

**Progetto di Ricerca:**

**AREA 06 - Scienze Mediche**

**SETTORE CONCORSUALE:** 06/D3 - Malattie del sangue, oncologia e reumatologia

**Settore scientifico-disciplinare:** MED/06 - Oncologia medica

**Tematica:** Analisi genomica in una coorte di pazienti con forte familiarità per carcinoma mammario mediante metodiche di sequenziamento high throughput (Genomic analysis in a cohort of patients with a strong family history of breast cancer using high throughput sequencing methods)

**Attività da svolgere:**

Identificazione e caratterizzazione di alterazioni molecolari su cellule primarie isolate da tessuto neoplastico mammario o dal sangue di pazienti affetti da neoplasie mammarie (Detection and characterization of molecular alterations in primary cells derived from primary neoplastic breast tissue or from the peripheral blood of patients diagnosed with breast cancer).

**Titolo della ricerca:** “Analisi genomica in una coorte di pazienti con forte familiarità per carcinoma mammario mediante metodiche di sequenziamento high throughput”

**Relazione attività di ricerca:**

### Introduzione

Il carcinoma mammario (BC) è la neoplasia più frequentemente diagnosticata nelle donne e rappresenta il 29% di tutte le diagnosi di tumore [1]. Secondo le linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) l'andamento dell'incidenza del tumore alla mammella è in leggero aumento (+0.3% per anno) mentre continua a scendere in modo significativo la mortalità (-0,8% per anno), riduzione in parte ascrivibile alle numerose campagne di screening attuate, che permettono una diagnosi precoce della patologia e dunque un intervento terapeutico tempestivo e più efficace.

Diversi marcatori surrogati sono attualmente impiegati per classificare i carcinomi mammari in diversi sottotipi molecolari. Questi sono l'iper-espressione dei recettori per gli estrogeni (ER) e il progesterone (PgR), l'amplificazione del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2), l'indice di proliferazione Ki-67 e il grado di differenziazione tumorale (G) [2]. Dalla combinazione di questi marcatori, i tumori della mammella possono essere distinti nelle seguenti categorie:

1. Luminali A: neoplasie con marcata espressione dei recettori ormonali e livelli di ki67 < del 20%;
2. Luminali B: (HER2 negativi o HER2 amplificati): marcata espressione dei recettori ormonali e livelli di ki67 > del 20%;
3. HER2 positivi: iper-espressione del recettore per il fattore di crescita epidermico HER2 e negatività per i recettori ormonali;
4. Triplo negativo o Basal like: neoplasie che non esprimono né i recettori ormonali né HER2 [2,3].

Tale suddivisione si è dimostrata particolarmente importante dal punto di vista prognostico, essendo i tumori Luminali A a prognosi migliore rispetto ai Luminali B. Inoltre, fra tutti i sottogruppi, i carcinomi positivi per HER-2 e i basal-like sono sicuramente quelli a prognosi più infausta [4,5].

Sebbene l'85-90% dei tumori alla mammella sia di natura sporadica, circa il 5-15% sono di natura eredo-familiare e quindi collegate ad una predisposizione genetica [6,7]. Nel 40% dei casi le cause sono mutazioni germinali nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Altri fattori ereditari sono rappresentati dalle mutazioni a carico di altri geni come *ATM*, *CHK2*, *PALB2*, *p53*, *PTEN*, *CDH1*, *BARD1*, *RAD51C* e *RAD51D*, come dimostrato da due ampi studi epidemiologici che hanno coinvolto più di 180.000 donne [8-9]. Tali geni sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella riparazione al danno del DNA, nei processi di apoptosi e di arresto del ciclo cellulare.

Le donne portatrici di mutazioni a carico dei geni *BRCA1* e *BRCA2* hanno un rischio di sviluppare un tumore mammario del 40-80% e un tumore ovarico del 30-40%, in particolare le donne portatrici di mutazioni a carico di *BRCA1* hanno un rischio del 72% di sviluppare un tumore mammario nel corso della vita, mentre quelle con mutazioni su *BRCA2* hanno un rischio del 69% [10].

