnostico e di conseguenza non si può, se non a scopo di ricerca, estendere l'identificazione di quella stessa variante nei familiari. Per definire su quali VUS focalizzare l'attenzione si utilizzano metodi di studio bioinformatici, detti in silico, che permettono di stabilire a priori la probabilità della variante di avere carattere patogenetico. Questi si avvalgono di algoritmi che combinano dati che includono regioni di sequenza conservate coinvolte nei siti mutati, tipo di cambio amminoacidico, studio dei siti di splicing attraverso programmi che studiano gli effetti teorici di cambiamenti nucleotidici a livello di queste regioni andando ad identificare i motivi di enhancer di splicing, l'interessamento ai siti di enhancer o silencer di splicing (ESEfinder) o ipotetici siti di silenziamento di splicing (SpliceSiteFinder) [36]. La combinazione di questi dati con analisi di co-segregazione, analisi funzionale e dati epidemiologici permettono una maggiore comprensione delle Varianti a significato sconosciuto. È stato dimostrato che la maggior parte delle VUS con chiaro significato patologico si trovano a ridosso di domini funzionali altamente conservati e che di

conseguenza determinano la formazione di una proteina non funzionante, non attiva nella riparazione del DNA, nella sua funzione di attivazione trascrizionale o nel controllo del ciclo cellulare [37,38].

Tabella 7: *Classificazioni delle Varianti secondo ENIGMA e raccomandazioni cliniche [16]*

Classe 1: non patogenetica	Classe 2: probabilmente non patogenetica	Classe 3: incerta	Classe 4: probabilmente patogenetica	Classe 5: patogenetica
Probabilità di patogenicità < 0,001 con modelli multifattoriali	Probabilità di patogenicità 0.1-0.05% con modelli multifattoriali	Probabilità di patogenicità 5-99% con modelli multifattoriali	Probabilità di patogenicità 95-99% con modelli multifattoriali	Probabilità di modelli patogenicità > 99% con multifattoriali
Frequenza allelica ≥ 1% nei gruppi di controllo	Cambiamento che codifica lo stesso aminoacido considerato non patogenetico + non evidenza di aberrazioni all' mRNA	Insufficiente evidenza per classificarla	Sito di splicing canonico non testato che non predice una isoforma normale	Delezioni che alterano un dominio funzionale proteico
Variante intronica od esonica con probabilità a priori secondo – GVDG < 2% + Variante in trans con una variante patogenetica e nessun fenotipo oltre al tumore mammario + Bassa probabilità di alterare lo splicing o alta probabilità di alterare lo splicing senza alcuna evidenza di aberrazione dello splicing dell' mRNA		Variante di splicing con difficoltà di interpretazione	Codifica di un aminoacido già valutato come missense patogenetico + Nessuna evidenza di splicing + aberrante Assenza dai gruppi di controllo di riferimento	Duplicazioni che alterano un dominio funzionale proteico
		Variante di rischio intermedio	Delezione in-frame per cui una variante patogenetica è già stata descritta + Assenza dai gruppi di controllo di riferimento	Saggio di splicing dell' mRNA che altera un dominio funzionale proteico
				Frameshift che porta ad un codone di stop prematuro
Non estendere il test BRCA ai familiari. Nel management clinico del caso indice tener conto del fatto che non ha VP BRCA	Non estendere il test BRCA ai familiari. Nel management clinico del caso indice tener conto del fatto che non ha VP BRCA	Estendere il test BRCA ai familiari dopo attenta valutazione della storia familiare, istologia, etc.	Estendere il test BRCA ai familiari. Consigliare sorveglianza e trattamenti preventivi.	Estendere il test BRCA ai familiari. Consigliare sorveglianza e trattamenti preventivi.

Capitolo 2

2.MATERIALI E METODI

2.1 Pazienti

Nello studio sono stati inseriti tutti i pazienti selezionati dopo counseling genetico presso l'ambulatorio di Prevenzione Oncologica, UOSD Assistenza Oncologica Territoriale, ASL1 Abruzzo, Università L'Aquila. Al momento della prima visita è stato redatto l'albero genealogico del paziente risalendo quanto più possibile per quattro generazioni e collaterali almeno al terzo grado di parentela.

2.2 Tipologia dei campioni biologici

Prelievo di sangue periferico da cui viene estratto nel minor tempo possibile il DNA genomico. Il campione è stabile per un massimo di 24 ore ad una temperatura di +4°C e per a -20°C.

2.3 Studio della sequenza genica BRCA1 e BRCA2

2.3.1 Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da linfociti da prelievo di sangue periferico utilizzando il kit *QIAamp DNA Blood Mmini Kit-Qiagen* seguendo il protocollo indicato.

Protocollo di estrazione

1. Il protocollo prevede l'aggiunta all'interno di una eppendorf contrassegnata con l'identificativo del paziente di 200 µl di sangue periferico + 20 µl di proteasi K + 200 µl di *buffer* di lisi.
2. La eppendorf viene vortexata per 15 secondi per garantire l'omogeneità della soluzione e posta a bagnomaria ad una temperatura di 56°C per 10 minuti
3. Centrifugazione per 1 minuto ad 8000 rpm.
4. Aggiunta di 200 µl di etanolo assoluto e vortexata per ulteriori 15 secondi

5. I 620 μ l di soluzione ottenuti vengono inseriti nella colonnina con filtro fornita dal kit
6. Centrifugazione per 1 minuto ad 8000 rpm.
7. Cambio dalla provetta sottostante contenete il residuo derivante dalla centrifugazione
8. Aggiunta di 500 μ l di *buffer* AW1
9. Centrifugazione per 1 minuta ad 8000 rpm
10. Eliminazione del residuo dalla provetta sottostante
11. Aggiunta di 500 μ l di *buffer* AW2
12. Centrifugazione per 3 minuti e 30 secondi a 13.200 rpm, questo passaggio permetterà di ottenere sulla membrana della colonnina l'intrappolamento del DNA.
13. Risospensione del DNA tramite aggiunta all'interno della colonnina di 25 μ l di H₂O
Nucleasi free
14. Centrifugazione per 1 minuto ad 8000 rpm

Il quantitativo di DNA ottimale per l'effettuazione della PCR corrisponde a circa 150 ng/microlitro e per valutare la resa della sua estrazione e la purezza viene utilizzato lo spettrofotometro NANODROP, *Thermo Scientific*. Nello specifico le misurazioni sono eseguite caricando 2 μ l di campione su di un'apposita piastra di lettura che crea una colonna di liquido a diretto contatto con le fibre ottiche. Dopo una lettura preliminare con solo acqua RNAsi free ed impostando questo valore come bianco è stato possibile effettuare la lettura dell'assorbanza del campione. La valutazione della quantità di DNA viene eseguita misurando l'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda di 260 nm (A₂₆₀), alla quale il DNA è in grado di assorbire per la presenza degli anelli aromatici. La purezza, invece, è stata valutata considerando il rapporto delle assorbanze A₂₆₀/A₂₈₀, dove 280 nm rappresenta la lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine. Sono considerati di buona qualità i campioni che hanno rapporti di assorbanza compresi tra 1.8-2, valori più bassi indicano contaminazione da proteine e sostanze organiche. I campioni analizzati in questo studio sono stati valutati come di buona qualità e quindi idonei per ulteriori analisi. Nella maggior parte dei pazienti il DNA

è stato utilizzato direttamente per la PCR e solo raramente è stato necessario fare aggiustamenti poiché o troppo concentrato o troppo diluito.

Il DNA genomico viene conservato da +2° a +8°C oppure -20°C fino al momento dell'utilizzo.

2.3.2 Amplificazione tramite PCR (Polimerasi Chain Reaction)

La PCR è stata utilizzata per amplificare frammenti noti di DNA di cui si conosce la sequenza di interesse in questo caso i 24 ampliconi di *BRCA1* ed i 27 ampliconi di *BRCA2*. Il processo di amplificazione è permesso dal susseguirsi di tre fasi: fase di denaturazione, fase di appaiamento, fase di allungamento (Figura 8).

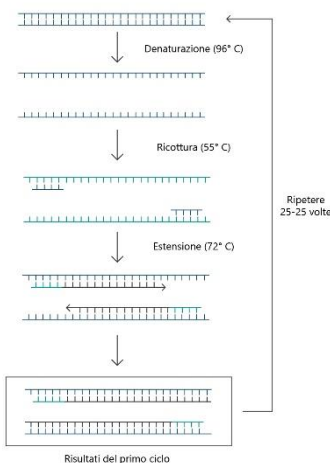
Fase di denaturazione: si ha la separazione termica dei due filamenti di DNA, questa temperatura si basa principalmente sul quantitativo di Citosina e Guanina presente nel doppio filamento in quanto queste due basi sono unite da tre legami idrogeno.

Fase di appaiamento (annealing) dei primers, oligonucleotidi a singolo filamento complementari alle regioni 5' e 3' delle regioni di interesse. Si ha la formazione di legami idrogeno tra le basi complementari del primer e del filamento da allungare. Un primer deve avere determinate caratteristiche:

- Lunghezza ottimale di 20-30 basi, mai inferiore a 16 per garantire specificità di appaiamento. Non eccessivamente lunga poiché sarebbe necessario un quantitativo di energia troppo elevato per staccarlo dal filamento target.
- Valutazione della temperatura di melting funzione del contenuto di Citosina e Guanina le basi che stabiliscono tra loro tre legami idrogeno. La loro presenza nel primer dovrebbe essere compresa tra il 45 ed il 50%.

- Il primer F e quello R devono avere temperatura di annealing più simile possibile in quanto andranno a lavorare alla stessa temperatura.
- Valutare l'eventuale presenza di sequenze palindrome, che possono portare alla formazione di strutture secondarie
- Assenza di sequenze complementari tra i due primers che porterebbero a self-annealing.

