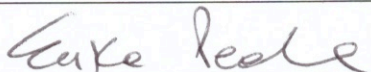


PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

Cognome/Surname	Pedone
Nome / Name	Erika
Titolo del progetto / Project title	Determinazione del profilo di Homologous Recombination Deficiency (HRD) mediante Next-Generation Sequencing (NGS) in pazienti affette da cancro ovarico
Corso di dottorato / PhD	Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Firma del candidato / Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

Il carcinoma ovarico (OC) è la seconda causa più comune di morte per cancro ginecologico nelle donne di tutto il mondo e la quarta causa di morte per neoplasia nel sesso femminile. L'OC rappresenta un gruppo eterogeneo di neoplasie con differenti caratteristiche morfologiche e biologiche. Sotto il profilo genetico presenta varianti patogene (VP) germinali o somatiche nei geni oncosoppressori *BRCA1* e *BRCA2*.

Infatti, sebbene nel 90% dei casi si presenti come una patologia sporadica, una piccola percentuale è associata alla presenza di VP in *BRCA1* e *BRCA2*.

Come conseguenza di ciò, si ha una perdita di funzionalità dei prodotti proteici oncosoppressori dei geni *BRCA1/2* e un mal funzionamento del sistema di ricombinazione omologa (HR), un meccanismo di riparazione del DNA. La ridotta funzionalità di questo meccanismo definisce la cosiddetta Homologous Recombination Deficiency (HRD). La HRD può essere causata anche da alterazioni molecolari che insorgono a carico di altri geni correlati ad altri meccanismi di riparo del DNA e a meccanismi che influenzano la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule neoplastiche.

Le VP dei geni *BRCA1/2*, siano esse di natura germinale o somatica, rappresentano un biomarcatore predittivo di maggiore sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima Poli (ADP-ribosio)Polimerasi (PARP), che interviene nella riparazione del DNA danneggiato a singolo filamento.

L'identificazione di una VP consente quindi di pianificare, nelle pazienti affette, un percorso terapeutico adeguato e di intraprendere un percorso di consulenza ontogenetica nei familiari al fine di identificare i portatori ad alto rischio.

2 - Descrizione del progetto / Project

Background

L'OC è la seconda causa più comune di morte per cancro ginecologico nelle donne di tutto il mondo e la settima causa di morte per tumore.

L'80-90% dei tumori ovarici insorge in donne di età compresa fra 20 e 65 anni e circa il 70% delle neoplasie viene diagnosticata in fase avanzata. (1-2)

Le neoplasie epiteliali rappresentano il 90% di tutti i casi. Derivano dall'epitelio di superficie ovarico e sono classificate secondo il **tipo cellulare e sulla base dell'istologia, dell'immunoistochimica e delle caratteristiche molecolari** come sieroso, mucinoso, endometrioido, a cellule chiare, transizionale, e sottoclassificate in base agli **aspetti architettonici**, alle **caratteristiche nucleari** e dalla presenza o assenza di **invasione stromale** come borderline, alto medio e basso grado di malignità. (3)

Le neoplasie epiteliali sono ulteriormente raggruppate, in base a fattori clinicopatologici, come **tipo I** (tumori grandi, unilaterali, di basso grado) o **tipo II** (tumori aggressivi, in fase avanzata, di alto grado) con il principale fattore molecolare distintivo che è stato contrassegnato come instabilità genetica nel tipo II rispetto al tipo I. (4)
Le condizioni genetiche associate all'insorgenza di questi tumori sono la sindrome familiare del carcinoma mammario ed ovarico (HBOC), la sindrome specifica del carcinoma ovarico familiare (SSOCS) e la sindrome ereditaria del carcinoma colico non polipoide (HNPCC)(5).

Sin dalla scoperta del ruolo chiave nella sindrome HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome), i geni *BRCA1* e *BRCA2* (Breast Cancer genes) vengono indagati in probandi (caso indice) appartenenti a nuclei familiari in cui si sospetta la presenza di una ereditarietà di VP nei due principali geni di suscettibilità alla malattia.

Infatti, benché l'OC si presenti in circa il 90% dei casi come una patologia sporadica, una piccola percentuale è stata associata alla presenza di VP di natura ereditaria nei geni oncosoppressori *BRCA1/2* di classe 5/4 rispettivamente secondo la classificazione proposta dal gruppo ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles) e dalle raccomandazioni IARC. (6)

La componente genetica riveste un ruolo fondamentale nell'insorgenza del fenotipo della malattia, infatti, soggetti carriers di varianti in tali geni mostrano un più elevato rischio di sviluppare un OC, che è diverso a seconda del gene implicato, e un rischio aumentato di sviluppare anche altre neoplasie.

Tale rischio è diverso a seconda che si tratti di varianti nel gene *BRCA1* o *BRCA2*, infatti, le donne portatrici di varianti in *BRCA1* hanno un rischio di sviluppare la neoplasia ovarica entro i 70 anni pari al 39%, mentre una portatrice di una variante nel gene *BRCA2* pari all'11-17%, rispetto all'1,4% di un soggetto appartenente alla popolazione generale. (7)

Queste alterazioni possono presentarsi anche solo come varianti somatiche a livello tissutale o come alterazioni epigenetiche, come ad esempio la metilazione del promotore di *BRCA1*.

