

**PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT**  
(max 5 pagine / max 5 pages)

<b>Cognome/Surname</b>	FIORINO
<b>Nome / Name</b>	ALESSIA
<b>Titolo del progetto / Project title</b>	ANALISI DI NEXT GENERATION SEQUENCING CON PANNELLO MULTIGENICO IN PAZIENTI CON TUMORE DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO
<b>Corso di dottorato / PhD</b>	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
<b>Firma del candidato / Applicant's signature</b>	

**Abstract**

Il tumore della mammella rappresenta il 29% delle nuove diagnosi di cancro nella popolazione femminile. Tra i sottotipi molecolari di cancro della mammella viene identificato il carcinoma mammario triplo-negativo (TNBC), che rappresenta il 10-20% di tutti i tumori al seno ed è caratterizzato da una prognosi sfavorevole e marcata aggressività. Il TNBC è caratterizzato dal punto di vista molecolare dall'assenza dell'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PR) e dall'assenza di amplificazione o di overespressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale umano HER2. La mancanza di tali targets terapeutici fa emergere la necessità di trovare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di terapie mirate. Circa il 20% dei TNBC è associato a varianti patogene (PVs) della linea germinale nei geni di suscettibilità *BRCA1/2*, mentre alterazioni in somatico di tali geni si verificano nel 3-5% dei casi e sono responsabili delle forme sporadiche di malattia. Tra le varianti riscontrate, oltre l'80% ricade nel gene *BRCA1*, mentre il 20% nel gene *BRCA2*. Varianti in tali geni determinano una condizione di *Homologous Recombination Deficiency* (HRD) che è alla base dell'instabilità genomica. Il pathway dell'*Homologous Recombination* (HR) coinvolge altri geni le cui alterazioni potrebbero essere responsabili di alcuni TNBC *BRCA1/2 wild type*, cosiddetti "*BRCAness*" che presentano una forte storia familiare per neoplasie mammarie. L'identificazione di PVs in geni coinvolti nell'HR assume significato predittivo di risposta al trattamento, infatti, è noto che soggetti *BRCA1/2* mutati, siano più responsivi ai derivati del platino e agli inibitori di PARP (*PARPi*). L'FDA ha approvato nel gennaio 2018 il trattamento con *PARPi* in pazienti *BRCA1/2* mutati con carcinoma mammario HER2 negativo. Pertanto, l'identificazione di nuovi markers indicativi di HRD potrebbe permettere a pazienti *BRCAness* di beneficiare del trattamento con i *PARPi*.

**Background**

Il tumore della mammella rappresenta il 29% delle nuove diagnosi di cancro nella popolazione femminile. I risultati di studi di popolazione sono stati riportati dalle recenti linee guida 2018 dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica-AIOM e dall'Associazione Italiana Registri Tumori AIRTUM (1). Il trend di incidenza è così distribuito nelle varie fasce d'età 0-49 anni (41%), 50-69 anni (35%), 70 anni (22%). Il cancro al seno rappresenta il 29% delle cause di morte oncologica prima dei 50 anni, il 21% tra i 50 e i 69 anni e il 14% dopo i 70 anni. Tuttavia, si osserva una continua tendenza alla diminuzione della mortalità pari circa al -0,8%/anno attribuita alla maggiore diffusione dei programmi di screening. Inoltre, la sopravvivenza a 5 anni delle donne con tumore della mammella in Italia è pari all'87% e l'area del paese con percentuali inferiori è il Meridione (85%) (2).