La temperatura di annealing e la sua durata sono determinanti per ottenere un'amplificazione specifica del target, in particolare tale temperatura deve essere



qualche grado (mediamente 5°C) più bassa della temperatura di melting dei primers, calcolata con la formula $[2 (A+T) + 4 (G+C)]$, temperatura alla quale metà dei primers sono appaiati alla sequenza target, in modo da favorire la formazione di legami stabili. Solitamente tale temperatura di annealing è compresa tra 37-65°C e la fase di annealing ha una durata di circa 30 secondi. La

Figura 8 PCR

temperatura rappresenta quindi un punto critico della PCR, in

quanto da essa dipende sia la resa sia la specificità della reazione. La determinazione della corretta temperatura di allungamento rappresenta un punto cruciale della tecnica perché una temperatura troppo bassa porterebbe ad un appaiamento aspecifico delle basi, viceversa, un'atropo elevata una separazione dei filamenti

Fase di allungamento (extension) dei primers eseguita grazie all'azione della DNA Polimerasi che permette l'amplificazione del DNA target. Nello specifico viene utilizzata una polimerasi chiamata Taq Polimerasi estratta da un batterio termofilo che ha temperatura di extension di 72°C. Questo enzima utilizza come substrato per la sintesi del filamento ex novo, i

dideossinucleotidi (dNTP: deossinucleotide trifosfato) e procede in direzione 5' 3' dello stampo incorporando un dNTP alla volta all'estremità 3'-OH dei primers.

Per la realizzazione della PCR sono utilizzati:

<i>Soluzione MIX</i>	DNA di sequenza target (100/150ng/ μ l)	1 μ l
	Primer F (10 μ M)	1 μ l
	Primer R (10 μ M)	1 μ l
	DNTPs (10 μ M)	0,5 μ l
	Buffer (10X)	2,5 μ l
	MgCl ₂ (50Mm)	1,5 μ l
	Taq Polimerasi	0,25 μ l
	H ₂ O RNAsi free	17,25 μ l

Protocollo di PCR

1. Aggiunta all'interno di una eppendorf da PCR di: 1 μ L del DNA estratto + 1 μ l di Primer F+1 μ l di Primer R
2. Preparazione della Soluzione MIX all'interno di una eppendorf da 1,5ml con i quantitativi indicati nella tabella
3. Aggiunta di 20 μ L della Soluzione Mix ai 3 μ L complessivi della eppendorf da PCR.

Per l'analisi della regione codante del gene *BRCA1* sono stati selezionati 35 coppie di primers, inoltre, per la notevole estensione dell'esone 11 composto da 3425bp è stato necessario per la sua amplificazione utilizzare 14 primers sovrapposti. Per il gene *BRCA2* sono stati selezionati 45 coppie di primers. In questo caso gli esoni più lunghi, l'esone 10 con 1115bp e l'esone 11 con 4931 bp sono stati analizzati utilizzando 5 e 15 primers sovrapposti, rispettivamente. Per la PCR è stato utilizzato il termociclatore *Mastercycler gradient* seguendo lo specifico programma di reazione per 30 cicli termici.

94°C	4 minuti	30 cicli
94°C	30 secondi	
50-60°C	45 secondi	
72°C	1 minuto	
72°C	6 minuti	
4°C	∞	

I primer utilizzati per l'analisi sono i seguenti (Tabella 8 e 9):

Tabella 8: Primers utilizzati per amplificare gli esoni di BRCA1

Esoni	Primer	T. Annealing (°C)
B1- 2F	5'-GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT-3'	52
B1- 2R	5'-TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT-3'	
B1- 3F	5'-TCCTGACACAGCAGACATTTA-3'	58
B1- 3R	5'-TTGGATTTTCGTTCTCACTTA-3'	
B1- 5F	5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG-3'	54
B1- 5R	5'-ATGGTTTTATAGGAACGCTATG-3'	
B1- 6F	5'-GTCTTTTCTTATTTTAGTGTCC-3'	56
B1- 6R	5'-TGAGTTTCATGGACAGCACT-3'	
B1- 7F	5'-ACACAACAAAGAGCATAACATAG-3'	54
B1- 7R	5'-AAGAAGAAGAAAACAAATGGT-3'	
B1- 8F	5'-TCAGGAGGAAAAGCACAGAA-3'	54
B1- 8R	5'-AGATAAGGAATCCAGCAATT-3'	
B1- 9F	5'-CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA-3'	54
B1- 9R	5'-TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA-3'	
B1- 10F	5'-TGGTCAGCTTTCTGTAATCG-3'	54
B1- 10R	5'-TCTACCCACTCTCTTTTCAG-3'	
B1- 11.1F	5'-TGTATTTTTTTAATGACAATTCAG-3'	54
B1- 11.1R	5'-CTCCACATGCAAGTTTGAAAC-3'	
B1- 11.2F	5'-GGCATCCAGAAAAGTATCAGG-3'	56
B1- 11.2R	5'-TTTTTTTCTGTGCTGGGAGTC-3'	
B1- 11.3F	5'-GGGCTGGAAGTAAGGAAACAT-3'	56
B1- 11.3R	5'-CTACTTTGGCATTGATTTCAGAC-3'	
B1- 11.4F	5'-ACTGTTAGGTTCTGATGACTC-3'	56
B1- 11.4R	5'-ACGCTCTTGATATTATCTGTGG-3'	
B1- 11.5F	5'-AGGAGCATTGTTACTGAG-3'	54
B1- 11.5R	5'-AGACTTCCTCCTCAGCCTATT-3'	
B1- 11.6F	5'-ATCCACAATTCAAAGCACC-3'	54
B1- 11.6R	5'-TCTTCTTTTTCTTCTTGGGA-3'	
B1- 11.7F	5'-CTAAGTGTTCAAATACCAGT-3'	54
B1- 11.7R	5'-ATTTCTATGCTTGTTCCTCCG-3'	
B1- 11.8aF	5'-ATCCATTGGGACATGAAGTTA-3'	52

B1- 11.8aR	5'-CTTGATTTTCTTCCTTTTGT-3'	
B1- 11.8bF	5'-AAACAAAGTCCAAAAGTCAC-3'	
B1- 11.8bR	5'-GATGGGAAAAAGTGGTGGTAT-3'	54
B1- 11.9aF	5'-GACTTTTACAAAACCCATATC-3'	
B1- 11.9aR	5'-ATTGCTTGAGCTGGCTTCTTT-3'	56
B1- 11.9bF	5'-GAGAACATTCCAAGTACAGTG-3'	50
B1-11.9bR	5'-TTTTATTTTCAGGATGCTTAC-3'	
B1-11.10F	5'-ACAGAGGGCCAAAATTGAAT-3'	
B1- 11.10R	5'-TTTCTGGACGCTTTTGCTAA-3'	56
B1- 11.11F	5'-GACATTAAGGAAAGTTCTGCTG-3'	
B1- 11.11R	5'-TTCCTGAGATGCCTTTGCCA-3'	56
B1- 11.12F	5'-CTAAGAACACAGAGGAGAATTT-3'	
B1-11.12R	5'-TCCCCAAAAGCATAAACATTT-3'	54
B1- 12F	5'-GTCCTGCCAATGAGAAGAAA-3'	
B1- 12R	5'-TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3'	56
B1- 13F	5'-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3'	
B1- 13R	5'-ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-3'	56
B1- 14F	5'-GATTTGTTTTTCTCATTCCAT-3'	
B1- 14R	5'-ACCACAGCATCTTTACATTG-3'	54
B1- 15F	5'-TGGCGATGGTTTTTCTCCTTCC-3'	
B1- 15R	5'-TCCAATACAGCAGATGAAATA-3'	60
B1- 16	5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3'	
B1- 16R	5'-AAAACCTCTTTCCAGAATGTTGT-3'	60
B1- 17F	5'-GTGCTAGAGGTAATCATG-3'	
B1- 17R	5'-CAGCAGATGCAAGGTATTC-3'	56
B1 -18F	5'-GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC-3'	
B1- 18R	5'-GAGACCATTTTCCCAGCATC-3'	56
B1- 19F	5'-CTGTCATTCTTCCTGTGCTC-3'	
B1- 19R	5'-CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC-3'	56
B1- 20F	5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3'	
B1- 20R	5'-CTGTGTGAAAGTATCTAGCAC-3'	58
B1- 21F	5'-AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC-3'	
B1- 21R	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'	52
B1- 22F	5'-TCCCATTGAGAGGTCTTGCT-3'	
B1- 22R	5'-GCCAGTCTTGCTCACAGGA-3'	60
B1- 23F	5'-AATGCTCTTTCCCTTCCTGG-3'	
B1- 23R	5'-ACTCAAGCACCAGGTAATG-3'	58
B1- 24F	5'-TTGACACTAATCTCTGCTTG-3'	
B1- 24R	5'-CTTGGGGTCCTGTGGCTCT-3'	56

