

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

LEZIONE 2

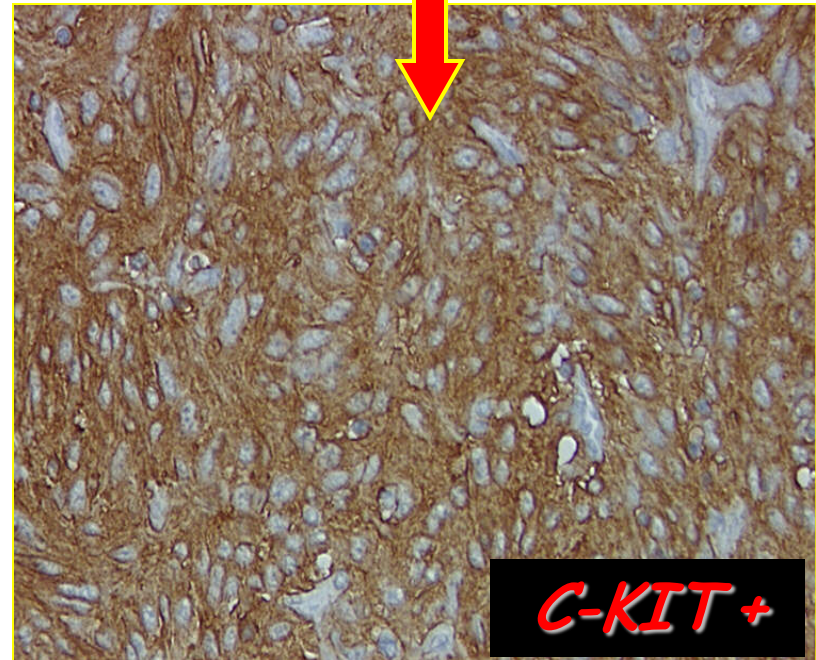
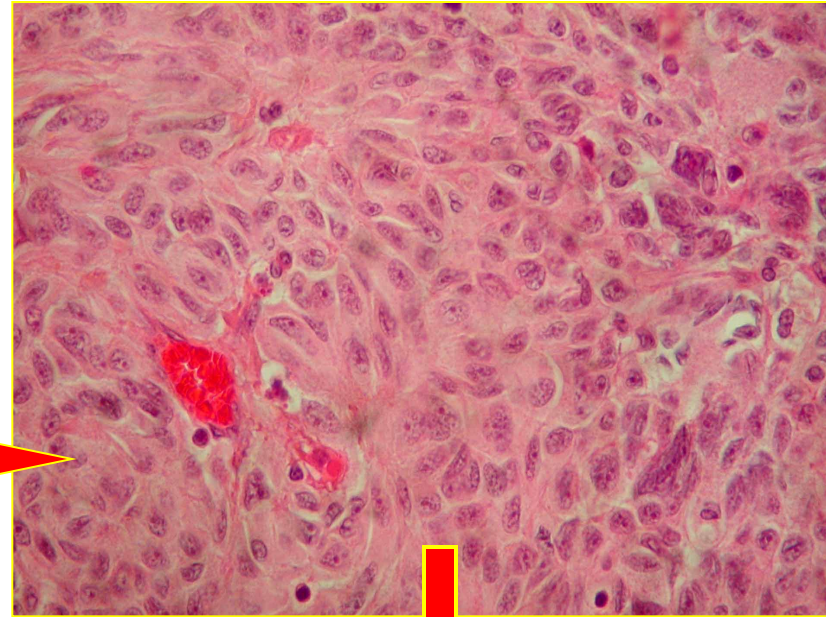
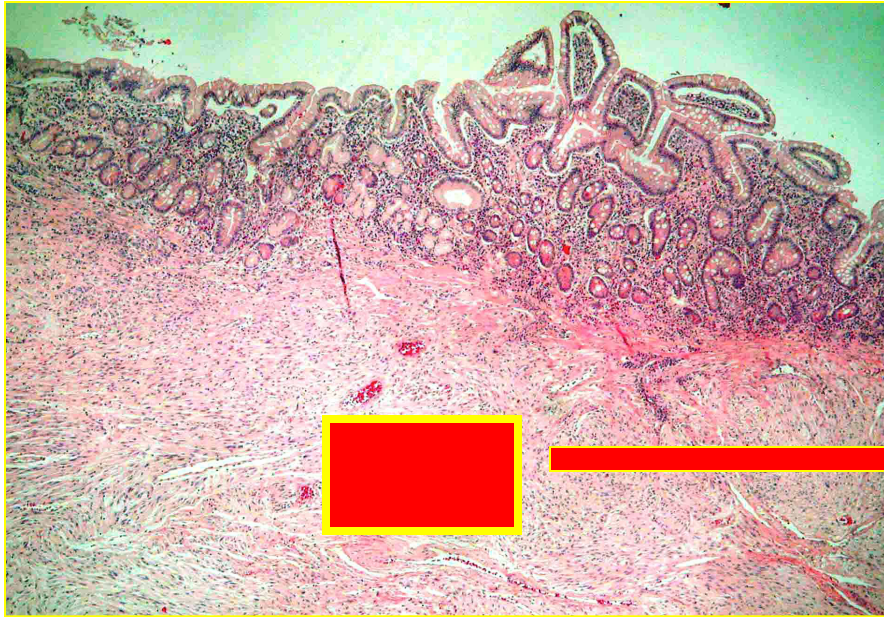
4 novembre 2021 – Argomenti della lezione

1. Applicazione della diagnostica molecolare nel GIST gastrico.
2. Applicazione della diagnostica molecolare nei tumori della mammella

Esempi

La caratterizzazione biomolecolare
dei tumori solidi

Applicazioni

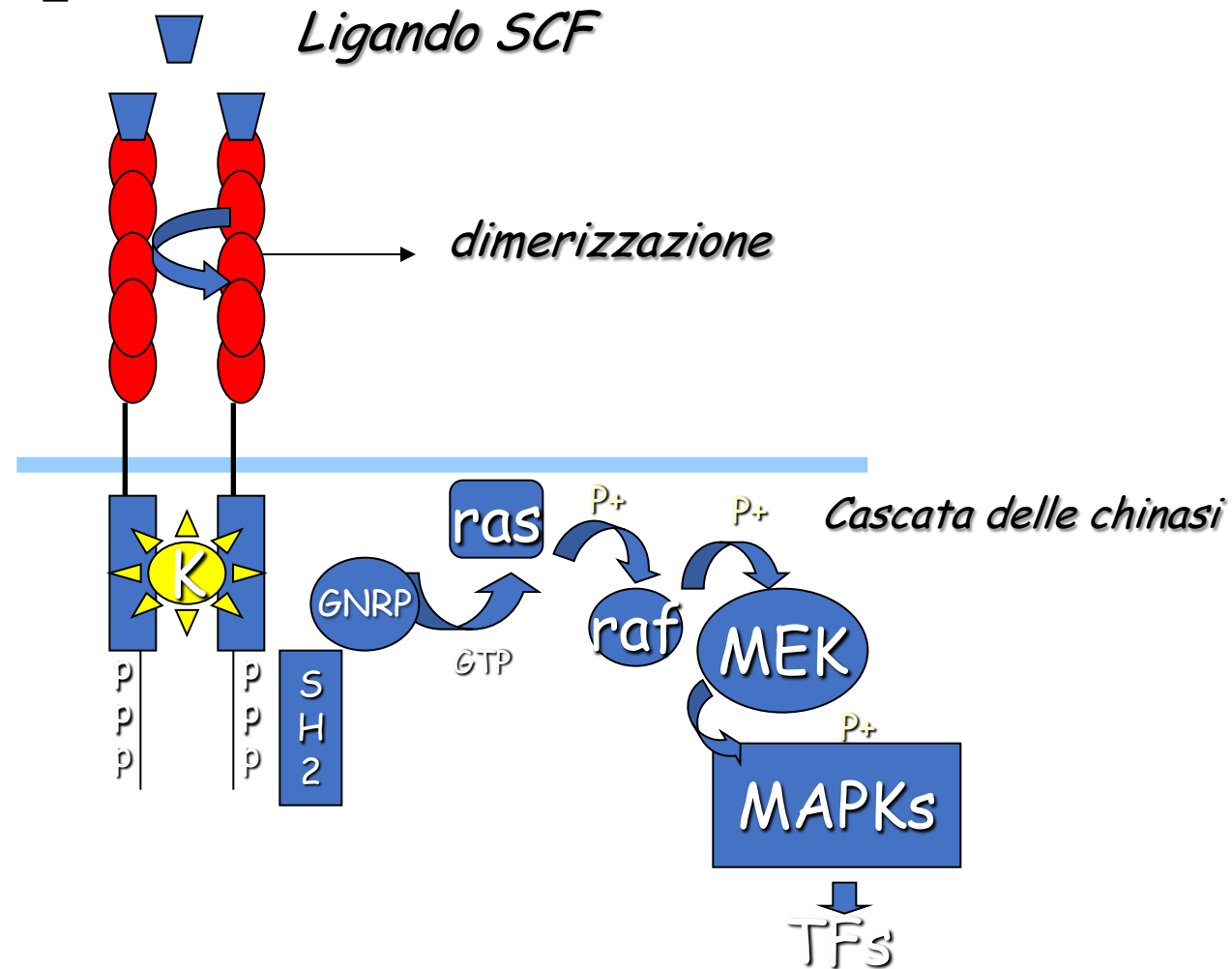


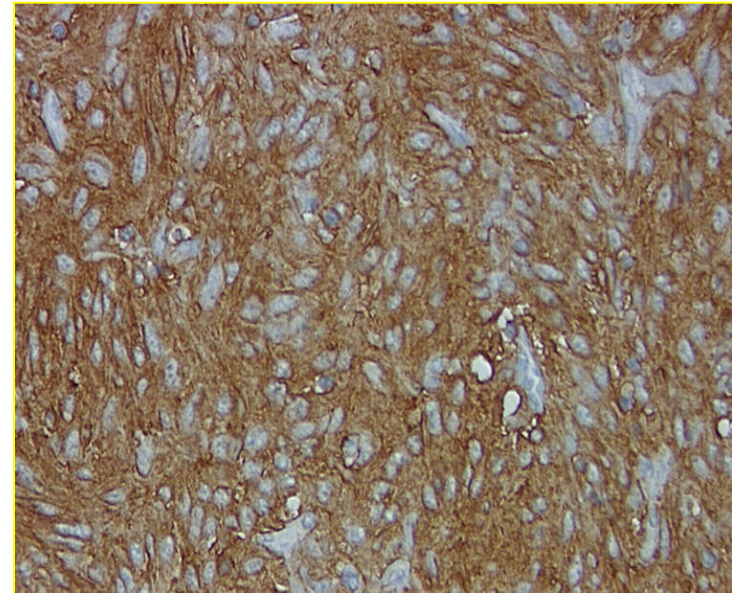
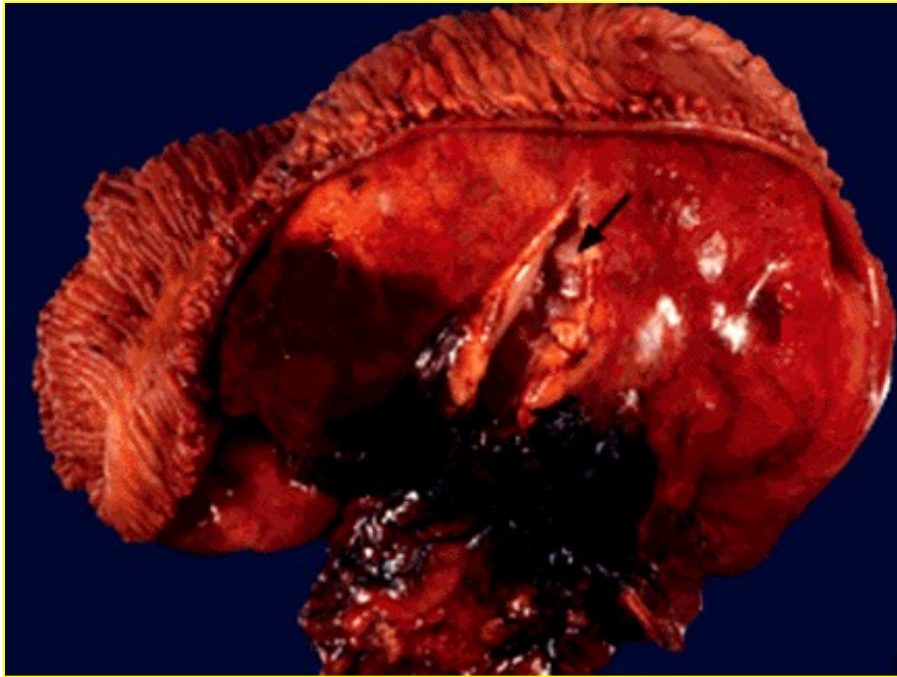
Conferma diagnostica
GIST

C-KIT+

Il c-kit è un recettore delle tirosin chinasi che quando interagisce con il suo ligando, il fattore di crescita della cellule staminali, dimerizza e attiva il suo sito catalitico che attiva per fosforilazione la cascata delle chinasi con l'attivazione ultima di fattori di trascrizione nucleare che stimolano la proliferazione cellulare.

