



XIX Congresso Nazionale A.G.E.O.
**PREDITTIVITÀ E DIAGNOSI PRECOCE
IN OSTETRICIA E GINECOLOGIA**

APPLICAZIONI DELLA GENOMICA PER LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI TUMORI DELLA SFERA GENITALE FEMMINILE

NAPOLI, 6 GIUGNO 2019

Roberta Tarallo

Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica
Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria «Scuola Medica Salernitana»
Università degli Studi di Salerno



TUMORI GINECOLOGICI

- ✓ 10-15% delle neoplasie femminili
 - ✓ Tumori dell'utero e dell'ovaio
- ✓ Non esiste test di screening per CO
- ✓ 80-90% tumori ovarici in donne tra i 20 e i 65 anni
 - ✓ 15-20% tumori maligni
 - ✓ 60% epiteliale



CARCINOMA OVARICO: INCIDENZA

5.200 nuovi casi stimati nel 2018 in Italia¹

3.186 decessi nel 2015¹

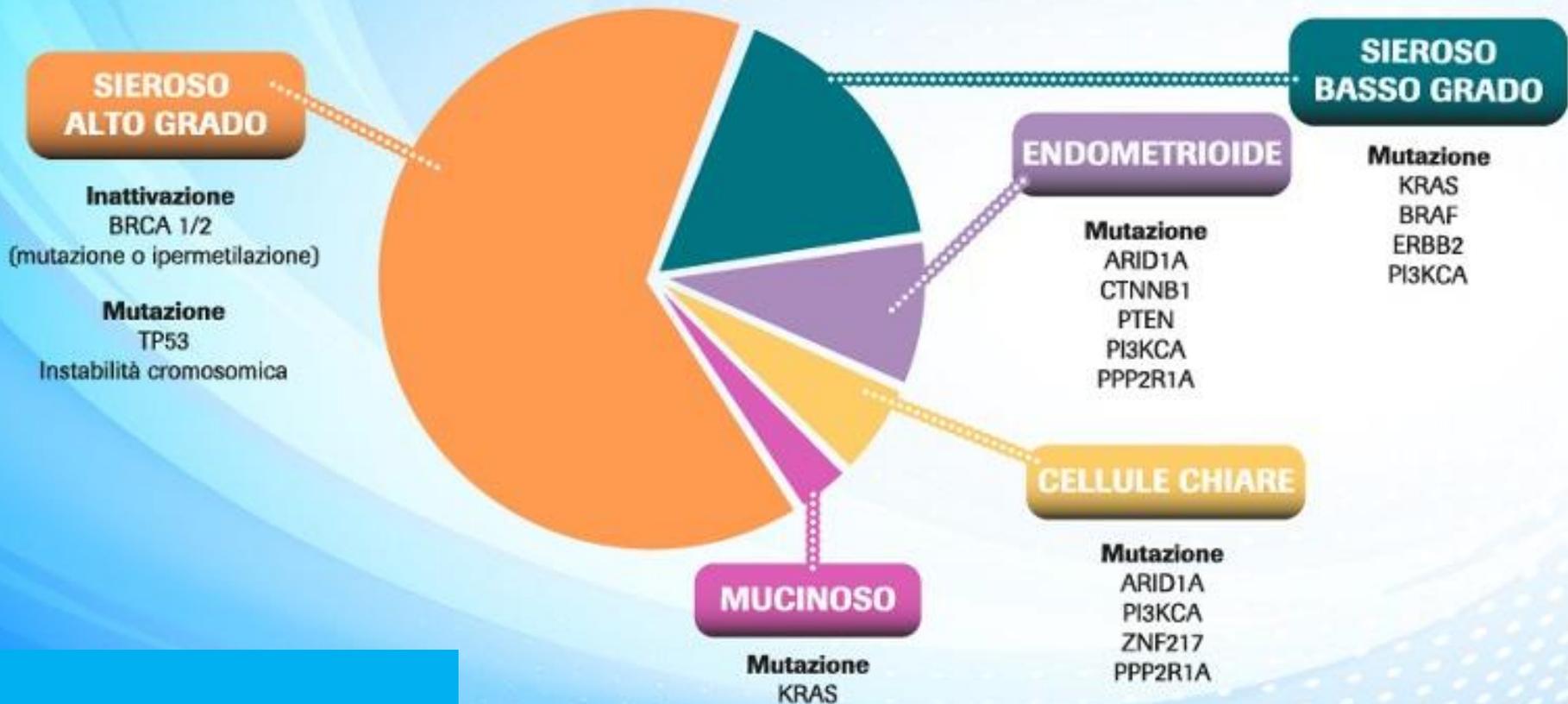
80 % III e IV stadio 20 % I e II stadio



SOTTOTIPI ISTOLOGICI DEL CARCINOMA OVARICO EPITELIALE



SOTTOTIPI ISTOLOGICI DEL CARCINOMA OVARICO EPITELIALE



Il CO epiteliale è associato a deficit di ricombinazione omologa (HRD)



FATTORI DI RISCHIO

familiarità

Nelle famiglie con 2 o più parenti di primo grado (madre, sorella, zia) colpite da questo tumore il rischio può addirittura superare il 50 %

