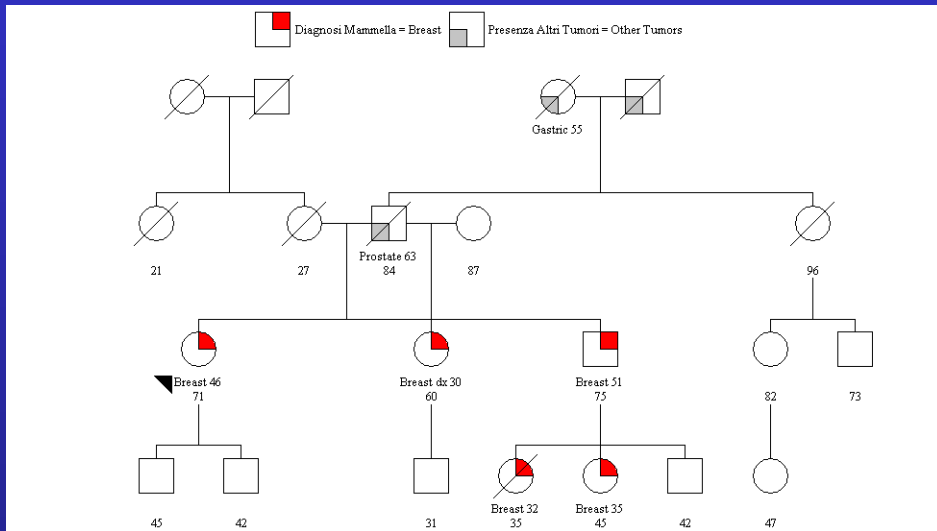


# LA CONSULENZA GENETICA E I TEST GENETICI NELLA PRATICA CLINICA: IL CARCINOMA MAMMELLA E OVAIO



MARIA ADELAIDE CALIGO  
AZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA PISANA

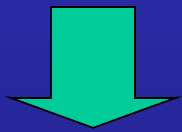
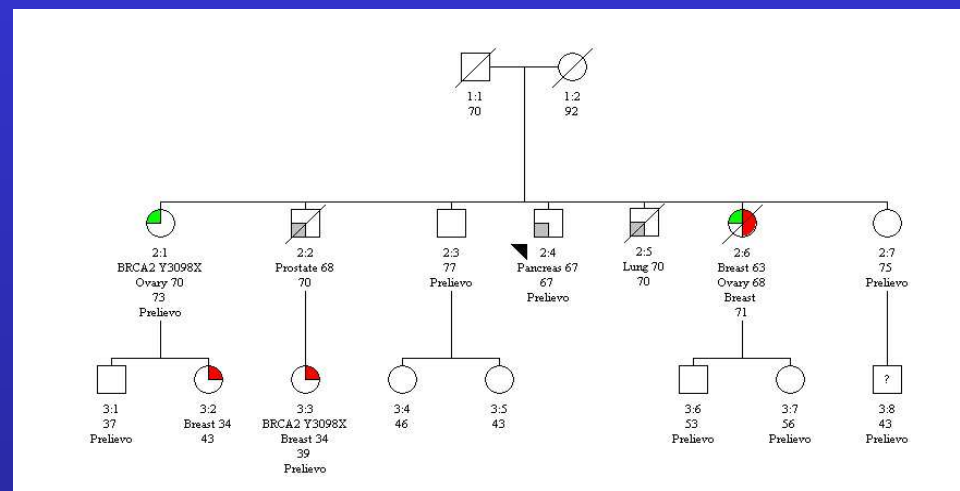
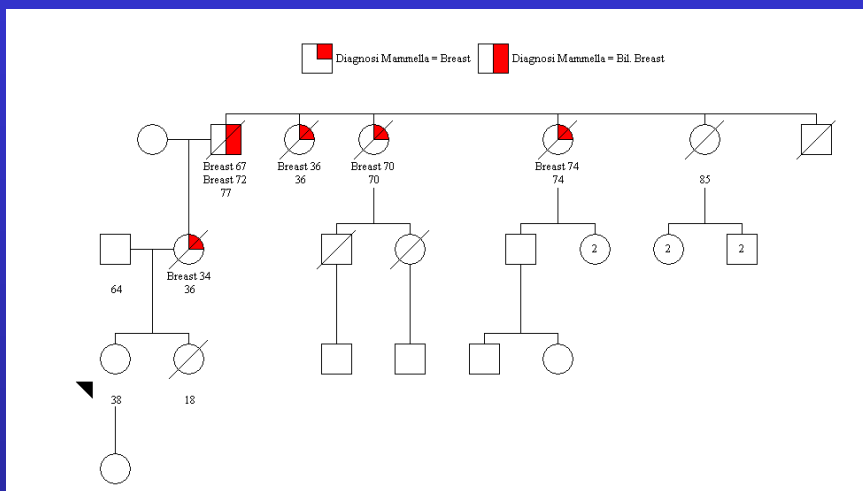
# Tumore familiare della mammella/ovaio



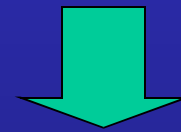
familiarità  
fattore di rischio

aumentato rischio di tumore nei  
parenti di donne affette rispetto  
alla popolazione generale

- rischio piu' elevato piu' precoce é l'età di insorgenza della malattia
- aumenta ancora se esistono piu' casi di parenti affette



- predisposizione ristretta al cancro della mammella

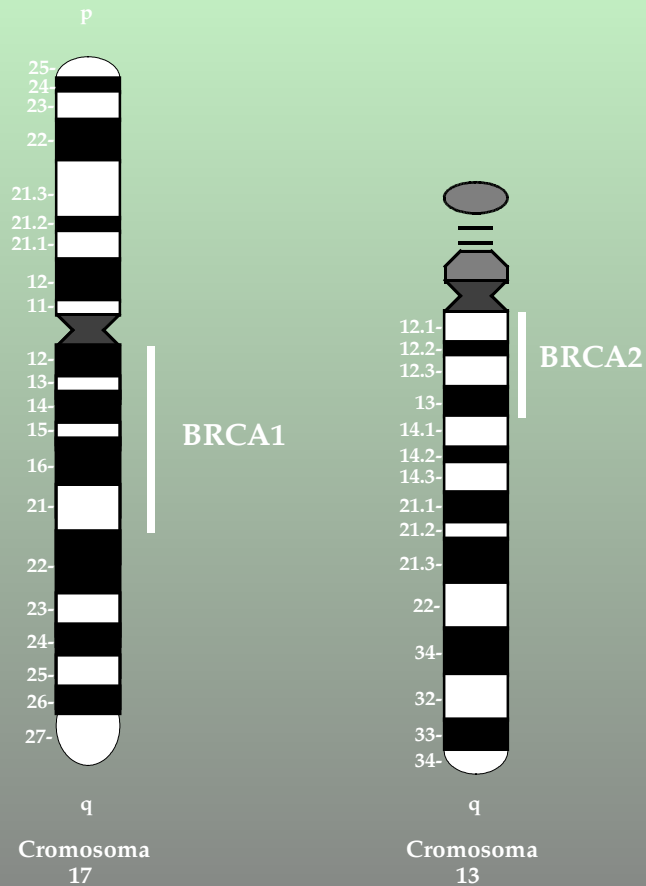


- aumentata suscettibilità anche per il carcinoma ovarico e per altri tumori

- stretta associazione per la suscettibilità sviluppo del tumore mammella/ovaio

# BRCA1

# BRCA2



**BRCA1** (Miki et al Science, 66-71, 1994)

**24 esoni (22 codificanti)**

**Proteina nucleare 1863aa**

**BRCA2** (Wooster et al Nature, 789,1995)

**27 esoni (26 codificanti)**

**Proteina nucleare 3418aa**

**Esoni 11 >60% proteina**

**BRCA1 e BRCA2 sono localizzati in regioni di DNA ripetuto**

# BRCA1&2-associated Breast and Ovarian Cancer Syndrome

- Prevalenza dei carriers nella popolazione occidentale  
1:150-1:800
- Fenotipo clinico:  
Età di insorgenza precoce, tumore bilaterale sincrono o metacrono,  
tumore ad organi associati specie mammella ed ovaio
- Spettro tumorale associato:  
**BRCA1:** tumori alla mammella, ovaio  
**BRCA2:** tumori alla mammella maschile, prostata , pancreas,  
altri tumori
- Fenotipo dei tumori mammari  
**BRCA1:** Triplo negativo, Basal like,  
**BRCA2:** Er+/Pr+
- Nessun altro segno patognomonico evidente

# CRITERI DI IDENTIFICAZIONE dei CARRIER (HBOC\EOBC\HOC)

## Casi Singoli :

- Ca mammella dx < 40anni
- Ca ovaio dx < 50anni
- Ca mammella+ovaio
- Ca bilaterale mammella < 50anni

## Casi familiari

### 3 affetti (parenti di 1° grado)\*

- Ca mammella dx < 50 + Ca mammella
- Ca mammella dx < 50 + Ca ovaio
- Ca ovaio + Ca ovaio
- Ca mammella maschile + Ca Ovaio e/o Ca mammella