Tabella 9: Primers utilizzati per amplificare gli esoni di BRCA2

Esoni BRCA2	Sequenze primer	T.A. (°C)
B2- 2F	5'-CCAGGAGATGGGACTGAATTAG-3'	56
B2- 2R	5'-CTGTGACGTACTGGGTTTTTAGC-3'	
B2- 3F	GATCTTTAACTGTTCTGGGTCACA	58
B2- 3R	CCCAGCATGACACAATTAATGA	
B2- 4F	AACACTTCCAAAGAATGCAAA	58
B2- 4R	TTCTACCAGGCTCTTAGCCA	
B2- 5et6F	TGTGTTGGCATTTTAAACATCA	58
B2- 5et6R	CAGGGCAAAGGTATAACGCT	
B2- 7F	CCTTAATGATCAGGGCATTTC	58/60
B2- 7R	ATACTGCCTCTTAAACGCTT	
B2- 8F	GCCATATCTTACCACCTTGTGA	58
B2- 8R	AGGTTTAGAGACTTTCTCAAAGGC	
B2- 9F	ATAACTGAAATCACCAAAAGTG	58/60
B2- 9R	CTGTAGTTCAACTAAACAGAGG	
B2- 10aF	TGTTTCTATGAGAAAGGTTGTGAGA	60
B2- 10aR	TCATTTGGTTCCACTTCAGA	
B2- 10bF	AGCAAACGCTGATGAATGTG	60
B2- 10bR	GGCTAGAAATACGTGGCAAA	
B2- 10cF	TTTCAGAAAAAGACCTATTAGACA	56
B2- 10cR	CTTTTTGATACCCTGAAATGAAGAAG	
B2- 10dF	TAAAGCAGGCAATATCTGGAACTTCT	56
B2- 10dR	GTGGATATTAAACCTGCATTCTTCAA	
B2- 10eF	TTTGCTCACAGAAGGAGGACT	58
B2- 10eR	TTACAAAAAAGACAGAGGT	
B2- 11.0F	TGATTGATGGTACTTTAATTTTGTCCAC	60
B2- 11.0R	GCCAAGACCTCTTCTTTTATATCTG	
B2- 11.1F	AAGCTGATTCTCTGTCATGCCTG	60
B2- 11.1R	GATTTGTGTTTTGGTTGAATTGTACC	
B2- 11.2F	CGTTGAGCTGTTGCCACCTG	60
B2- 11.2R	CCTCCAAAAGTGTGATTTGAAATTG	
B2- 11.3F	TTGGTTTATGTTCTTGCAGAGGAG	58
B2- 11.3R	CCTTTTGGCTAGGTGTTAAATTATGG	
B2- 11.4F	TGGCATTAGATAATCAAAAGAACTG	56
B2- 11.4R	CCTAAACCCCACTTCATTTTCATC	
B2- 11.5F	GAAATTAACGGAAGTTTGTCTGG	58
B2- 11.5R	TGAATCACTGCCATCAAATTCTAAG	
B2- 11.6F	AATGACTACTGGCACTTTTGTGTTG	56/58/60
B2- 11.6R	CACTTGCAGTCTGAAAAATGTATC	
B2- 11.7F	TGCGAAAGCTCAAGAAGCATG	56
B2- 11.7R	TGATGGCTAAAAGTGGTGAATTCAC	
B2- 11.8F	AATACTGAAAGAAAGTGTCCAGTTG	58
B2- 11.8R	CTGATTTGTGTAACAAGTTGCAGG	
B2- 11.9F	CTTATTCAGTCATTGAAAATTCAGCC	54
B2- 11.9R	GGTGAAGAGCTAGTCACAAGTTCCTC	

B2- 11.10F	GCATGTCTAACAGCTATTCCTACC	56
B2- 11.10R	TTCTTCACTCTGAATGTCAGCAA	
B2- 1.11F	GGCATTGGATGATTCAGAGG	56
B2- 11.11R	TGGAAACTTGCTTTCCACTTG	
B2- 11.12F	CCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTG	56/58
B2- 11.12R	TTACGTTTTTTAGGTGAAGCCTGTTC	
B2- 11.13F	AAACCCAGAGCACTGTGTAAACTC	da52a60
B2- 11.13R	TCTCCTCTTCTTTTTTCCAATTCTTG	
B2- 11.14F	ACAGATTCTAAACTGCCAAGTCATG	58
B2- 11.14R	AACCATACTCCCCAAACTGAC	
B2- 12F	AATTGACATTGAAGACTGACTTTACTC	58
B2- 12R	AGCACTTTGGAGAGGCAGG	
B2- 13F	GTAAAACGACGGCCAGT	60
B2- 13R	AACAGCTATGACCATG	
B2- 14F	AGCAAATGAGGGTCTGCAAC	56
B2- 14R	GCAAAAATTCATCACACAAATTGTC	
B2- 15F	GGCCAGGGGTGTGCTTTTT	56
B2- 15R	AGGATACTAGTTAATGAAATA	
B2- 16F	TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG	58/60
B2- 16R	AGCCAACTTTTTAGTTTCGAGAG	
B2- 17F	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGA	60
B2- 17R	AGAAACCTTAACCCATACTGC	
B2- 18aF	GATCCACTATTTGGGGATTGC	58/60
B2- 18aR	GATCTAACTGGGCCTTAACAGC	
B2- 18bF	GCAGATACCCAAAAAGTGCC	60
B2- 18bR	TCTGGACCTCCAAAAACTG	
B2- 19F	AAGTGAATATTTTTAAGGCAGTT	56
B2- 19R	TATATGGTAAGTTTCAAGAAT	
B2- 20F	TGTGCCTGGCCTGATAC	58/60
B2- 20R	AAAGTCTCTAAGACTTTGTTCTCA	
B2- 21F	GGGTGTTTTATGCTTGGTTCT	58/60
B2- 21R	CATTTCAACATATTCCTTCCTG	
B2- 22F	AACCACACCCTTAAGATGAGC	60
B2- 22R	GGGCATTAGTAGTGGATTTTGC	
B2- 23F	ACTTCTTCCATTGCATCTTTCTCA	56
B2- 23R	AAAACAAAACAAAAATTC AACATA	
B2- 24F	GCAGCGACAAAAAAACTCA	60
B2- 24R	ATTTGCCAACTGGTAGCTCC	
B2- 25F	GCTTTCGCCAAATTCAGCTA	58/60
B2- 25R	TACCAAAATGTGTGGTGATGC	
B2- 26F	GTCCCAAACTTTTCATTTCTGC	60
B2- 26R	GGAGCCACATAACAACCACA	
B2- 27aF	CTGTGTGTAATATTTGCGTGCT	58
B2- 27aR	GCAAGTTCTTCGTCAGCTATTG	
B2- 27bF	CACCAAATACGAAACACCATA	58

	CGATACACAAACGCTGAGGTAA	
--	------------------------	--

2.3.3 Elettroforesi su gel

Per definire la corretta temperatura di annealing per i primers di *BRCA2* sono state eseguite per ciascuna coppia di primers corrispondente a ciascuno delle coppie dei 27 ampliconi diversi cicli di PCR. Questo dopo aver definito tramite applicazione della formula $[2 (A+T) + 4 (G+C)]$, i range di temperature che assicuravano una reazione migliore. In seguito si è verificata l'avvenuta reazione tramite elettroforesi su gel di agarosio. Per visualizzare gli amplificati otteniti è stato utilizzato come intercalante al DNA il *Gel Red* e come tampone di corsa il TAE 1X (0,04M-Tris-Acetato, 0,001M EDTA, Ph 8). Le bande corrispondenti ai frammenti di DNA analizzati visualizzate tramite lampada UV (Figura9).

Protocollo per Elettroforesi su gel di Agarosio

Per lo svolgimento dell'Elettroforesi sono necessari: matrice gel con funzione di setaccio molecolare, nel nostro caso si utilizza l'Agar +cella elettroforetica + alimentatore + tamponi salini.

1. Preparazione del gel Agar all'1%: a 0,5 mg di polvere di agarosio vengono aggiunti 50ml di TAE (0,04% M-Tris-Avetato, 0,001 M EDTA, Ph 8)
2. Sciogliere l'agarosio nel TAE a microonde per 3 minuti e 30 secondi
3. Quando la soluzione sarà tiepida e di consistenza ancora liquida si aggiungono 2,5µl di Gel Red agente intercalante il DNA.
4. Inserire i pettinini per la creazione dei pozzetti della cella elettroforetica e versare la soluzione all'interno della stessa.

5. Attendere il completo raffreddamento della soluzione con sua gelificazione ed estrazione dei pettinini.
6. Sistemare il gel nella camera elettroforetica
7. Aggiungere il TAE fino a completo riempimento dei pozzetti
8. (Escludere il primo pozzetto dal caricamento) In ciascun pozzetto viene caricato l'amplificato costituito da: 1-2 μ l di campione + 1 μ l di *loading Buffer* 10X + 7-8 μ l di *H₂O Nuclease free*
9. Caricare nel primo pozzetto della fila un marker di taglia da 100-1000 Kb necessaria per avere dei riferimenti sulla lunghezza delle bande degli amplificati.

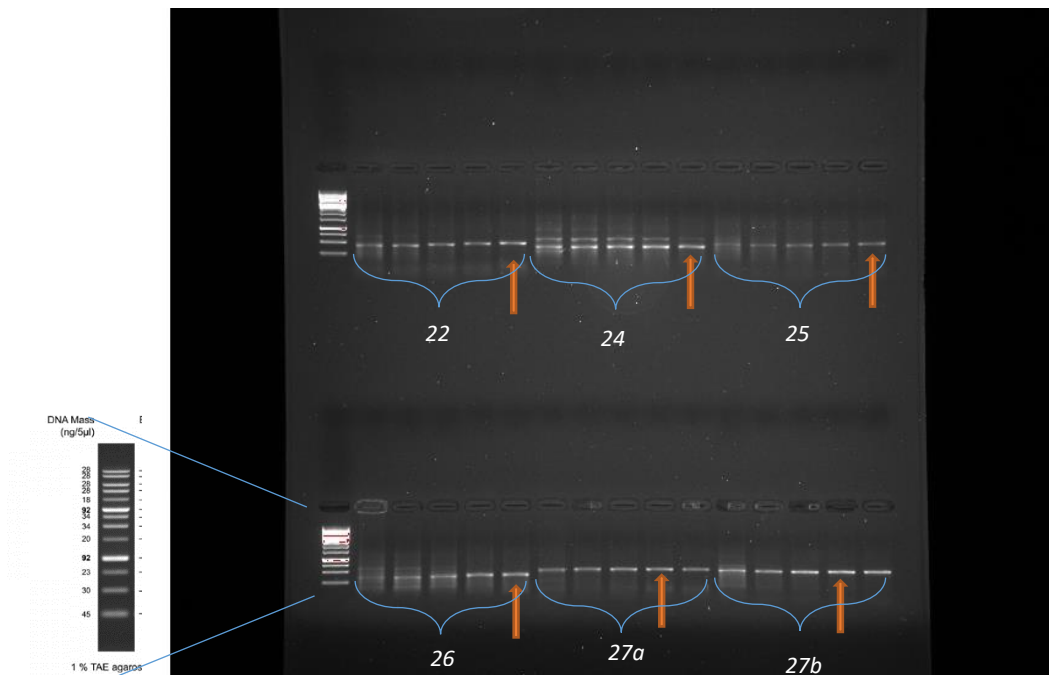


Figura 9: **Amplificazione degli ampliconi 22-24-25 sopra, 26-27a-27b sotto-gene BRCA2.** Le T.A. per ciascun ciclo di PCR sono da sinistra a destra: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C ed ottenute utilizzando l'apposito programma gradient di volta in volta creato appositamente per la migliore amplificazione degli esoni.