**Donne con familiarità
o anamnesi personale
positiva per una di
queste neoplasie:
mammella
utero
colon-retto**

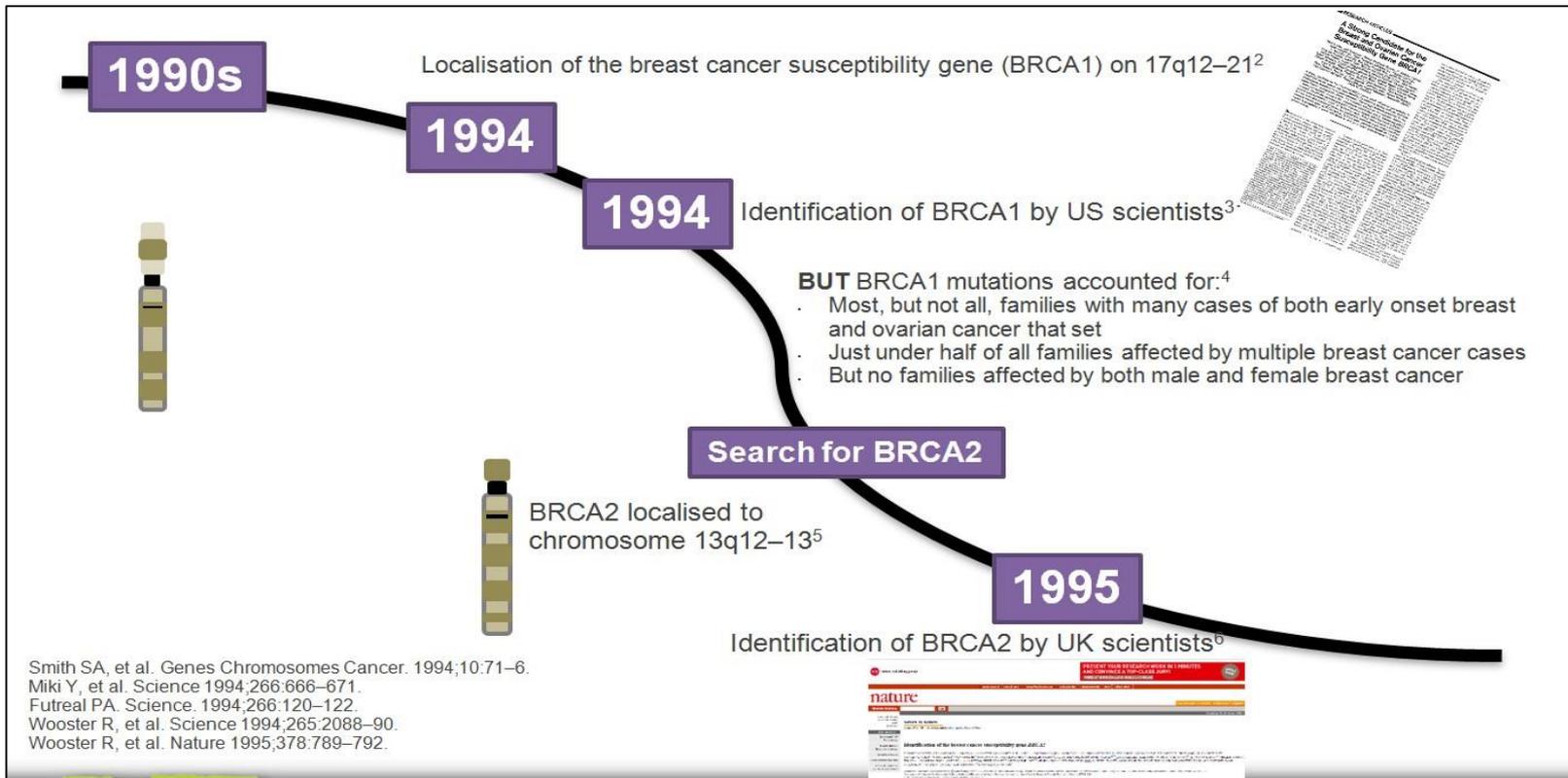


**Consulenza
genetica**



CARCINOMA OVARICO: GENI DI SUSCETTIBILITÀ

- ✓ L'esistenza di forme di predisposizione ereditaria ai tumori della mammella e dell'ovaio è stata **documentata per la prima volta circa 25 anni fa con l'identificazione dei geni BRCA1 e BRCA2** (collettivamente indicati come BRCA).
- ✓ Donne portatrici di **una copia non funzionante** di uno di questi geni hanno **un alto rischio** di sviluppare tali tumori nel corso della loro vita, anche in età molto precoce.



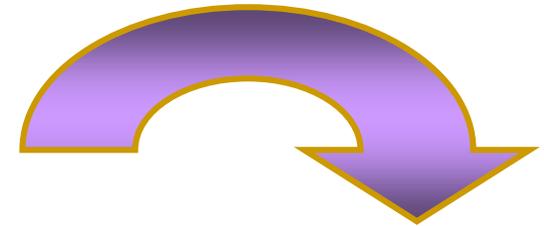
FATTORI GENETICI (5-10%)