### 3 affetti (parenti di 1° grado)\*

- Ca mammella qualsiasi età

\*2° grado per linea paterna

# Stime di PROBABILITA' pre - test di identificare un difetto genetico (si propone il test a chi ha una $PP \geq 10\%$ )

---

## Regressione logistica

caratteristiche  
qualificanti  
dei nuclei famigliari a  
mutazione nota



probabilità di mutazione  
in geni noti

## Modello Bayesiano

probabilità di  
aggregazione casuale

< >

difetto genetico

- frequenza allelica
- penetranza
- frequenza della npl nella popolazione generale

# REGRESSIONE LOGISTICA

Myriad Genetic Laboratories  
Mutation Prevalence Tables



**Stime di PROBABILITA' pre - test**  
di identificare un difetto genetico in BRCA1o2

Table of prevalence-Method used: J. Clinical Oncology 2002

Empiric model

1. The Prevalence of Deleterious Mutations in BRCA1 and BRCA2 (Excludes Individuals of Ashkenazi Ancestry)

Patient's History	Family History (Includes at least one first or second degree relative)					
	No breast cancer <50, or ovarian cancer; in any relative. <sup>†</sup>	Breast cancer <50 in one relative; no ovarian cancer in any relative.	Breast cancer <50 in more than one relative; no ovarian cancer in any relative.	Ovarian cancer at any age in one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Ovarian cancer in more than one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age. <sup>††</sup>
No breast cancer or ovarian cancer at any age	2.7%	4.4%	9.8%	6.2%	8.9%	16.4%
Breast cancer ≥ 50	2.5%	9.1%	12.2%	6.8%	12.1%	21.8%
Breast cancer <50	8.0%	18.6%	33.7%	16.0%	26.9%	46.4%
Male breast cancer	14.3%	18.8%*	50.0%*	0%*	None Tested	100%*
Ovarian cancer at any age, no breast cancer	9.2%	34.2%	39.5%	24.4%	32.0%	49.1%
Breast cancer ≥50 and ovarian cancer at any age	22.0%	7.7%*	41.7%*	10.0%*	42.9%*	54.5%*
Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age	31.6%	61.5%	76.9%*	64.3%*	62.5%*	82.8%

<sup>†</sup> May include families with breast cancer ≥50 (in women or men).

<sup>††</sup> Includes family members with either or both diagnoses.

Number of observations in Table 1 is 8074

\*N<20



# Stime di **PROBABILITA'** pre - test di identificare un difetto genetico in BRCA1o2

## MODELLO GENETICO-BAYESIANO

basato sulla frequenza allelica, penetranza della mutazione  
nella popolazione, incidenza della neoplasia nella popolazione

CaGene3.3.2

U.T. Southwestern Medical Center at Dallas  
present.  
**CancerGene**  
with  
B R C A P R O  
Duke University Institute of Statistics  
and Decision Sciences

Enter Pedigree  
Load File  
Cancer Syndromes  
Set-up  
Info  
Credits  
Exit

Copyright © The University of Texas, 1998-2000. All rights reserved.

6/18/2002  
PISA126  
10

### BRCA Mutation Probability Models

Print  
Quit

	Proband Probability
<b>BRCA1</b>	
Couch (U. Penn)	0.545
Shattuck-Eidens (Myriad I)	0.325
BRCAPRO	0.812
<b>BRCA2</b>	
BRCAPRO	0.094
<b>BRCA1 or 2</b>	
NCI CART	none
Myriad.com (MyriadII)	0.511
BRCAPRO	0.906

**Pedigree Information**  
Ashkenazi family: No  
Number of family members: 11  
Number with breast cancer only: 2  
Number with ovarian cancer only: 0  
Number both breast and ovarian cancer: 1  
Number with bilateral breast cancer: 0

Ontario FHAT: 25

Values expressed as probabilities, not percents

"none" means no calculation possible

CancerGene Version 3.3  
Myriad.com table 08/23/2000

Copyright © The University of Texas, 1998-2000. All rights reserved.

# Fenotipo dei tumori mammari nella BRCA1&2-associated Breast and Ovarian Cancer Syndrome

## BRCA1

Alto grado

Scarsamente differenziati

Negativi per l'espressione di ER/Pr ed Her2/neu

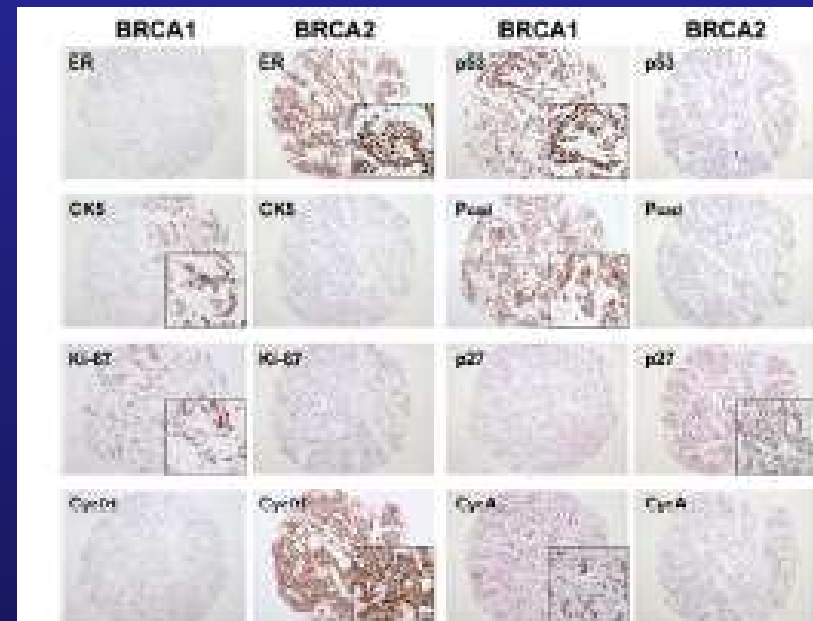
Positivi per l'espressione di citocheratine Basali CK5 e CK6

Overesprimimenti CycE e p53

Più frequentemente midollari

## BRCA2

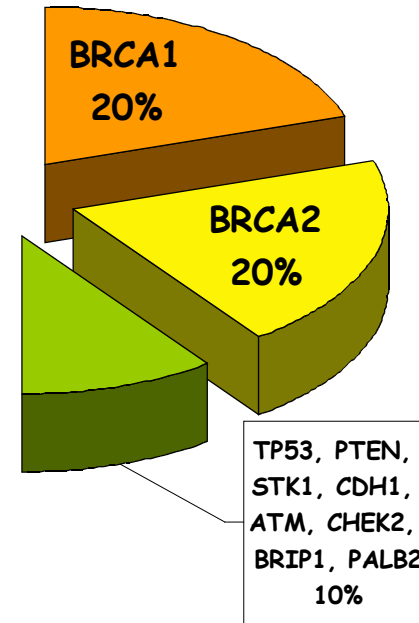
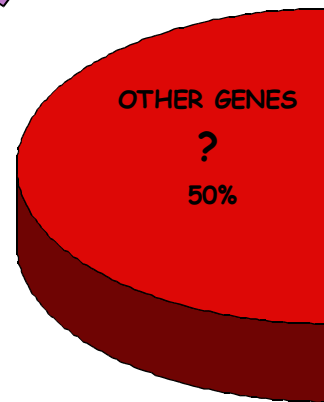
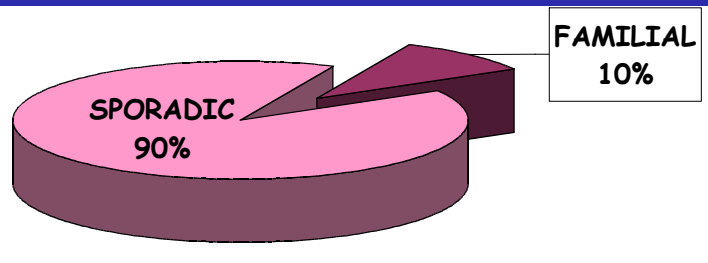
Nessun fenotipo particolare



