

L'analisi dello stato di instabilità dei microsatelliti per la diagnosi e la terapia dei tumori correlati alla sindrome di Lynch

Francesca Duraturo¹, Paola Izzo^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche e ²CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università Federico II, Napoli

ABSTRACT

Detection analysis of microsatellite instability status for the diagnosis and therapy of Lynch syndrome-related cancers. Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant genetic disorder that is characterized by an increased risk of developing colorectal cancer. LS is associated with germline mutations in DNA mismatch repair genes (MMR) that are involved in the correction of nucleotide misalignments that may arise during DNA replication. The deficiency of the MMR complex results in a high rate of mutations in repetitive DNA sequences known as microsatellites; these, because of their structure, are more prone to errors during replication. This condition is known as microsatellite instability (MSI) and is present in about 95% of the tumors associated with LS. MSI analysis is used for making clinical diagnosis of LS. All the individuals showing MSI-high status on the tumor tissue should undergo to genetic testing to identify pathogenetic mutation in one of the MMR genes. The identification of the mutation allows making an early diagnosis, in individuals belonging to families at risk. Moreover, the MSI testing in addition to the key role in the molecular diagnosis of LS, has also a very important role in identifying the most appropriate therapeutic approach for LS patients. Recently, novel therapeutic approaches such as immunotherapy, which represent a viable alternative to traditional therapeutic methods, give a good life expectancy to patients showing a MSI-high status, who have already developed a LS-related cancer. In this paper, through a review of the most recent literature, we present this dual role of MSI analysis in Lynch syndrome.

La sindrome di Lynch, nota anche come cancro ereditario del colon non-poliposico (HNPCC, dall'acronimo inglese), è associata a mutazioni germinali nei geni della riparazione del DNA (Mismatch Repair, MMR), in particolare *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Altri due geni *MMR* meno coinvolti nella patogenesi della sindrome di Lynch sono i geni *MLH3* e *MSH3* (1, 2, 3). La sindrome di Lynch è una malattia genetica con un'ereditarietà autosomica dominante e una penetranza del 80-90%. È caratterizzata da un elevato rischio (20-70%) di sviluppare tumori del colon-retto, nonché tumori in sedi extra-coliche, quali il cancro dell'endometrio con un rischio che va dal 15 al 70%, tumori renali, uretere, vie biliari e piccolo intestino, con un rischio complessivo di ~15%. Di solito i tumori del colon-retto tipici della sindrome di Lynch mostrano un esordio precoce (~42 anni) rispetto ai tumori colon-rettali sporadici (~69 anni) e hanno una prognosi migliore (4). La maggior parte dei pazienti con la sindrome di Lynch presenta una mutazione germinale

patogenetica nei geni *MLH1* e *MSH2*, mentre mutazioni negli altri geni *MMR* (*PMS2*, *MSH6*, *MLH3* e *MSH3*) rendono conto di un complessivo 10-13% dei casi (5). La presenza di una mutazione patogenetica in uno dei geni *MMR* determina la perdita di funzione dell'allele del relativo gene. L'inattivazione somatica del corrispondente allele "wild-type", che si verifica in seguito a mutazioni puntiformi o perdita (parziale) del gene, determina l'inattivazione bi-allelica a livello tissutale e porta quindi alla completa abolizione della funzione proteica. Poiché le proteine MMR sono coinvolte nella correzione degli appaiamenti errati di singoli nucleotidi e di piccole inserzioni/delezioni che possono insorgere durante la replicazione del DNA, l'inattivazione di queste proteine si traduce in un sistema di riparazione del DNA difettoso.