Predisposizione autosomica dominante



Mutazioni dei geni

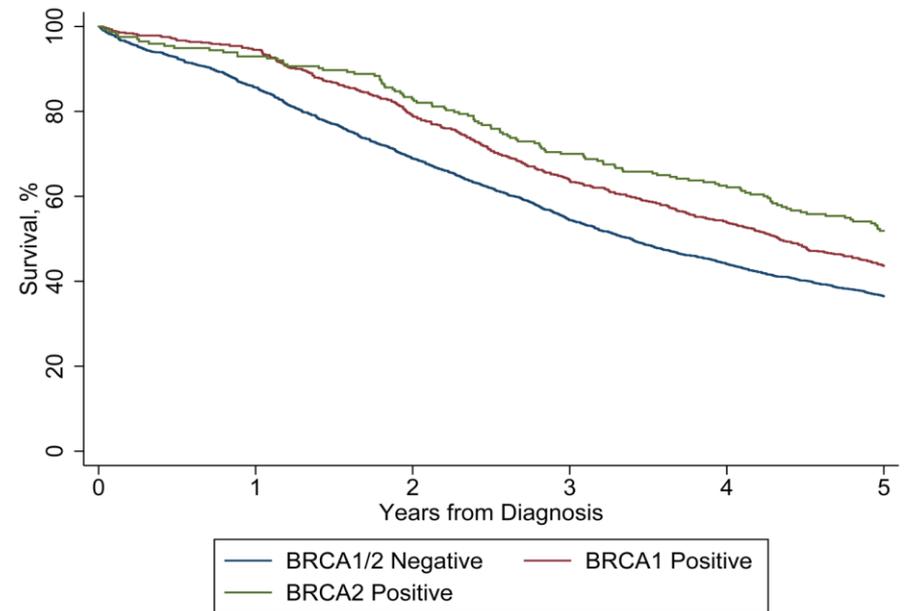
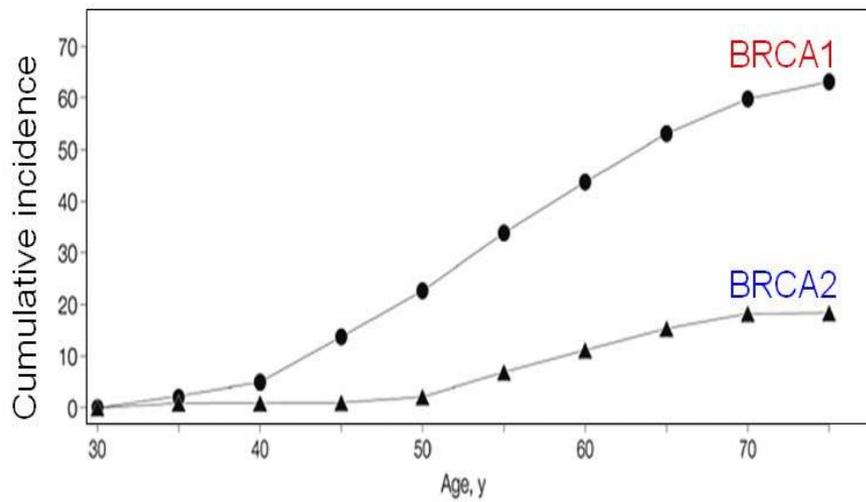
BRCA₁ e BRCA₂



**Rischio da 3 a 5 volte >
di sviluppare tumore
dell'ovaio e della
mammella !!**



RISK OF OVARIAN CANCER IN BRCA 1/2 CARRIERS



Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group, JAMA

Bolton *et al.*, JAMA 2012



BRCA1 E BRCA2: FUNZIONI

- BRCA1 : Cromosoma 17q21
- BRCA2 : Cromosoma 13q12-13

- Geni onco-soppressori
- Responsabili dei meccanismi di riparazione del DNA
- Regolazione ciclo cellulare
- Regolazione espressione genica

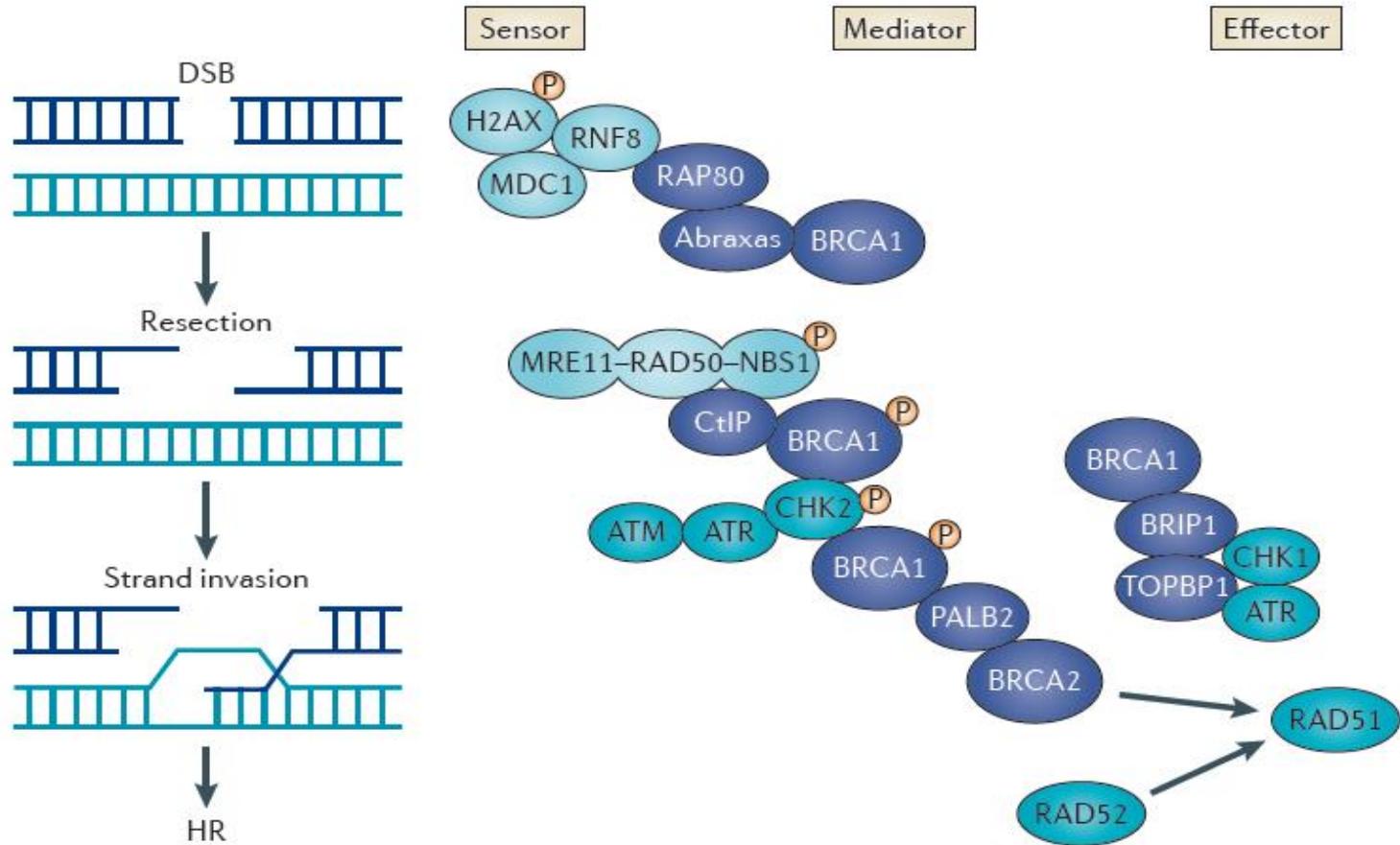
INATTIVAZIONE di una delle due copie determina un INCREMENTO consistente del rischio di sviluppare tumori nel corso della vita