2.3.4 Prima purificazione dell'amplificato

Protocollo di purificazione

La prima purificazione è effettuata utilizzando kit Qiagen secondo il seguente protocollo:

1. al prodotto di PCR si aggiungono 125 µl di *buffer PB*, la miscela poi posta nella colonnina fornita di membrana in silice per ottenere un recupero efficace del DNA.
2. Centrifugazione per 1 minuto a 13.000 rpm per garantire l'eliminazione completa dei residui di buffer e contaminati.
3. Aggiunta nella colonnina di 750 µl di *buffer PE* di lavaggio
4. Centrifugazione per 1 minuto a 13.000 rpm
5. Dopo aver svuotato la colonnina dal residuo del buffer centrifugare una seconda volta per 1 minuto a 13.000 rpm, questa seconda centrifugazione garantisce la completa eliminazione del buffer di lavaggio.
6. Eluizione del DNA con 25 µl di H₂O Nuclesi free in una nuova eppendorf contrassegnata con l'identificativo del paziente

Parte del prodotto purificato ottenuto è utilizzato per la fase successiva dell'analisi, il rimanente conservato ad una temperatura di -20 °

2.3.5 Reazione di sequenza

La Reazione di sequenza è stata condotta con un volume finale di 20 µl contenente:

- 1 µl di DNA purificato
- 1 µl di un singolo primer con diluizione a 3,5 Mm
- 1 µl di Big Dye

- 2 μ l Buffer
- 15 μ l H₂O Rnasi free

La miscela di reazione è stata sottoposta a 25 cicli di reazione utilizzando il termociclatore

Temperatura	Tempo
96 °C	10 secondi
60°C	30 secondi
60°C	4 minuti

Il sequenziamento permette di ricostituire il preciso ordine delle basi azotate all'interno del filamento di DNA.

Esistono vari modi di sequenziare il DNA, in questo progetto nella prima fase è stato utilizzato il sequenziamento diretto Sanger, nella seconda parte dello studio su di una parte dei campioni analizzati con Sanger si è proceduto alla comparazione di dati ottenuti con analisi NGS utilizzando il macchinario Illumina.

Il sequenziamento Sanger risulta essere il metodo di elezione per lo studio dei geni *BRCA1* e *BRCA2* per la mancanza di hot spot mutazionali e la complessità dei due geni. Nel nostro caso i campioni di DNA sono stati sequenziati trami il sequenziatore automatico 3500 dell'Applied Biosystem. Questa metodica si basa sul principio di sequenziamento Sanger, cioè di terminazione di catena. Tale processo richiede una molecola di DNA ibrida costituita da DNA a singolo filamento e da un oligonucleotide costruito in modo tale che la sua sequenza 3' sia a monte del DNA in esame. L'oligonucleotide agisce come primer e la sua elongazione avviene grazie alla Dna Polimerasi I che permettel'incorporazione di nucleotidi modificati i

dideossinucleotidi trifosfati (ddNTP). Nella miscela di reazione oltre alla presenza dei dNTPs, c'è ciascuna base nella sua forma dideossinucleotidica caratterizzata dalla sostituzione al 3' del ribosio del gruppo ossidrilico -OH con un idrogeno -H. Questa sostituzione impedisce l'aggiunta di un nuovo nucleotide dopo l'incorporazione di quello modificato e quindi l'allungamento della catena, in quanto l'assenza dell'-OH al 3' del ribosio non permette la formazione di un nuovo legame fosfodiesterico. Ciascun ddNTP competerà per l'incorporazione nella sequenza con il corrispondente dNTP in modo del tutto casuale in questo modo si genereranno diversi filamenti che differiranno gli uni dagli altri per un singolo nucleotide. Ciascun ddNTP è, in tre, marcato con un fluorocromo diverso necessario per la loro discriminazione. Il filamento più corto corrisponde alla sequenza primer più un nucleotide quello più lungo sarà pari all'intera sequenza da amplificata. I filamenti prodotti avranno medesima sequenza al 5' ma differente al 3'. Terminata questa fase i diversi filamenti di DNA sono separati tramite elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore 3500 dell'Applied Biosystem.

2.3.6 Seconda purificazione con Sephadex

5,0 g di Sephadex una resina polimerica di destrano vengono sciolti in 75mL di acqua demineralizzata, 750 µl di tale soluzione viene messa in apposite colonnine e fatta centrifugare a 3000 rpm per 2 minuti. Il processo di centrifugazione permetterà l'impaccamento della resina polimerica a formare una colonnina sulla quale vengono caricati i 20 µl di campione corrispondenti all'intero volume derivante dalla reazione di sequenza. Un'ultima centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti permetterà l'eluizione del campione attraverso la colonnina e la conseguente purificazione. Il prodotto ottenuto viene caricato nei pozzetti delle piastre da sequenziamento

2.3.7 Analizzatore genetico Applied Biosistem 3500

Per l'analisi viene utilizzato l'analizzatore a fluorescenza della Applied Biosystems 3500. Nel corso dell'elettroforesi i 4 diversi fluorocromi diversi per ciascun ddNTPs sono rilevati da un raggio laser che provoca l'emissione di una radiazione luminosa a diversa lunghezza d'onda, ciascuna caratteristica per ciascuno dei quattro ddNTPs. La lunghezza d'onda viene poi rilevata da un fotomoltiplicatore sistema che produce diversi picchi di emissione ciascuno diverso per i quattro ddNTP. Questa tecnologia usa l'elettroforesi capillare di frammenti di sequenza (8 capillari). Questo sistema completamente automatizzato permette la rilevazione ed identificazione di ciascun ddNTP. Durante la corsa elettroforetica i frammenti di DNA vengono colpiti da un raggio laser, questo provoca l'eccitamento dei fluorocromi che marciano i frammenti. Ciscuno dei 4 fluorocromi emettono ad una lunghezza d'onda diversa, segnale che verrà rilevato da una cella fotelettrica e convertito in un segnale grafico. La sequenza dei picchi corrisponde alla sequenza degli acidi nucleici ed il colore di ciascun picco a quello di ciascuna base. In questo caso i desossinucleotidi sono legati al Big Dye contenete un colorante a base di floescina legato mediante un linker, un acido aminobenzoico, al colorante Accettore a base di diclororodamina. Un raggio lase eccita il colorante Donatore che trasferisce l'energia al colorante Accettore. Ciò permetterà l'avvenimento delle quattro reazioni del metodo Sanger in un'unica reazione. Il vantaggio dell'utilizzo di sistemi di trasferimenti di energia a singola molecola costituiti da una molecola Donatore ed una Accettore legati da un linker è l'ottenimento di un segnale omogeneo, un basso rumore di fondo, la luminosità maggiore del segnale facilità di interpretazione per basi

2.3.8 Analisi dell'elettroferogramma

L'elettroferogramma ottenuto, rappresenta sottoforma di picchi di diverso colore una per ciascuna delle quattro basi la sequenza nucleotidica. La ricerca di mutazioni è stata effettuata tramite l'utilizzo di software bioinformatico *Software Sequencing Analysis v.5.4*, *Finch TV v.1.4.0* per confronto con la sequenza di riferimento dei geni BRCA1 e BRCA2 (MIM# 600185). Per l'interpretazione delle varianti sono stati utilizzati i seguenti database: ENIGMA, UMD, LOVD, ClinVar (Figura 10-11-12).