Oltre a conferire un aumentato rischio di sviluppare un tumore mammario, la presenza di alterazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* è predittiva di risposta a trattamenti specifici, inclusi sali di platino e agenti mirati come gli inibitori della poli-adenosil-ribosio-polimerasi (PARPi) [11,12].

Sarebbe pertanto auspicabile che in tutte le donne non portatrici di mutazioni a carico di *BRCA1/2*, ma con anamnesi familiare/personale suggestiva per neoplasie a carattere eredo-familiari, si proceda all'esecuzione di un test esteso, che comprenda i suddetti geni.

Negli ultimi anni, l'implementazione del sequenziamento di nuova generazione (NGS) nella pratica clinica ha dato accesso a un numero crescente di pazienti con carcinoma mammario alle analisi molecolari per le sindromi predisponenti al cancro, tra cui i test per la valutazione dei geni *BRCA1* e *BRCA2* [13].

Allo stesso tempo, la definizione di criteri precisi, dopo un'adeguata consulenza genetica, ha permesso di identificare meglio gli individui che necessitano dell'analisi molecolare dei geni suddetti [14].

L'esito dell'analisi genetica potrà essere:

1. informativo, nel caso in cui venga trovata una variante patogenetica, riconducibile al quadro fenotipico;
2. non informativo, se non si identifica la variante patogenetica in soggetti che presentano la neoplasia, ma non si può escluderne la presenza;
3. non conclusivo: se vengono ritrovate varianti di sequenza a significato incerto (VUS).

Nel caso in cui vengano riscontrate mutazioni a carico dei geni *BRCA1/2*, esse possono essere suddivise, sulla base del loro potenziale patogenetico, in 5 classi di rischio, in accordo con la classificazione proposta dal gruppo ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles):

- Classe 1: non patogenetica. Probabilità di rischio patogenetico <0,001%;
- Classe 2: probabilmente non patogenetica. Probabilità di rischio patogenetico 0,01%- 0,49%;
- Classe 3: di significato incerto (VUS). Probabilità di rischio patogenetico 0,5% -94.9%;
- Classe 4: probabilmente patogenetica. Probabilità di rischio 95-99%;
- Classe 5: patogenetica. Probabilità di rischio patogenetico del 99%.

Il significato clinico delle eventuali varianti di sequenza individuate va interpretato sulla base dei dati disponibili in letteratura e tramite consultazione di appositi database riconosciuti dalla comunità scientifica. La presenza di VUS può verificarsi per varianti non precedentemente riportate in letteratura o già note ma con significato clinico ancora incerto. In tal caso l'interpretazione della variante prevede anche la verifica del grado di conservazione dell'aminoacido, dell'evoluzione e della frequenza della variazione nella popolazione di controllo.

Qualora venga riscontrata una variante patogenetica, questa non dà la certezza di sviluppare una neoplasia nel corso della vita, ma ne aumenta la probabilità rispetto alla popolazione generale. Il rischio può variare in base alla penetranza, ovvero alla frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente. I geni di suscettibilità collegati alla patologia possono essere a bassa, media ed alta penetranza:

- *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1*, *PTCH* e *MMR* sono geni ad alta penetranza. *PALB2* conferisce invece un rischio medio/alto;
- *BARD1*, *CHEK2*, *ATM*, *FANCM*, *NBN*, *MRE11A*, *FANCD*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1* e *XRCC2* sono geni a media penetranza;
- *ESR1*, *FGFR2*, *MAP3K1*, *RAD51L1*, *TNRC9*, *LSP1* e *CASP8* sono geni a bassa penetranza.

### Obiettivi della ricerca

L'obiettivo della ricerca è stato quello di analizzare il profilo mutazionale dei geni *BRCA1* e *BRCA2* in una popolazione di 553 donne affette da carcinoma mammario provenienti dalla Sicilia Orientale, utilizzando l'approccio di Next-Generation Sequencing (NGS).

Nello specifico si è voluto:

- 1] Investigare l'incidenza e la distribuzione delle varianti patogeniche (PV) e di significato incerto (VUS) a carico dei geni *BRCA1* e *BRCA2*;
- 2] Valutare la prevalenza dei sottotipi molecolari di carcinoma mammario in pazienti portatrici di mutazioni patogeniche nei geni *BRCA1* e *BRCA2*;
- 3] Analizzare il tipo e la localizzazione delle varianti patogenetiche in *BRCA1* e *BRCA2*;
- 4] Predire il significato clinico delle VUS mediante sistemi di predizione *in silico*.