BRCA1

BRCA2



BRCA1 E BRCA2: FUNZIONI



HOMOLOGOUS RECOMBINATION



IL DNA REPAIR COME TARGET FARMACOLOGICO

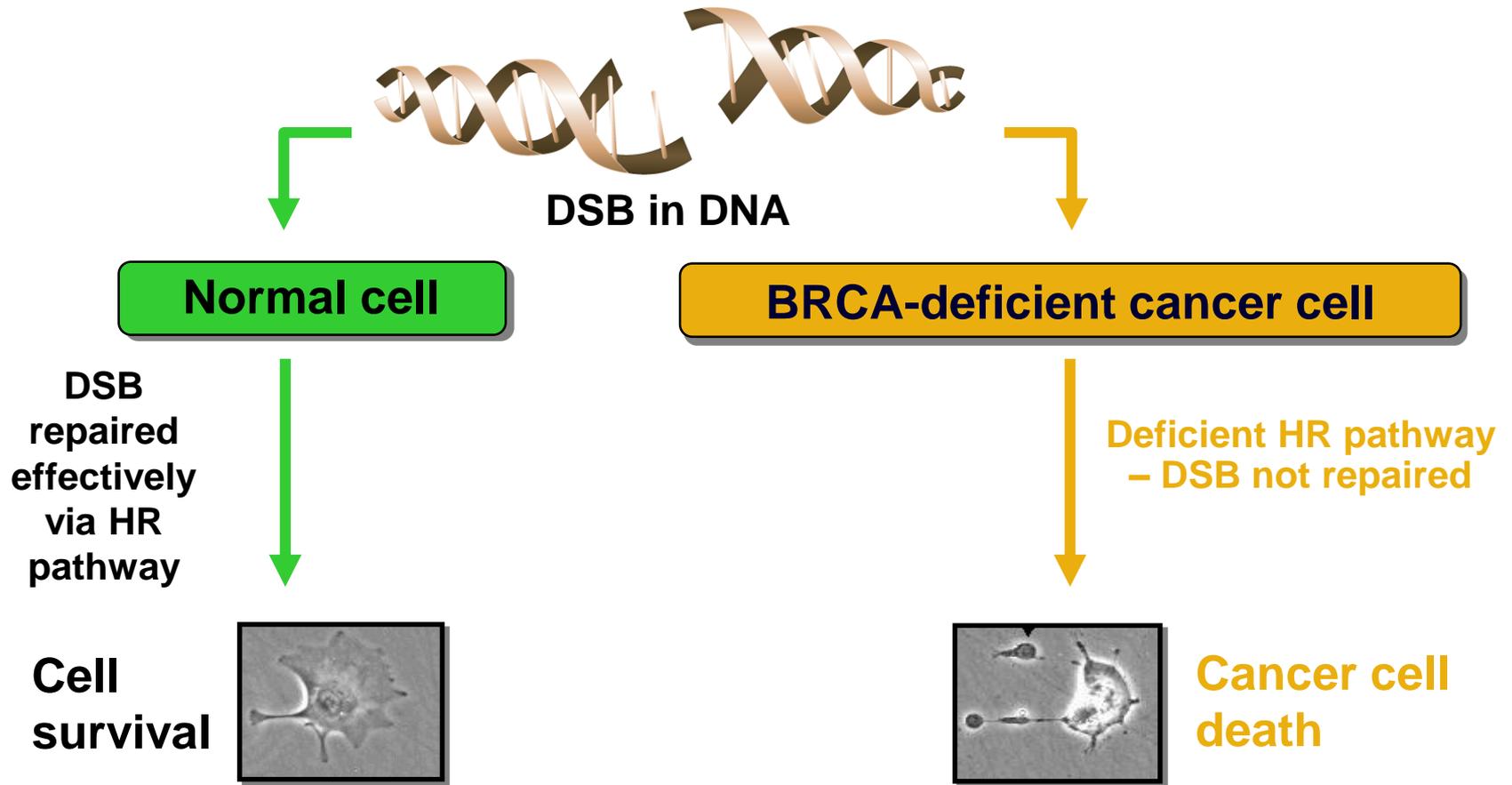
Perché il DNA Repair è un buon bersaglio?