I microsatelliti, corte sequenze di DNA ripetute da 15 a 30 volte e disperse nel genoma umano, proprio per la loro natura, sono maggiormente esposti a variazioni della loro lunghezza durante la replicazione; il mancato

Corrispondenza a: Paola Izzo, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Via Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 08174641, Fax 08176439, E-mail: paola.izzo@unina.it

Ricevuto: 07.03.2018

Revisionato: 29.03.2018

Accettato: 17.04.2018

Pubblicato on-line: 09.05.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.030

funzionamento del sistema di riparazione *MMR* impedisce la correzione di questi errori favorendo l'instabilità delle sequenze microsatellite. Pertanto, l'instabilità dei microsatelliti (microsatellite instability, MSI) può essere considerata come un marcatore del mancato funzionamento del sistema di riparazione *MMR*. La MSI è stata riscontrata in ~90-95% dei tumori correlati alla sindrome di Lynch e nel 15% dei tumori colon-rettali sporadici (6).

Nei tumori correlati alla sindrome di Lynch circa il 95% dei casi di MSI è dovuto alla perdita di espressione dei geni *MLH1* (45%), *MSH2* (40%), *MSH6* (10%) o *PMS2* (5%). Invece, nei tumori sporadici, la MSI è data dalla perdita della funzione di *MLH1* dovuta all'ipermetilazione del suo promotore che causa quindi un meccanismo di silenziamento genico (7).

E' possibile definire il grado di MSI del relativo tumore considerando il numero di ripetizioni microsatellitari instabili. Per la determinazione della MSI è possibile analizzare, sul DNA estratto dal tessuto tumorale, un pannello, noto come pannello di Bethesda, di cinque microsatelliti comprendenti due ripetizioni mononucleotidiche (BAT-25 e BAT-26) e tre ripetizioni dinucleotidiche (D2S123, D5S346 e D17S250). Tumori con instabilità in due o più di queste ripetizioni sono definiti ad alta instabilità (MSI-High); quelli con una ripetizione instabile sono detti a bassa instabilità (MSI-Low); tumori senza alterazioni sono stabili (MSI-Stable) (8).

Le recenti linee guida previste per la diagnosi della sindrome di Lynch suggeriscono l'analisi di questo gruppo di microsatelliti in tutti i casi di tumore colon-rettale insorto in soggetti con un'età inferiore a 50 anni, anche senza familiarità per patologie tumorali, e sui carcinomi colon-rettali sincroni e metacroni o con familiarità e con altri tumori associati alla sindrome di Lynch, indipendentemente dall'età (4).

Tutti i soggetti che mostrano MSI sul tessuto tumorale sono sottoposti al test genetico per la ricerca di mutazione in uno dei geni *MMR*. L'identificazione della mutazione permette di effettuare la diagnosi precoce, negli individui appartenenti a famiglie a rischio. I portatori di mutazione patogenetica in uno dei geni *MMR* dovranno sottoporsi a un programma di sorveglianza clinica, specifico per i soggetti affetti da sindrome di Lynch (4).

Il test MSI oltre al ruolo chiave che riveste nella diagnosi molecolare della sindrome di Lynch, ha anche una funzione molto importante nel suggerire l'eventuale approccio terapeutico da seguire per i soggetti che presentano un tumore colon-rettale "MSI-High", infatti la determinazione dell'instabilità molecolare è stata considerata come un marcatore prognostico dei tumori correlati alla sindrome di Lynch. Consistenti dati di letteratura confermano che i soggetti affetti da sindrome di Lynch o che sviluppano tumori colon-rettali "MSI-High" rispetto ai tumori colon-rettali "MSI-Low" e "MSI-Stable", sono associati a una prognosi favorevole quando non sono sottoposti a trattamento con 5-fluorouracile (9), che rappresenta il farmaco chemioterapico più utilizzato