## Stato della ricerca

Sono stati analizzati 553 campioni di sangue periferico di pazienti affetti da carcinoma mammario, al fine di valutare lo stato mutazionale dei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki prima di eseguire il test genetico. Ogni campione è stato analizzato mediante il sequenziamento di nuova generazione utilizzando la tecnologia Ion Torrent con il sequenziatore Gene Studio S5 Plus System.

Le caratteristiche istologiche e biologiche dei tumori mammari (ER, PgR, lo stato di HER2, Ki-67 e il grado di differenziazione tumorale) sono state definite sul prelievo biotico o il pezzo tumorale fissato in paraffina e incluso in formalina (FFPE). Inoltre le pazienti, prima di eseguire l'analisi genetica, sono state sottoposte a consulenza oncogenetica.

L'analisi eseguita su questa popolazione ha evidenziato che il 17,7% (98 su 553) dei pazienti mostravano un'alterazione nella sequenza genica di *BRCA1* e *BRCA2*. In particolare, 46 (8,3%) dei 553 pazienti aveva una variante patogenetica (PV), mentre in 52 (9,4%) dei soggetti è stata riscontrata una mutazione di significato incerto (VUS) nei geni *BRCA*. Nello specifico, il 50% delle 46 varianti patogenetiche sono state rilevate in *BRCA1* e l'altro 50% in *BRCA2*, mentre 10 (19,2%) delle 52 VUS sono state trovate in *BRCA1* e le restanti 42 (80,8%) in *BRCA2*.

È stata poi valutata la distribuzione delle varianti patogenetiche in *BRCA1* e *BRCA2*, in base ai sottotipi molecolari di carcinoma mammario. Dei 46 pazienti analizzati, 2 (4,3%) hanno mostrato un istotipo compatibile con i tumori Luminali A, 20 (43,4%) con i Luminali B, 3 (6,5%) con i carcinomi Luminali B-HER2+, 5 (11%) evidenziavano il recettore HER2+ e 16 (34,8%) hanno mostrato un tumore Triplo Negativo (TNBC). Nel sottogruppo con PV nel gene *BRCA1*, 5 (21,7%) erano Luminali B, 5 (21,7%) HER2+ e 13 (56,5%) erano TNBC. In questo sottogruppo non sono stati trovati tumori con istotipo Luminali A o Luminali B-HER2+. Nel sottogruppo *BRCA2* mutato, 2 (8,7%) erano Luminali A, 15 (65,2%) erano Luminali B, 3 (13%) Luminali B-HER2+, e 3 (13%) erano tumori TNBC. Nessun tumore HER2+ era presente in questo sottogruppo.

Successivamente, è stato valutato il tipo di variante patogenetica e la sua posizione nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Tra le varianti patogenetiche in *BRCA1* è stato osservato che 10 varianti erano a singolo nucleotide (SNVs), 9 delezioni, 3 duplicazioni e 1 inserzione.

Le varianti patogenetiche più frequenti riscontrate su *BRCA1* sono quattro e sono state rilevate in 2 pazienti. Di queste una è l'alterazione c.5035\_5039delCTAAT (delezione nell'esone 15), la seconda è la c.798\_799delTT (delezione nell'esone 11), la terza è la c.117\_118delTG (delezione nell'esone 3) e l'ultima è la c.65C>T (mutazione missenso). Inoltre, due delle varianti riportate si trovano in una regione consenso del sito di giunzione (c.4357+1G>T), (c.5278-1G>C).

Per quanto riguarda le varianti patogenetiche in *BRCA2*, abbiamo osservato 8 delezioni, 9 varianti a singolo nucleotide (SNV) e 7 duplicazioni. Le mutazioni maggiormente ricorrenti nella nostra popolazione sono state quattro: i. c.428dup riscontrate in 5 pazienti (duplicazione nell'esone 5); ii. c.8487+1G>A osservate in 4 soggetti (alterazione introne 19); iii. c.5851\_5854delAGTT trovate in 2 casi (delezione nell'esone 10); iv. c.9455\_9456delAG presenti in 2 pazienti (delezione nell'esone 24).