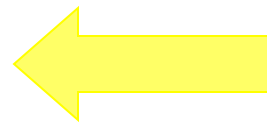
Struttura e Funzione





Somministrazione
Farmaco bersaglio specifico

**Imatinib
Gleevec**



GIST



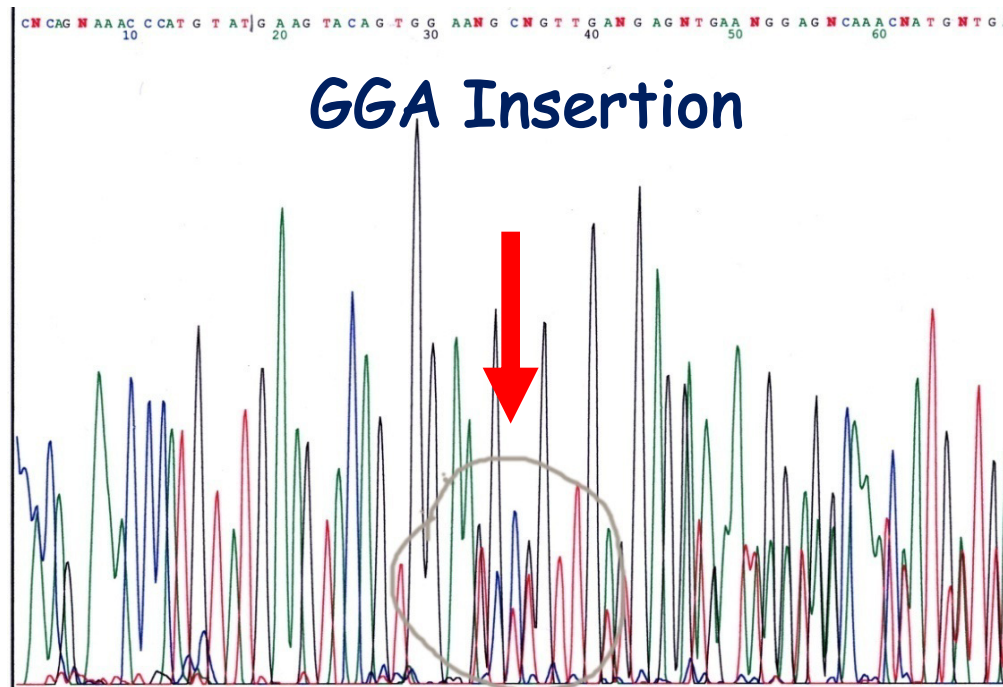
Inibitore dei recettori ad attività tirosin-chinasica

GIST

Fase analitica

- Utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori.
- La scelta del metodo analitico deriva dalle esigenze di giungere ad una definizione diagnostica o dalla disponibilità di farmaci diretti contro specifiche varianti mutazionali o alterazioni molecolari

KIT Activation Is a Ubiquitous Feature of Gastrointestinal Stromal Tumors



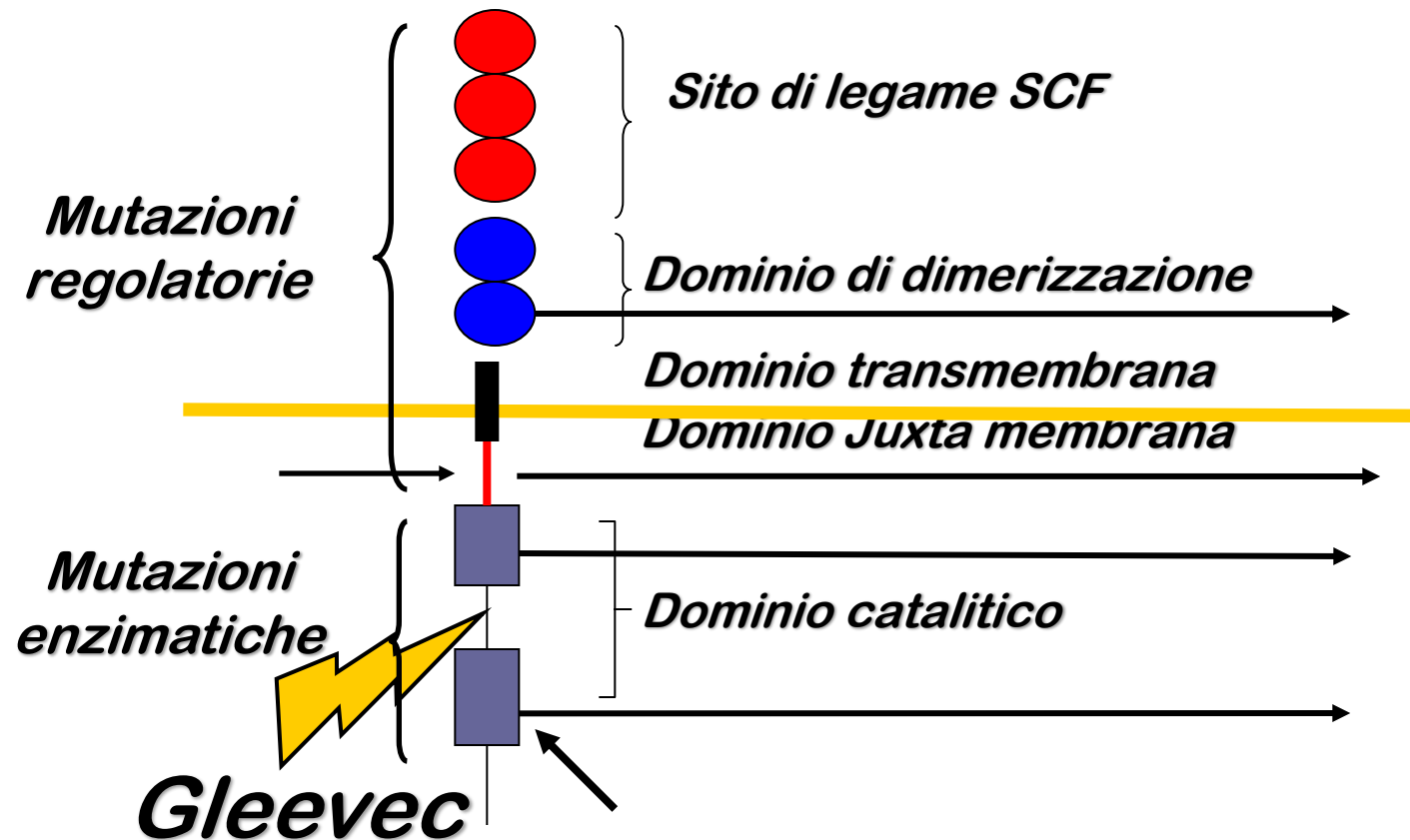
**Esone 11
C-kit**

La caratteristica di questi tumori è che nella maggioranza dei casi presentano mutazioni attivanti il gene KIT

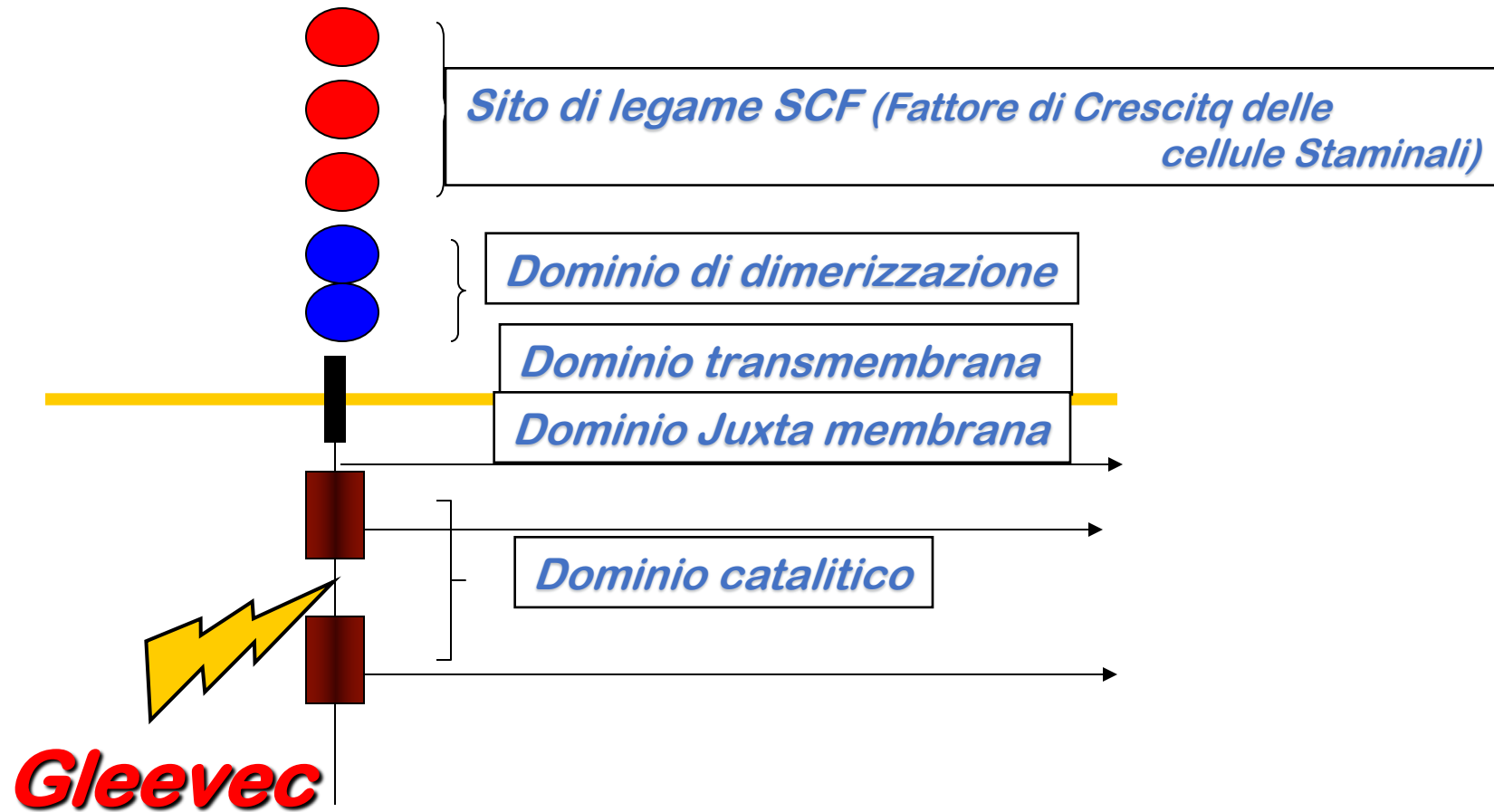
Queste mutazioni sono distribuite prevalentemente nell'Esone 11 che codifica per il dominio transmembrana.