# Fenotipo dei tumori ovarici nella BRCA1&2-associated Breast and Ovarian Cancer Syndrome

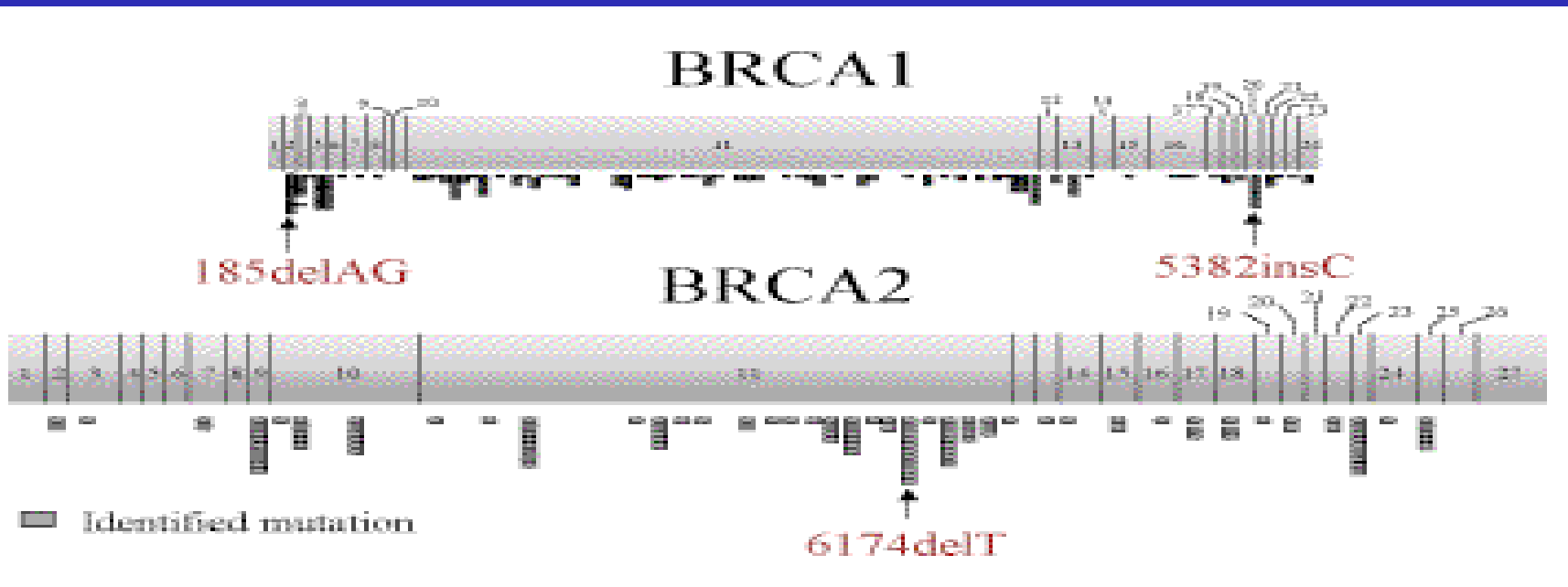
- Istotipo Sieroso-papillare meno frequente endometriode e quello a cellule chiare
- Frequenti anche localizzazione alle tube del Falloppio e al peritoneo.

# Tumore mammella e ovaio



## BRCA1&2 : spettro mutazionale

Breast Cancer Information Core (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>)  
elenca più di 1560 diverse mutazioni/polimorfismi per BRCA1 e  
1880 per BRCA2



### No hot spot mutazionali

80% frameshift o nonsense

7% varianti di splicing

10% riarrangiamenti genomici

patogenetiche

? %UVP (missense, intronic variants)= patogenetiche?

• MUTAZIONI PRIVATE

• MUTAZIONI  
FONDATORE

AD

EFFETTO



185delAG	BRCA1	Ashkenazim	41 %
5382insC	BRCA1	Ashkenazim	6%
6174delT	BRCA2	Ashkenazim	6%
995del5	BRCA2	Icelanders	4%
(ovca)			
C4446T	BRCA1	French-Canadian	
2804delA	BRCA1	Dutch-Belgians	
3171ins5	BRCA1	Swedish	23-26%

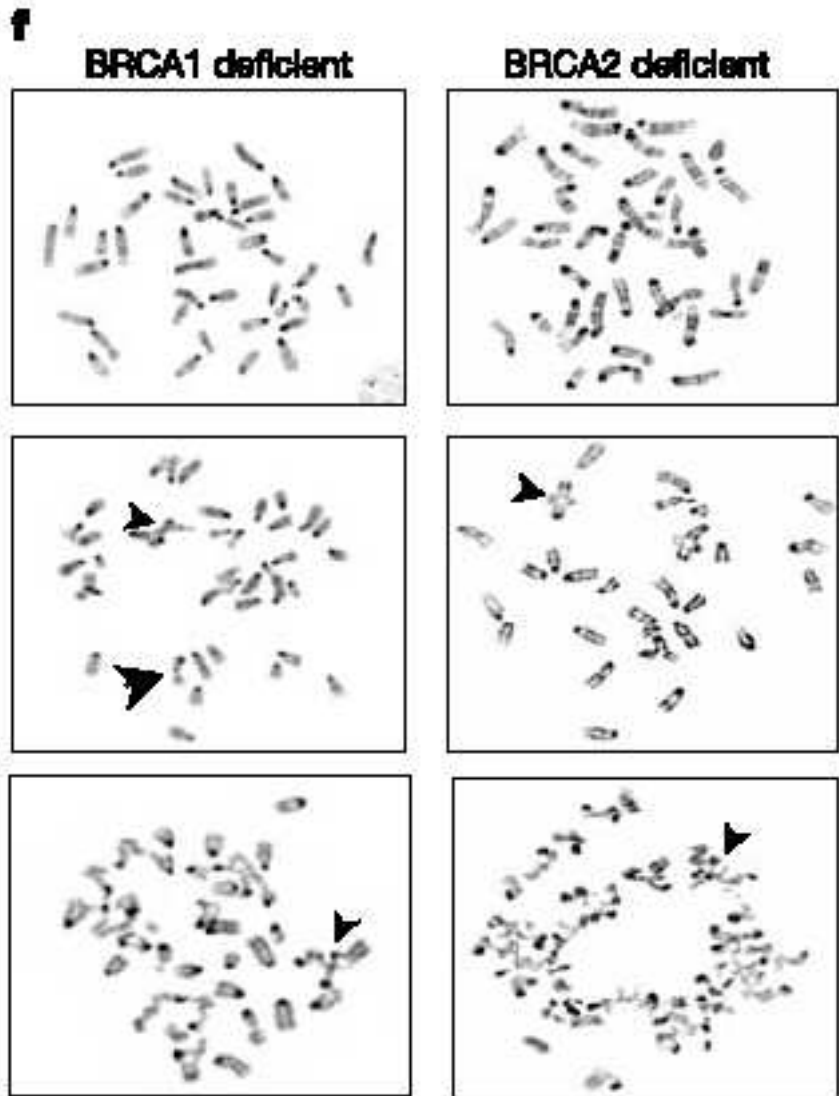
Frequenza dei carrier nella  
popolazione generale

**BRCA1:1/974**

**BRCA2:1/734**

(Antoniou 2002)

# BRCA1&2 sono essenziali nel preservare la struttura cromosomica : soppressori della instabilità genomica

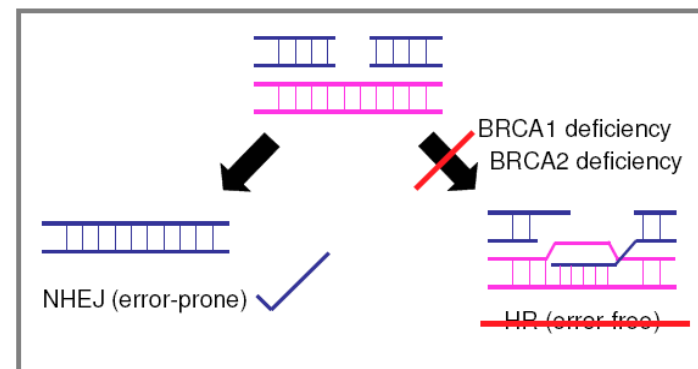


## RISPOSTA AL DANNO DSB AL DNA :

Coinvolti nel RIPARO via HR, NHEJ, SSA  
Le cellule BRCA-deficienti sono  
cromosomicamente instabili

QUESTA INSTABILITA' generalizzata e' Alla  
BASE DELLO SVILUPPO DEL TUMORE

BRCA-deficient cells repair DNA breaks by  
error-prone mechanisms



L.S. anni 38

**28 aa:** carcinoma mammella sx

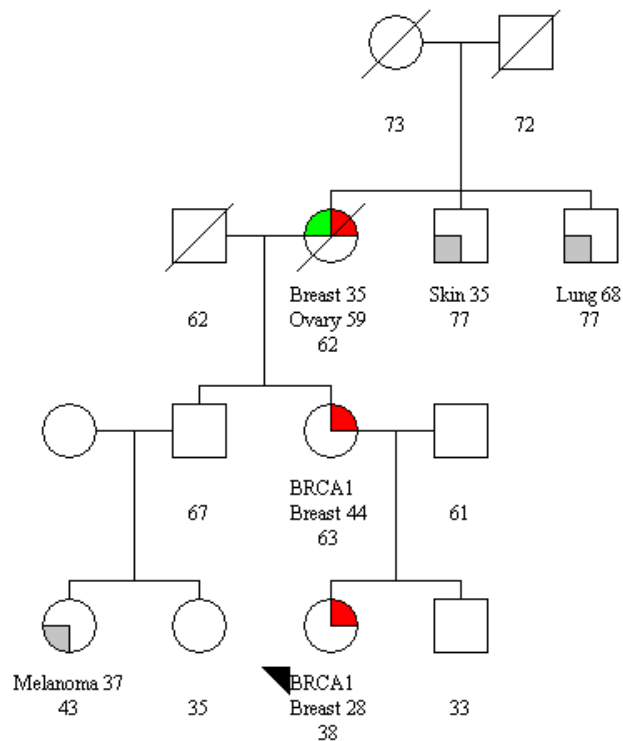
**Istotipo midollare**

**Er-/Pr-Ki67 70%**

**Madre 44aa:** carcinoma mammella sx duttale  
infiltrante Er-/Pr-

**BRCAPRO PP: BRCA1 95%; BRCA2 4%**

Diagnosi Mammella = Breast    Presenza Altri Tumori = Tumor?    Presenza Altri Tumori = Other Tumors    Diagnosi Ovaio = Ovary