- Il danno al DNA è un evento frequente in tutte le cellule
- Il difetto di riparazione del DNA aumenta il rischio di tumore (es. BRCA mut.) ma anche la sensibilità agli agenti farmacologici che agiscono sul DNA (es. chemioterapia)
- Le cellule normali possiedono molti meccanismi di riparazione, ma alcuni di questi sono perduti nelle cellule neoplastiche
- L'inibizione del DNA repair nelle cellule tumorali che non sono in grado di riparare il danno porta ad una morte cellulare selettiva e ad una maggiore efficacia terapeutica

Nuovo approccio terapeutico con farmaci a bersaglio molecolare



EFFETTO SELETTIVO DELL'INIBIZIONE DI PARP-1 IN CELLULE TUMORALI CON MUTAZIONI DI BRCA1 O BRCA2



TEST GENETICO: QUALE UTILITÀ?

Per la paziente → **TEST DIAGNOSTICO**



- diagnosi di ereditarietà
- stima del rischio
- modificazione del trattamento

TEST PREDITTIVO di risposta al trattamento

Per i famigliari → **TEST PREDITTIVO**



- identificazione dei portatori
- inclusione dei portatori nei percorsi di prevenzione **alti rischi**



LA MUTAZIONE DI BRCA NON È LIMITATA ALLE PAZIENTI PIÙ GIOVANI, CON ANAMNESI FAMILIARE E ISTOTIPO DI ALTO GRADO

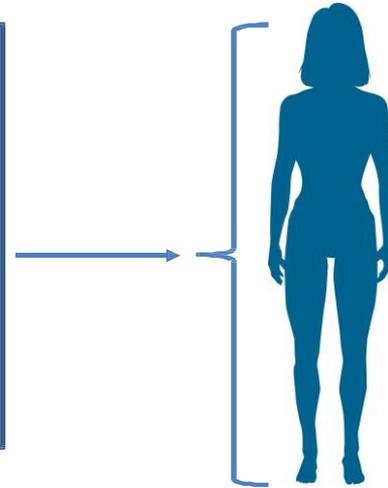
- 25% delle portatrici di mutazioni BRCA ha un'età > 60 anni
- 35%-40% of BRCA non ha storia familiare
- Il tipo istologico non è un criterio sufficiente per il test BRCA



LA MUTAZIONE BRCA PUÒ ESSERE GERMINALE O SOMATICA

•**Germline (hereditary) mutations** exist in the patient's germ cells and thus can be passed on to future generations

- ✓ A patient who inherits a germline mutation will have that mutation in all the cells of their body (since the mutation was present at conception)



10-40% of carriers have no family history of BC/OC



•**Somatic (acquired) mutations** can spontaneously arise in any cell in the body (except germ cells) at any time during the patient's life

- ✓ This type of mutation only affects those cells which are reproduced from the original mutated cell – it is not present in other cells in the patient's body



TEST SOMATICO VS GERMLINE

Germline mutations can be detected in all cells of the body.

They are commonly identified by testing blood or saliva.

Somatic mutations can be detected only in the tumor cells.

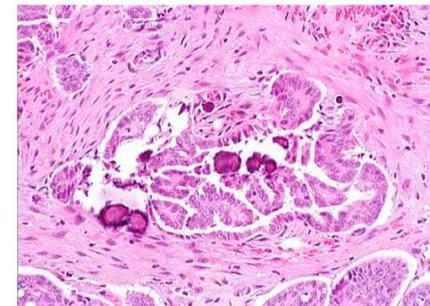
They are only identified by testing the tumor tissue. They are not identifiable through testing the blood.

