un evento promosso da

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA

ISTITUTO ROMAGNOLO PER LO STUDIO DEI TUMORI DINO AMADORI

SCHOOL OF NGS

Nuove frontiere del Next Generation Sequencing nella diagnostica oncologica ed ematologica

04 Novembre 2022

Centro Congressi FEDERICO II Napoli

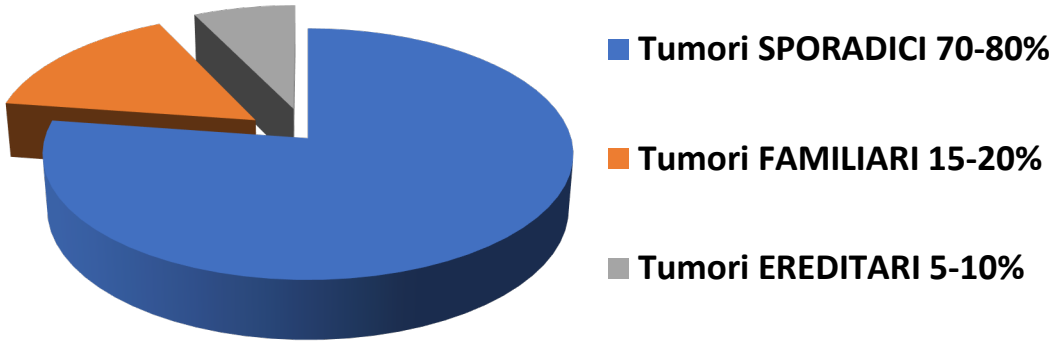
Valentina Zampiga

IRCCS - IRST Meldola (FC)

Evoluzione dei test genetici: BRCA e oltre

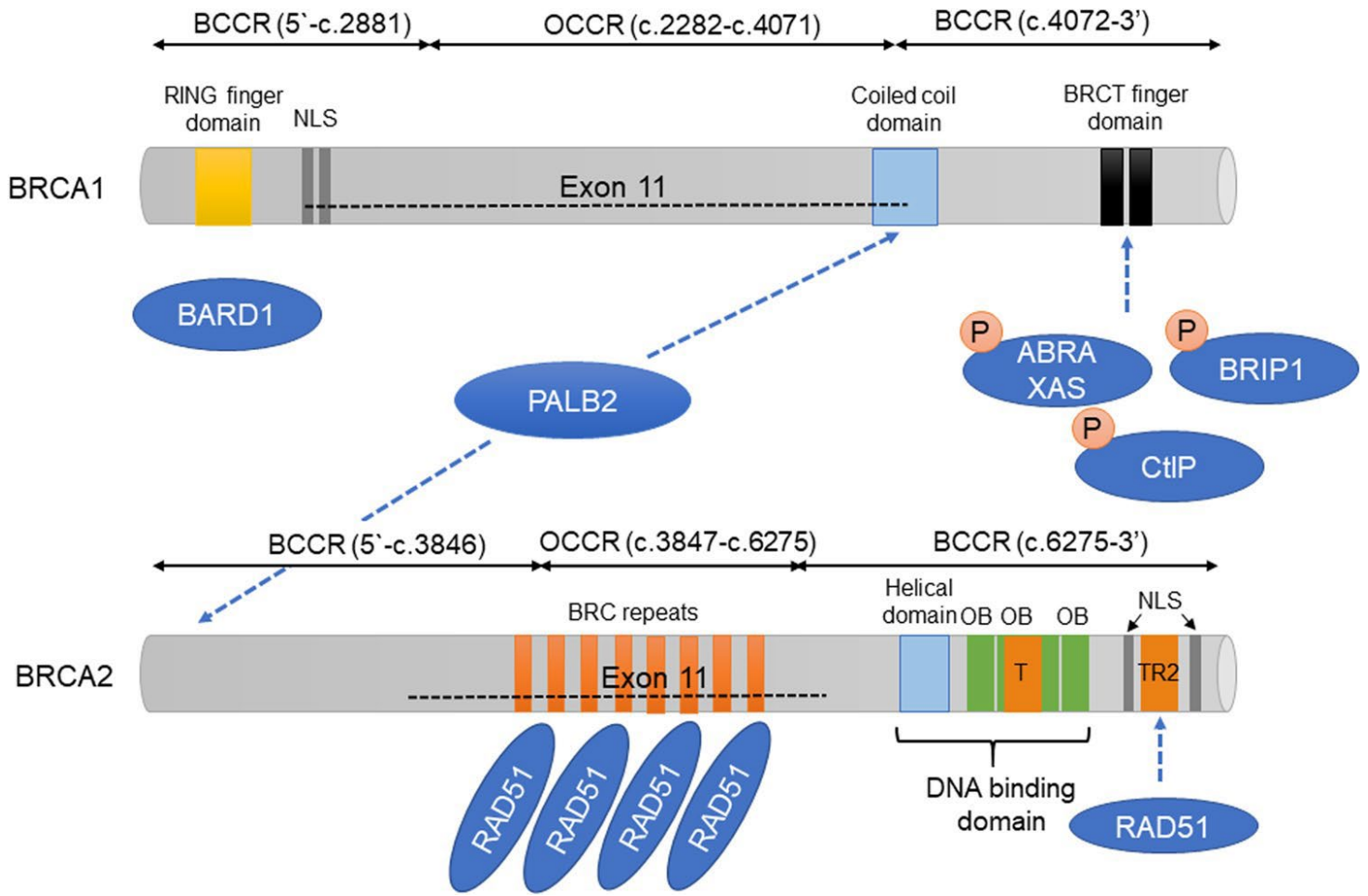
BRCA and HEREDITARY BREAST AND OVARIAN CANCER (HBOC)