**BRCA1 mutata**



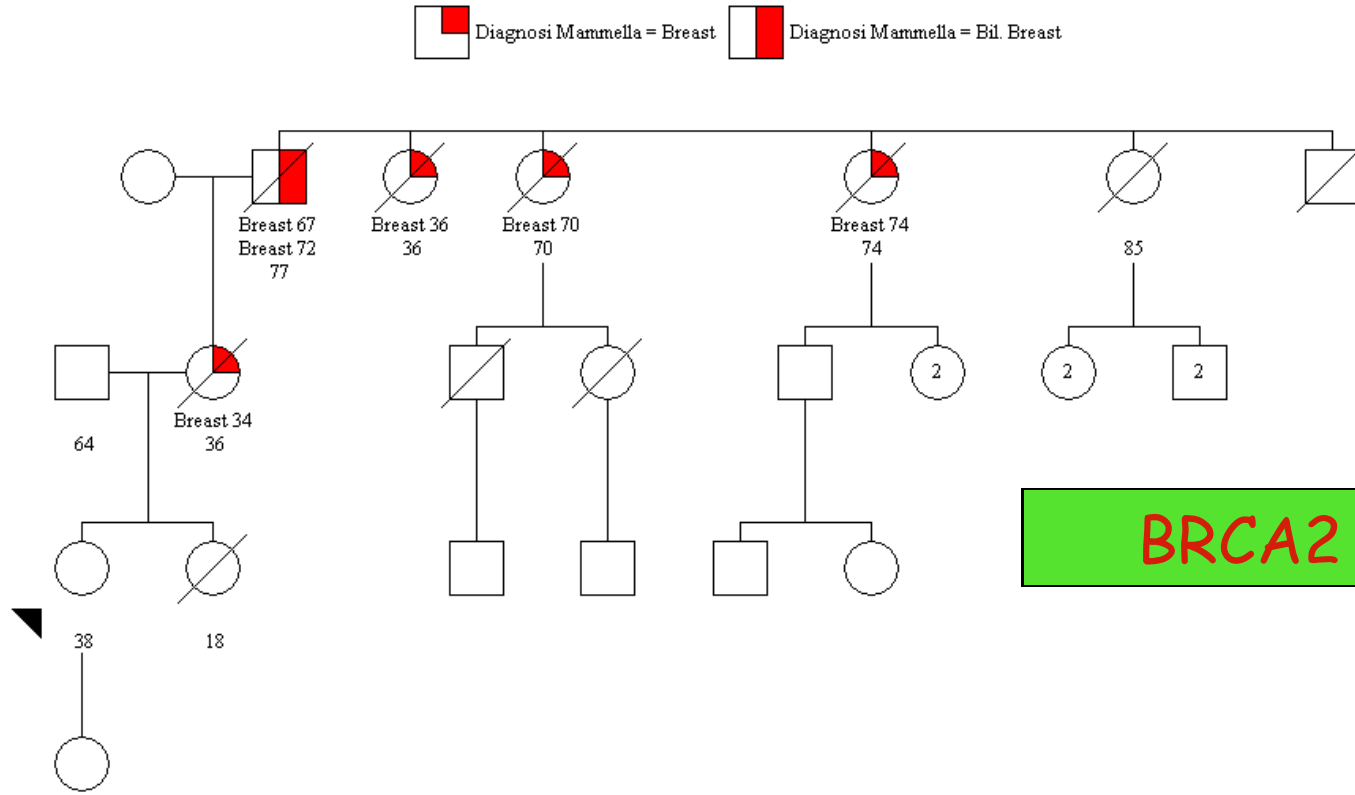
**P.L.39: sana**

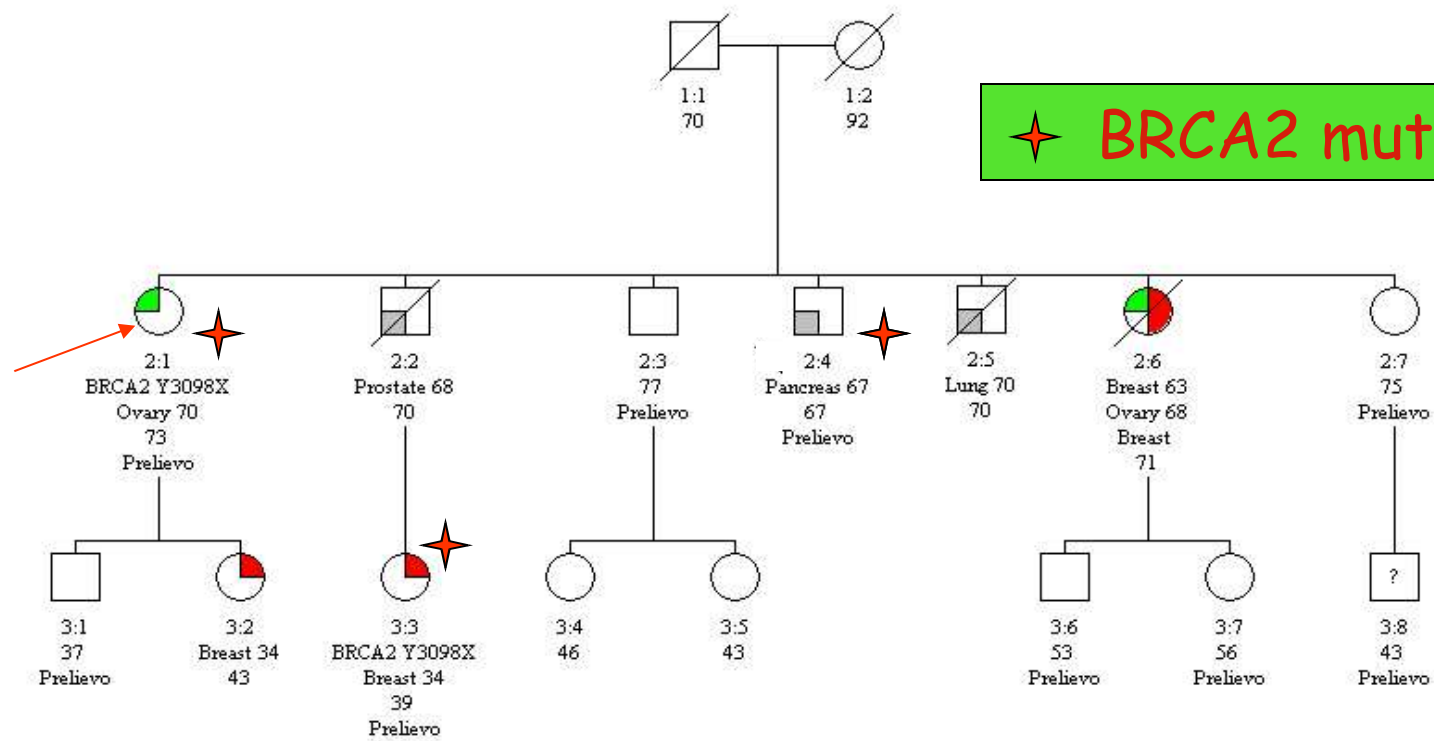
**Madre: 34 aa carcinoma mammella duttale infiltrante**

**Nonno: 67aa carcinoma mammella duttale infiltrante**

**72aa carcinoma mammella controlaterale**

**BRCA1 0.7%; BRCA2 46%**





# CONCLUDENDO

## Le mutazioni di BRCA1 sono state identificate:

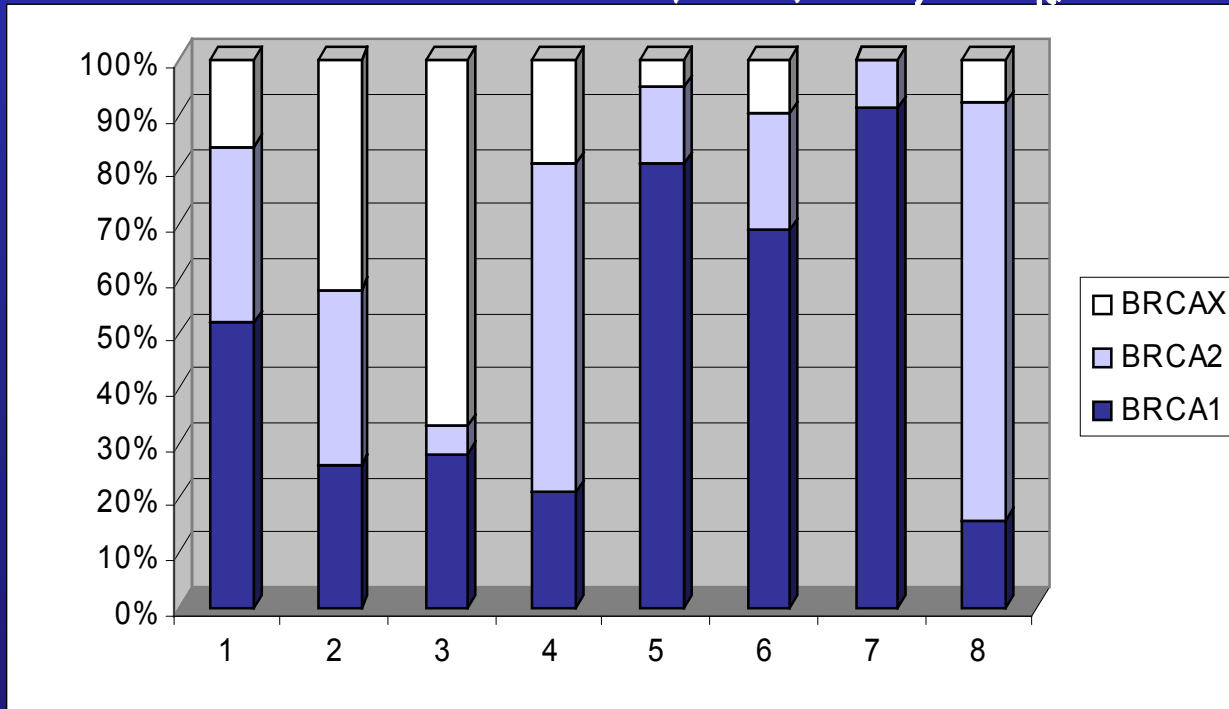
- ~45% delle famiglie con casi multipli di carcinomi della mammella sito-specifici
- ~90% delle famiglie con cancro della mammella e dell'ovaio o solo ovaio

## Le mutazioni di BRCA2 sono state identificate:

- ~35% delle famiglie con casi multipli di carcinoma della mammella talora associata a casi di carcinoma della mammella maschile, carcinoma del pancreas e della prostata.