Il 70% dei tumori della mammella risulta essere di natura sporadica, mentre il 5-10% è legato a fattori ereditari e un quarto di tali casi è legato all'ereditarietà autosomica dominante delle alterazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* (3) (2). Le donne portatrici di mutazioni in tali geni rappresentano, infatti, il 25-30% di tutte le donne affette da tumore al seno ereditario e per le pazienti con alterazioni del gene *BRCA1* il rischio di ammalarsi nel corso della vita è pari al 70-80%, mentre per le donne con mutazioni del gene *BRCA2* è pari al 50-60%. Le alterazioni di sequenza dei geni *BRCA1* e *BRCA2* sono legate anche a un aumentato rischio di carcinoma ovarico e sono alla base della Sindrome ereditaria *HBOC* (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) (4). Tra i sottotipi molecolari di cancro alla mammella viene identificato il carcinoma mammario triplo-negativo (TNBC), che rappresenta il 10-20% di tutti i tumori al seno ed è caratterizzato da una prognosi sfavorevole e marcata aggressività. Il TNBC è caratterizzato dal punto di vista molecolare dall'assenza dell'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PR) e dall'assenza di amplificazione o di overespressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale umano HER2 (5). Inoltre, è comune tra le donne di età inferiore ai 40 anni, è definito un tumore ad alto grado, spesso identificato a stadi avanzati, nonché associato a un elevato rischio di recidiva. È caratterizzato, inoltre, da un basso *survival rate* a 5 anni. Si presenta, nella maggior parte dei casi con un'istologia di carcinoma duttale infiltrante CDI ed è associato a un *outcome* peggiore rispetto agli altri tipi di tumore della ghiandola mammaria (7). I TNBC sono caratterizzati da un'elevata eterogeneità e comprendono vari sottotipi molecolari. Dal punto di vista molecolare, alterazioni nei geni *BRCA1/2* si presentano nel 10-20% dei TNBC ed è stato riscontrato che oltre l'80% dei tumori TNBC risulta *BRCA1* mutato, mentre solo il 20% *BRCA2* mutato. Mentre alterazioni in somatico nei geni *BRCA1/2* si verificano nel 3-5% dei casi di TNBC (6).

La conseguenza delle varianti nei geni *BRCA1/2* è una perdita di funzionalità dei loro prodotti proteici oncosoppressori con conseguente mal funzionamento del sistema di ricombinazione omologa (HR) deputato al riparo dei danni al DNA a doppio filamento (DSB, *double-strand break*) (8). La ridotta funzionalità del meccanismo HR definisce la cosiddetta *Homologous Recombination Deficiency* (HRD). L'HRD può essere causata anche da alterazioni molecolari che insorgono a carico di altri geni coinvolti nelle sindromi ereditarie poligeniche che hanno come tumore associato anche il tumore della mammella. È, pertanto, opportuno che nei tumori *BRCA1/2 wild type* che abbiano forte storia familiare, definiti "*BRCAness*", sia valutato lo stato mutazionale di geni correlati al pathway della ricombinazione omologa come *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *BARD1* e di altri geni il cui meccanismo d'azione influenza la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule neoplastiche. Alterazioni in questi geni possono, infatti, influenzare negativamente l'equilibrio cellulare e, quindi, la stabilità genomica determinando l'insorgenza neoplastica (5). I geni di suscettibilità alla malattia vengono stratificati in tre categorie in base al rischio di predisposizione genetica conferito ai portatori di varianti patogene in tali sequenze. Pertanto, si parla principalmente di geni ad elevata penetranza che determinano un rischio di insorgenza neoplastica che va dal 40 all'85%, e tra questi ritroviamo i geni *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *PTEN*, e di geni a moderata penetranza che conferiscono moderato rischio neoplastico (20-40%) includono *PALB2*, *ATM* e *CHEK2* (9).

Il test genetico per le mutazioni di *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *PTEN* viene, ad oggi, effettuato per pazienti ad alto rischio e per i familiari con età >18 anni. È importante sottolineare che, da gennaio 2017 l'Associazione Italiana di Oncologia Medica-AIOM include nel percorso di *Counseling* Oncogenetico anche le pazienti con TNBC di età inferiore ai 36 anni estendendo al probando e ai loro familiari il test genetico per l'eventuale identificazione di varianti di sequenza nei geni di suscettibilità alla neoplasia mammaria (2). I geni a elevata, media e bassa penetranza riescono a dare una spiegazione di soltanto il 49% di tutti i casi familiari di tumore al seno, evidenziando come esista una componente genica per la quale è ancora sconosciuta la correlazione con la malattia neoplastica mammaria. Attualmente, l'analisi molecolare si concentra inizialmente sui geni *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* e *TP53*, ma grazie alle nuove tecnologie di *Next Generation Sequencing* è possibile sottoporre le pazienti ad indagini di profili molecolari più dettagliate. Lo studio di questi profili molecolari è utile per una migliore comprensione dei rischi gene-specifici di sviluppo di un TNBC e, di conseguenza, servirà a stratificare i pazienti in classi di rischio differenti e a poter identificare nuovi targets per lo sviluppo di terapie mirate e personalizzate. Inoltre, l'interesse è anche quello di identificare nuovi markers predittivi per identificare pazienti con HRD che potrebbero beneficiare delle terapie mirate con i *PARPi* come avvalorato