La conseguenza delle VP nei geni *BRCA1/2* determina una perdita di funzionalità dei loro prodotti proteici oncosoppressori con conseguente mal funzionamento del sistema di ricombinazione omologa (HR), una forma di riparazione del DNA che utilizza una sequenza di DNA omologa per guidare la riparazione dei danni al DNA a doppio filamento (DSB, double-strand break). L'HR è generalmente un meccanismo "conservativo", in quanto ripristina la sequenza di DNA originale nel sito di danno al DNA (14). Quando le cellule diventano carenti di HR, indipendentemente dal fatto che siano causate da difetti in *BRCA1*, *BRCA2* o altri componenti del percorso, predominano le forme non conservative di riparazione del DNA, come l'NHEJ (Non-Homologous End Joining). (8)

La ridotta funzionalità del meccanismo HR definisce la cosiddetta Homologous Recombination Deficiency (HRD). (9)

Fino al 50% dei pazienti con OC con istotipo sieroso ad alto grado (HSG) può presentare una condizione di HRD attraverso meccanismi che includono mutazioni *BRCA* germinali, mutazioni *BRCA* somatiche e metilazione del promotore *BRCA*.

Alterazioni in questi geni possono, infatti, influenzare negativamente l'equilibrio cellulare e, di conseguenza, la

stabilità genomica determinando l'insorgenza di una patologia neoplastica.

I geni di suscettibilità alla malattia vengono classificati, sulla base del rischio di predisposizione genetica, come geni a elevata penetranza (*BRCA1/2*, *TP53* e *PTEN*) che determinano un rischio di insorgenza neoplastica dal 40 all'85% e geni a moderata penetranza (*PALB2*, *ATM* e *CHEK2*) che conferiscono un rischio di circa il 20-40%. (10)

Pertanto, l'esecuzione del test genetico *BRCA* su pazienti che rientrano nei criteri di eleggibilità, in accordo alle linee guida nazionali, assume un significato preventivo per i familiari del soggetto identificato come caso indice.

Inoltre è stato dimostrato che le VP dei geni *BRCA*, siano esse di natura germinale o somatica, rappresentano un biomarcatore predittivo di maggiore sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima Poli (ADP-ribosio)Polimerasi (PARP), che interviene nella riparazione del DNA danneggiato a singolo filamento, nelle pazienti affette da carcinoma dell'ovaio in fase avanzata.

L'efficacia dei PARPi come opzione terapeutica nel carcinoma dell'ovaio si realizza attraverso un meccanismo di "letalità sintetica" in presenza di una concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparazione del DNA a doppio filamento mediante HR, nei quali le proteine *BRCA1/2* svolgono un ruolo essenziale. (11)

La perdita di funzione delle proteine *BRCA1/2* quale effetto di alterazioni costituzionali o somatiche dei geni corrispondenti rappresenta la condizione più frequente, anche se non esclusiva, di disfunzione dei meccanismi di HR.

L'HRD può essere causata anche da alterazioni molecolari che insorgono a carico di altri geni. 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, ad altri sistemi di riparo del DNA e a meccanismi che influenzano la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule neoplastiche (*ATM*, *APC*, *BARD1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*).

Alterazioni in questi geni possono, infatti, influenzare negativamente l'equilibrio cellulare e, di conseguenza, la stabilità genomica determinando l'insorgenza di una patologia neoplastica.

Sulla base di queste evidenze le linee guida europee e statunitensi raccomandano a tutte le donne con carcinoma epiteliale ovarico epiteliale non mucinoso e non borderline, con carcinoma delle tube di Falloppio e con carcinoma peritoneale primitivo, consulenza genetica e test genetici anche in assenza di una storia familiare al momento della diagnosi. La determinazione dello stato *BRCA1/2* può essere un biomarcatore prognostico clinico rilevante legato alla sopravvivenza e anche un fattore predittivo, influenzando la risposta o la resistenza alla chemioterapia e al PARPi nel OC sporadico.

Recenti studi di popolazione hanno dimostrato che le pazienti con OC hanno una prevalenza di varianti patogene costituzionali di *BRCA* > 10%, indipendentemente dall'età alla diagnosi e dalla presenza di anamnesi familiare di carcinoma mammario/ovarico. Circa il 25% delle portatrici di varianti patogenetiche *BRCA*, infatti, ha una diagnosi di OC ad un'età superiore ai 60 anni. La prevalenza di VP sale al 17-20% nelle pazienti con OC sieroso e al 23-25% se di alto grado. (12)

In base ai dati ad oggi disponibili, è atteso che i 2/3 delle varianti patogenetiche *BRCA* identificabili in pazienti affette da OC siano di tipo costituzionale (presenti in ogni cellula dell'organismo), ereditate dalla madre o dal padre o comparse per effetto di mutazioni *de novo* (meno dell'1% dei casi) e trasmissibili ai figli (50% di probabilità per ogni figlio/a). In 1/3 dei casi le varianti patogenetiche sono invece esclusivamente somatiche e, pertanto, confinate al tessuto tumorale. (12)

Obiettivi

Lo scopo di questo progetto è quello di:

- analizzare tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) le varianti di sequenza a carico dei geni *BRCA1/2* in pazienti con OC su prelievo di sangue venoso periferico per l'identificazione di VP presenti nella linea germinale e su campioni di tessuto ovarico per l'analisi di VP somatiche;
- implementare, mediante l'utilizzo della piattaforma NGS, l'analisi complementare degli altri geni, oltre *BRCA1/2*, coinvolti nell'HRD o in altri *pathways* correlati alla crescita, sopravvivenza e proliferazione delle cellule neoplastiche, come *ATM, APC, BARD1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*.