# Le mutazioni BRCA1 BRCA2 danno un fenotipo "familiare" differente

*>4 casi KM  
>6 casi KM  
KM+KOV  
KOV SC  
>2KOV  
KM male*



1. Famiglie totali
2. Solo ca mammella
3. 4-5 casi ca mammella
4. 6+ casi ca mammella
5. Ca mammella+ ovaio
6. 1 caso ca ovaio
7. 2+ casi ca ovaio
8. Ca mammella maschile

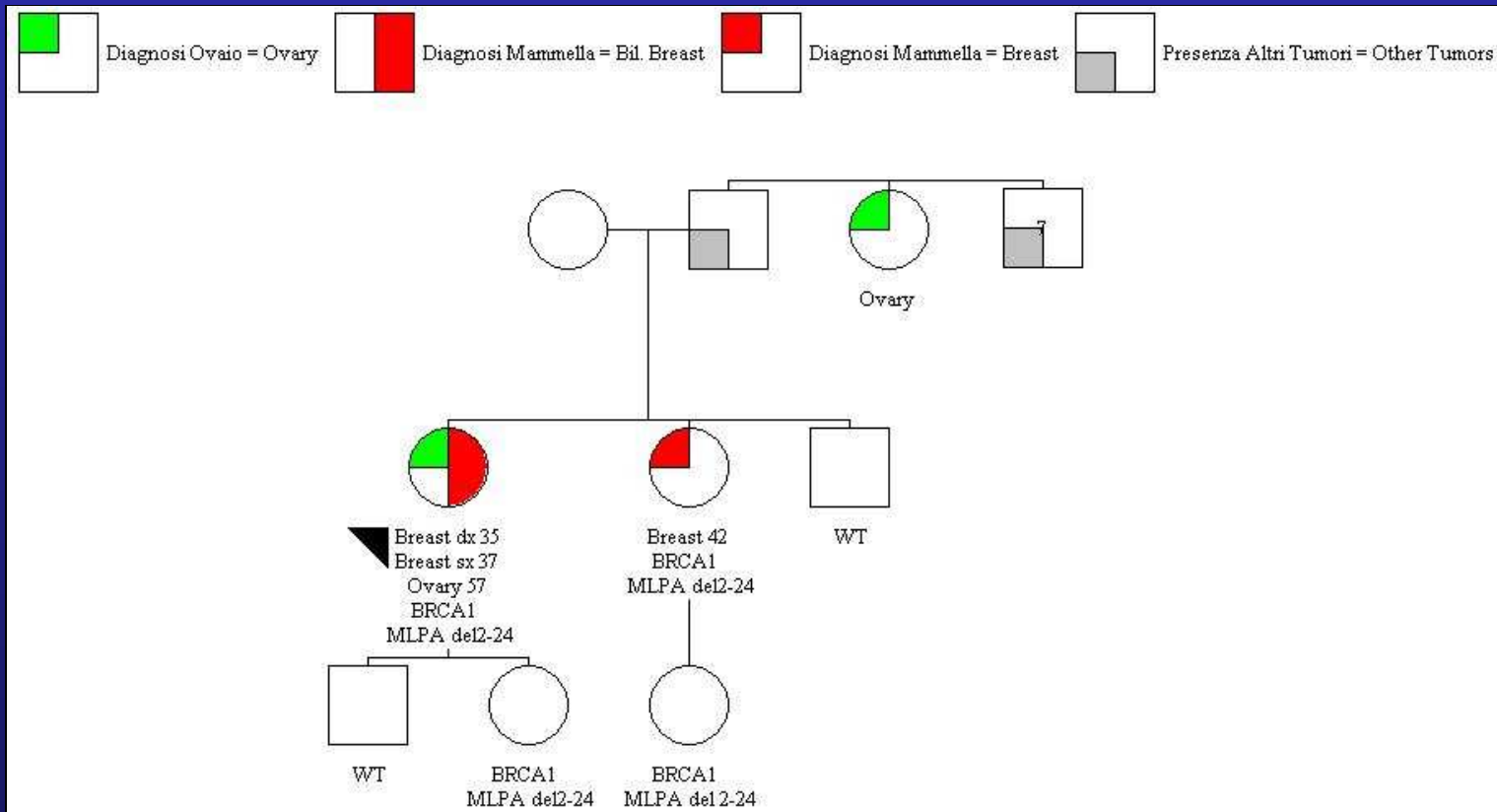
N.D., anni 57 (30/03/07)

35 aa: carcinoma mammella dx

37 aa: carcinoma mammella sx

57aa: carcinoma ovarico

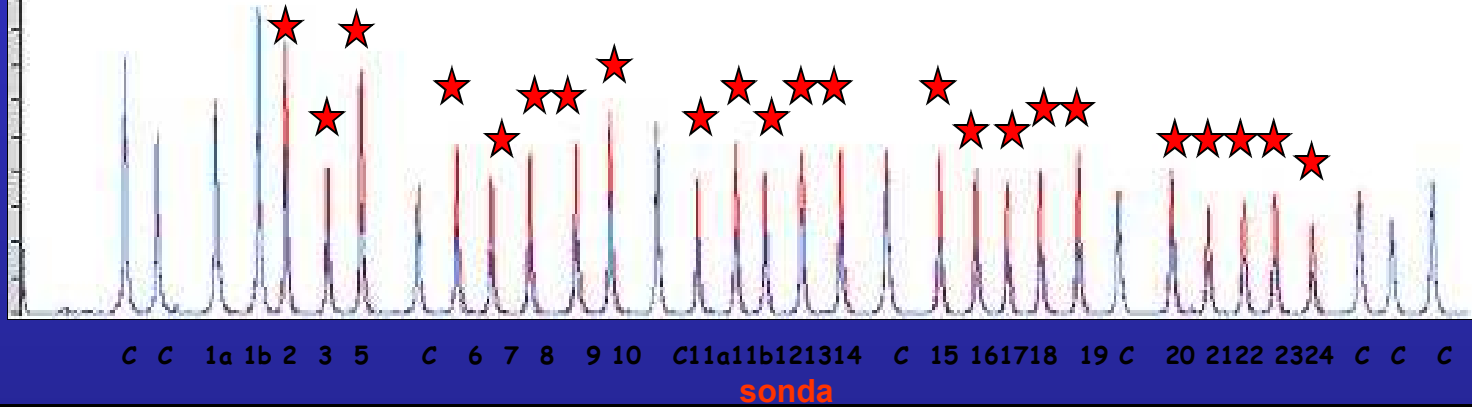
Test genetico (sequenziamento diretto): WT