dai risultati dello studio OlympiAD (10). Questo trial randomizzato mostra come pazienti con tumore al seno HER2 negativo e una variante di sequenza germinale in *BRCA1/2* siano più responsivi al trattamento con *PARPi*. Questi risultati ed altri studi a favore, hanno portato nel gennaio 2018, l'FDA ad approvare l'Olaparib nel trattamento del tumore metastatico HER2 negativo in soggetti portatori di varianti patogene nei geni *BRCA1/2* (11). *Trials* clinici in corso stanno cercando di dimostrare l'efficacia dei *PARP inhibitors* in pazienti *BRCAness* (12). I *PARPi* sono farmaci che basano il loro meccanismo d'azione sulla letalità sintetica, ovvero l'effetto letale determinato dalla combinazione di due alterazioni genetiche che non sono letali quando si verificano singolarmente. *Farmer et al.* hanno dimostrato che la condizione HRD, in cellule in cui era stata bloccata l'attività di PARP, causava l'instabilità cromosomica, un arresto del ciclo cellulare e la cellula andava incontro all'apoptosi (13). La letalità sintetica dei *PARPi* nei tumori umani si ritiene che dipenda dalla mancata azione del *Base Excision Repair* (BER), ossia, da un'assenza di riparazione dei *single-strand break* (SSB), dal collasso delle forche di replicazione e da una degenerazione dei SSB in DBS che avrebbero bisogno del sistema HR per essere riparati. Le cellule tumorali *BRCA1/2* mutate si presentano come HRD, pertanto l'utilizzo di *PARPi* si rivela fatale per la cellula stessa. Essendo compromesso il sistema HR, la cellula diventa sensibile agli agenti genotossici come il platino che si rivela un ottimo farmaco in queste circostanze. Il 40% dei tumori al seno, sia ereditari che sporadici, presenta HRD e in tali neoplasie ha senso il razionale di somministrazione dei *PARPi*, inibendo il BER. Inoltre, il 3-5% delle pazienti con TNBC potrebbe presentare nel tessuto tumorale PVs nei geni *BRCA1/2*. Pertanto, il test somatico condotto su tali geni consentirebbe di rilevare PVs che non vengono identificate dal test genetico su campioni di sangue periferico dando una probabile chance terapeutica a tali pazienti. L'ostacolo che ancora rimane un argomento molto discusso è il fatto che, in seguito a un'iniziale sensibilità dei tumori *BRCA1/2* mutati ai derivati del platino e ai *PARPi*, si può instaurare un fenomeno di resistenza a causa di mutazioni di reversione che si sviluppano sotto pressione selettiva farmacologica (14).

L'obiettivo ultimo della medicina di precisione è quello di identificare specifiche alterazioni molecolari che siano predittive di risposta al trattamento con particolari farmaci a bersaglio molecolare (*target therapy*). Questo tipo di analisi può essere condotta grazie all'utilizzo dei pannelli multigenici in *Next Generation Sequencing* che consentono il sequenziamento massivo e parallelo di più geni e di più pazienti contemporaneamente con un approccio *multiplexing*, ampliando le conoscenze sui profili genici delle pazienti (15).

### **Main objectives**

Il presente progetto di ricerca mira a:

- Analizzare tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) lo stato mutazionale dei geni *BRCA1/2* in pazienti con TNBC, a partire da prelievi di sangue venoso periferico per l'identificazione di varianti in germinale e da campioni di tessuto mammario per l'analisi in somatico;
- Indagare il profilo molecolare di pazienti *BRCAness*, selezionate per la negatività al test genetico *BRCA1/2* e per la forte storia familiare, tramite pannello multigenico per l'identificazione di PVs in altri geni di suscettibilità;
- Valutare la distribuzione delle varianti patogene e delle VUS dei geni *BRCA1/2* rilevate nella coorte in esame;
- Valutare i profili molecolari anche di pazienti con TNBC e scarsa storia familiare per l'identificazione di nuovi markers di HRD al fine di sviluppare nuove terapie paziente-specifiche.