- Breast cancer is the most common cancer in women: 2 million new cases in 2018 (WHO); 11.6% of all new cases of cancer in both men and women
- 5–10% of all breast cancer patients are genetically predisposed to cancer
- According to the National Cancer Institute, HBOC is defined as “An inherited disorder in which the risk of breast cancer (especially before the age of 50 years) and ovarian cancer is higher than normal”
- HBOC syndrome are caused by certain mutations in *BRCA1* or *BRCA2:*increased risk of developing other types of cancer, including melanoma, pancreatic and prostate cancers



- MUTAZIONI GENI CARRIER
- VERTICALITA’ E TRASM. AUTOSOMICA DOMINANTE
- INSORGENZA PRECOCE

BRCA1 e BRCA2 (1/2)



BRCA proteins are involed in HR

BRCA1:

- 1994
- 17q21
- 24 exons
- 1863 aa

BRCA2:

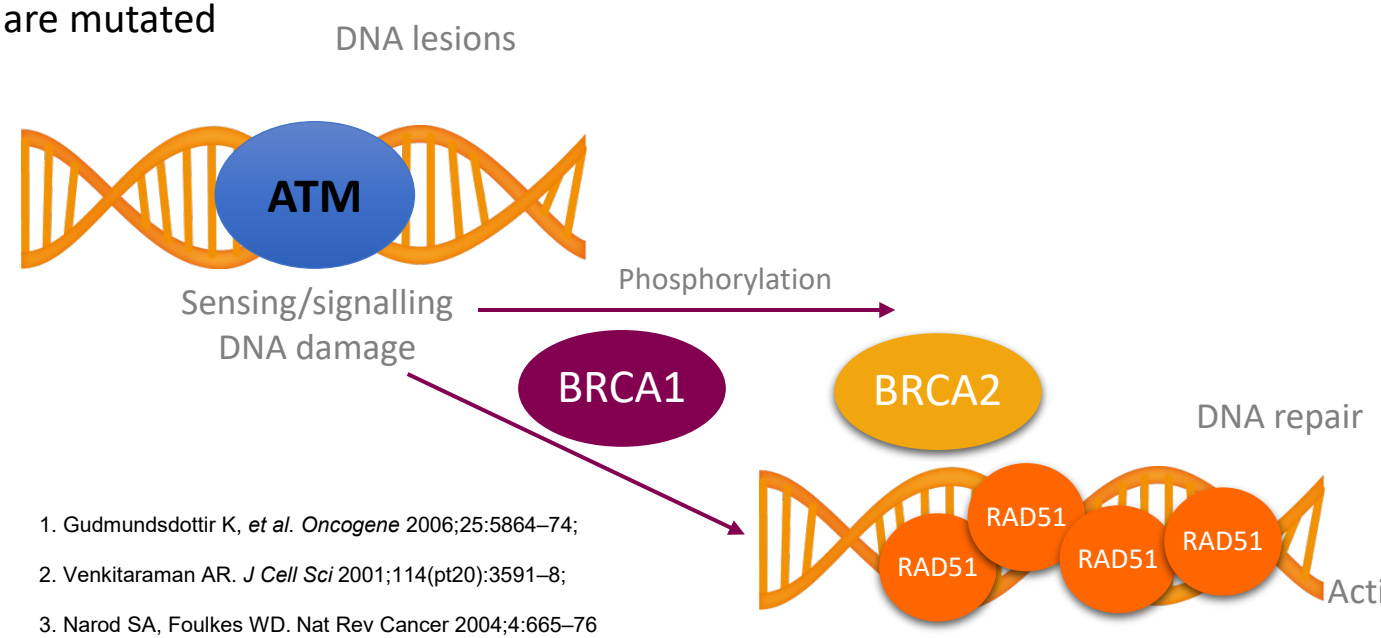
- 1995
- 13q12
- 27 exons
- 3418 aa

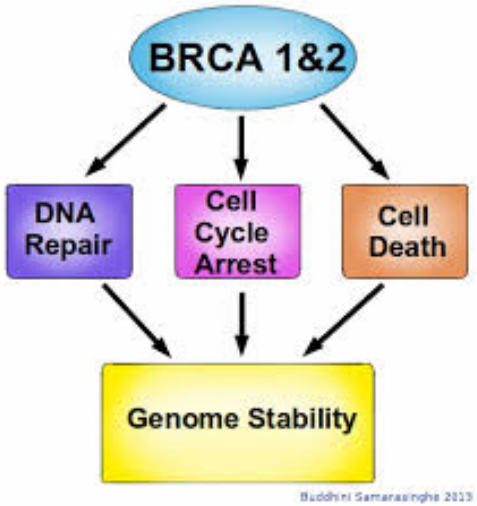
✓ Phenotype of BC and OC differs depending on the location of the mutation (BCCR, OCCR)