Il gleevec inibisce l'attività catalitica del recettore evitando l'attivazione della cascata della map chinasi

La presenza della mutazione, condiziona la risposta alla terapia

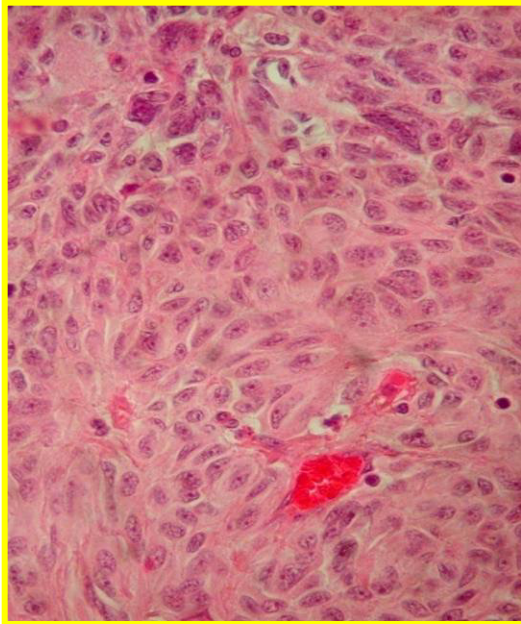


Mutazioni di PDGFRA nei GIST



DIAGNOSI MOLECOLARE GIST

applicazione diagnostica



90-95%

Morfologia + CD117 + → GIST

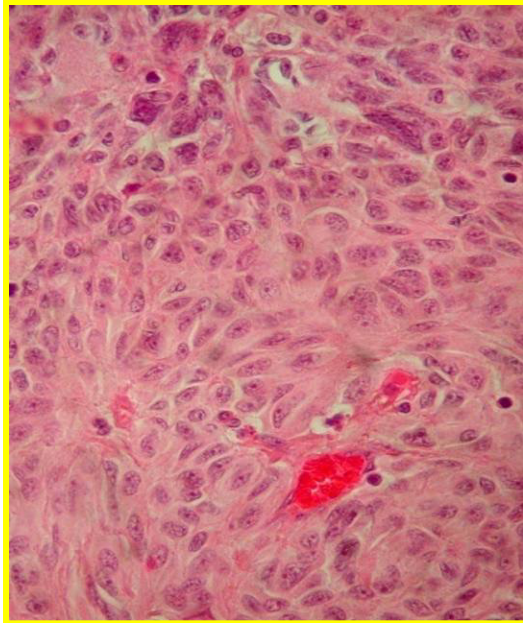
**5-10% CD117 - → Analisi molecolare
Kit/PDGFRA +
(88%-100%)**

Kit/PDGFRA -

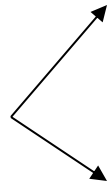
**0-5% GIST CD117 -
(Morfologia)**

DIAGNOSI MOLECOLARE GIST

a scopo prognostico terapeutico



Giudizio prognostico e predittivo di risposta alla terapia: studio delle mutazioni attivanti responsive al trattamento



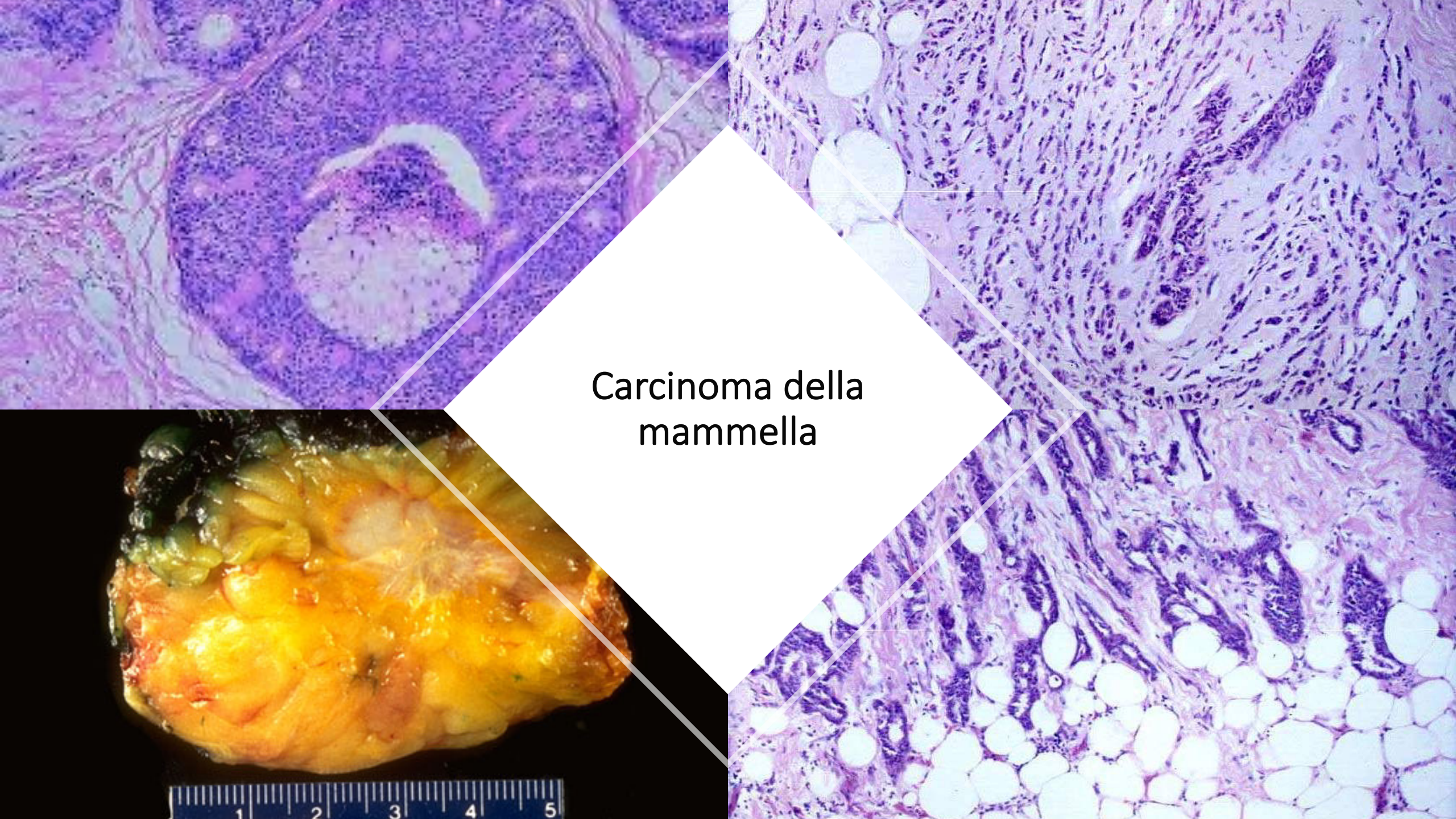
Studio della resistenza: seconde mutazioni dopo trattamento

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

LEZIONE 2

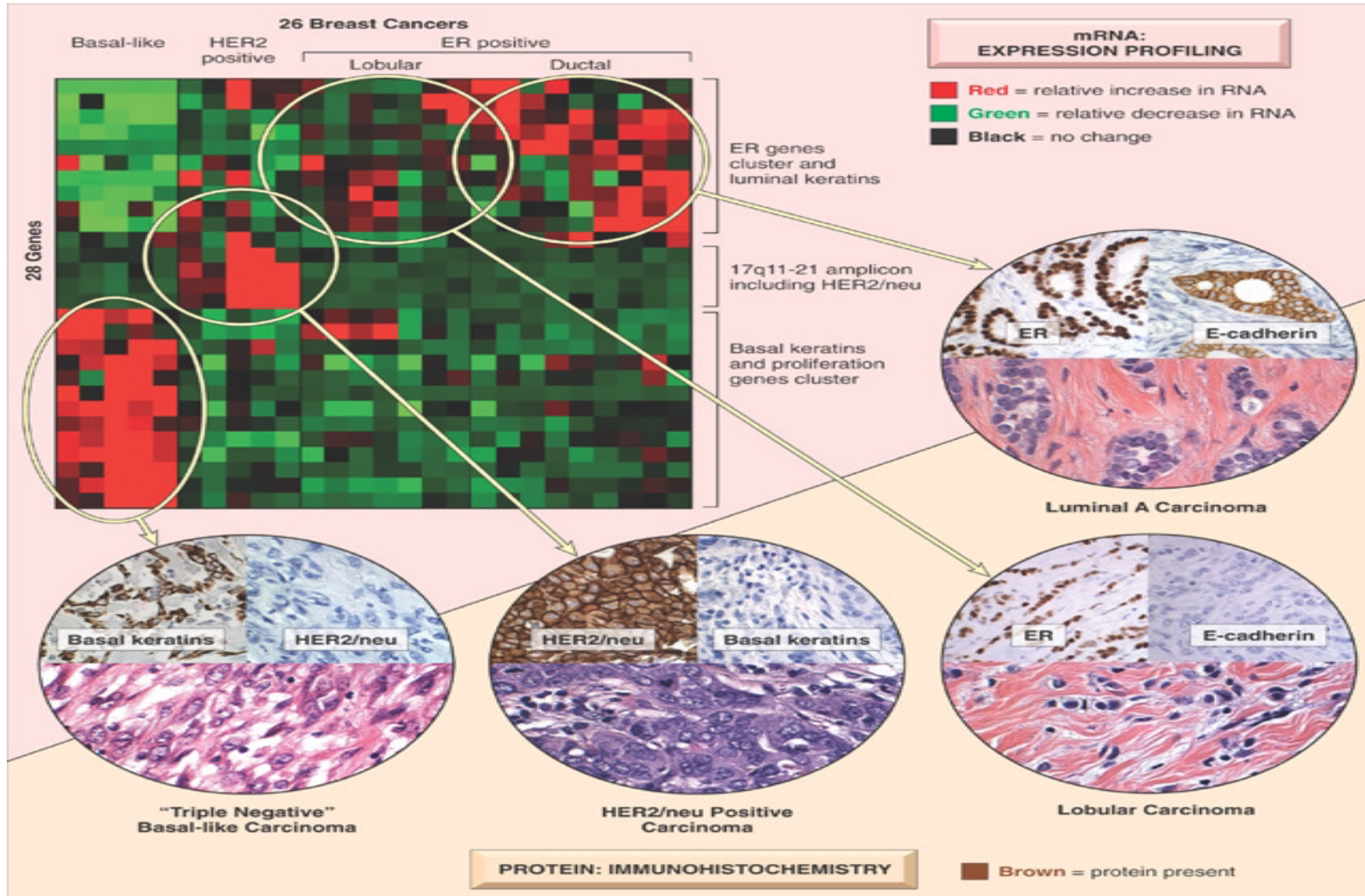
4 novembre 2021 – Argomento della lezione

Applicazione della diagnostica molecolare nei tumori
della mammella



Carcinoma della
mammella

La classificazione molecolare del carcinoma della mammella



Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con tumori apparentemente simili per caratteristiche clinicopatologiche possono presentare un decorso clinico diverso.

In seguito alle indagini di analisi di espressione genica mediante metodica di “microarray” che hanno identificato una “intrinsic gene list” di 496 geni, sono stati individuati **quattro sottotipi di carcinomi invasivi**:

- **“Luminali A”**: neoplasie con marcata espressione dei recettori ormonali;
- **“Luminali B”**: neoplasie che, pur esprimendo i recettori ormonali, hanno un rischio di recidiva elevato, a causa dell’elevato indice proliferativo correlato ad alta espressione dei geni di proliferazione;
- **“HER2”**: caratterizzati dalla presenza di espressione di HER2;
- **“Basal like”**: neoplasie caratterizzate dall’assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2 e da una aumentata espressione delle citocheratine basali (ad esempio CK5/6 e CK14).

Tali sottogruppi si sono dimostrati anche prognosticamente importanti:

Luminali A carcinomi a prognosi favorevole,
di molto migliore rispetto ai **Luminali B**,

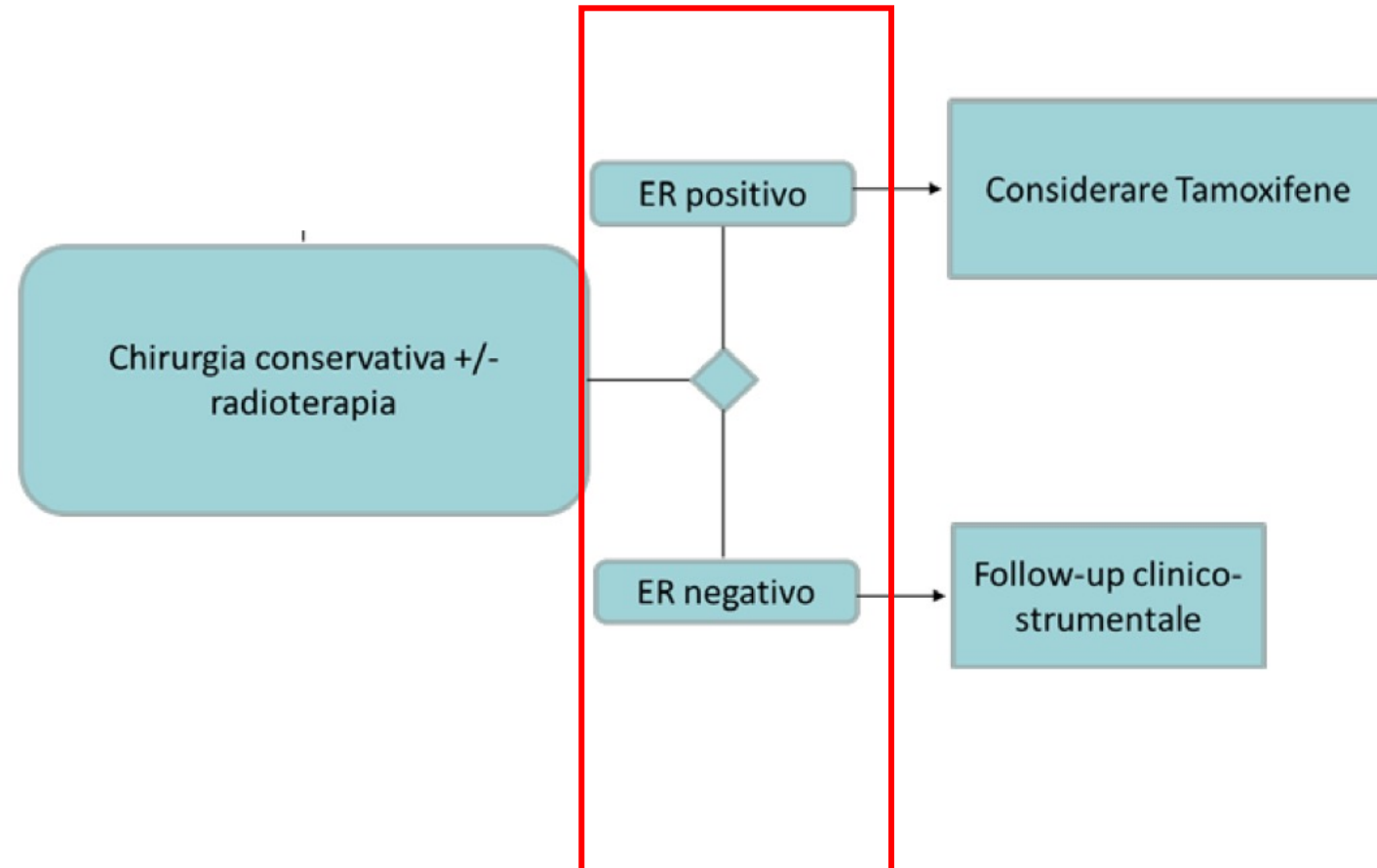
Carcinomi **HER2 positivi** e **Basal-like** la prognosi peggiore rispetto a tutti i sottogruppi