■ Germline ■ Somatic

TESTING BLOOD
or SALIVA will detect **only germline** mutations



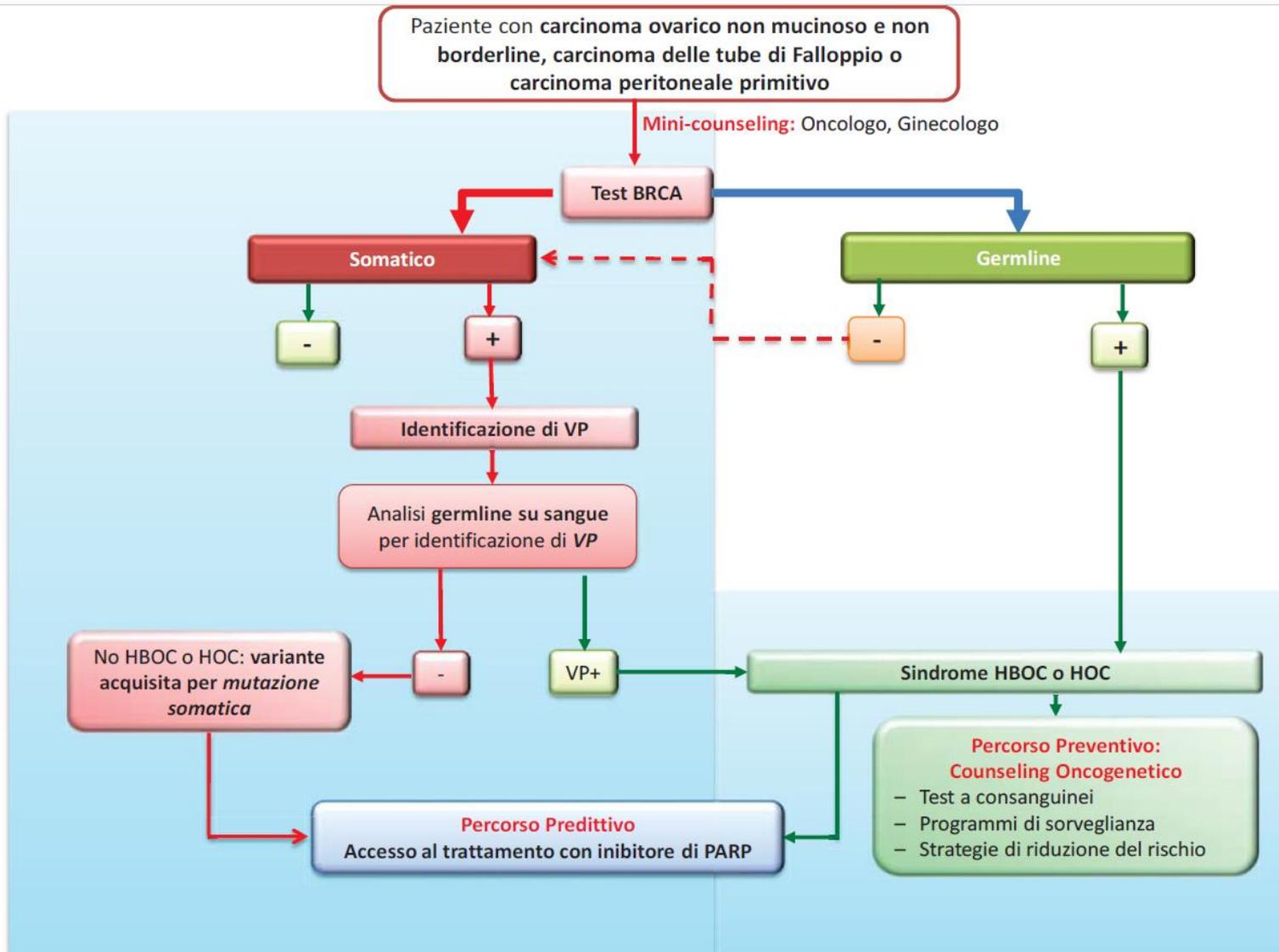
TESTING TUMOR TISSUE
will detect **both germline and somatic** mutations



Patients identified with
BRCA1/BRCA2 mutations



RACCOMANDAZIONI PER L'IMPLEMENTAZIONE DEL TEST BRCA



BRCA1 E BRCA2: MUTAZIONI



<http://research.nhgri.nih.gov/bic>

BRCA1 > 1560 mutazioni/polimorfismi

BRCA2 > 1880 mutazioni/polimorfismi

Oltre 3500 mutazioni

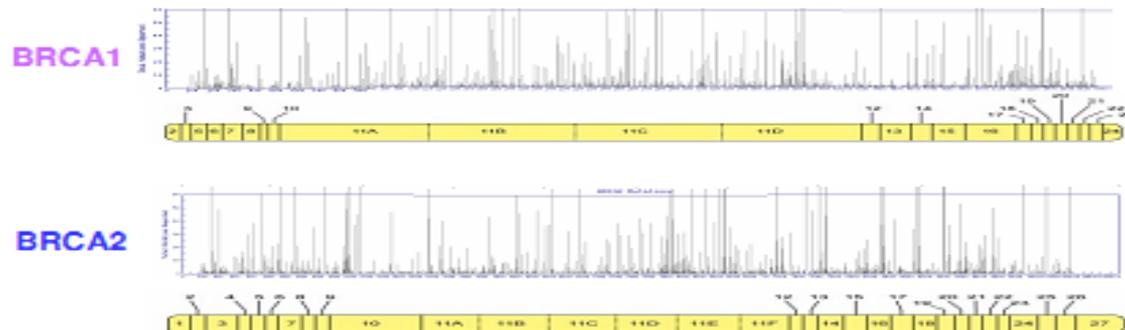
Non esistono “hot spot” di mutazione

Spettro estremamente eterogeneo

85% causano «**loss of function**» (frameshift, nonsense varianti di splicing)

10% riarrangiamenti genomici

7.5 % **VUS** (variant of uncertain significance)



BRCA1 E BRCA2: METODICHE DI ANALISI

Requisiti

- ✓ Copertura regioni codificanti e giunzioni esone/introne
- ✓ Rilevazione SNVs, InDels (>90%)
- ✓ Rilevazione ampi riarrangiamenti (<10%)

Tecniche

- ✓ Sequenziamento Sanger
- ✓ Sequenziamento di nuova generazione (NGS)
- ✓ MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)