Yoschida et al., 2021

BRCA1 e BRCA2 (2/2)

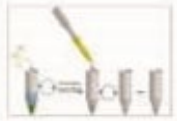
- ***BRCA1* and *BRCA2*** are tumour suppressor genes.[1,2] They encode proteins involved in the repair of DNA double-strand (dsDNA) breaks via the homologous recombination (HR) pathway.[3]
- Functional BRCA proteins regulate **cell growth** and prevent abnormal cell division that might otherwise lead to tumour development
- Mutations in tumor-suppressor genes cause **loss-of-function**. These generally only become evident when both copies of the gene are mutated

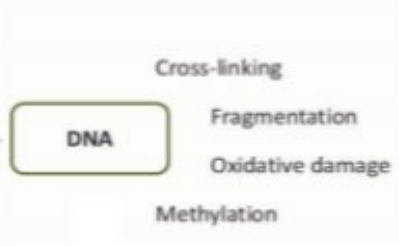




- 1. Gudmundsdottir K, *et al. Oncogene* 2006;25:5864–74;
- 2. Venkitaraman AR. *J Cell Sci* 2001;114(pt20):3591–8;
- 3. Narod SA, Foulkes WD. Nat Rev Cancer 2004;4:665–76

TEST GENETICO: cosa serve?

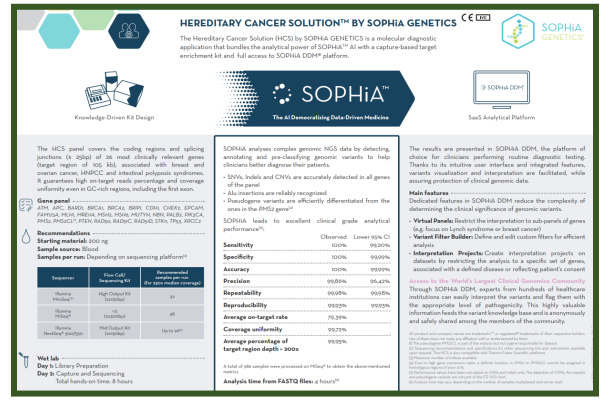




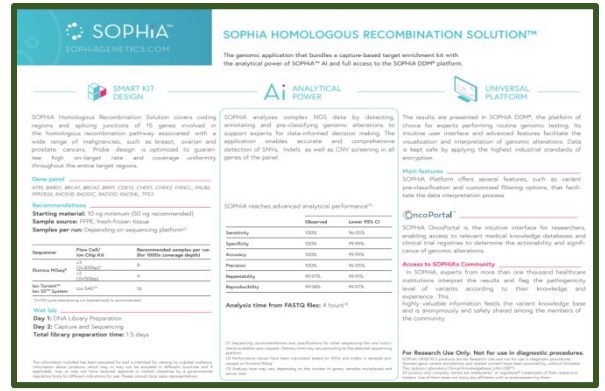
Test BRCA germinale (solo mutazioni costituzionali)

Test BRCA somatico (mutazioni costituzionali e acquisite)