Materiali e Metodi

Lo studio verrà effettuato su pazienti di età >18 anni con carcinoma ovarico non mucinoso o borderline afferenti al Centro di Riferimento Regionale Siciliano per la Prevenzione, la Diagnosi e il trattamento dei Tumori Eredo-Familiari dell'Adulto (Direttore Prof. Antonio Russo) della Sezione di Oncologia Medica dell'AOUP "Paolo Giaccone" di Palermo.

Per ogni paziente verrà effettuata una analisi su campione di sangue venoso periferico in provette vacutainer con EDTA e su campioni di tessuto neoplastico FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) con una percentuale $\geq 20\%$ di cellule neoplastiche, al fine di garantire una migliore esecuzione del test.

Il test *BRCA* eseguito su tessuto tumorale ("test somatico") è in grado di evidenziare sia le varianti acquisite per mutazione somatica sia quelle costituzionali. Pertanto, in caso di risultato positivo, l'alterazione va ricercata su sangue periferico per verificare se si tratta di una variante germinale.

È preferibile effettuare in prima istanza la ricerca delle mutazioni di *BRCA1/2* su tessuto tumorale, in quanto il test *BRCA* su sangue periferico è in grado di evidenziare soltanto le varianti costituzionali/ereditarie. La natura della variante identificata (costituzionale o somatica) sarà contestualmente stabilita analizzando un tessuto normale (sangue, altro tessuto). (11)

Quindi, si procederà estraendo il DNA dal campione di sangue e dal tessuto biotico attraverso l'uso di kit commerciali, rispettivamente il QIAmp® DNA Mini Kit (250) (Qiagen) e il Kit QIAmp® Tissue Kit (Qiagen) secondo protocollo.

Il DNA estratto viene successivamente quantificato mediante sistema spettrometrico Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) o fluorimetrico Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies).

Le successive analisi prevedono l'utilizzo della piattaforma NGS con la tecnologia Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific).

L'NGS basata sul sistema di sequenziamento "high-throughput", è in grado di rivelare aberrazioni genomiche sfruttando la sua capacità di sequenziamento massiccio e parallelo per analizzare più geni contemporaneamente in un singolo test. Inoltre, questa tecnologia è recentemente diventata più economica, portando a grandi studi collaborativi su interi genomi che sono stati in grado di documentare geni bersaglio e biomarcatori predittivi nel cancro.

L'analisi con pannello multigenico indaga i 21 geni implicati (*BRCA1, BRCA2, ATM, APC, BARD1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*).

Attualmente, il test *BRCA* su sangue periferico eseguito tramite NGS viene seguito da sequenziamento Sanger per la validazione delle varianti che verranno successivamente classificate sulla base dei criteri sviluppati dal

gruppo ENIGMA in cinque categorie: benigne, probabilmente benigne, incerte, probabilmente patogenetiche e patogenetiche.

Grazie alle innovative tecnologie disponibili e all'ampia casistica di pazienti da sottoporre all'analisi del profilo multigenico del paziente è possibile individuare nuovi possibili markers di HRD finalizzati a un approccio terapeutico sempre più personalizzato.

3 - Bibliografia / References

- 1- Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014 Oct 11;384(9951):1376-88.
- 2- Linee guida Tumori dell'ovaio AIOM Edizione 2019.
- 3- Prat, J., E. D'Angelo, and I. Espinosa, Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. *Hum Pathol*, 2018.
- 4- Kurman RJ, Shih Ie M. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *Am J Pathol* 2016;186:733–747.
- 5- The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer. Susan J. Ramus 1 and Simon A. Gayther. *Mol Oncol*. 2009.
- 6- Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: moving beyond BRCA1 and BRCA2. Hoang L., Gilks B. 2018, *Advances in Anatomic Pathology*, Vol. 25 (2) p.85-89.
- 7- Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:284-296.
- 8-PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy, Christopher J. Lord and Alan Ashworth.
- 9- Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. Renata Rodrigues da Cunha Colombo Bonadio, *Clinics (Sao Paulo)*. 2018
- 10- Familial breast cancer. D.G., Lallo F. and Evans. 2012, *Clinical Genetics*, Vol. 82, p. 105;114.
- 11- Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia, 2019.
- 12- Pinto C, Bella MA, Capoluongo E, et al. Recommendations for the implementation of BRCA testing in the care and treatment pathways of ovarian cancer patients. *Future Oncol* 2016; 12:2071-5)