### **Materials e methods**

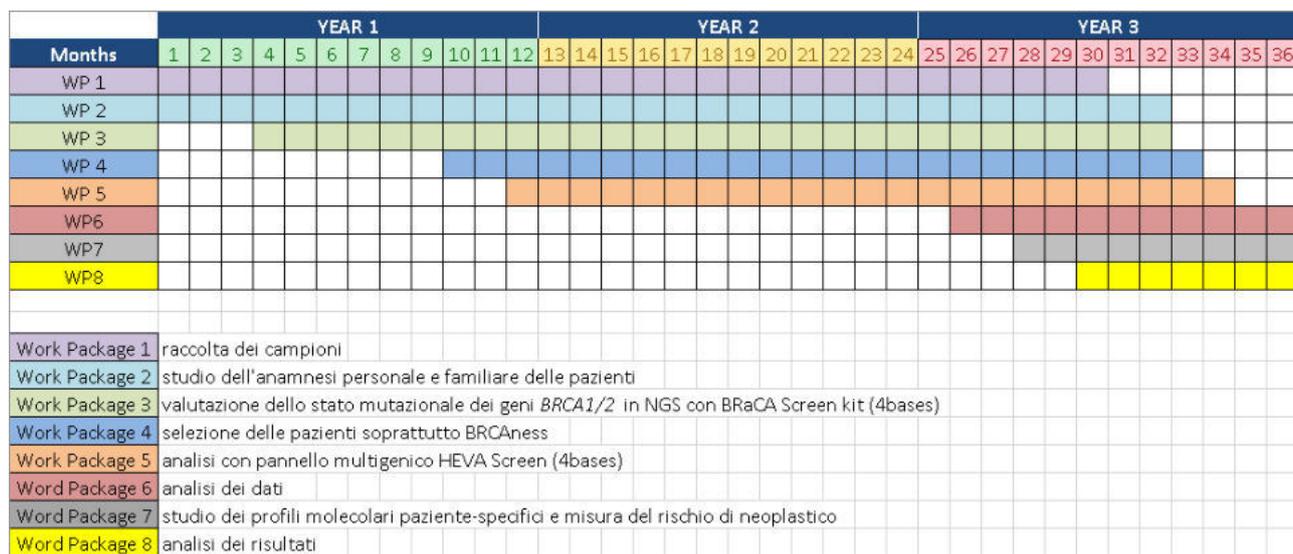
Lo studio prevede il reclutamento di pazienti TNBC e di pazienti sani come controllo. Agli stessi verrà fornito un consenso informato riportante le informazioni relative alle generalità, lo stile di vita, la storia naturale di malattia e con lo stesso modulo autorizzeranno le analisi a scopo di ricerca sul campione fornito.

A ciascun paziente verrà prelevato un campione di sangue periferico venoso attraverso una siringa vacutainer contenente EDTA e saranno raccolti campioni di tessuto neoplastico FFPE bioptico. Le sezioni di tessuto paraffinato saranno disponibili sotto forma di biopsie esplorative o di tessuto neoplastico asportato con l'intervento chirurgico.

Partendo da un prelievo di sangue periferico si procederà con l'estrazione del DNA attraverso l'uso del kit commerciale *QIAamp® DNA Mini Kit (250)* (Qiagen). L'estrazione verrà eseguita seguendo il protocollo riportato nel manuale del kit. Per l'estrazione di DNA da tessuto verrà utilizzato il kit *QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen) e si procederà come da protocollo. Il DNA ricavato dai campioni sarà sottoposto a quantizzazione attraverso il fluorimetro Qubit®. La piattaforma di *Next Generation Sequencing* utilizzata si baserà sulla tecnologia Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Si procederà con l'opportuna diluizione dei campioni a 4ng/µl e con la preparazione della libreria di ampliconi per mezzo del kit *4bases BRaCA Screen* (CE-IVD) che analizza i geni *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, validato per l'analisi somatica (SNPs e indel) e germinale (SNPs, indel e CNV) di DNA ottenuto da cellule neoplastiche di tessuto (fresco, congelato o FFPE) o derivanti da campione di sangue periferico. In seguito, verrà condotta l'analisi con il pannello multigenico *4bases HEVA Screen* (CE-IVD) che indaga 22 geni, ovvero *ATM*, *APC*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*. Questo pannello è clinicamente validato per l'identificazione delle varianti ereditarie associate al rischio di tumore della mammella, dell'ovaio e delle poliposi coloretali. Le varianti di sequenza identificate all'analisi bioinformatica verranno valutate per mezzo di database disponibili online e costantemente aggiornati come ClinVar e le eventuali VUS identificate verranno sottoposte ad analisi in silico tramite database online come *HCI Breast Cancer Genes Priors Probabilities*.