- **Luminali A:** recettori ormonali positivi, HER2 negativo e bassa attività proliferativa (di cui fanno parte frequentemente alcuni istotipi speciali quali carcinoma tubulare, carcinoma lobulare tipo classico).
- **Luminali B/HER2 negativi:** recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa;
- **Luminali B/HER2 positivi:** recettori ormonali positivi, HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato, qualsiasi valore di attività proliferativa;

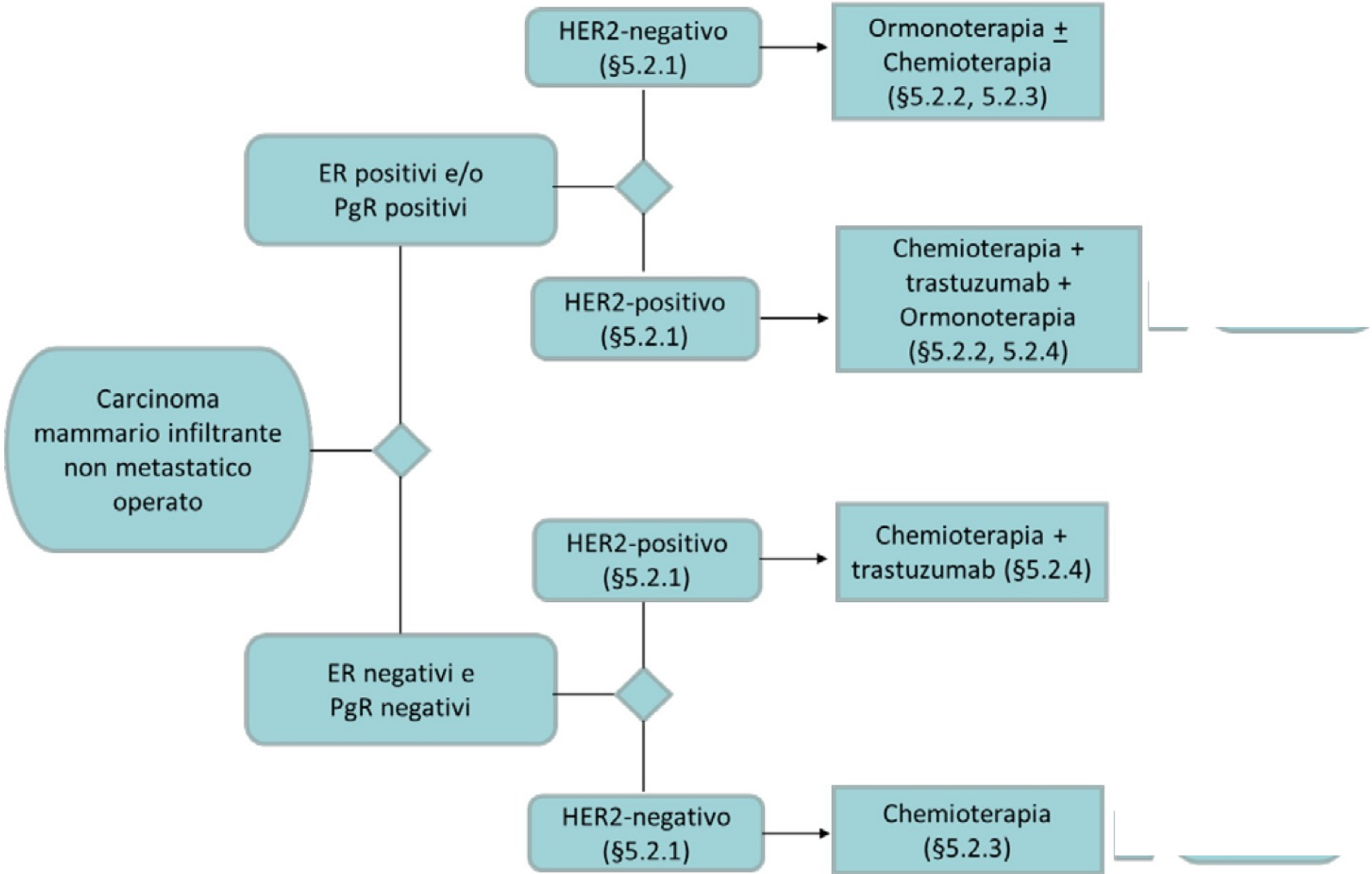
- **HER2 positivi (non luminali):** HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato (FISH o altre metodiche) ed entrambi i recettori ormonali negativi
- **Triplo-negativi:** assenza di espressione dei recettori ormonali e negatività di HER2

SOTTOTIPO	DEFINIZIONE SURROGATA	CARATTERISTICHE
Simil-luminale A	Simil-luminale A	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-negativo • Bassi livelli di Ki67 • Alti livelli di PgR • Profilo molecolare di tipo “basso rischio” (se disponibile)
Simil-luminale B	Simil-luminale B (HER2 -negativo)	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-negativo • Alti livelli di Ki67 o bassi livelli di PgR • Profilo molecolare di tipo ad “alto rischio” (se disponibile)
	Simil-luminale B (HER2 -positivo)	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-positivo • Qualsiasi livello di Ki67 • Qualsiasi livello di PgR
Sovraesprimente HER2	HER2 -positivo (non luminale)	<ul style="list-style-type: none"> • HER2-positivo • Assenza di ER e PgR
Basal-like	Triplo-negativo (duttale)	<ul style="list-style-type: none"> • HER2-negativo • ER e PgR-negativo

CARCINOMA DUTTALE IN SITU – TERAPIA

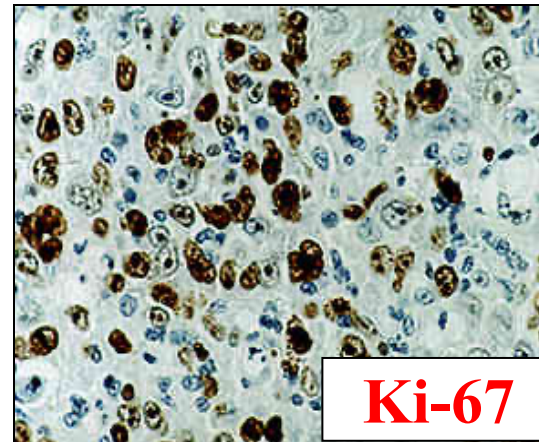
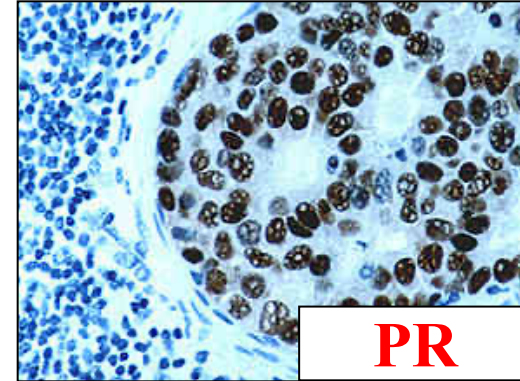
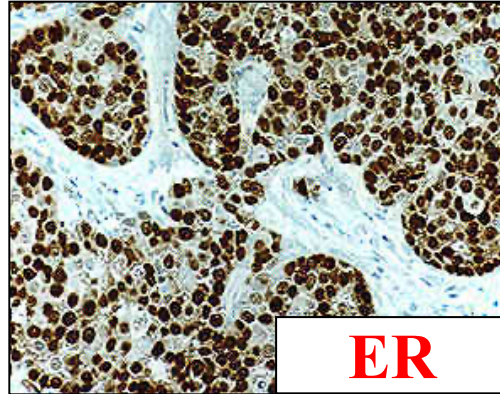


CARCINOMA INFILTRANTE NON METASTATICO – TERAPIA



Fattori prognostico-predittivi

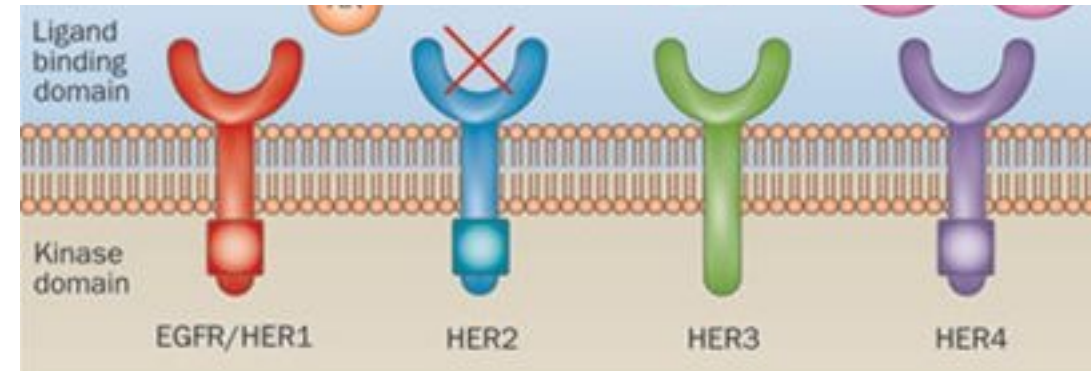
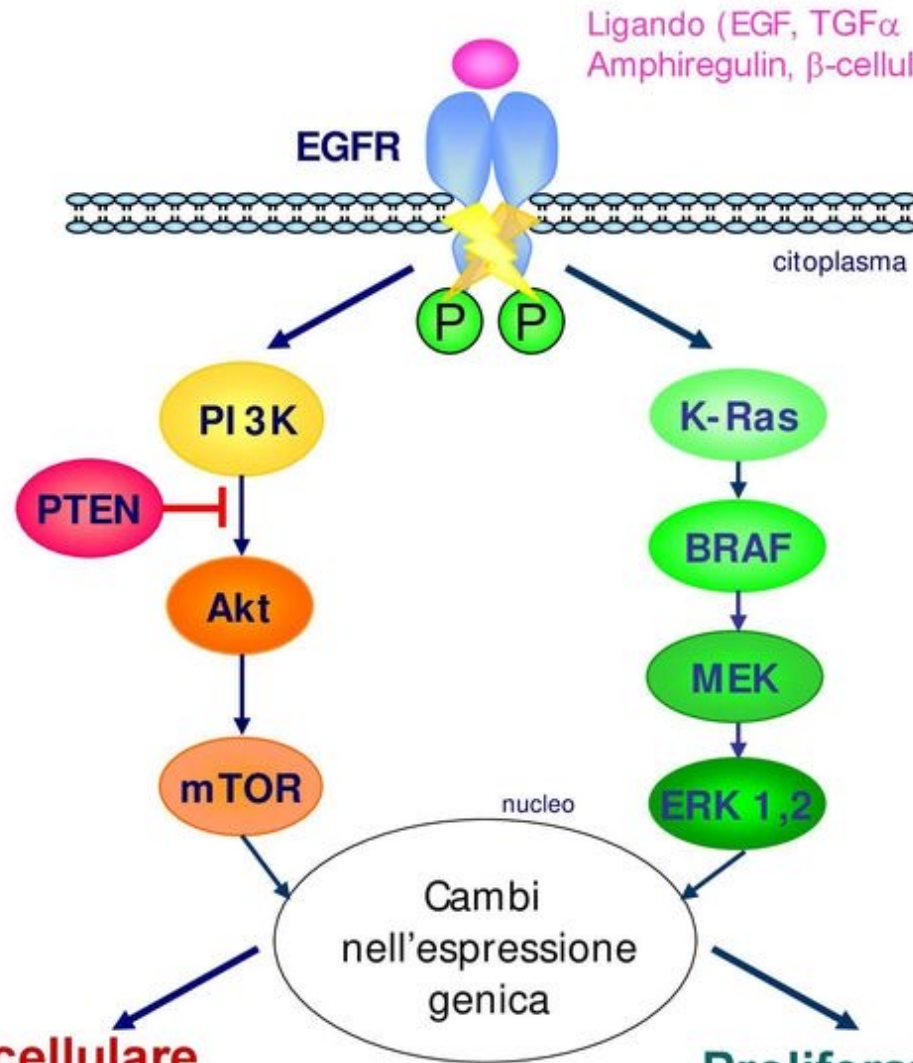
- Istotipo
- Grado
- Stadio
- Estrogeni
- Progesterone
- Ki-67
- HER2