Figura 10: Mutazione situata sull'esone 14 di BRCA2 c.1238 del; p Leu 413 Hisfs*17

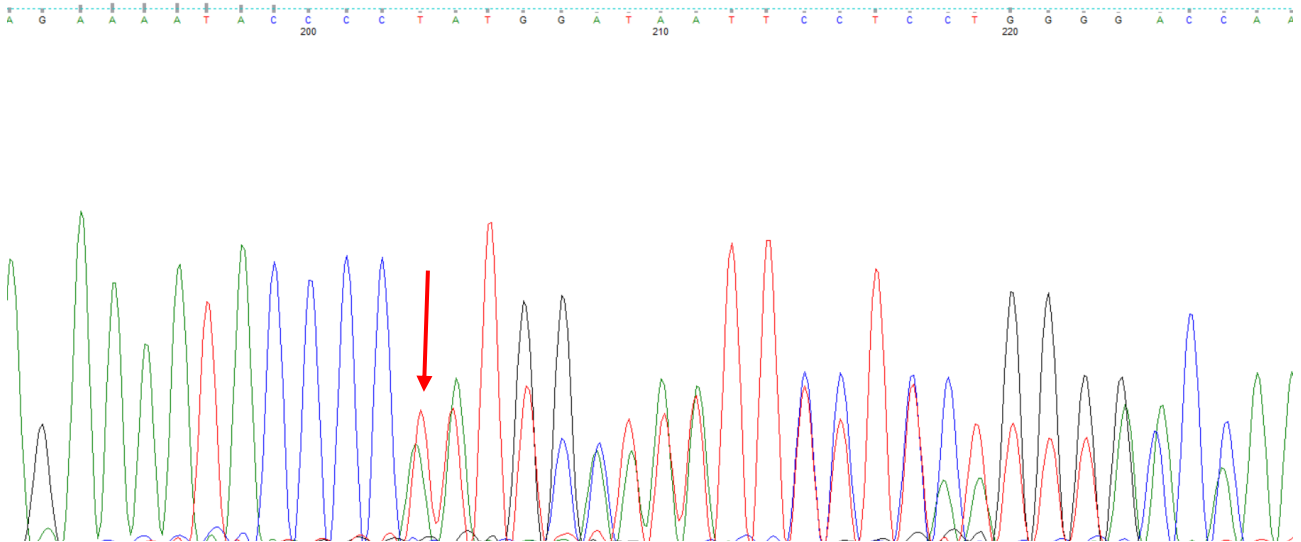


Figura 11: Mutazione situata sull'esone 12 di BRCA1

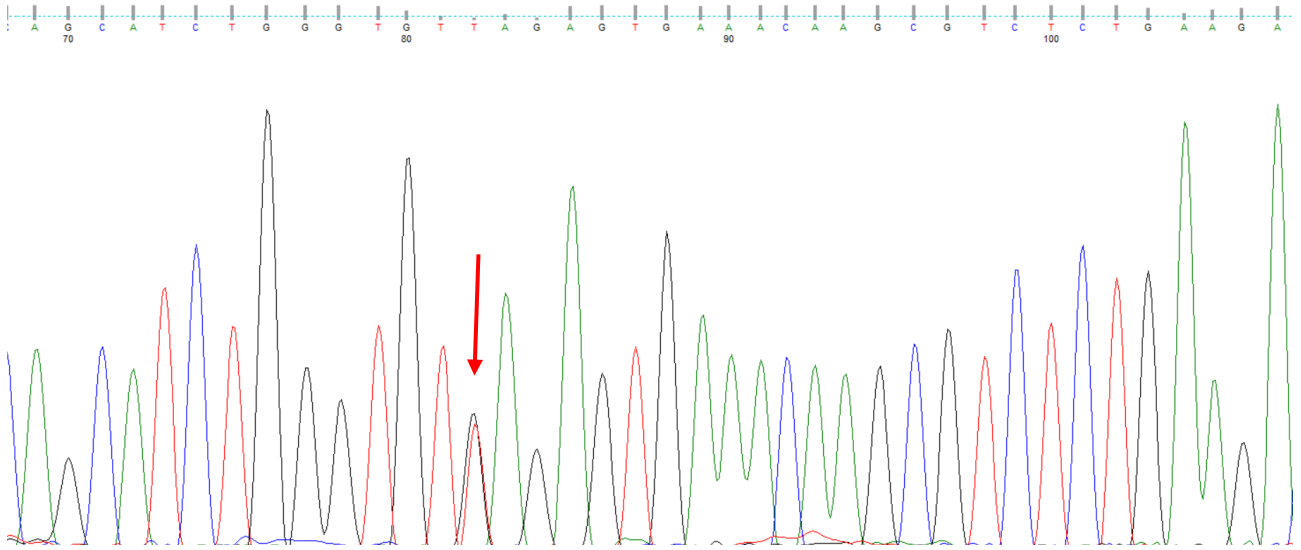
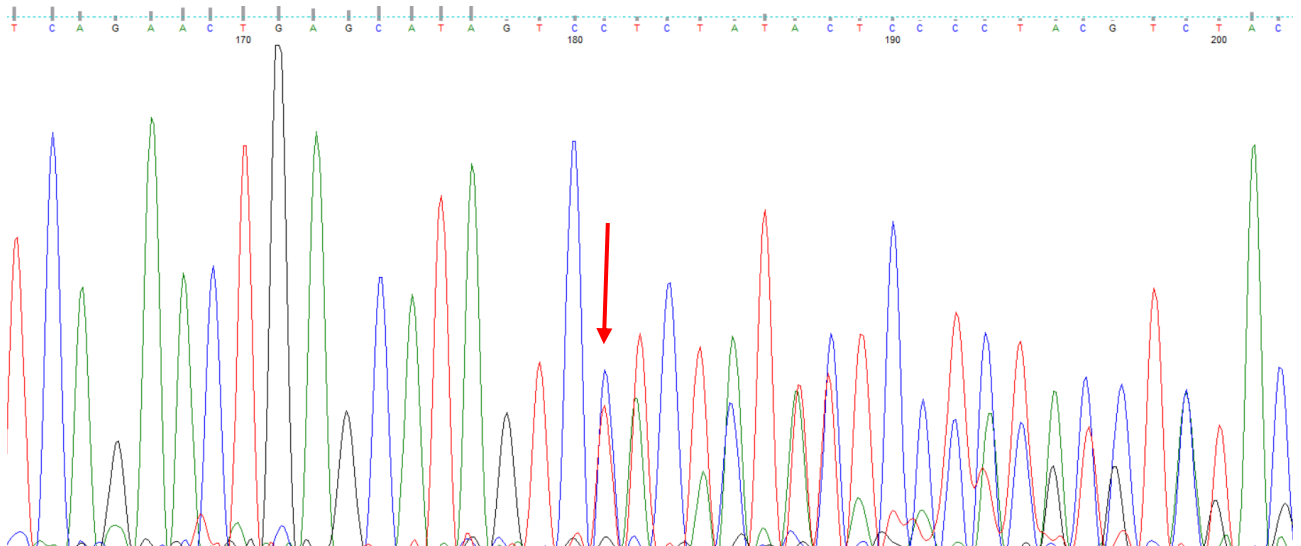


Figura 12: Mutazione sul gene BRCA2 ex.12, c.6275_6276 del TT la delezione di due Timine consecutive porta allo scorrimento della cornice di lettura dando luogo ad una mutazione frameshift



Capitolo 3

3. RISULTATI

3.1 Varianti trovate con sequenziamento diretto

Il progetto di dottorato include lo studio dei geni *BRCA1* e *BRCA2* su 100 pazienti (Tabella 10) selezionati previo counseling genetico, in un lasso di tempo che va dal 1 Settembre 2017 al 31 luglio 2022. Lo studio ha permesso di evidenziare nel nostro territorio una mutazione founder **c.4117G>T-p.Glu1373*** predisponente al Tumore ereditario della Mammella e dell'Ovaio geolocalizzata principalmente nell'area di Tagliacozzo. Nella maggior parte dei casi sono state evidenziate numerose varianti classificate dai vari database come di classe 1 o benigne. In sei pazienti (analizzati tra il 2020 e 2021) l'analisi genetica ha permesso di evidenziare varianti patologiche o di classe 5. Nello specifico oltre la mutazione founder situata nell'esone 12 di *BRCA1* sono emerse le seguenti mutazioni di classe cinque sullo stesso gene: nell'esone 3 la **c.117_118 del : p(C39*)**, nell'esone 20 la **c.5194-54_5277+72 del** che con la delezione di 209 paia di basi porta alla produzione di una proteina tronca non funzionante.

Sempre con focus 2020-2021 su *BRCA2* oltre a numerosi polimorfismi si evidenziano le seguenti mutazioni di classe 5: situata sull'esone 10 la **c.1238 del: p (L413 fs*)** individuata in 2 pazienti su 3 facenti parte dello stesso nucleo familiare, la **c.6275-6276 del TT : p.Leu2092fs** trovata due volte in due pazienti correlati tra loro, la mutazione **c.7007 G>C: p.R2336H** che cade nell'ultima base codante dell'esone 13 ed è stata identificata in quattro pazienti dello stesso nucleo familiare. Entrambe le mutazioni sono localizzate tra il dominio BRC-8 ed il dominio DBD (*DNA/DSS1 domain – helical,OB1, OB2, OB3*) di *BRCA2*

Tabella 10. Numero di Analisi Genetiche effettuate nei 5 anni di attività.