# Riarrangiamento genomico?

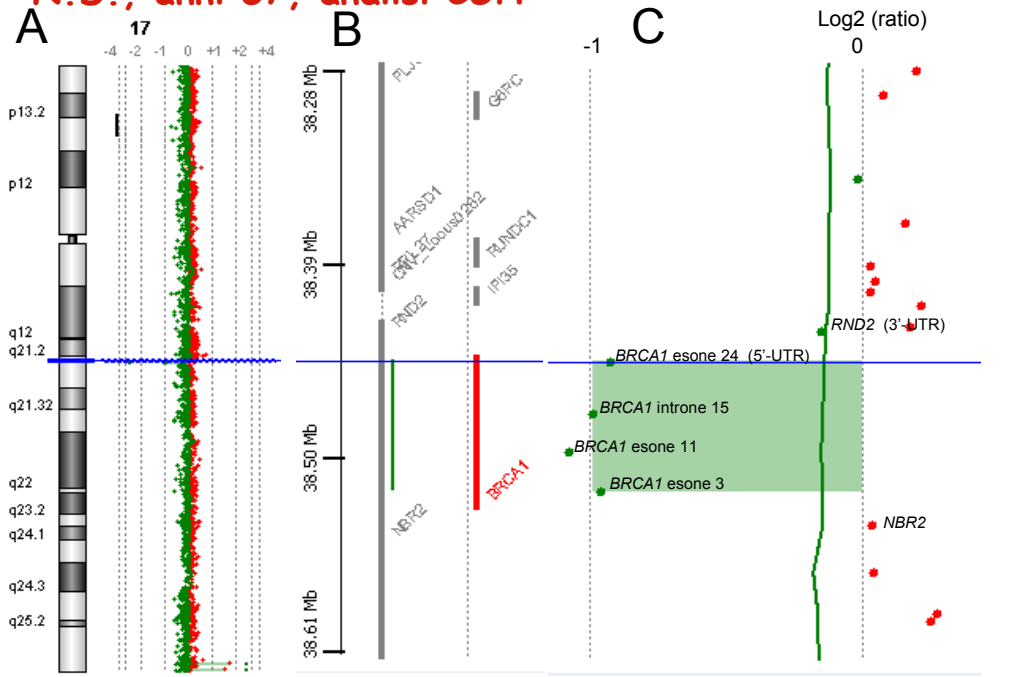
## BRCA1: Delezione esoni 2-24

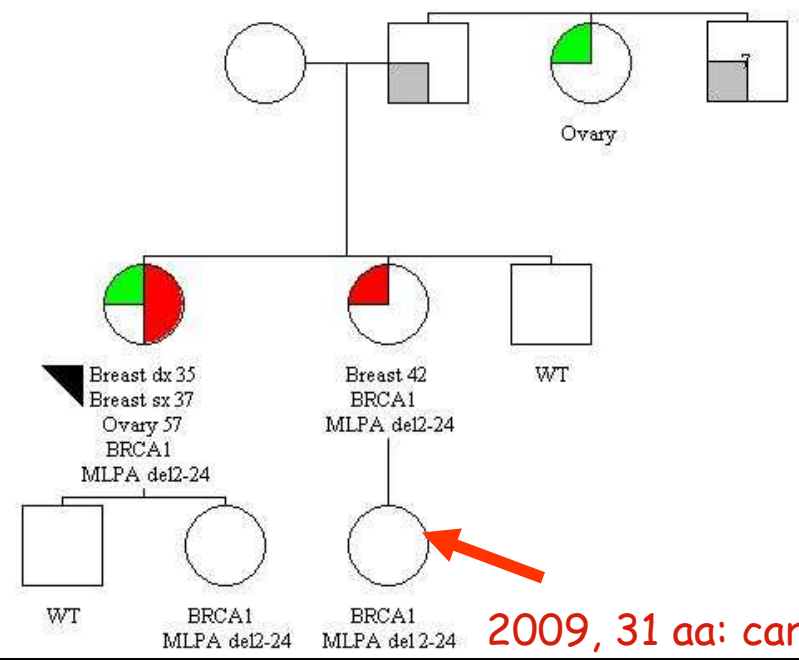
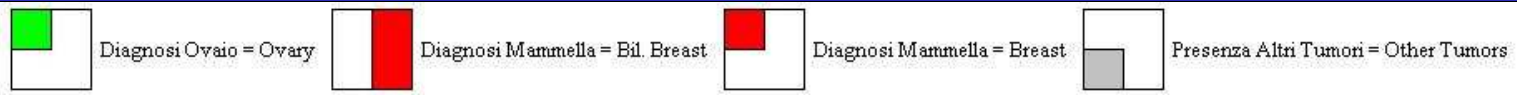
N.D., anni 57, MLPA BRCA1



N.D., anni 57, analisi CGH

chr 17: 38288726-38613083, 324 Kb





2009, 31 aa: carcinoma mammella

PC anni37  
32aa: Ca mammella  
duttale infiltrante G3

SD anni52  
46aa: Ca mammella  
duttale infiltrante  
50aa: Ca ovaio sieroso papillare  
G3

PP BRCA1  
BRCA1 80%  
BRCA2 3%

No mutazioni troncanti

Nessuna delezione identificata

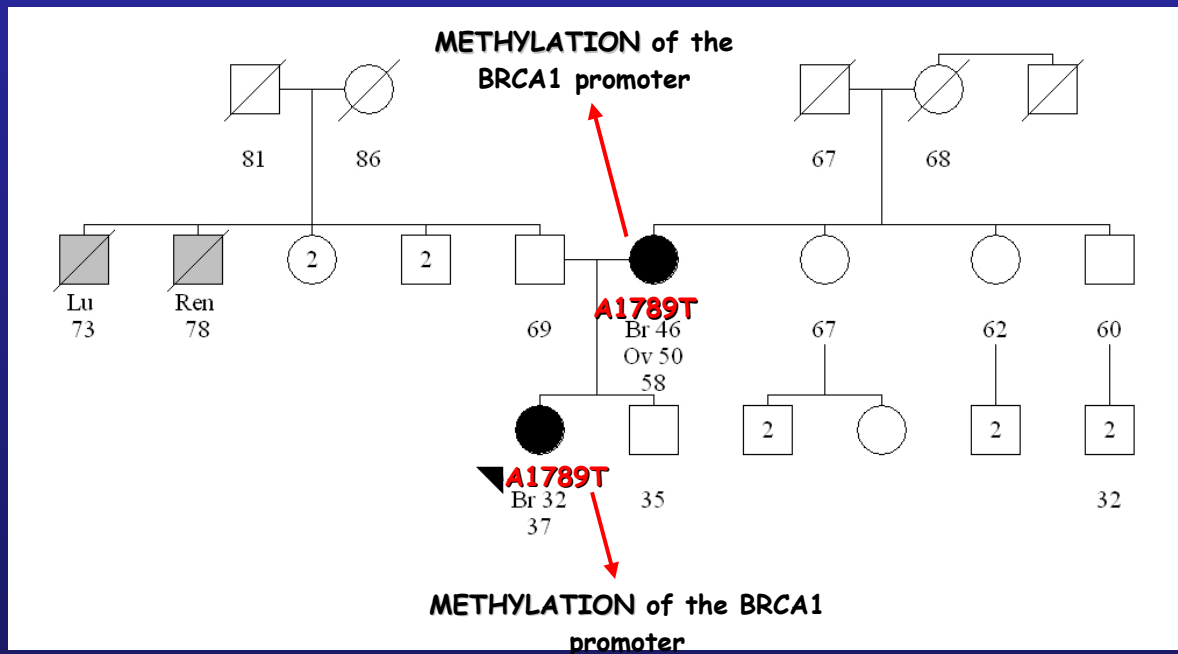
UV BRCA1  
A1789T

Cosegregazione

LOH

Software  
predittivi

Test  
funzionale





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

---

- **POSITIVO**

mutazione "patogenetica"  
identificata



**Penetranza incompleta**

non tutti i portatori di mutazione svilupperanno la malattia

**Espressività variabile**

la storia clinica della malattia può essere molto diversa tra portatori della stessa mutazione germinale. Mutazioni diverse nello stesso gene possono conferire differente rischio di malattia

# Rischio di tumore nei portatori

I carriers di mutazioni BRCA1&2 hanno un rischio molto elevato di sviluppare tumori della mammella e dell' ovaio ma il rischio attribuibile a ciascuna differente mutazione non può ancora essere stimato con precisione ed è diverso se viene valutato in



Famiglie ad alto rischio



Popolazione generale

## *Breast/Ovarian Cancer Risk in BRCA1&2 carriers*

### Penetrance Estimates based on High-risk BCLC families (Am J Hum Genet 1998)

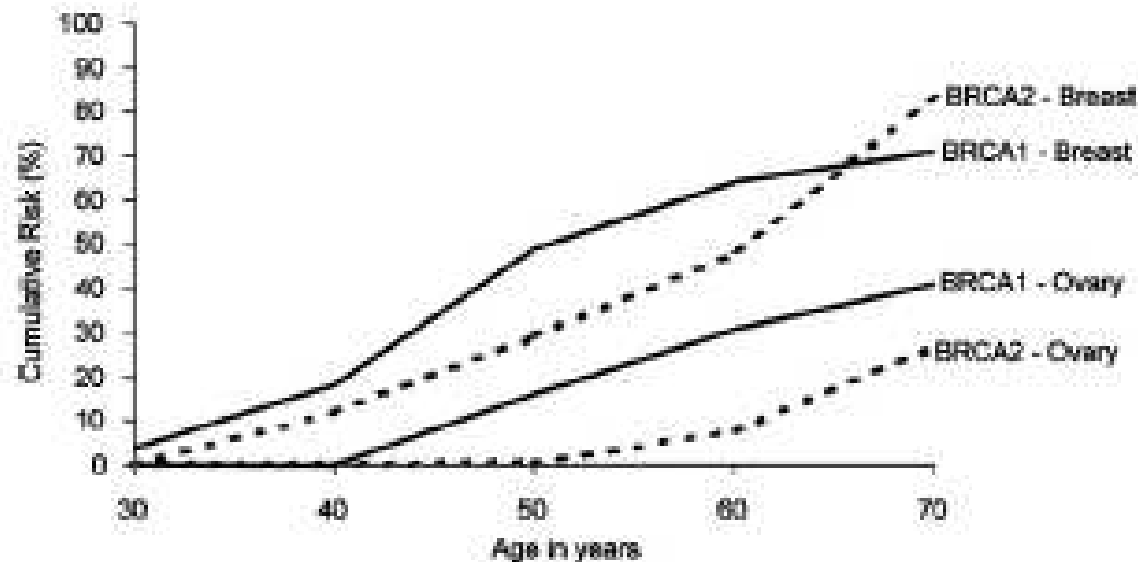
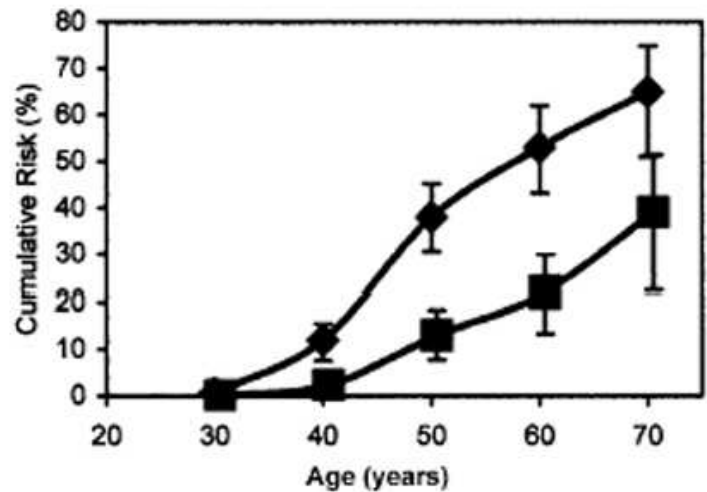


Fig. 1. BRCA1 and BRCA2 breast and ovarian cancer penetrance estimates, based on high-risk BCLC families (45,46).