HER2

EGFR e segnali a valle

- E' un Recettore Tirosin-Kinasico appartenente alla famiglia dei recettori HER (ErbB)



Iperespressione/Amplificazione di HER-2

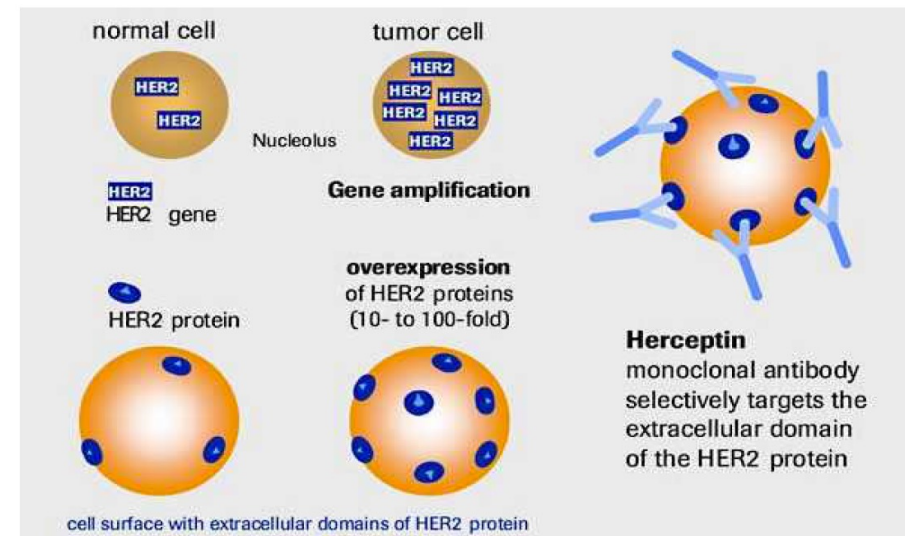
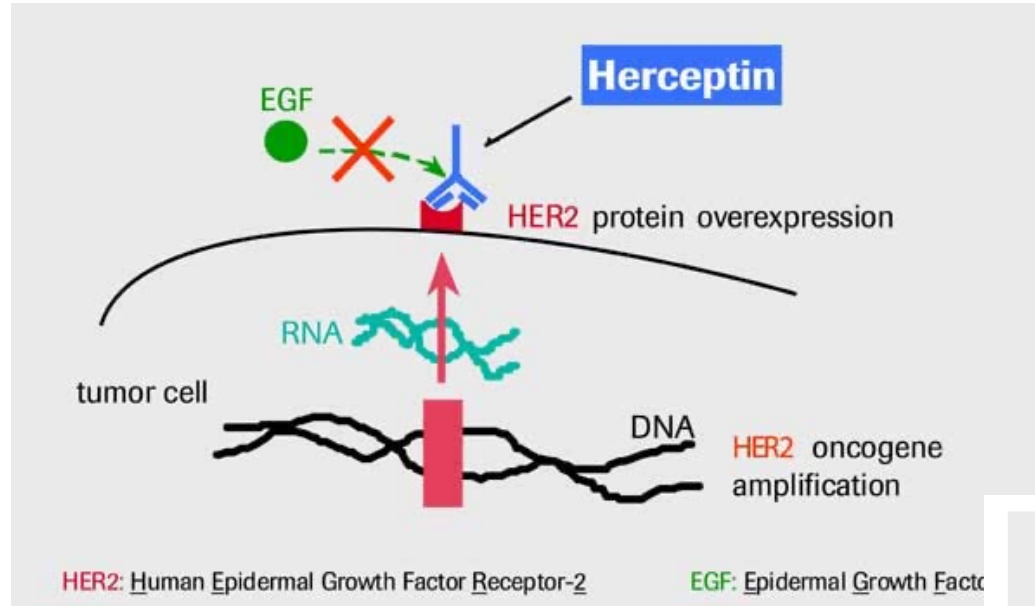
- HER-2 risulta iperespresso nel 20-30% dei casi di carcinoma mammario
- L'iperespressione di HER-2 è dovuta nel 95% circa dei casi all'amplificazione del gene

Iperespressione/Amplificazione di Her-2/neu

Rilevanza clinica

- L'amplificazione è un fattore prognostico negativo in termini di OS e DFS; è marcatore di recidiva precoce
- Correla positivamente con la risposta alla terapia antitumorale (taxani e antracicline) e negativamente con quella ormonale (tamoxifene)
- L'iperespressione/amplificazione condizionano la somministrazione e la risposta terapeutica dell'anticorpo monoclonale anti-Her2 (es. Trastuzumab)

Herceptin (TrastuzuMAb) (anti-HER MABs)



Valutazione dello stato di HER-2/Neu

IHC

HercepTest *

A085

Dako

Pathway *

CB11

Ventana

* FDA approved

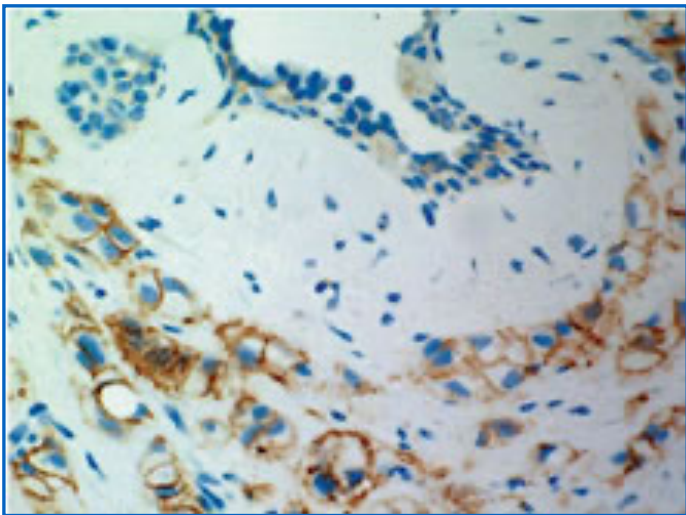
*ASCO/CAP 2006;
GU 01-08-2006 n.177

HER2/IHC

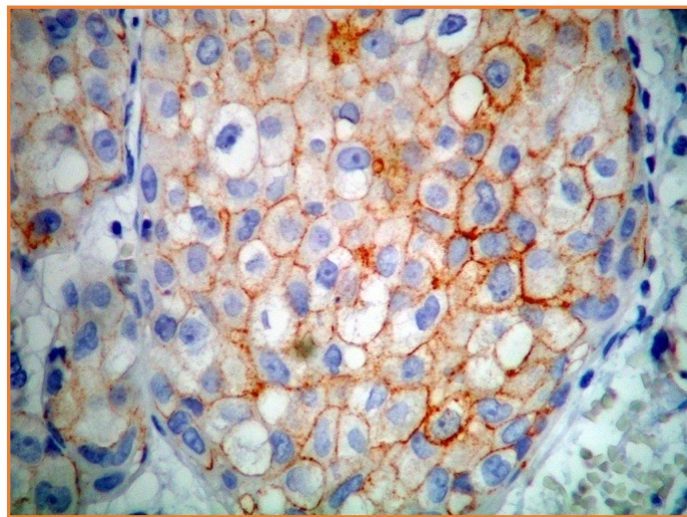
valutazione

- ▶ Score 0 **negativo**
 - ▶ No pos; pos membrana <30%
- ▶ Score 1+ **negativo**
 - ▶ Appena percettibile pos membrana >30%, incompleta
- ▶ Score 2+ **dubbio**
 - ▶ debole.-moderata pos membrana >30%, completa
- ▶ Score 3+ **positivo**
 - ▶ Intensa pos membrana >30%, completa

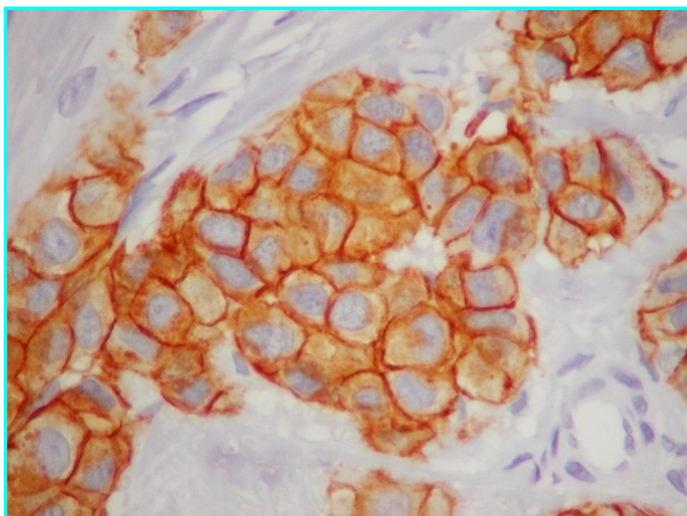
***Hercept test Ditta DaKo**



1+ colorazione di
membrana debole e
discontinua



2+ colorazione di membrana
continua da debole a moderata
(caso dubbio)



+3 colorazione di
membrana continua ed
intensa

Valutazione dello stato di HER-2/Neu

- Testati mediante IHC
- Intensa positività per HER-2 (IHC 3+)
- in più del 30% delle cellule neoplastiche
terapia con Herceptin