	2018	2019	2020	2021	2022
Tumori e Geni analizzati					
Ovaio, Mammella					
BRCA1/BRCA2					
Pazienti	8	15	2	6	31
Familiari non Affetti	24	40		5	69

Tabella 11: Varianti trovate su 13 pazienti BRCA2 analisi compiuta tra il 2020 e 2022

ESONE/ INTRONE	TYPE	SNV	SIGNIFI CATO (CLASSE)	
EX 2	5'UTR	NM_000059.3: c.-26G>A:p.?	1	
	intronica	NM_000059.3: c.68-38A>C:p.?	1	
INT 3	intronica	NM_000059.3: c.68-60C>T:p.?	1	
	intronica	NM_000059.3: c.68-74G>T:p.?	1	
	intronica	NM_000059.3: c.361+193T>A:p.?	1	
INT 7	intronica	NM_000059.3: c.631+183T>A:p.?	1	
	intronica	NM_000059.3: c.631+83T>A:p.?	1	
	intronica	NM_000059.3: c.681+125C>T:p?	1	
INT 8	intronica	NM_000059.3: c.651+56C>T:p.?	1	
INT 9	intronica	NM_000059.3: c.682-32A>G:p.?	2	
10	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.1114A>C:p.(H372N)	1	
	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.2335C>T:p.(L779=)	1	
	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=)	1	
	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.3344C>T:p.(S 1115F)	1	
	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.3807C>T:p.(V126=)(omozigosi 1 volta)	1	
		NM_000059.3: c.3807T>C (eterozigosi 1 volta)	1	
	11	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4528 G>T:p.(D1420Y)	1
	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.5429T>A:p.(V1810D)	1	
	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4989C>T:p.(V1663=)	1	
	Nonsense_Mutation	NM_000059.3: c.6275-6276 del TT:p.(L2092fs) (trovata 2 volte)	5	
intronica	NM_000059.3: c.6841+79 del TTAA NM_000059.3: c.6841+79_6841+83 del TTAA NM_000059.3: c.6838-120T>C (omozigosi 5 volte)			
13	Nonsense_Mutation	NM_000059.3: c.7007 G>CA:p.(R2336H) (VP trovata 4 volte)	Classe 5	

14	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7021C>T NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=)	
INT 16	Intronica	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.? (OMOZIGOSI)	1
INT 17	Intronica	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.? (ETEROZIGOSI)	1 Classe 2 /Classe3 LOVD
21	Intronica	c.7976+50A>G:p? c.7979+52C>A:p? c.5332+88 A>G (omozigosi 1 volta)	
22		c.8755-66T>C (omozigosi 1 volta)	Classe1 ncbi
24	Synonymous_Substitution	c.8953+120G>A c.9118-119G>T:p.(Q3047=)	Classe1
25		c.9118-6C>T	
26		c.9257-16 T>C	
27		c.9502-105A>T c.9976 A>T:p.(L3326*) c.10257+105 A>C(omozigosi 1 volta) c.10257+105 A>C(eterozigosi 1 volta)	Classe1 Enigma UMD

Tabella 12 Varianti trovate su 4 pazienti BRCA1 analisi compiuta tra l'anno 2020 e 2022

ESONE/ INTRONE	TYPE	SNV	SIGNIFICA TO (CLASSE)
INT 1		c.-19-60insTGAA (Introne 1)	
6		c.213-105C>T;	
7		c.302-97A>T+18C>A	
8		c.442-34C>T in omozigosi 1 /2 eterozigosi	
9		c.548-58 del T; c.1067A>G;LOVD	Classe1 UMD LOVD
	nonSynonymous_Substitut ion n	c.2077G>A:p.(D693N)	
	Synonymous_Substitution	c.2082C>T:p.(S694=)	
	Synonymous_Substitution	c.2311T>C:p.(L771=)	UMD
	nonSynonymous_Substitut ion	c.2612C>T; p.P871L c.2537A>T:p.(E846V)	
11	nonSynonymous_Substitut	c.2876G>A c.3058C>T:p.(P1020S)	

	ion		
	nonSynonymous_Substitution	c.3113A>G;p.(E1038G)	
	ion		
	nonSynonymous_Substitution	c.3548A>G;p.(K1183R)	
	ion	c.4308T>C;p.(S1436=)	
13	Synonymous_Substitution		
	nonSynonymous_Substitution	c.4837A>G;p.(S1613G)	LOVD
16	ion		
17		c.4987-40G>T	VUS Classe 3
18		c.5152+66 G>A	NCBI
19		c.5153-19T>G	
20		c.5277+92G>A	Mai riportata
21		c.5778-106C>T	
22		c.5406+58G>A	
23		c.5407-21G>T	Mai riportata

3.2 Mutazione Founder

Le mutazioni Founder sono una speciale classe di mutazioni genetiche, che spesso sono causa di patologia. L'alterazione genetica osservata con elevata frequenza in un gruppo di persone geograficamente o culturalmente isolate sono riconoscibili poiché localizzate in regioni note del DNA ed identiche in tutti i suoi portatori in quanto originate da un antenato comune, appunto the founder cioè il capostipite [7]. La loro rilevanza oltre ad essere correlata come prima cosa alla terapia Oncologica Personalizzata e nell'importantissimo percorso preventivo negli affetti, è legata ad una possibile identificazione della sua apparizione sul territorio ed il suo percorso di diffusione sullo stesso. Si potrebbe perciò in via presuntiva avere informazioni sulle migrazioni di specifici gruppi di persone nel corso della storia. Studi condotti dal 2018 fino ad oggi su pazienti selezionati dall'Unità di Oncologia Territoriale dell'Aquila ASL1 Abruzzo, e l'Unità di Genetica del Policlinico Gemelli hanno identificato ben 17 famiglie non correlate portatrici della mutazione founder c.4117G>T- p.Glu1373 *predisponente al Tumore ereditario della Mammella e dell'Ovaio.

Questa nuova mutazione founder ricorrente in numerosi famiglie di Abruzzo e Lazio vede la sua geolocalizzazione lungo il decorso del fiume Liri nella piccola città di Tagliacozzo: 6 Famiglie nella provincia di Teramo, 9 Famiglie in Lazio in provincia di Frosinone ed 1 Famiglia a Roma. Nel 2018 è stata trovata una seconda mutazione, questa volta su BRCA2 c.1238del-p.Leu413Hisfs*17.

La totalità delle famiglie analizzate, non correlate tra loro, che condividono la mutazione non senso sull'esone 12 di *BRCA1* c.4117G>T condividono un'origine comune da un'area geografica ristretta, presenti tutto intorno delle regioni Abruzzo e Lazio nell'Italia centrale. La conformazione “chiusa” del territorio determinata dalla presenza della catena montuosa vede la geolocalizzazione della mutazione circoscritta in una precisa area del territorio dell’Abruzzo, quella di Tagliacozzo (Figura13).

L'origine comune da un determinato territorio regionale del Centro Italia delle 17 famiglie portatrici della mutazione predisponente *BRCA1* c.4117G>T, (p.Glu1373*) e la cosegregazione di questa mutazione con la *BRCA1* AV c.3119G>A in tutti i 41 soggetti affetti e non affetti portatori della mutazione predisponente rappresentavano i risultati preliminari della rilevanza fondatrice di questa mutazione *BRCA1*. Questo polimorfismo ricorre con una prevalenza <7% nella popolazione italiana del Centro Italia.

L'ipotesi dell'effetto fondatore della mutazione nonsense *BRCA1* c.4117G>T è stata supportata dalla cosegregazione di questa mutazione con la mutazione *BRCA1* AV c.3119G>A. Le analisi dei marcatori microsatellitari nella regione 17q21 (D17S846, D17S1328, D17S855, D17S902, D17S806, tra cui D17S855 è intragenico) hanno confermato la presenza di un aplotipo comune co-segregante con la mutazione, nella regione definita dai marcatori D17S1328. La



Figura 13 Geolocalizzazione della mutazione founder *BRCA1* c.4117G>T, (p.Glu1373*)

dimensione della regione condivisa da tutti gli aplotipi è stata stimata in circa 400 kb. È interessante notare che questa regione conservata è breve, rispetto agli aplotipi precedentemente studiati di portatori di altre mutazioni fondatrici di *BRCA1* (Papi et al. 2009). L'ipotesi della mutazione nonsense *BRCA1* c.4117G>T come mutazione founder italiana è stata supportata dalla sua precedente descrizione in una famiglia canadese con origini italiane, considerando la forte immigrazione di persone dall'Abruzzo in Canada e in particolare nella regione di Toronto. La nostra osservazione preliminare del verificarsi della mutazione c.4117G>T, (p.Glu1373*) in famiglie apparentemente non imparentate dell'Italia Centrale è stata confermata dall'identificazione di 17 famiglie non imparentate, tutte accomunate da un'origine geografica comune. Mentre la mescolanza genetica e la migrazione aumentano la diversità di sequenza, le barriere geografiche e linguistiche generano isolati genetici, in cui sono comuni le mutazioni del fondatore.

3.3 NGS Illumina

Nella seconda parte del progetto di ricerca, grazie alla collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Teramo è stato possibile testare alcuni pazienti già analizzati con sequenziamento diretto con NGS Illumina per evidenziare la sovrapposizione dei risultati ottenuti. Il sequenziamento del DNA attraverso il sistema Illumina si basa sull'uso di adattatori. Attraverso la sonicazione il DNA viene frammentato in frammenti di lunghezza simile. Al 3' ed al 5' di ogni frammento vengono attaccati degli adattatori. I frammenti di DNA con legati gli adattatori vengono fatti legare su dei chip grazie alla presenza di frammenti di DNA complementari a quella degli adattatori. Si avvia la PCR utilizzando dei primer disegnati per legarsi agli adattatori. Inizia l'amplificazione del frammento di DNA, sono presenti tre nucleotidi standard più un quarto detto terminatore che non permetterà dopo

la sua incorporazione l'ulteriore allungamento del filamento. Il nucleotide terminatore è legato ad un fluoroforo, quando il ciclo di PCR si blocca viene colpito da un laser questo emette un segnale luminoso intercettato e letto. Segue una fase di lavaggio che serve a staccare il terminatore e viene fornita una nuova mix con diverso terminatore. Questo processo si sussegue per ciascuna base.