Le mutazioni patogenetiche di *BRCA1* e *BRCA2* sono state infine mappate attraverso il dominio funzionale e le regioni di legame alle proteine. Nel gene *BRCA1*, 10 delle varianti patogenetiche (PV) risultano essere localizzate nella regione "breast cancer cluster regions" (BCCR), mentre 4 mutazioni nella regione "ovarian cancer cluster regions" (OCCR). Tra le varianti patogenetiche in *BRCA2*, 6 delle varianti sono state localizzate nella regione BCCR, e 6 (26%) delle mutazioni nell'OCCR. Per la proteina *BRCA1*, abbiamo trovato 4 varianti posizionate nel dominio RING, 3 sia nel dominio COILED-COIL sia nel dominio BRCT. Per la proteina *BRCA2*, 4 varianti sono state mappate nei domini BRC repeats, mentre sono state rilevate 3 alterazioni introniche e 4 esoniche nei domini "oligonucleotide/oligosaccharide binding" (OB) e nel dominio "Tower".

### Sviluppo del Progetto di ricerca

In questa prima fase della ricerca, sono stati raggiunti i primi tre obiettivi. Infatti, la tecnologia NGS ha permesso di analizzare la distribuzione delle PV e delle VUS nonché la prevalenza dei sottotipi molecolari di carcinoma mammario in pazienti portatrici di mutazioni patogeniche nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. I nostri risultati sono paragonabili alle evidenze preesistenti e si sovrappongono a quelli precedentemente pubblicati sia in termini di prevalenza di mutazioni che di caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con carcinoma mammario.

Per completare il quarto obiettivo, sarà necessario utilizzare sistemi di predizione in silico al fine di predire il significato clinico delle VUS così che possano essere un utile strumento di sostegno nell'interpretazione finale del risultato dell'analisi familiare e nel sostegno della patogenicità di una variante.

### Giudizio complessivo del responsabile scientifico

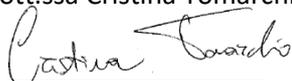
In qualità di responsabile scientifico del progetto di ricerca “Analisi genomica in una coorte di pazienti con forte familiarità per carcinoma mammario mediante metodiche di sequenziamento high throughput” portato avanti dalla Dottoressa Cristina Tomarchio, posso asserire che la Dottoressa Tomarchio ha egregiamente ed autonomamente portato avanti il suddetto progetto con il conseguimento degli obiettivi prefissati mostrando impegno, dedizione ed abilità tecniche ed analitiche. La Dottoressa Tomarchio ha mostrato, inoltre, capacità di impostare autonomamente la corretta progettazione ed esecuzione sperimentale degli esperimenti, e raggiungendo gli obiettivi assegnati ha ottenuto risultati di grande interesse nel campo della ricerca traslazionale per i pazienti affetti da carcinoma mammario eredo-familiare (BC). Ella così ha confermato e migliorato le sue capacità professionali nell’ambito della ricerca in campo oncologico e nell’analisi dei meccanismi di trasformazione tumorale svolta da diversi anni.

## Bibliografia

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-2223.
3. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1700-1712.
4. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207.
5. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):895-915.
6. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 2015;26(7):1291-1299.
7. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5741-5750.
8. Breast Cancer Association C, Dorling L, Carvalho S, et al. Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med.* 2021;384(5):428-439.
9. Hu C, Hart SN, Gnanolivu R, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2021;384(5):440-451.
10. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017;317(23):2402-2416.
11. Torrisi R, Zuradelli M, Agostinetti E, et al. Platinum salts in the treatment of BRCA-associated breast cancer: A true targeted chemotherapy? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;135:66-75.
12. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):235-244.
13. Pinto P, Paulo P, Santos C, et al. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;159(2):245-256.
14. Forbes C, Fayter D, de Kock S, Quek RG. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2019;11:2321-2337.

Catania, 03 Giugno 2024

Dott.ssa Cristina Tomarchio



Prof. Paolo Vigneri