- IHC 2+ rivalutati FISH

***ASCO/CAP 2006;
GU 01-08-2006 n.177**

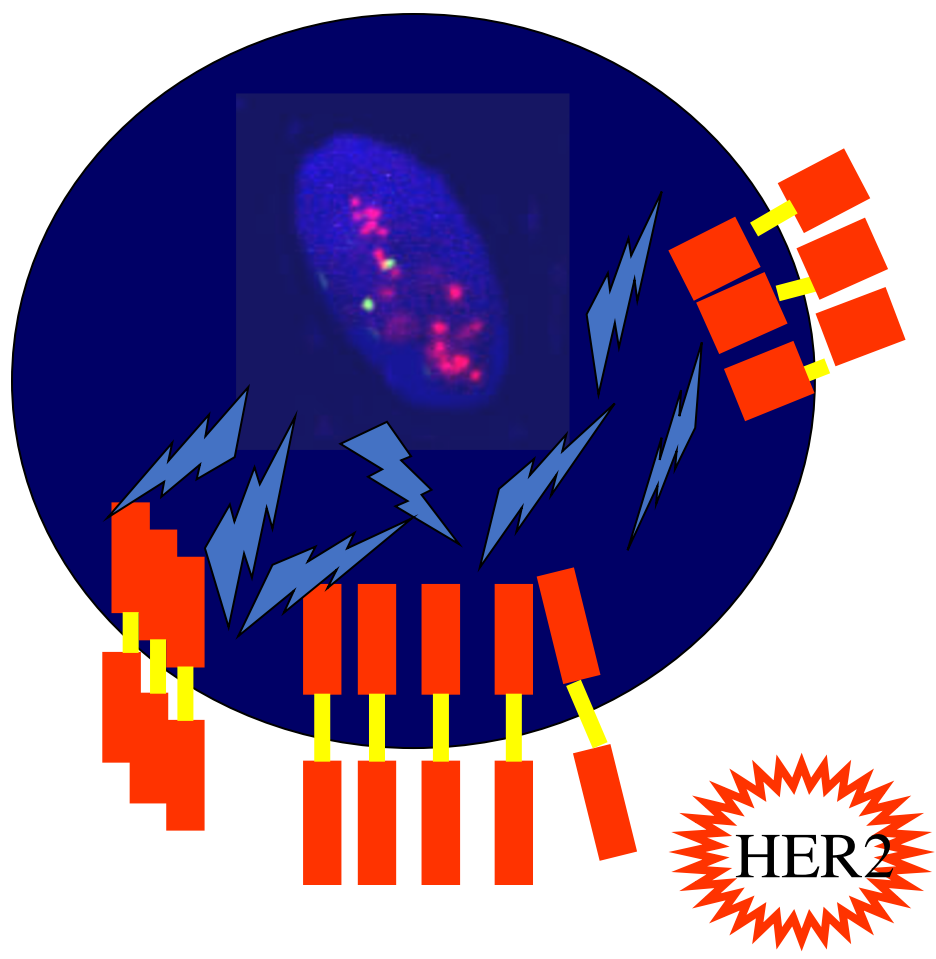
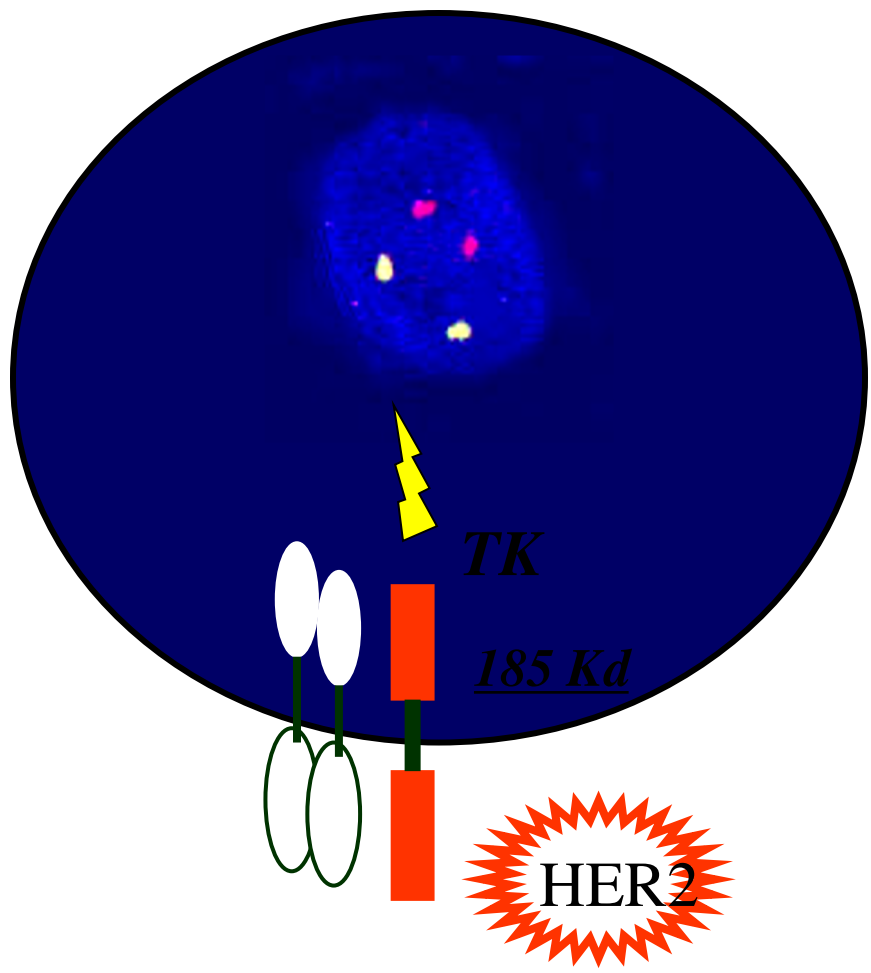
La valutazione FISH HER-2

80% dei casi ICH 2+
non sono amplificati

Falsi positivi

Quando si richiede la valutazione FISH HER-2/Neu

- IHC 2+ (sempre)*
- IHC 3+ (10%-30% di positività)
- Controlli di qualità IHC su 3+ e negativi
(come controllo interno del laboratorio)



FISH

- conta (100X) dei segnali relativi a HER-2 e CEP 17 in 60 nuclei neoplastici ben preservati e non sovrapposti
- rapporto tra la somma dei segnali relativi alle due sonde

Ogni caso viene caratterizzato riportando il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromerici del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17

Criteria di definizione dell'amplificazione genica di Her2

Positivo per l'amplificazione: il **rapporto** tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è **maggiore o uguale a due**

Negativo per l'amplificazione: il **rapporto** tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è **minore di due**

Valutazione FISH

Amplificazione:	Her-2/C17	$> 2,2$
Borderline:	Her-2/C17	1,8-2,2
Non amplificato:	Her-2/C17	$< 1,8$

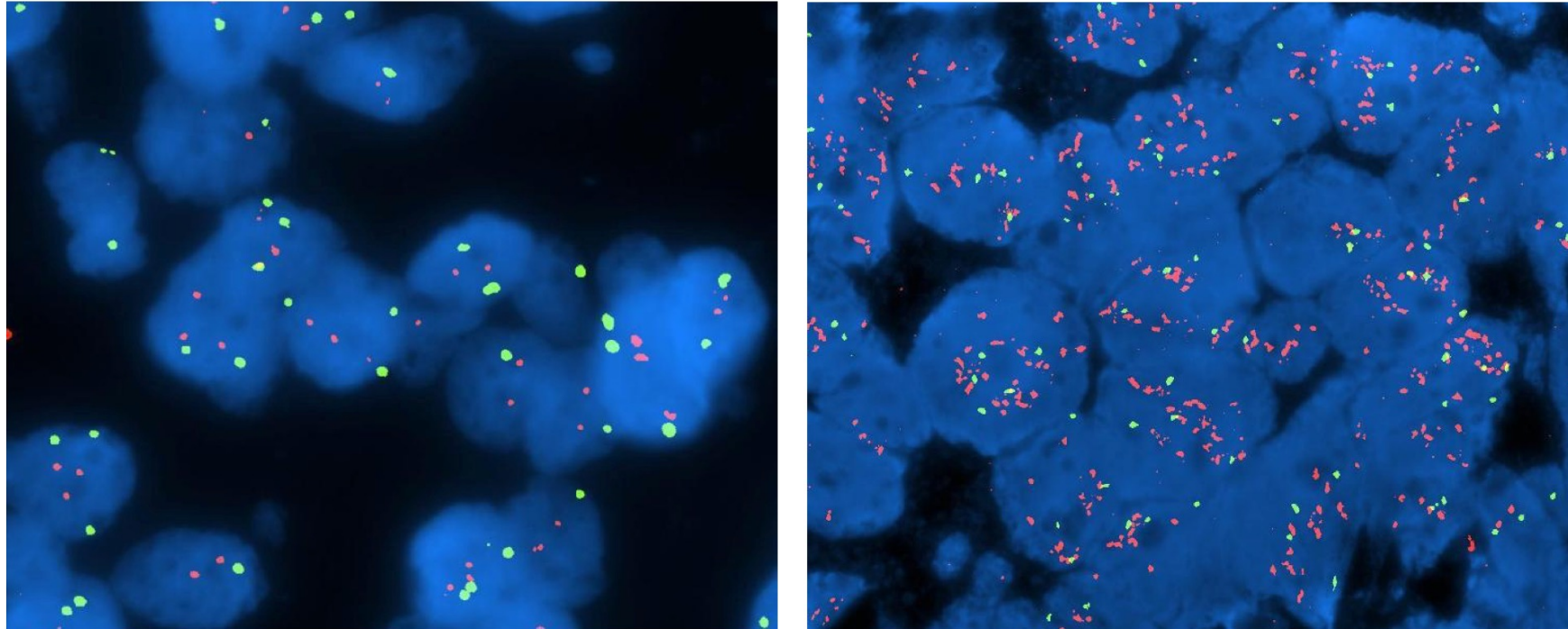
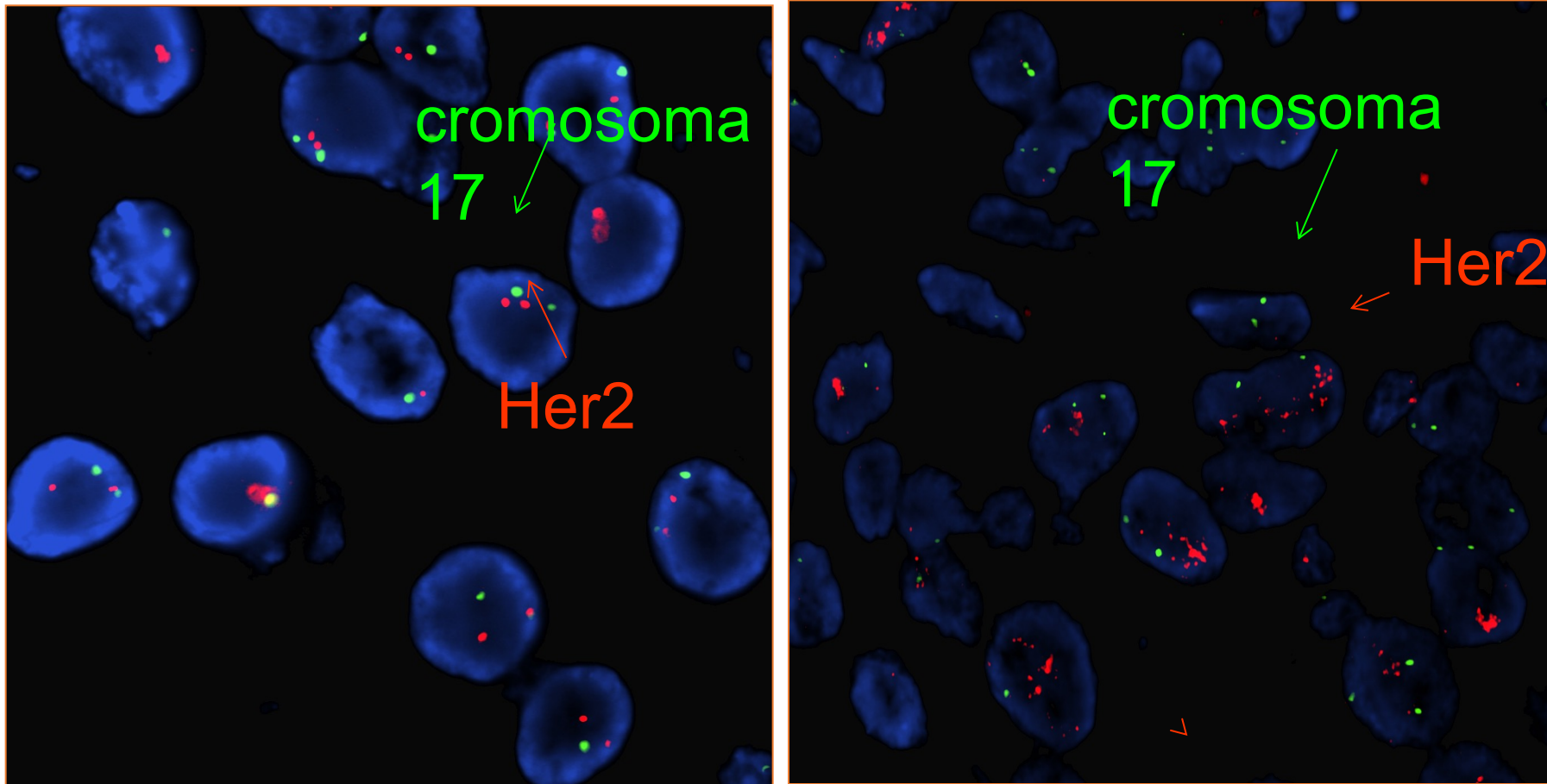


Figura 3 rispettivamente un caso con FISH negativa (ratio <2) ed un caso con FISH positiva (ratio >2)

La sonda utilizzata per la valutazione dell'amplificazione di Her2 :
ON HER2/CEP17 dual colour probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands),
è caratterizzata dall'emissione in spectrum orange (segnali genici) e spectrum green (segnali centromerici).