HCS



HRS



De Iaco 2018

Analisi genetica dei geni BRCA1 e BRCA2 nelle donne dal 2012 al 2022
La nostra esperienza in AVR

Delibera Giunta regionale DGR n° 220/2011

1930 HBOC

Analisi genetica *BRCA1 e BRCA2*

326

Portatori di VARIANTE

17% *

1064

WILD TYPE

83% **

210

Varianti PATOGENETICHE o probab. PATOGENETICHE

65%

116

Varianti di INCERTO SIGNIFICATO

35%

- * Estesa successiva analisi genetica ai collaterali di 1 e 2 grado secondo indicazioni del Medico Genetista
- ** Terapia e follow-up per malattia oncologica

Analisi mirata variante specifica dei geni BRCA1 o BRCA2 in familiari sani di probande affette

876 collaterali sani

Analisi MIRATA geni *BRCA1 e BRCA2*

375

Portatori di VARIANTE

43% *

501

WILD TYPE

57% **

329

Varianti PATOGENETICHE o probab. PATOGENETICHE

88%

466

Varianti di INCERTO SIGNIFICATO

12%

- * Avviato percorso di sorveglianza periodica
- ** Adesione ai programmi di screening di popolazione

Analisi genetica dei geni BRCA1 e BRCA2 nei MBC dal 2012 al 2022
La nostra esperienza in AVR

122 MBC

Analisi genetica
BRCA1 e BRCA2

17 MBC

Portatori di VARIANTE

13% *

105 MBC

WILD TYPE

87% **

12 MBC

Varianti PATOGENETICHE o probab. PATOGENETICHE

70%

- 1 Variante in BRCA1 (8%)
- 11 in BRCA2 (92%)