## Rischio di cancro nei portatori della mutazione (penetranza)

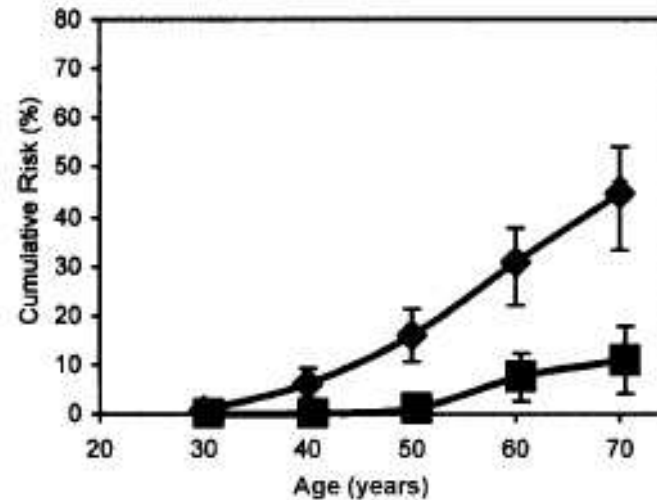
Casi non selezionati per storia familiare: analisi combinata di 22 studi (Am J Hum Genet.2003)

BRCA1



Cumulative risk of breast (◆) and ovarian (■) cancer in BRCA1-mutation carriers.

BRCA2



Cumulative risk of breast (◆) and ovarian (■) cancer in BRCA2-mutation carriers.

QUALI SONO I FATTORI CHE  
MODIFICANO LA  
PENETRANZA DELLE  
MUTAZIONI DEI GENI BRCA  
E/O NE FANNO VARIARE  
L' ESPRESSIVITA' CIOE' IL  
FENOTIPO CLINICO ?

# MODIFICATORI della PENETRANZA

COORTE DI NASCITA

USO DI CO

ETA' ALLA PRIMA GRAVIDANZA

ESERCIZIO FISICO

OVARIECTOMIA PROFILATTICA IN PREMENOPAUSA



**Altri fattori genetici**

# Clinical Management di donne BRCA-mutate

	25-35	35-50	>50
Visita ginecologica senologica	Semestrale	Semestrale	Semestrale
Ca125	Semestrale	Semestrale	Semestrale
Eco mammella	Annuale	Annuale	Annuale
Eco pelvi e transvaginale	Annuale	Semestrale	Semestrale
Mammografia	Annuale	Annuale	Annuale

Raccomandata la RMN mammaria annuale

## PROFILASSI CHIRURGICA

• Salpingo-ooforectomia riduce il rischio di BC del 50% se eseguito in premenopausa

## CHEMIOPREVENZIONE

Combinazione di CO contenenti estrogeni ed alte dosi di progestinici pare proteggere da OC ma è descritto un' aumentata incidenza di BC in BRCA1 carrier che hanno fatto uso di CO.

Tamoxifen e analoghi sembrano utili in BRCA1 carrier anche se i tumori sono negativi per ER e PR

# DFS e OS in pazienti affette da BrCa carrier di mutazioni BRCA1&2

- *Several studies have proved that patients with BRCA1 mutation have poor outcome*
- *Five-year survival (UK+Norway)*
- BRCA1-mutated patients: 73%
- Mutation-negative patients: 92% ( $P < 0.001$ ) (Moller *et al.*, 2007).
- *116-months survival (496 Jewish women)*
- BRCA1-mutated patients: 62%
- Mutation-negative patients: 86% ( $P < 0.0001$ ) (Robson *et al.*, 2004).
- *On the contrary, some studies reported no significant differences of survival data*
- *Rates of death (Israeli women)*
- BRCA1-mutated patients: 76%
- BRCA2-mutated patients: 130% ( $P < 0.0001$ ) (Rennert *et al.*, 2007).
- New York and Rotterdam studies: breast cancer specific survival is similar between the mutation carriers and non-carriers in breast cancer patients and patients at high risk for breast cancer, respectively (El-Tamer *et al.*, 2004; Brekelmans *et al.*, 2006).

 **Controlateral breast cancer risk in carrier (Fw up: 5years)**

**BRCA1: 19%**

**BRCA2: 12%**

**Controlateral breast cancer risk in non carrier: 0.4-0.8%/year**



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

---

- “UV” di significato ignoto
  - controlli “normali” (centinaia !)
  - test o “ipotesi” funzionali
  - analisi di segregazione
  - Software di predizione basati sul modelling molecolare o sulla conservazione del residuo
  - analisi di co-occorrenza con una mutazione deleteria (consultare i database)

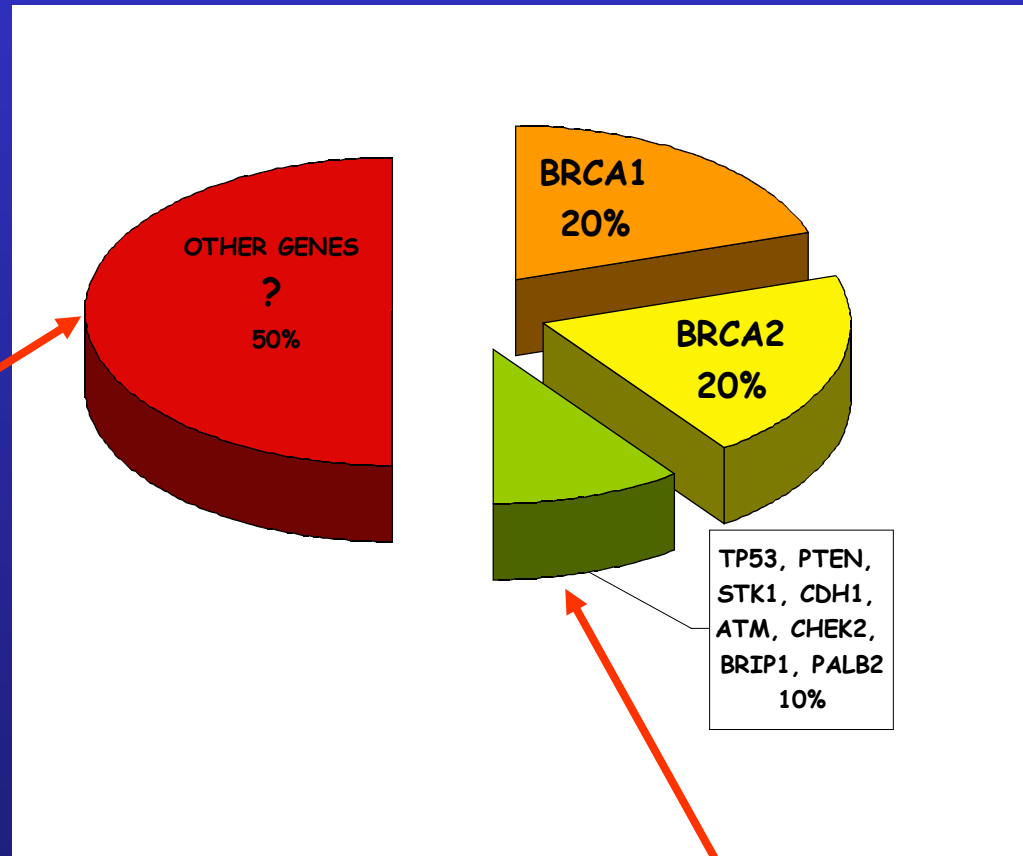
# TEST GENETICO: COME INTERPRETARE IL RISULTATO.....