Negativo

Amplificato

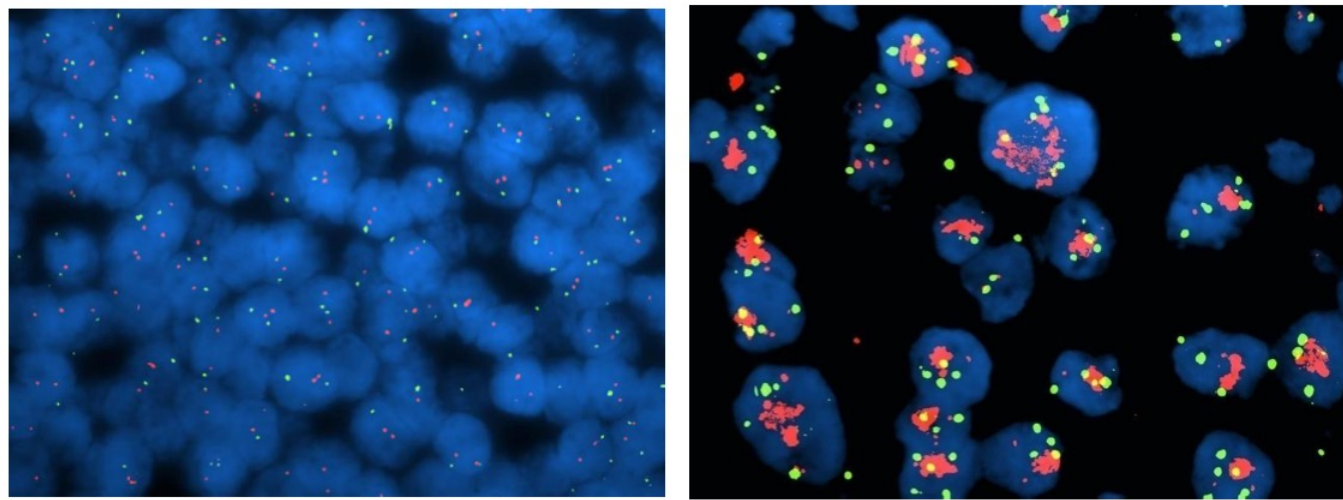


Figura 12 FISH Her2 rispettivamente non amplificata (sx) e amplificata (dx)

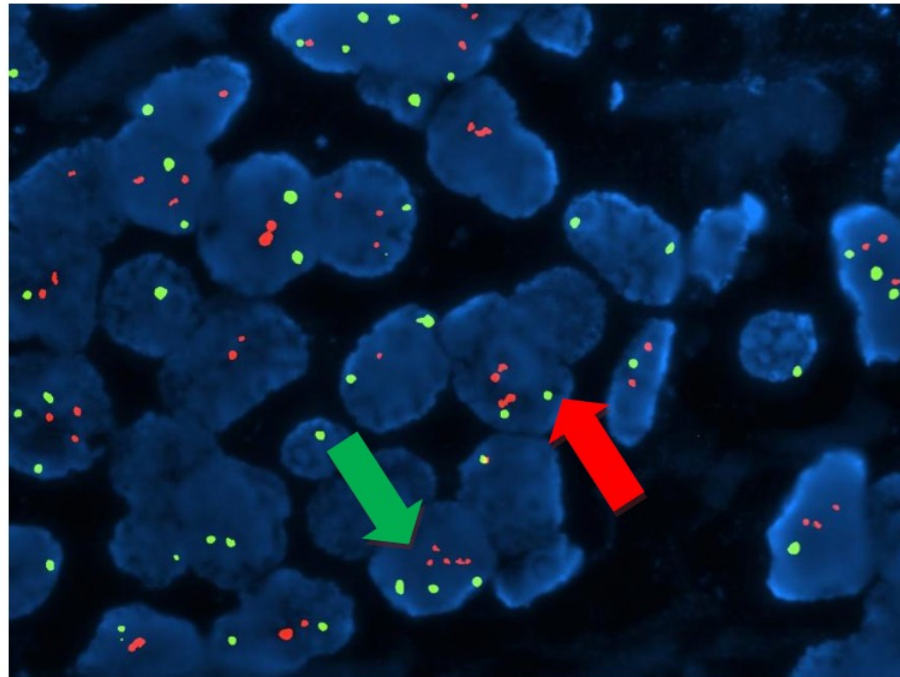


Figura 13 FISH Her2: caso eterogeneo (le frecce indicano i nuclei amplificati in un contesto complessivo di assenza di amplificazione)

Rivelazione del segnale relativo all'espressione proteica.

Indagine SISH

La SISH è una metodica quasi completamente automatizzata che permette la visualizzazione quantitativa delle copie del gene HER2 mediante ibridazione in situ con argento.

I vetrini vengono privati della paraffina e sottoposti a trattamento con proteasi per permettere alle sonde di penetrare nelle cellule. Le sonde, marcate con DNP (2,4 dinitrofenolo), si legano a specifiche sequenze target di DNA.

Il probe, è visualizzato mediante l'utilizzo di un anticorpo primario anti-DNP di coniglio ed anticorpo secondario anti-coniglio di capra coniugato a perossidasi di rafano (HRP) utilizzato come substrato cromogenico.

La reazione di ibridazione in situ con argento è indotta dall'aggiunta in sequenza di **argento acetato, idrochinone e perossido di idrogeno.**

In questa reazione gli ioni argento (Ag^+) sono ridotti dall'idrochinone in atomi di argento metallico.

Il precipitato di argento si deposita nei nuclei e una singola copia del gene HER2 (17q11.2-q2), o il centromero del cromosoma 17, viene visualizzata come punto nero.

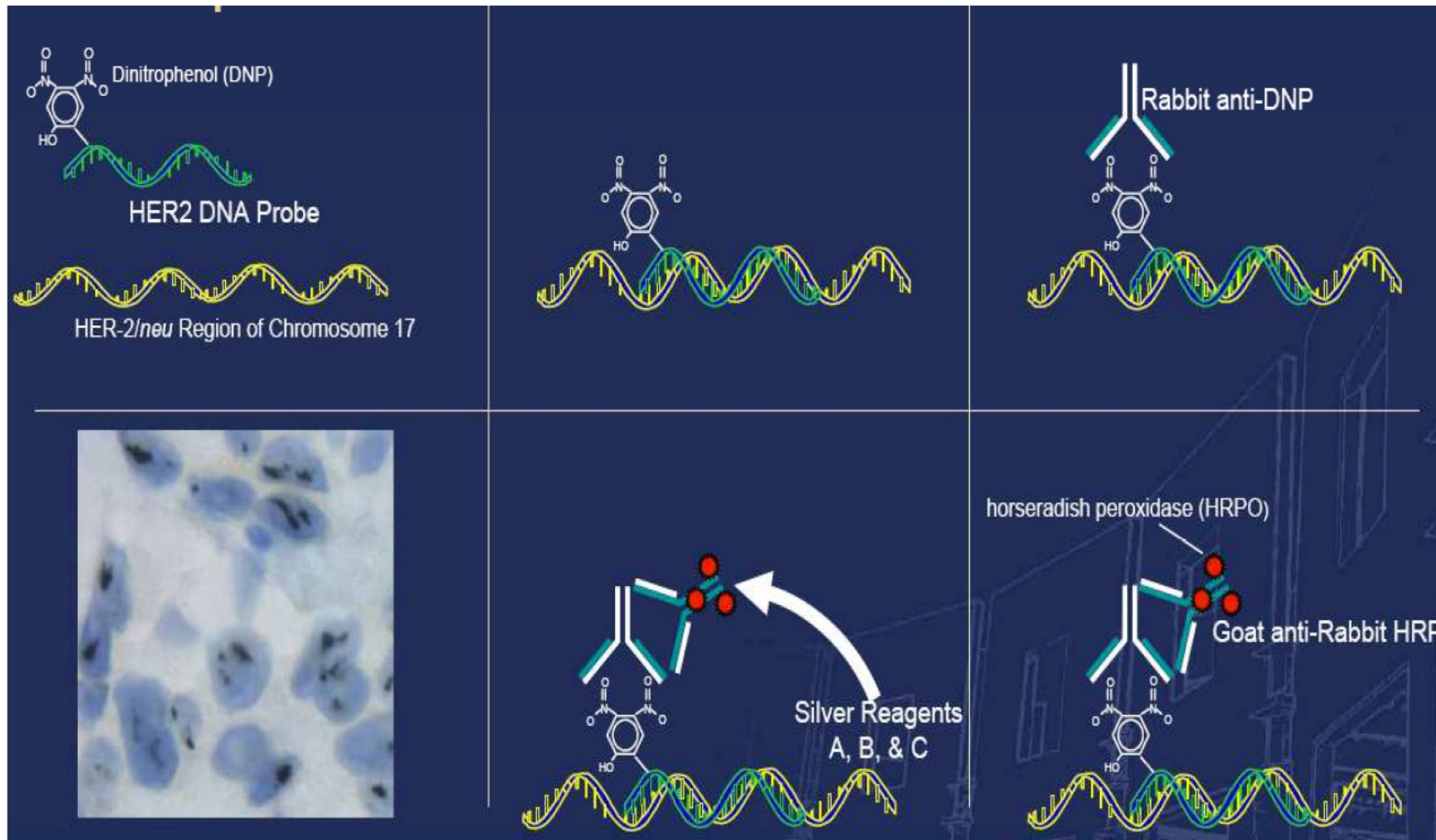


Figura 25: L'HRP catalizza la riduzione dello ione argento ad argento metallico e permette la visualizzazione del gene Her2 o del centromero del cromosoma 17.

Il campione viene successivamente controcolorato e disidratato per l'interpretazione al microscopio ottico.

La procedura consente di visualizzare su un campione di tessuto lo stato del gene HER2 della neoplasia e contemporaneamente, su un altro campione di tessuto, lo stato del cromosoma 17.

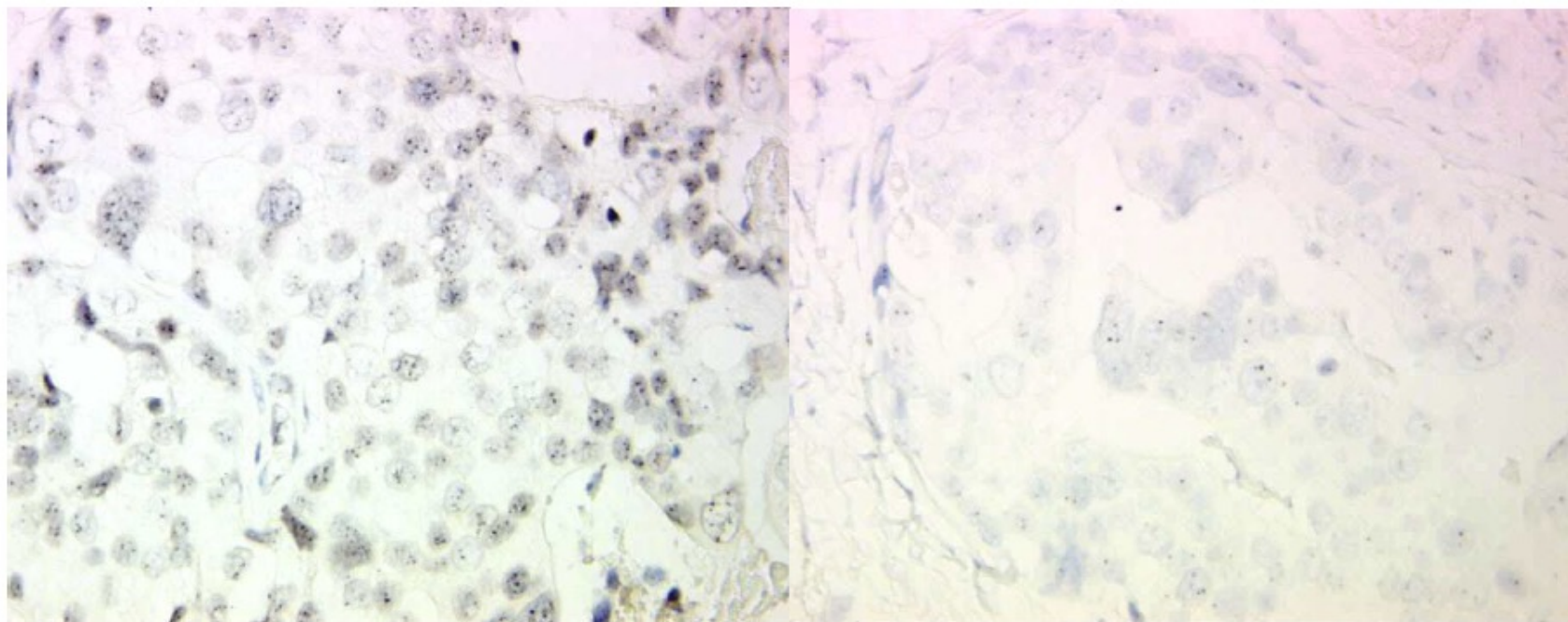


Figura 33: gene HER2 e CEN17 (metodica SISH)

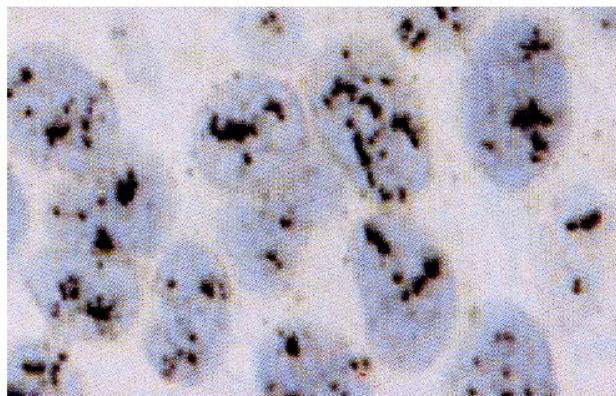


Figura 26: INFORM™ HER2 DNA Probe della linea cellulare BT474

(Interpretative guide for Ventana INFORM™ HER2 DNA Probe Staining of Breast
Carcinoma)

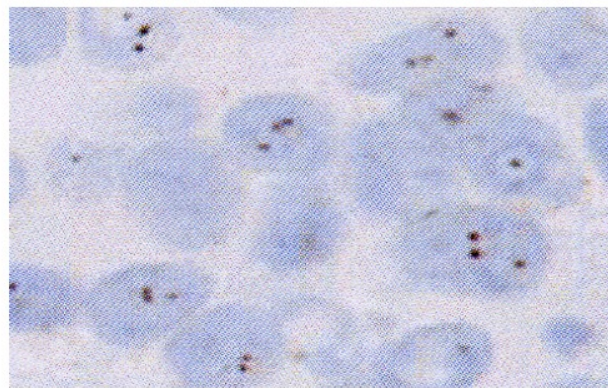


Figura 27: INFORM™ HER2 DNA Probe della linea cellulare ZR-75-1

(Interpretative guide for Ventana INFORM™ HER2 DNA Probe Staining of Breast
Carcinoma)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

Lo stato del gene HER2 è una funzione del rapporto tra il numero di copie del gene HER2 ed il numero di copie del cromosoma 17 per ogni cellula.