5 MBC

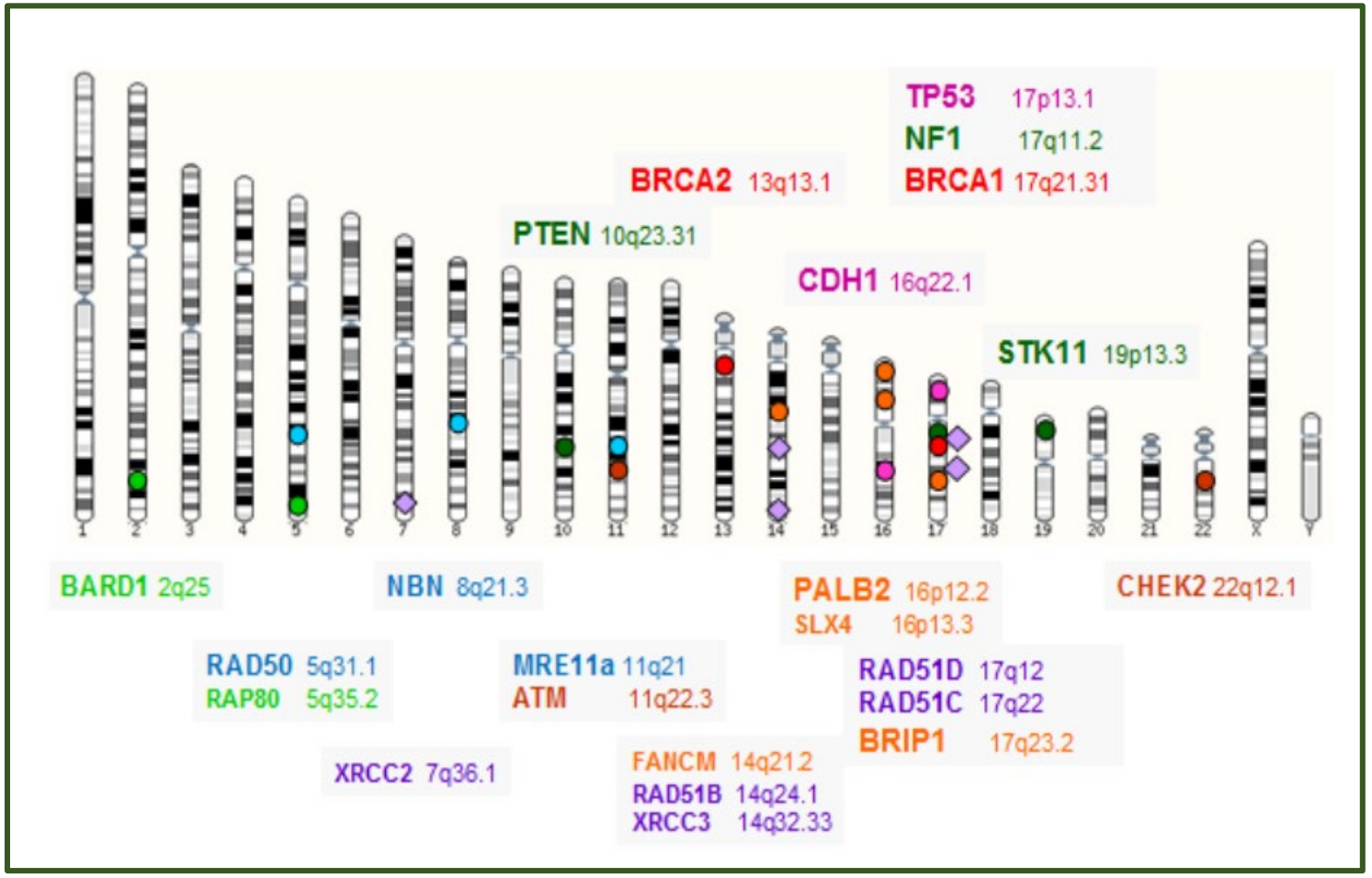
Varianti di INCERTO SIGNIFICATO

30%

- 5 Varianti in BRCA2 (100%)

- * Estesa successiva analisi genetica ai collaterali di 1 e 2 grado secondo indicazioni del Medico Genetista
- ** Terapia e follow-up per malattia oncologica

Geni di predisposizioni allo sviluppo di tumori della mammella e dell'ovaio



- ***TP53, STK11, PTEN, CDH1:*** Alta penetranza: elevato rischio oncogenetico
- ***PALB2:*** media/alta penetranza: rischio medio/alto
- ***CHEK2 e ATM:*** rischio oncogenetico intermedio

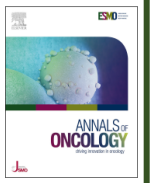
ESMO Clinical Practice Guideline - 6 October 2022

Table 1. Lifetime cancer risks in HBOC-associated PVs

	Breast Cancer*	Tubo-ovarian Cancers†	Pancreatic Cancer‡	Colon Cancer§	Other Cancers
ATM	Yes 25%-30%	Yes <5%	Yes <5%	No	Prostate 30%
BARD1	Yes ~20%	No	No	No	No
BRCA1	Yes >60%	Yes 40%-60%	Yes <5%	No	
BRCA2	Yes >60%	Yes 15%-30%	Yes <5%	No	Prostate 33%
BRIP1	No	Yes 5%-10%	No	No	No
CDH1	Yes (LBC) 40%	No	No	No	Diffuse gastric cancer 35%-45%
CHEK2	Yes 25%-30%	No	No	Yes 15%	
PALB2	Yes 40%-60%	Yes 3%-5%	Yes 2%-3%	No	No
PTEN	Yes 40%	No	No	yes 10%	Thyroid cancer 20%; endometrial 20%
RAD51C	Yes 20%	Yes 10%	No	No	No
RAD51D	Yes 10%	Yes 10%	No	No	No
STK11	Yes 40%	No	Yes 10%-30%	Yes 30%	Gastric 30%; Sertoli-Leydig 10%-20%
TP53	Yes 40%	No	Possibly	Possibly	Sarcoma, brain, leukaemia, adrenocortical carcinoma

HBOC, hereditary breast and ovarian cancer syndrome; LBC, lobular breast cancer; PV, pathogenic variant.

Lifetime risk in general 'average risk' population: *breast cancer 11%, †ovarian cancer 1.3%, ‡pancreatic cancer 1.6%, §colon cancer 4%.



Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline†

C. Sessa, J. Balmaña, S.L. Bober, M.J. Cardoso, N. Colombo, G. Curigliano, S.M. Domchek, D.G. Evans, D. Fischerova, N. Harbeck, C. Kuhl, B. Lemley, E. Levy-Lahad, M. Lambertini, J.A. Ledermann, S. Loibl, K.-A. Phillips, Paluch Shimon, on behalf of the ESMO Guidelines Committee

PII: S0923-7534(22)04193-X
DOI: https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.004
Reference: ANNONC 1115
To appear in: *Annals of Oncology*
Received Date: 11 July 2022
Revised Date: 5 October 2022
Accepted Date: 6 October 2022

PALB2 PV o LPV:

- sorveglianza clinico-strumentali entro i 30y
- offerta la chirurgia profilattica mammaria

Pannello genetico HBOC multiplo *HCS_v1_1 (Sophia Genetics)*:

BRCA1, BRCA2, ATM, BARD1, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD50, PTEN, RAD51C, RAD51D, TP53, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, STK11.