per il tumore del colon-retto. Ciò può essere spiegato considerando che i tumori MSI dovuti al mancato funzionamento delle proteine *MMR* (ovvero tipici della sindrome di Lynch) presentano istologicamente molto spesso una spiccata reazione linfocitaria che indicherebbe una risposta immunitaria contro tali tumori, la quale potrebbe essere abrogata dagli effetti immunosoppressivi di questa specifica chemioterapia (9). Inoltre, le cellule con una deficienza del sistema di riparazione *MMR* accumulano mutazioni nelle sequenze microsatelliti e queste si possono ritrovare anche in regioni codificanti di geni rilevanti per il processo di tumorigenesi. Queste mutazioni possono dare origine a una perdita di funzione delle rispettive proteine di tali geni, ma possono anche innescare la traduzione di neopeptidi o antigeni "frameshift" altamente immunogenici (frameshift specific peptides, FSP). Questi antigeni FSP derivano da slittamenti della cornice di lettura derivanti da inserzioni o delezioni di singoli nucleotidi nella sequenza codificante dei rispettivi geni; questo crea sequenze amminoacidiche insolite. La presenza di questi neo-antigeni nei tumori MSI potrebbe spiegare la caratteristica patologica di questi tumori che mostrano una massiccia infiltrazione di linfociti e altre cellule immuno-correlate che indicherebbero la forte immunogenicità di tali tumori (10). Dati recenti di letteratura mostrano che un sottogruppo di pazienti con tumore MSI risponde particolarmente bene al trattamento con inibitori del controllo immunitario. I checkpoint immunitari giocano un ruolo chiave nel limitare le risposte immunitarie antitumorali, come quelle dirette contro l'antigene T-linfocitario citotossico 4 (CTLA-4) e il recettore programmato di morte cellulare (PD-1) e il suo ligando, PD-L. Il blocco di questa via da parte degli anticorpi anti-PD-1 impedisce la down-regulation delle funzioni effettrici delle cellule T e consente a esse di mantenere la funzionalità antitumorale e la capacità di mediare la morte delle cellule tumorali. Recentemente, agenti inibitori del checkpoint immunitario, come Pembrolizumab che è un anticorpo anti-PD-1, sono stati sviluppati come farmaci antitumorali e sembrano molto promettenti proprio nei pazienti con tumori colon-rettali "MSI-High" (11). L'immunoterapia rappresenta dunque una buona speranza di sopravvivenza per i pazienti con la sindrome di Lynch che presentano tumori anche in stadi avanzati e, sono quindi, un valido approccio terapeutico. Inoltre, questo nuovo approccio terapeutico andrà a beneficio di tutti coloro che sviluppano un carcinoma del colon sporadico con uno stato "MSI-High" a livello somatico.

Pertanto, la determinazione dello stato MSI sul tessuto tumorale colon-rettale fornisce informazioni molto importanti sia per porre una diagnosi di malattia ereditaria, come la sindrome di Lynch, sia per l'eventuale trattamento di tumori colon-rettali sporadici con uno stato "MSI-High". Questo permetterà di procedere con un approccio medico del trattamento dei tumori sempre più personalizzato (12).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Liccardo R, De Rosa M, Rossi GB, et al. Incomplete Segregation of MSH6 Frameshift Variants with Phenotype of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci* 2017;18:999.
2. Duraturo F, Liccardo R, Izzo P. Coexistence of MLH3 germline variants in colon cancer patients belonging to families with Lynch syndrome-associated brain tumors. *J Neurooncol* 2016;129:577-8.
3. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, et al. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. *Int J Cancer* 2011;129:1643-50.
4. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1159-79.
5. Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, et al. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. *Gastroenterol Res Pract* 2017;2017:2595098.
6. Vilar E, Mork ME, Cuddy A, et al. Role of microsatellite instability-low as a diagnostic biomarker of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Cancer Genet* 2014;207:495-502.
7. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18:1506-12.
8. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, et al. Multivariate analysis as a method for evaluating the pathogenicity of novel genetic MLH1 variants in patients with colorectal cancer and microsatellite instability. *Int J Mol Med* 2015;36:511-7.
9. Li LS, Morales JC, Veigl M, et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2009;158:679-92.
10. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008;134:988-97.
11. O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One* 2017;12:0189848.
12. De Rosa M, Rega D, Costabile V, et al. The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:861-6.