Tabella 13.1: Varianti INDIVIDUALI trovate sui geni BRCA1 e BRCA2 con sequenziamento NGS

PAZIENTE	GENE	ESONE/ INTRONE	TYPE	SNV	SIGNIFICATO (CLASSE)
	BRCA	1	EX 12	Nonsense_Mutation nonSynonymous_Su c.4117G>T:p.(E1373*)	5
	BRCA	1	EX 11	bstitution c.3119G>A:p.(S1040N)	1
	BRCA	1	INT 7	Intronic NM_007294.4: c.442- 34C>T:p.?	1
	BRCA	2	EX 2	5'UTR NM_000059.3: c.-26G>A:p.?	1
	BRCA	2	EX 10	nonSynonymous_Su bstitution c.1114A>C:p.(N372H)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substit ution c.3396A>G:p.(K1132=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substit ution c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substit ution c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA	2	EX 14	Synonymous_Substit ution c.7242A>G:p.(S2414=)	1
	BRCA	2	EX 14	nonSynonymous_Su bstitution c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA	2	INT 16	Intronic NM_000059.3: c.7806- 14T>C:p.?	1
P1	BRCA	1	EX 12	Nonsense_Mutation nonSynonymous_Su c.4117G>T:p.(E1373*)	5
	BRCA	1	EX 11	bstitution c.3119G>A:p.(S1040N)	1
	BRCA	1	INT 7	Intronic NM_007294.4: c.442- 34C>T:p.?	1
	BRCA	2	EX 10	nonSynonymous_Su bstitution c.1114A>C:p.(N372H)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substit ution c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substit ution c.6513G>C:p.(V2171=)	1

	BRCA 2	EX 14	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
P2	BRCA 1	EX 3	Nonsense_Mutation	NM_007294.4: c.117_118del:p.(C39*)	5
	BRCA 2	EX 2	5'UTR	NM_000059.3: c.-26G>A:p.?	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=)	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA 2	EX 14	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA 2	INT 16	Intronic	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	1
P3	BRCA 1	INT 7	Intronic	NM_007294.4: c.442-34C>T:p.?	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA 2	EX 14	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA 2	INT 16	Intronic	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	1
	BRCA 1	EX 20	CNV	c.5194-54_5277+72del; g.41208999-41209208	Del di 209 bp in frame 3
P4	BRCA 1	EX 24	3'UTR	NM_007294.4: c.*1287C>T:p.?	1
	BRCA 1	EX 16	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.4956G>A:p.(M1652I)	1
	BRCA 1	EX 16	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.4837A>G:p.(S1613G)	1
	BRCA 1	EX 13	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.4308T>C:p.(S1436=)	1
	BRCA 1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.3548A>G:p.(K1183R)	1
	BRCA 1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.3113A>G:p.(E1038G)	1
	BRCA 1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2612C>T:p.(P871L)	1
	BRCA 1	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2311T>C:p.(L771=)	1
	BRCA 1	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2082C>T:p.(S694=)	1

	BRCA	1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2077G>A:p.(D693N)	1
	BRCA	1	INT 8	Intronic	NM_007294.4: c.548-58del:p.?	1
	BRCA	2	EX 10	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.1114A>C:p.(N372H)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA	2	EX 14	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA	2	INT 16	Intronic	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	1
P5	BRCA	1	EX 24	3'UTR	NM_007294.4: c.*1287C>T:p.?	1
	BRCA	1	EX 16	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.4837A>G:p.(S1613G)	1
	BRCA	1	EX 13	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.4308T>C:p.(S1436=)	1
	BRCA	1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.3548A>G:p.(K1183R)	1
	BRCA	1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.3113A>G:p.(E1038G)	1
	BRCA	1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2612C>T:p.(P871L)	1
	BRCA	1	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2311T>C:p.(L771=)	1
	BRCA	1	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2082C>T:p.(S694=)	1
	BRCA	1	EX 11	nonSynonymous_Substitution	NM_007294.4: c.2077G>A:p.(D693N)	1
	BRCA	1	INT 8	Intronic	NM_007294.4: c.548-58del:p.?	1
	BRCA	2	EX 2	5'UTR	NM_000059.3: c.-26G>A:p.?	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.2817C>T:p.(T939=)	2
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA	2	EX 11	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA	2	EX 14	Synonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=)	1
	BRCA	2	EX 14	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA	2	INT 16	Intronic	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	1
	BRCA	EX 26	nonSynonymous_Substitution	NM_000059.3:	3	

	2		bstitution	c.9586A>G:p.(K3196E)	
P6	BRCA 1	EX 11	nonSynonymous_Su bstitution	NM_007294.4:exon11:c.4039 A>G:p.(R1347G)	1
	BRCA 1	INT 7	Intronic	NM_007294.4:intron7:c.442- 34C>T:p.?	1
	BRCA 2	EX 2	5'UTR	NM_000059.3: c.-26G>A:p.?	1
	BRCA 2	EX 10	FrameShift_Deletion	NM_000059.3: c.1238del:p.(L413Hfs*17)	5
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substit ution	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=)	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substit ution	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=)	1
	BRCA 2	EX 11	Synonymous_Substit ution	NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	1
	BRCA 2	EX 14	Synonymous_Substit ution	NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=)	1
	BRCA 2	EX 14	nonSynonymous_Su bstitution	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	1
	BRCA 2	INT 16	Intronic	NM_000059.3: c.7806- 14T>C:p.?	1

Tabella 13.2

ESONI /INTRONI BRCA1	PAZIENTI Analisi BRCA1				
	1	2	3	4	5
EX 2					
EX 3	/	/	NM_007294.4: c.117_118del:p.(C39*)		
INT 7	NM_007294.4: c.442-34C>T:p.?	NM_007294.4: c.442-34C>T:p.?		NM_007294.4: c.442-34C>T:p.?	NM_007294.4:intro n7:c.442-34C>T:p.?
EX 11	NM_007294.4: c.3119G>A:p.(S1040 N)	NM_007294.4: c.3119G>A:p.(S1 040N)			NM_007294.4:exon 11:c.4039A>G:p.(R1 347G)
EX 12	NM_007294.4: c.4117G>T:p.(E1373 *)	NM_007294.4: c.4117G>T:p.(E1 373*)			
EX 20				c.5194- 54_5277+72del; g.41208999- 41209208	
ESONI/IN TRONI BRCA2	PAZIENTI Analisi BRCA2				
	1	2	3	4	5

EX 2	NM_000059.3: c.-26G>A:p.?		NM_000059.3: c.-26G>A:p.?		NM_000059.3: c.-26G>A:p.?
EX 10	NM_000059.3: c.1114A>C:p.(N372H)	NM_000059.3: c.1114A>C:p.(N372H)			NM_000059.3: c.1238del:p.(L413Hfs*17)
EX 11	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=) NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=) NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=) NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)
EX 14	NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=) NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)		NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=) NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)
INT 16	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?		NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?

Tabella 13.3

ESONI /INTRONI BRCA1	PAZIENTI Analisi BRCA1	
	1	2
INT 8	NM_007294.4: c.548-58del:p.?	NM_007294.4: c.548-58del:p.?
EX 11	NM_007294.4: c.3548A>G:p.(K1183R) NM_007294.4: c.3113A>G:p.(E1038G) NM_007294.4: c.2612C>T:p.(P871L) NM_007294.4: c.2311T>C:p.(L771=) NM_007294.4: c.2082C>T:p.(S694=) NM_007294.4: c.2077G>A:p.(D693N)	NM_007294.4: c.3548A>G:p.(K1183R) NM_007294.4: c.3113A>G:p.(E1038G) NM_007294.4: c.2612C>T:p.(P871L) NM_007294.4: c.2311T>C:p.(L771=) NM_007294.4: c.2082C>T:p.(S694=) NM_007294.4: c.2077G>A:p.(D693N)
INT 13	NM_007294.4: c.4308T>C:p.(S1436=)	NM_007294.4: c.4308T>C:p.(S1436=)
EX 16	NM_007294.4: c.4956G>A:p.(M1652I) NM_007294.4: c.4837A>G:p.(S1613G)	NM_007294.4: c.4837A>G:p.(S1613G)
EX 12		

EX 24	NM_007294 .4: c.*1287C>T:p.?	NM_007294.4: c.*1287C>T:p.?
ESONI/ IN TRONI BRCA2	PAZIENTI Analisi BRCA2	
	1	2
EX 2		NM_000059.3: c.-26G>A:p.?
EX 10	NM_000059.3: c.1114A>C:p.(N372H)	
EX 11	NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)	NM_000059.3: c.2817C>T:p.(T939=) NM_000059.3: c.3396A>G:p.(K1132=) NM_000059.3: c.4563A>G:p.(L1521=) NM_000059.3: c.6513G>C:p.(V2171=)
EX 14	NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)	NM_000059.3: c.7242A>G:p.(S2414=) NM_000059.3: c.7397T>C:p.(V2466A)
INT 16	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?	NM_000059.3: c.7806-14T>C:p.?
EX 26		NM_000059.3: c.9586A>G:p.(K3196E)

3.4 Discussione

Il progetto di Dottorato di Ricerca che ho sviluppato si è inserito nell'ambito della realizzazione, nella prima fase, delle procedure per l'identificazione di mutazioni puntiformi e varianti nei geni BRCA1 e BRCA2 in una prima serie di pazienti e famiglie a rischio genetico selezionate presso l'ambulatorio di Prevenzione Oncologica, UOSD Assistenza Oncologica Territoriale, ASL1 Abruzzo Università L'Aquila, sulla base di metodologie convenzionali al sequenziatore automatico capillare con l'obiettivo di realizzare la catalogazione completa di mutazioni e varianti in singoli pazienti caso-indice, oltre che verificare la segregazione delle mutazioni identificate.

Tale realizzazione ha riguardato l'analisi completa dei geni BRCA1/BRCA2, in particolare riferita all'identificazione delle tipologie di mutazioni alle quali il nostro gruppo di ricerca ha lavorato negli ultimi 20 anni: mutazioni puntiformi (49); delezioni cromosomiche (50, 51); VUS di significato sconosciuto coinvolgenti siti di splicing (52).