Pannello genetico HDGC multiplo HCS_v1_1 (Sophia Genetics):

CDH1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, STK11, TP53, APC, MUTYH.

Pannello genetico HNPCC multiplo HCS_v1_1 (Sophia Genetics):

MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, CDH1, CHEK2, PTEN, TP53, EPCAM, STK11, APC, MUTYH.

Pannello genetico multiplo HCS_v1_1 (Sophia Genetics):

APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, FAM175A, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PIK3CA, PMS2, PMS2CL, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2.

Il Pannello genetico multiplo HRS_v1 (Sophia Genetics):

ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53.

Analisi di 1 livello:

Indagine genetica nei geni canonici per la sospetta sindrome ereditaria

Analisi di 2 livello:

Indagine genetica nel pannello di geni associati alla sospetta sindrome ereditaria

Prevalence of a pathogenic variant identified in PALB2 gene in Vasta Romagna Area

- 1866 blood samples referring to Genetics Unit of IRST between 2015 and 2022
- 46/1866 **(2.5%)** highlighted the presence of ***PALB2* PVs** and likely pathogenic variants (**LPVs**)
- We focused our attention on the most recurrent observed PV **c.1140_1143del; p.(Ser380Argfs*43)**
- *PALB2* PV was detected in 19 subjects (40%): 14 probands and 5 family members

PROBANDS	AGE AT DIAGNOSIS	DEVELOPED PATHOLOGY	SUBTYPES
12	49,9 y.o	• 11 breast invasive ductal carcinoma (IDC) • 1 invasive lobular carcinoma (ILC)	• 8 luminal A • 4 TNBC
1	70 y.o	• ovarian cancer	
1	42 y.o	• duodenum adenocarcinoma	

After BC diagnosis, 3 probands developed further cancers:
- 1 colorectal
- 1 lung
- BC