Con un'ampia casistica in esame sarà possibile chiarire il ruolo delle varianti di significato ancora sconosciuto, individuare eventuali nuove varianti patologiche (PVs) nei geni indagati e comprendere meglio quali siano i profili molecolari delle pazienti *triple-negative*. Si potranno così individuare nuovi markers di HRD finalizzati allo sviluppo di terapie *targeted* paziente-specifiche.

## Gantt Charts



## **References**

1. *I numeri del cancro. AIRTUM, Associazione Italiana Registri Tumori.* 2017.
2. *AIOM, Linee Guida.* 2018.
3. *Breast cancer development and progression: Risk Factors, cancer stem cell, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis.* **Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., Zeng Z., Zhang L., Ji X., Liu W., Huang B., Luo W., Liu B., Lei W., Du S., Vuppalati A., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C., Ren G.** 2018, *Genes & Diseases*, Vol. 5, p. 77-106.
4. *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2.* **Hoang L., Gilks B.** 2018, *Advances In Anatomic Pathology*, Vol. 25 (2), p. 85-95.
5. *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous diseases.* **Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E. and Gianni L.** 2016, *Nature Reviews Clinical Oncology*, Vol. 13 (11), p. 674-690.
6. *Genetic alterations in sporadic triple negative breast cancer.* **Pop L.-A., Cojocneanu-Petric R.-M., Pileczki V., Morar-Bolba G., Irimie A., Lazar V., Lombardo C., Paradiso A., Berindan-Neagoe I.** 2018, *The Breast*, Vol. 38, p. 30-38.
7. *Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing.* **Shimelis H., LaDuca H., Hu C., Hart S.N., Na J., Thomas A., Akinhanmi M et al.** 2018, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 110 (8), p. 855-862.
8. *Homologous recombination deficiency in triple negative breast cancer.* **Belli C., Duso B.A., Ferraro E., Curigliano G.** 2019, *The Breast*, Vol. 45, p. 15-21.
9. *Familial Breast Cancer.* **D.G., Laloo F. and Evans.** 2012, *Clinical Genetics*, Vol. 82, p. 105-114.
10. *OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer.* **Robson M.E., Tung N., Conte P., Im S.-A., Senkus E., Xu B., Masuda N., Delaloge S., Li W.** 2019, *Annals of Oncology*, Vol. 30, p. 558-566.
11. *Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer.* **S., McCann K.E. and Hurvitz.** 2018, *Drugs in context*, Vol. 7, p. 212540.
12. *The Talazoparib Beyond BRCA (TBB) trial: A phase II clinical trial of talazoparib (BMN 673) in BRCA1 and BRCA2 wild-type patients with advanced triple-negative breast cancer (TNBC) and homologous recombination deficiency (HRD) as assessed by myriad genetics HRD assay and advanced HER-2 negative breast cancer (BC) with either a germline or somatic mutation in homologous recombination (HR) pathway genes* **Afghani A., Chang P.-J., Ford J.M., Telli M.L.,** 2016, *Cancer Research*, Vol. 76 (4), p. OT2-05 Abstract OT2-05-04.
13. *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* **Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B. et al.** 2005, *Nature*, Vol. 434 (7035), p. 917-21.
14. *The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality.* **Papadimitriou M., Mountzios G., Papadimitriou C.A.** 2018, *Cancer Treatment Reviews*, Vol. 67, p. 34-44.
15. *Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing.* **Shimelis H., LaDuca H., Hu C., Hart S.N., Na J., Thomas A., Akinhanmi M., Moore R.M., Brauch H., Cox A., Eccles D.M., Ewart-Toland A., Fasching P.A., Fostira F., Garber J., Godwin A.K., Konstantopoulou I., Nevanlinna H., Sharma P., Yannoukakos D. et al.** 2018, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 110 (8), p. djy106.