TEST BRCA: WORKFLOW



Library Prep



Sequencing



Data Analysis



Gene panel: BRCA1/2

NGS Sequencing

Sequence alignment and
variant calling

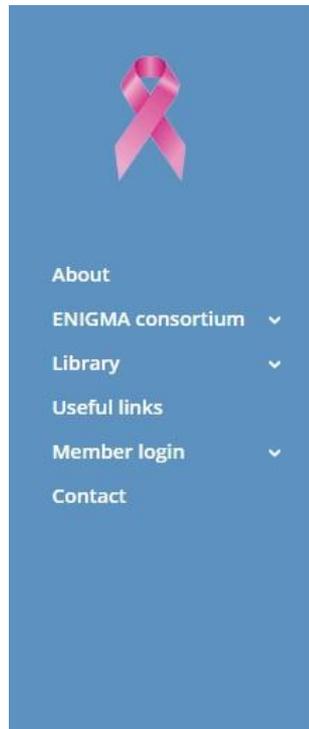


Sanger for SNPs
and In/Del

MLPA for CNVs



TEST BRCA: COME INTERPRETARE IL RISULTATO



Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles

AGATGC**VARIANT**TGAGTTTGT**CLASSIFICATION**GT
GTGAACAGACACTGAAATATTTTCTAGGAATTGCGGGA
GGAA**ENIGMA**TTGGGGAATTC
ATG**ENIGMA**TTGGGGAATTC
ATT**ENIGMA**TTGGGGAATTC
TGCAGAAGAATCTGAACATAAAAACAACAATTACGAAC
CBREASTCANCERAACCTAT**GENES**TTAAACTCCAC

ENIGMA is an international consortium of investigators focused on

- determining the clinical significance of sequence variants in BRCA1, BRCA2 and other known or suspected breast cancer genes;
- to provide this expert opinion to global database and classification initiatives, and
- to explore optimal avenues of communication of such information at the provider and patient level.

Criteria specifici per l'interpretazione del significato clinico delle varianti costituzionali dei geni BRCA sono stati recentemente sviluppati dall'Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) (<http://enigmaconsortium.org>)



TEST POSITIVO: CLASSIFICAZIONE IARC

Classe	Probabilità di essere causativa	Test predittivo di familiari a rischio	Sorveglianza familiari a rischio
5: Patogenetica	>0.99	Sì	Misure preventive per alto rischio
4: Probabilmente patogenetica	0.95-0.99	Sì	Misure preventive per alto rischio
3: Di incerto significato clinico (VUS)	0.05-0.949	No	Storia familiare e altri fattori di rischio
2: Probabilmente benigna	0.001-0.049	No	Bassa probabilità di correlazione all'insorgenza di tumore
1: Benigna	<0.001	No	Bassa probabilità di correlazione all'insorgenza di tumore



TEST BRCA: COME INTERPRETARE IL RISULTATO

- “UV” di significato ignoto (**non informativo**)



Circa il **10-20%** dei test genetici BRCA portano all'identificazione di varianti di significato incerto

Sostituzioni di **singoli amminoacidi, piccole delezioni o inserzioni** in-frame con un effetto sulla proteina non prevedibile

non identifica un rischio ma implica ulteriori ricerche ed una attenta valutazione clinica



TEST BRCA: COME INTERPRETARE IL RISULTATO

- **NEGATIVO** = nessuna mutazione patogenica identificata (non conclusivo)

Nella sindrome eredo-familiare sono implicati geni diversi (forse anche non ancora identificati !)

VERO NEGATIVO = Soggetti con mutazione nota in famiglia: il rischio di sviluppare una neoplasia è quello della popolazione generale, a parità di altri fattori di rischio

Received: 29 December 2017 | Accepted: 4 February 2018
DOI: 10.1002/jcla.22418

BRIEF REPORT

WILEY

Identification of a novel truncating mutation in PALB2 gene by a multigene sequencing panel for mutational screening of breast cancer risk-associated and related genes

Anna Guacci¹ | Angela Cordella¹ | Teresa Rocco¹ | Giorgio Giurato^{1,2} | Giovanni Nassa^{2,3} | Francesca Rizzo^{2,3} | Chiara Carlomagno⁴ | Stefano Pepe⁵ | Roberta Tarallo^{2,3} | Alessandro Weisz^{2,3} 

¹Genomix4Life srl, Department of Medicine, Surgery and Dentistry 'Scuola Medica Salernitana', University of Salerno, Baronissi, Italy

²Laboratory of Molecular Medicine and Genomics, Department of Medicine, Surgery and Dentistry, 'Scuola Medica Salernitana', University of Salerno, Baronissi, Italy

³Medical Genomics Program, 'SS. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona' Hospital, University of Salerno, Salerno, Italy

⁴Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Napoli 'Federico II', Napoli, Italy

⁵Division of Oncology, 'SS. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona' Hospital, University of Salerno, Salerno, Italy

Correspondence
Alessandro Weisz and Roberta Tarallo, Laboratory of Molecular Medicine and Genomics, Department of Medicine, Surgery and Dentistry 'Scuola Medica Salernitana', University of Salerno, Baronissi, Italy.
Emails: aweisz@unisa.it and rtarallo@unisa.it

Funding information
Italian Ministry of Education University and Research, Grant/Award Number: PON03PE_00146_1; Flagship Project InterOmics; Italian Association for Cancer Research, Grant/Award Number: IG-17426; Genomix4Life Srl

Background: Breast cancer (BC) is the most common neoplasm in women, with 5%–10% patients showing a familial predisposition, where germline mutations in BRCA1/BRCA2 genes are found in ~20% of cases. Next-generation sequencing (NGS) is among the best available options for genetic screening, providing several benefits that include enhanced sensitivity and unbiased mutation detection. PALB2 (partner and localizer of BRCA2) is a cancer predisposing gene recently described that encodes a protein partner of BRCA2 involved in DNA double-strand break repair and cell cycle control. The DNA damage response represents a key cellular event, targeted by innovative anticancer therapies, including those based on poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors targeting PARP1 and PARP2 enzymes, activated by DNA damage and involved in single-strand break and base excision repair.