5 variant carriers subjects have no evidence of cancer until now

Cangini et al., AIFET 2022

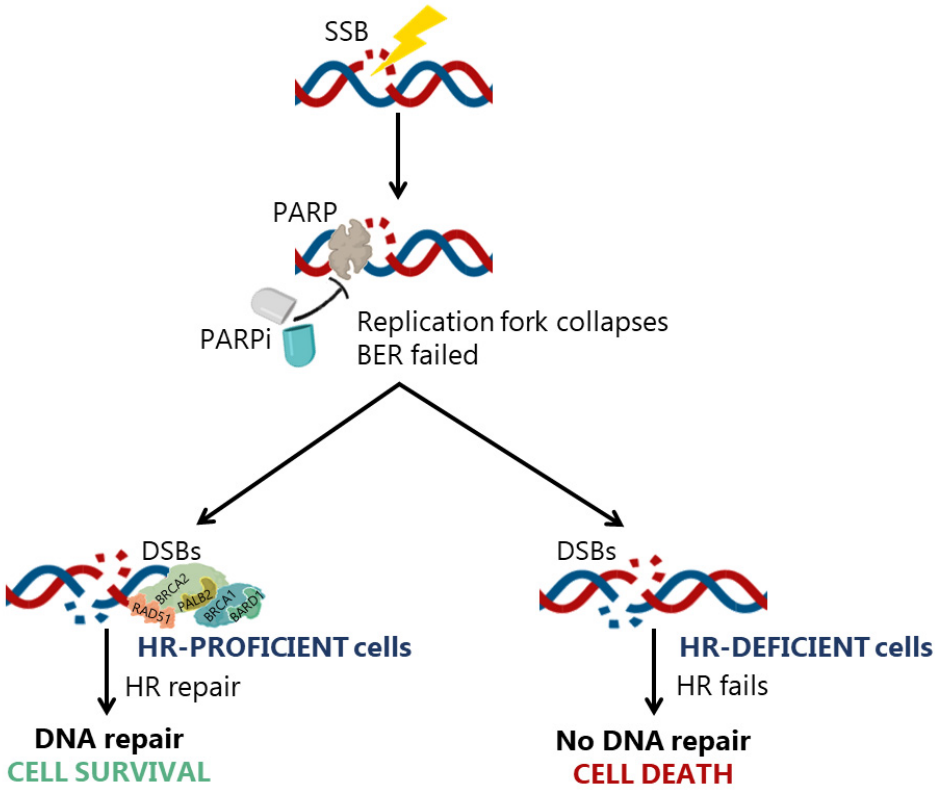
BRCA1 e BRCA2: IL TEST GENETICO A SCOPO TERAPEUTICO

- pazienti adulte con recidiva platino-sensibile del cancro epiteliale dell'ovaio di alto grado, del cancro della tuba di Falloppio o del cancro peritoneale primitivo, che sono in risposta (completa o parziale) alla chemioterapia a base di platino.
- carcinoma dell'ovaio: pazienti adulte con cancro epiteliale dell'ovaio di alto grado avanzato (stadi III e IV secondo FIGO), cancro della tuba di Falloppio o cancro peritoneale primitivo, in risposta (completa o parziale) dopo completamento della chemioterapia di prima linea a base di platino.
- carcinoma della prostata: pazienti con cancro metastatico resistente alla castrazione in progressione dopo precedente trattamento con un nuovo agente ormonale.
- carcinoma della mammella: pazienti adulti con cancro localmente avanzato o metastatico, HER2 negativo, precedentemente trattati con un'antraciclina e un taxano nel setting (neo)adiuvante o metastatico, a meno che i pazienti fossero stati non eleggibili per questi trattamenti

AIFA AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO

Agenzia Italiana del Farmaco, DETERMINA 8 marzo 2022 (GU n.64 del 17-3-2022)

MECHANISM OF SYNTHETIC LETHALITY BY POLY(ADP)–RIBOSE POLYMERASE (PARP)



Genomic integrity

Genomic instability

- ✓ PARP enzyme is crucial in SSBs repair
- ✓ HR important of DSBs repair
- ✓ Suppression of PARP enzyme throught PARPi produce distinct DNA repair responses by cells depending on their HR status

IL TEST BRCA1 E BRCA2: TEST GERMINALE E TEST INTEGRATO

Blood sample

Extract DNA from normal cells

Extract DNA from tumour cells

Tumour sample

Most of samples are formalin fixed & paraffin embedded (FFPE)

- Fixation process damaged and fragments the DNA
- Cellularity extimation

Frozen samples are in the minority

- Good preservation of DNA
- No cellularity

TO ANALYSIS

2015-2017

Test germinale *BRCA1 e BRCA 2* su sangue periferico

➢ **KIT: Illumina Trusight Cancer** (+ MLPA)

2017 ad oggi

Test INTEGRATO s*BRCA1 e BRCA 2* su tessuto paraffinato e gBRCA1 e BRCA2 su sangue periferico per analisi CNVs

➢ **KIT: TSCA Illumina** (+ MLPA su germinale) e **HRS Sophia Genetics**

PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO SOTTOPOSTE A TEST BRCA
LA NOSTRA ESPERIENZA IN IRST E AVR

615 pazienti con Carcinoma ovarico Sieroso ad alto grado

Test germinale **(dal 2015)** **207**

81 IRST
126 AVR

Test integrato somatico/germinale **(da febbraio 2017)** **408**

80 IRST
328 AVR

g BRCA+ **28 (14%)**

g BRCA wt **179**

s BRCA+ **56 (13%)**

s BRCA wt **352**

41% riconf. sulla linea germinale

Da Febbraio 2022 attivo il percorso con le U.O Ginecologia

Analisi genetica dei geni BRCA1 e BRCA2 nei ADK prostatico metastatico da Aprile 2022 ad oggi

26 pz ADK prostatico metastatico

TEST INTEGRATO
sBRCA1/2 e *gBRCA1/2*

2 pz Portatori di VARIANTE di incerto significato C3 somatica

(7%)

Varianti non utili ai fini terapeutici

7 pz da IRST

19 pz da AVR

24 pz

WILD TYPE

(93%)