La realizzazione di tale progetto ha consentito di identificare una nuova mutazione founder: la mutazione non senso BRCA1 situata sull'esone 12 c.4117G>T (p.Glu1373*) precedentemente descritta circa 20 anni fa come BRCA1 G4236T in un esteso studio di popolazione in un progetto di screening per cancro ovarico in Ontario, Canada emersa in pazienti con origini Italiane [Harvey A. et al., 2001]. Durante gli anni di ricerca è stato possibile caratterizzare questa mutazione proprio sul nostro territorio effettuando analisi sui geni BRCA1 e BRCA2 in pazienti selezionati e quindi l'identificazione e la sua caratterizzazione eseguita nel Programma italiano sui tumori ereditari delle regioni Abruzzo e Lazio come mutazione fondatrice della popolazione italiana proveniente dall'Italia centrale, predisponente all'ovaio, tumori della mammella e associati a BRCA1.

La mutazione founder non senso situata sull'esone 12 di BRCA1, c.4117G>T (p.Glu1373*) è stata successivamente confermata complessivamente in 17 famiglie non correlate tra loro originarie principalmente nel comune di Tagliacozzo e lungo il decorso del fiume Liri.

La fase più recente del progetto è stata avviata tra il 2019 e il 2021 ed è partita dall'analisi di una prima serie di campioni selezionati per la presenza di mutazioni note o per alto rischio di predisposizione in assenza di identificazione di mutazioni BRCA, ovvero non informativi, secondo la metodologia descritta convenzionale. Sono emerse le seguenti mutazioni di classe 5: BRCA2 esone 10, c.1238 del: p (L413 fs*) individuata in 2 pazienti su 3 facenti parte dello stesso nucleo familiare; BRCA2 esone 13, c.6275-6276 del TT,

p.Leu2092fs trovata due volte in due pazienti correlati tra loro; BRCA2 esone 13, c.7007 G>C, p.R2336H che cade nell'ultima base codante dell'esone 13 ed è stata identificata in quattro pazienti dello stesso nucleo familiare. Entrambe le mutazioni sono localizzate tra il dominio BRC-8 ed il dominio DBD (DNA/DSS1 domain –helical,OB1, OB2, OB3) di BRCA2.

Tale prima fase di implementazione è stata programmata per realizzare un doppio controllo, da un lato della metodologia convenzionale realizzata sui casi a rischio non informativi e dall'altro un controllo iniziale della strategia NGS sui 2 geni prevalentemente coinvolti per verificare la conferma di identificazione dei casi positivi. L'ottenimento dei dati NGS è stato possibile grazie alla collaborazione con L'Istituto Zooprofilattico di Teramo.

3.5 Conclusioni e prospettive

La ricerca e identificazione delle mutazioni predisponenti al cancro mammella/ovaio nei geni BRCA permette l'accesso dei pazienti selezionati a terapie oncologiche personalizzate, inoltre, la sua effettuazione in pazienti sani ma possibili portatori di VP costituzionali (germinali) nei geni BRCA ha scopo preventivo, cioè volto alla ricerca di VP su questi geni che andranno ad indicare la predisposizione verso una condizione patologica. Oltre questo fondamentale obiettivo lo studio ha permesso l'identificazione e caratterizzazione di numerose varianti appartenenti alle diverse classi utilizzando sequenziamento convenzionale. Un gruppo ristretto degli stessi pazienti, inoltre, è stato analizzato tramite sequenziamento NGS Illumina andando a confermare tutte le varianti trovate in precedenza.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dr. Douglas Easton, Cancer Research U.K. Genetic Epidemiology Unit, MeijersHeijboer et al., CHEK2*1100delC and Susceptibility to Breast Cancer: A Collaborative Analysis Involving 10,860 Breast Cancer Cases and 9,065 Controls from 10 Studies *Am J Hum Genet.* 2004 Jun; 74(6): 1175–1182.
- 2) Marc Tischkowitz et al., Rare germline mutations in PALB2 and breast cancer risk: A population-based study *Human mutation* Volume 33, Issue 4 (2012) p. 674-680
- 3) N. M. McInerney et al., Evaluation of variants in the CHEK2, BRIP1 and PALB2 genes in an Irish breast cancer cohort *Breast Cancer Research and Treatment* volume 121, pages 203–210 (2010)
- 4) Anthony Renwick et al., ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles *Nature Genetics* volume 38, pages 873–875 (2006)
- 5) Jirina Bartkova et al., Aberrations of the MRE11–RAD50–NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene *Molecular Oncology* volume 2, December 2008, p. 296-316
- 6) Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants Shuai Li, MD, PhD^{1,2,3}; Valentina Silvestri
- 7) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1
Y Miki¹, J Swensen, D Shattuck-Eidens, P A Futreal, K Harshman, S Tavtigian, Q Liu, C Cochran, L M Bennett, W Ding,
- 8) Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. “Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product” *Nat Genet.* 1996; 14(4): 430-40.
- 9) Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. “RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(20): 11364-9.

- 10) Morris JR, Solomon E. “BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair” *Hum Mol Genet.* 2004; 13(8): 807-17.
- 11) Rohit Prakash,1,3 Yu Zhang,1,3 Weiran Feng,1,2,3 and Maria Jasin1 Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015
- 12) Alvaro N.A. Monteriro, BRCA1: exploring the link to trascription
- 13) Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. ““The BRCA1 Cterminal domain: structure and function” *Mutat Res.* 2000; 460(3-4): 319-32.
- 14) Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, ElDeiry WS. “BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity” *Oncogene* 1998; 16(13): 1713-21.
- 15) Yarden RI, Brody LC. “BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(9): 4983-8.
- 16) Gori S., Cortesi L. et al. Raccomandazioni 2019 per l’implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma mammario e nei familiari a rischio elevato di neoplasia. AIOM-ANISC-SICO-SIGU-SIBIOC-SIAPEC-IAP-Fondazione AIOM. Ottobre 2019.
- 17) Wong A.K. et al., RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem*, 1997. 272(51): p. 31941-4. 112.
- 18) BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer Nancie Petrucelli, MS, Mary B Daly, MD, PhD, and Tuya Pal, MD
- 19) Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, ElDeiry WS. “BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity” *Oncogene* 1998; 16(13): 1713-21.
- 20) Erkkö H. et al., A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, 2007. 446(7133): p. 316-9
- 21) Chey Loveday et al., Germile RAD51 mutation confer suscetibility to ovarian cancer. *Nature Genetics*,2012 ,44, p. 475–476
- 22) Shattuck-Eidens D. et al., A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. Implications for presymptomatic testing and screening. *JAMA*, 1995. 273(7): p. 535–41

- 23) PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response Feng Zhang^{1,3}, Jianglin Ma^{2,3}, Jiaxue Wu^{1,3}, Lin Ye¹, Hong Cai², Bing Xia², and Xiaochun Yu¹ *Curr Biol.* 2009 March 24; 19(6): 524–529
- 24) Zhong Q. et al., Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, 1999. 285(5428): p. 747–50
- 25) Yang H. et al., BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, 2002. 297(5588): p. 1837-48.
- 26) Davies A.A. et al., Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*, 2001. 7(2): p. 273-821
- 27) Yuan S.S. et al., BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res*, 1999. 59(15): p. 3547-51
- 28) Esashi F. et al., CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 2005. 434(7033): p. 598-604
- 29) Kristensen C.N. et al., Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat Res*, 2010. 694(1-2): p. 60-4
- 30) Zhang J. et al., Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 708-18
- 31) Yang H. et al., BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, 2002. 297(5588): p. 1837-48
- 32) Kristensen C.N. et al., Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat Res*, 2010. 694(1-2): p. 60-4
- 33) Zhang J. et al., Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 708-18
- 34) Fokkema I.F., den Dunnen J.T. and Taschner P.E., LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum Mutat*, 2005. 26(2): p. 63-8
- 35) Spearman A.D. et al., Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance. *J Clin Oncol*, 2008. 26(33): p. 5393-400
- 36) Clinically Applicable Models to Characterize BRCA1 and BRCA2 Variants of Uncertain Significance Andrew D. Spearman, Kevin Sweet, Xiao-Ping Zhou, Jane McLennan, Fergus J. Couch, and Amanda Ewart Toland

- 37) Quiles F. et al., Functional and structural analysis of C-terminal BRCA1 missense variants. *PLoS One*, 2013. 8(4): p. e61302. 183
- 38) Multifactorial likelihood assessment of BRCA1 and BRCA2 missense variants confirms that BRCA1: c.122A>G(p.His41Arg) is a pathogenic mutation. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86836
- 39) <https://enigmaconsortium.org>
- 40) Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008; 20:1282-1291
- 41) Xia B. et al., 2006. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 22: 719–729
- 42) Oliver A.W. et al., Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep*, 2009. 10(9): p. 990-6
- 43) Zhou Y. et al., Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(3): p. e19
- 44) Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. “RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(20): 11364-9.
- 45) Siaud N. et al., Plasticity of BRCA2 function in homologous recombination: genetic interactions of the PALB2 and DNA binding domains. *PLoS Genet*, 2011. 7(12): p. e1002409.
- 46) Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. ““The BRCA1 Cterminal domain: structure and function” *Mutat Res*. 2000; 460(3-4): 319-32.
- 47) 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. [PubMed: 7545954]
- 48) Galkin VE, Esashi F, Yu X, Yang S, West SC, Egelman EH. BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8537–8542. [PubMed: 15937124
- 48) Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008; 20:1282-1291

- 49) Giuseppe Giannini, Carlo Capalbo, Elisabetta Ristori, Enrico Ricevuto et al. Novel BRCA1 and BRCA2 germline mutation and assessment of mutation spectrum and prevalence in Italian breast and/or ovarian cancer families.
- 50) Federica Casilli et al Human Mutation 2002 Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments
- 51) F. Casilli et al. Med Gen 2006 Sep. The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutation
- 52) Daniela di Giacomo et al. Human Mutation 34(11) 2013 Functional Analysis of a Large set of BRCA3 exon 7 Variants Highlights the Predictive Value of Hexamer Score in Detecting Alterations of Exonic Splicing Regulatory Elements