- Rapporto HER2/Chr17 inferiore a 1,8 campione negativo per amplificazione del gene;
- Rapporto HER2/Chr17 compreso tra 1,8 e 2,2 campione ambiguo per amplificazione del gene HER2;
- Rapporto HER2/Chr17 superiore a 2,2 campione positivo per amplificazione del gene HER2

Rapporto medio HER2/Chr 17	Risultati
$HER2/Chr\ 17 < 1.8$	Negativo per amplificazione gene <i>HER2</i>
$1.8 \leq HER2/Chr17 \leq 2.2$	Equivoco per amplificazione gene <i>HER2</i>
$HER2/Chr17 > 2.2$	Positivo per amplificazione gene <i>HER2</i>

Caso positivo: Donna di anni 69

Score FISH: >2.5- Score SISH: 2.4

KI67(Mib-1): 60%; ER: 70%; PR: 30%

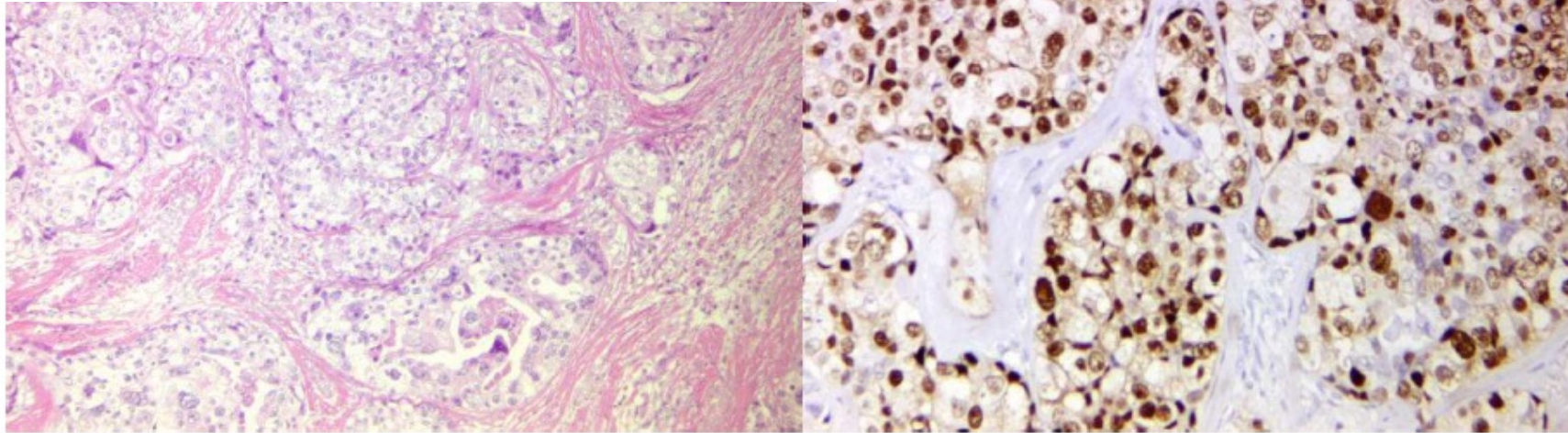


Figura 31: istologia ed immunoistochimica sul recettore estrogenico

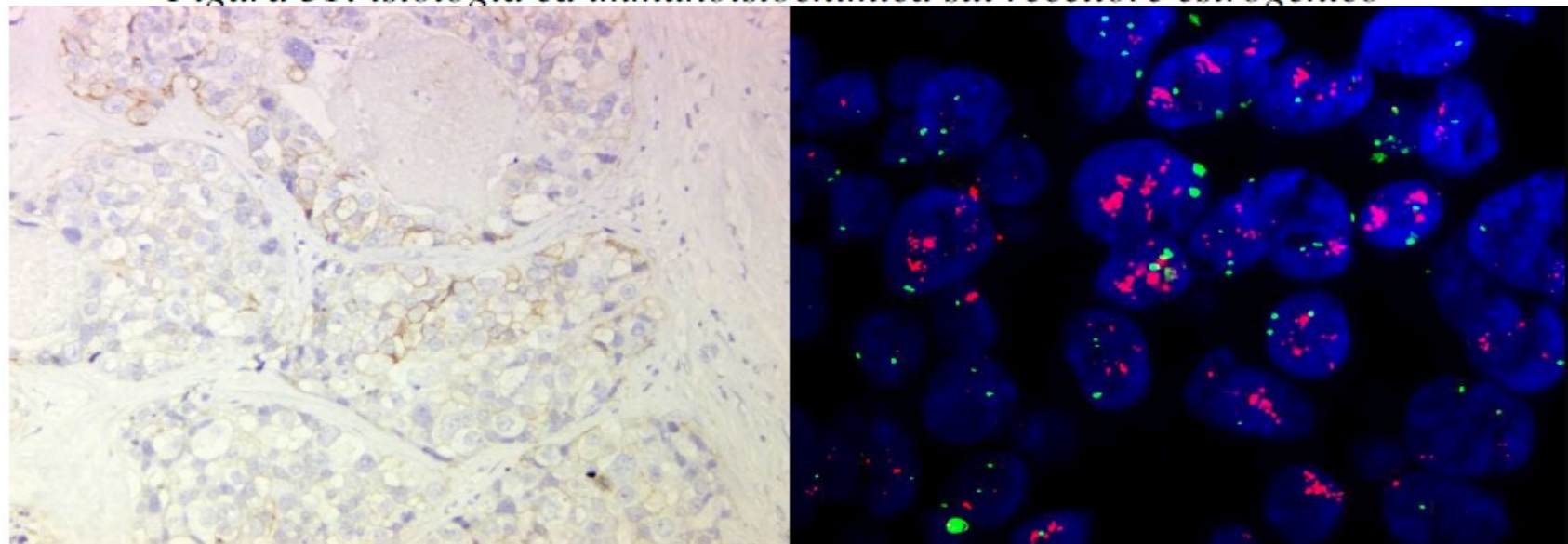
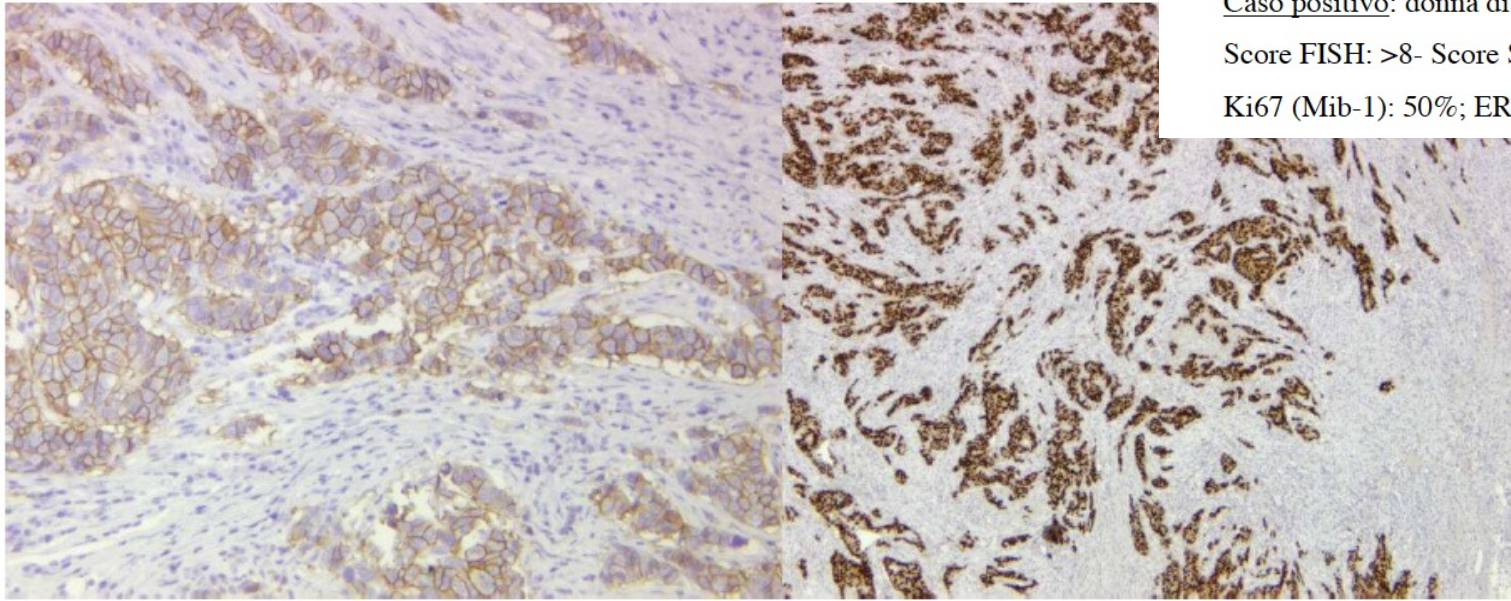


Figura 32: Hercept Test e FISH



Caso positivo: donna di anni 74
Score FISH: >8- Score SISH: >8
Ki67 (Mib-1): 50%; ER: 90%; PR: 90%

Figura 40: Hercept Test ed immunoistochimica sul recettore estrogenico

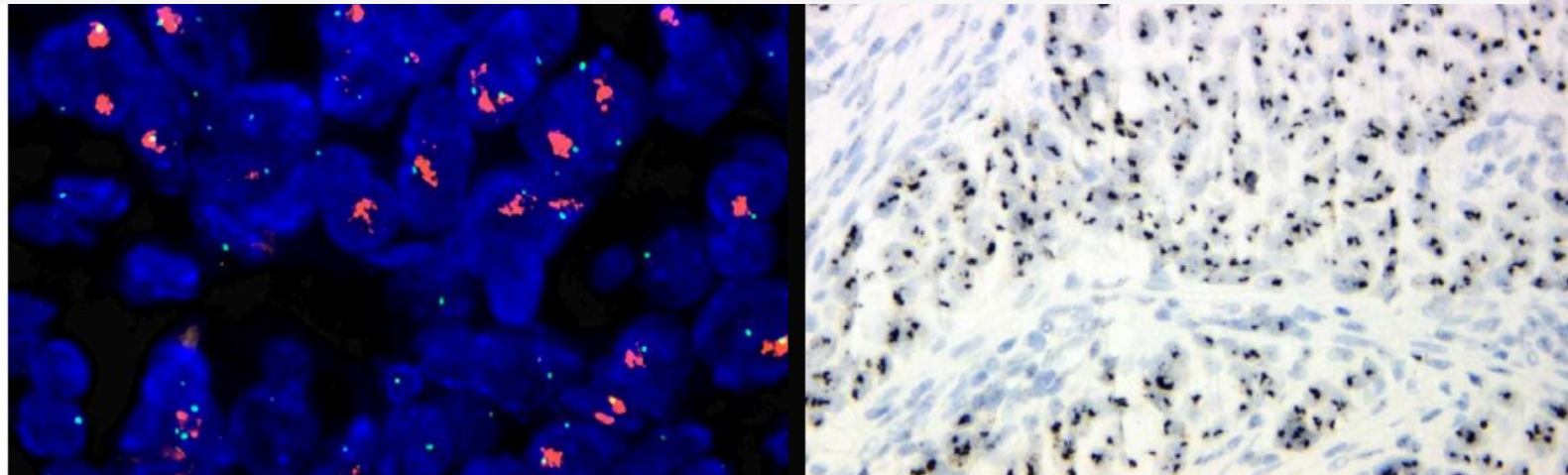


Figura 39: FISH e SISH sul gene HER2

CARCINOMA INFILTRANTE NON METASTATICO – TERAPIA