Methods: Genomic DNA was isolated from 34 patient samples and four BC cell lines, as controls, and 27 breast cancer predisposing genes belonging to the BRCA1/BRCA2 and PARP pathways were sequenced by NGS.

Results: The panel described here allowed identification of several sequence variations in most investigated genes, among which we found a novel truncating mutation in PALB2.

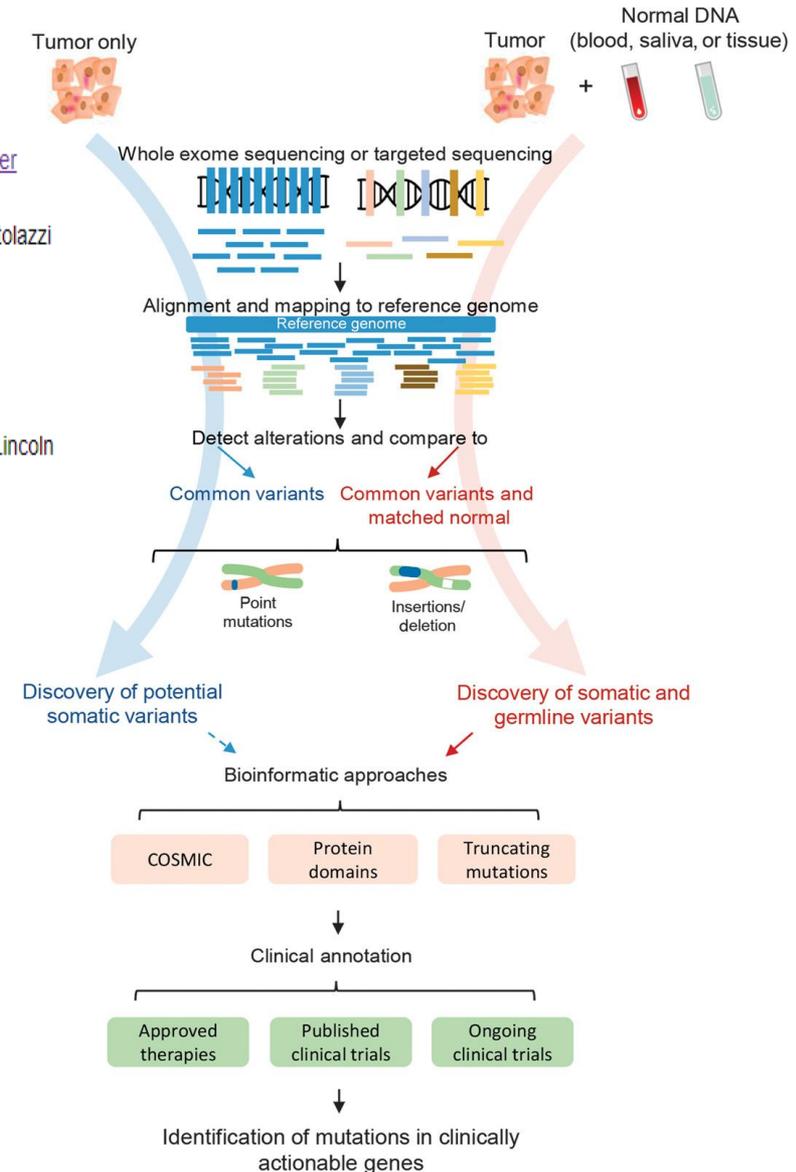
Conclusions: The NGS-based strategy designed here for molecular analysis of a customized panel of BC predisposing and related genes was found to perform effectively, providing a comprehensive exploration of all genomic sequences of the investigated genes. It is thus useful for BC molecular diagnosis, in particular for familial cases where alterations in routinely investigated genes, such as BRCA1, result to be absent.

KEYWORDS

Breast cancer, cancer gene panel, next-generation sequencing, pathogenic variants



OTTIMIZZAZIONE DELL'IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI RILEVANTI PER IL RISCHIO



[Optimizing the identification of risk-relevant mutations by multigene panel testing in selected hereditary breast/ovarian cancer families.](#)

Coppa A, Nicolussi A, D'Inzeo S, Capalbo C, Belardinilli F, Colicchia V, Petroni M, Zani M, Ferraro S, Rinaldi C, Buffone A, Bartolazzi A, Screpanti I, Ottini L, Giannini G.
Cancer Med. 2018 Jan;7(1):46-55. doi: 10.1002/cam4.1251. Epub 2017 Dec 22.

[Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment.](#)

Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, Horick N, Yang S, Shannon KM, Tung N, Ford JM, Lincoln SE, Ellisen LW.
JAMA Oncol. 2015 Oct;1(7):943-51. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2690.

- ✓ Utilità clinica dibattuta
- ✓ Impatto sulla gestione delle pazienti
- ✓ Implicazioni terapeutiche importanti
- ✓ Estensione del trattamento alle pazienti con profilo «BRCAness»



XIX Congresso Nazionale A.G.E.O.
**PREDITTIVITÀ E DIAGNOSI PRECOCE
IN OSTETRICIA E GINECOLOGIA**



Roberta Tarallo

Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria «Scuola Medica Salernitana»
Università degli Studi di Salerno

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!