---

## NEGATIVO o INDETERMINATO

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

# Mutazione in un gene diverso?



**LOW PENETRANCE GENES**  
FREQUENCY: COMMON  
(carrier 5-50%)  
RISK OF BREAST CANCER:  
1.25-1.65x rr  
IDENTIFY BY:  
Genome-wide association  
studies

**MODERATE PENETRANCE GENES**  
•FREQUENCY: RARE (carrier <0.6%)  
•RISK OF BREAST CANCER: 2-4 x rr  
•IDENTIFY BY: mutation screening of candidate  
genes in case- control studies

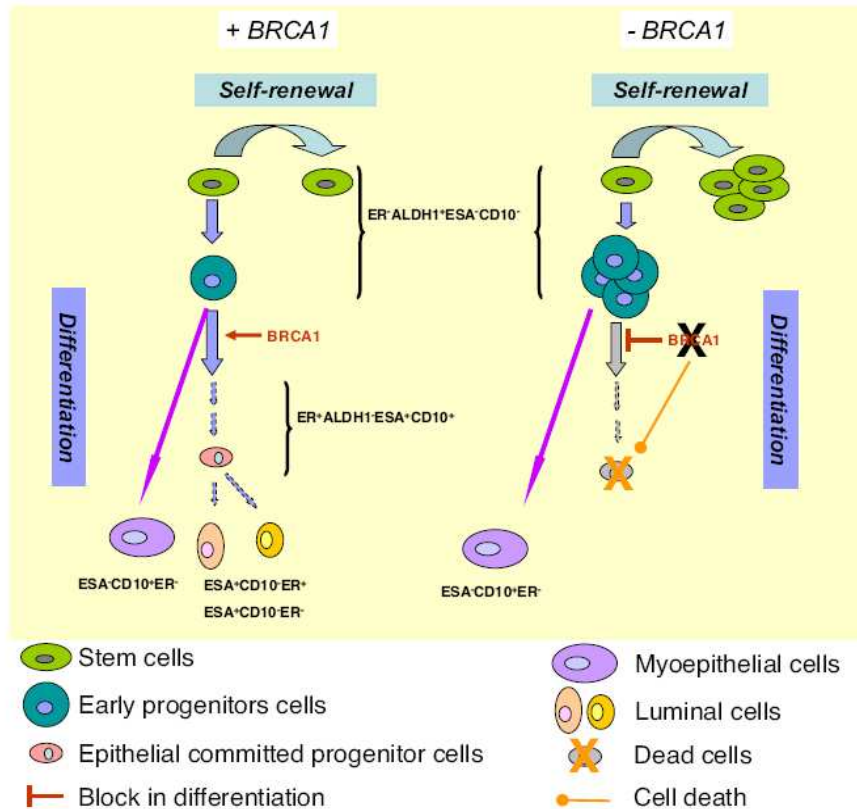
# Conclusioni

- Alle mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2 sono attribuibili il 30-40% circa di tutti i casi di familiarità
- E' molto improbabile che esista un terzo gene di suscettibilità ad alta penetranza
- I geni di suscettibilità a moderata e bassa penetranza per il tumore della mammella e ovaio rimangono ancora oggi in larga maggioranza non identificati anche se si presume che la maggior parte del rischio familiare sia attribuibile ad ereditarietà poligenica
- BRCA1 e 2 sono geni a penetranza incompleta ed espressività variabile e questo costituisce un problema per la consulenza genetica
- L'identificazione dei fattori ambientali e genetici che modificano la penetranza delle mutazioni BRCA1 e BRCA2 è importante per fornire una corretta valutazione del rischio di malattia.

GRAZIE per l'ATTENZIONE



# BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate



**Fig. 4.** Model depicting the proposed role of BRCA1 in mammary, stem, and progenitor cell fate. BRCA1 is required for the differentiation of ALDH1-positive/ER-negative stem/progenitor cells into ER-positive luminal epithelial cells. Loss of BRCA1 function results in aberrant luminal differentiation and also may have an effect on the survival of the luminal cells. Moreover, the loss of BRCA1 function results in the accumulation of ALDH1-positive/ER-negative stem/progenitor cells.

# Principali sindromi associate con una trasmissione AD di suscettibilità allo sviluppo di tumori alla mammella e/o ovaio

## SINDROME

## GENE RESPONSABILE

- |  |             |
|--|-------------|
| ➤ HBC/HBOC/EOBC/HOV<br>BRCA1&2-associated Breast and Ovarian Cancer Syndrome<br>(Hereditary Breast Cancer<br>Hereditary Breast Ovarian Cancer<br>Early Onset Breast cancer<br>Hereditary Ovarian Cancer) | BRCA1-BRCA2 |
| ➤ Li-Fraumeni  | P53         |
| ➤ Cowden's Syndrome  | PTEN        |
| ➤ Ataxia Telangiectasia  | ATM         |
| ➤ Peutz-Jeghers Syndrome   | STK11/LKB1  |
| ➤ HNPCC  | MMR         |



# Frequenze di tumori mammari dovuti alle principali sindromi associate con una trasmissione AD di geni suscettibilità allo sviluppo di tumori

• HBC/HBOC/EOBC/HOV

}

5% di tutti i casi

• Li-Fraumeni Syndrome

• Cowden's Syndrome

• HNPCC

• Peutz-Jeghers Syndrome

}

1% di tutti i casi

• Ataxia Telangiectasia

1% della popolazione generale è eterozigote,

gli eterozigoti sono a rischio aumentato

di sviluppare tumore alla mammella

(rischio relativo: 3.9 to 6.4)

}

?% di tutti i casi

# Common Breast Cancer-Predisposition Alleles Are Associated with Breast Cancer Risk in *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers

Antoniou et al., *The American Journal of Human Genetics* (2008)

10,358 mutation carriers  
SNPs  
FGFR2 (rs2981582)  
TNRC9 (rs3803662)  
MAP3K1 (rs889312)

The FGFR2 and  
TNRC9 loci  
appear to  
interact  
multiplicatively  
on breast  
cancer risk in  
*BRCA2*  
mutation  
carriers

**BRCA2 mutation carriers  
increases breast cancer risk**

rs2981582 (1.32x)

rs889312 (1.12x)

**BRCA1 carriers.**

NO

**BRCA1 and BRCA2 mutation carriers**

rs3803662 was associated with  
increased breast cancer risk (1.13)

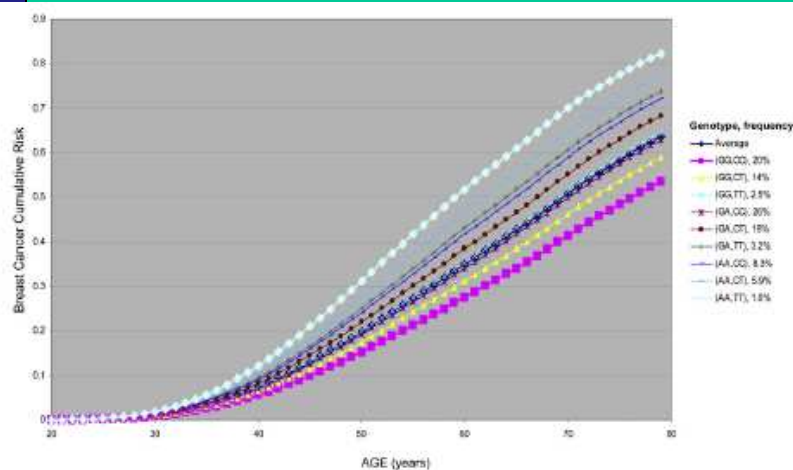


Figure 4. Cumulative Risk of Breast Cancer among *BRCA2* Mutation Carriers by Combined *FGFR2* and *TNRC9* Genotype under a Multiplicative Model for the Joint Effects of the Loci

# Other breast cancer susceptibility genes seem to be involved in sensing and signaling damage rather than being directly involved in DNA repair

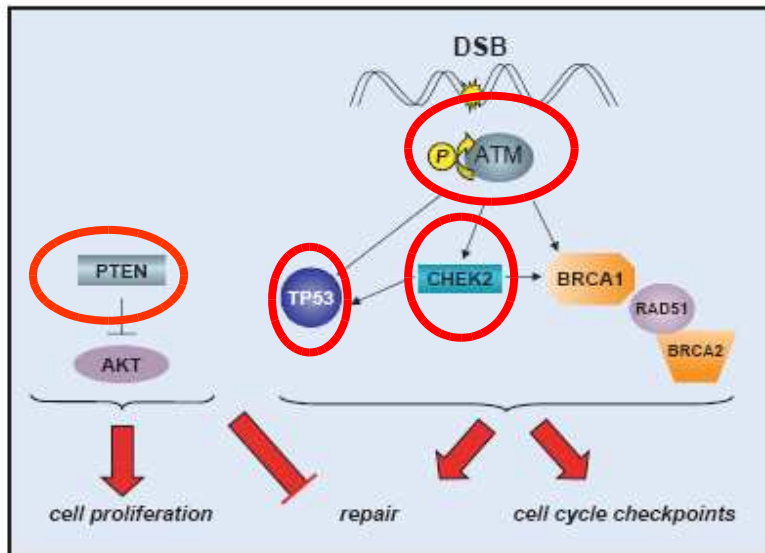


Fig 2. — Breast cancer susceptibility gene products and the DNA damage response pathway. In this simplified view, ATM is activated by the presence of DNA double-strand breaks (DSB) and phosphorylates CHEK2, BRCA1, and TP53. Activated CHEK2 also phosphorylates TP53 and BRCA1. Phosphorylation of these proteins seems to be required for the efficient activation of various cell cycle checkpoints. BRCA2 regulates the function of the RAD51 protein, which bridges the interaction between BRCA1 and BRCA2. Another protein implicated in breast cancer predisposition, PTEN, mediates down-regulation of AKT. Pointed arrowheads indicate activation, and flat arrowheads indicate inhibition.

## High-penetrance:

*TP53, pTEN*

Risk variants: Multiple, different mutations that predominantly cause protein truncation

Frequency: Rare ( $\leq 0.1\%$ )

Risk of breast cancer: 10- to 20-fold relative risk

## Moderate-penetrance

*ATM, CHEK2*

Risk variants: Multiple, different mutations that predominantly cause protein truncation

Frequency: Rare ( $\leq 0.6\%$ )

Risk of breast cancer: 2-to 4-fold relative risk