Homologous Recombination Deficiency Solution

Gene list:
ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53

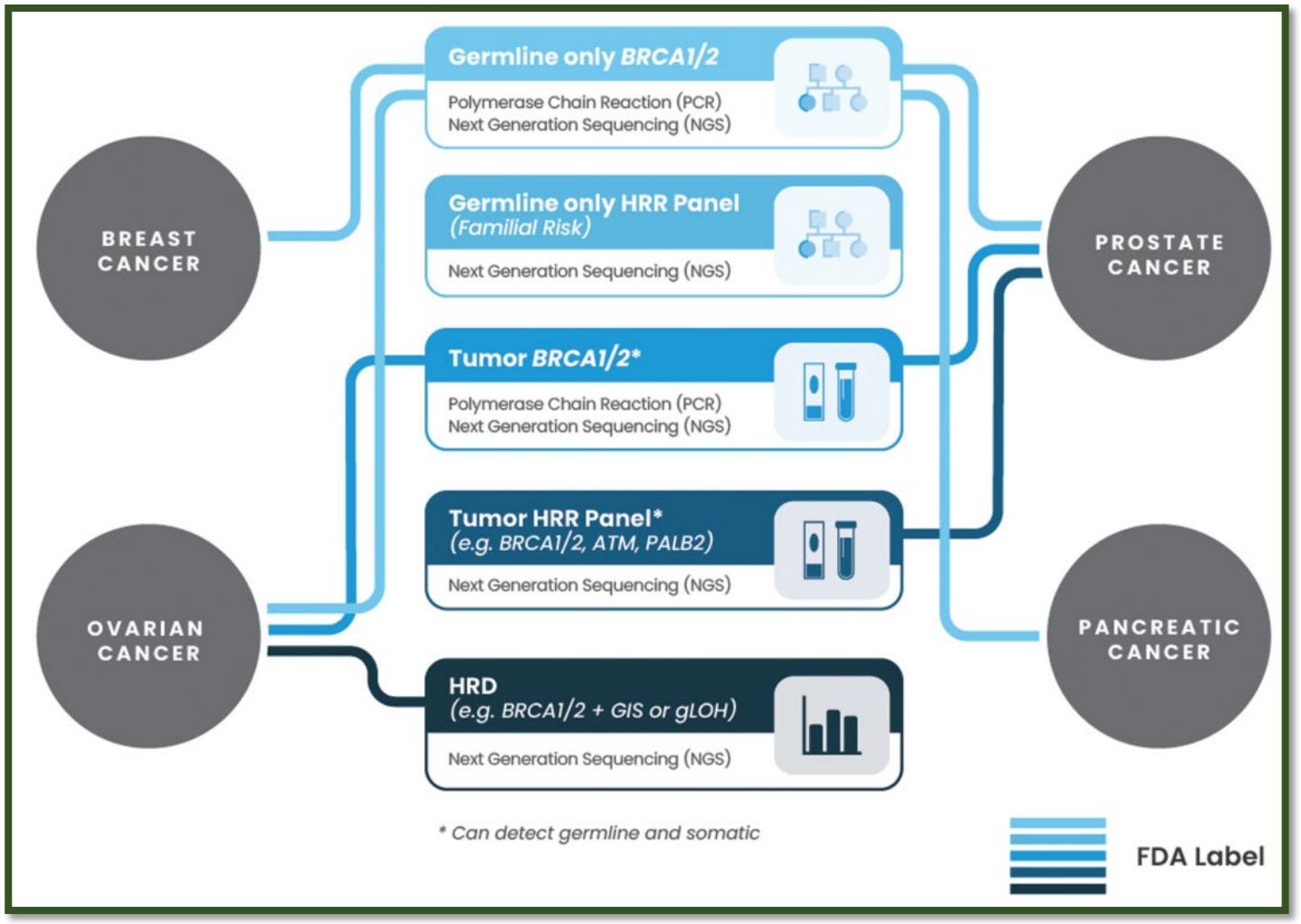
Figure 1: Starting from the left, a Hamilton STARlet platform, the HCS kit and SOPHiA DDM platform.

NGS Panel

Preparatore di librerie –Hamilton IVD

MiSeq Illumina

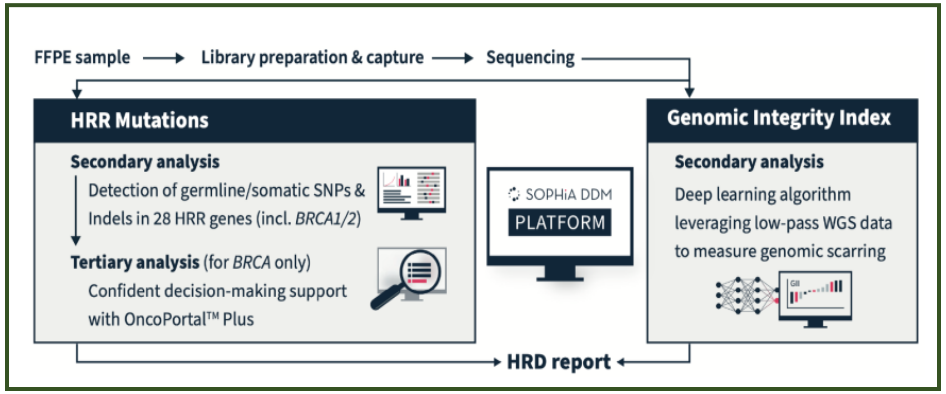
Non solo *BRCA1* e *BRCA2*.... Homologous Recombination Deficiency (HRD)



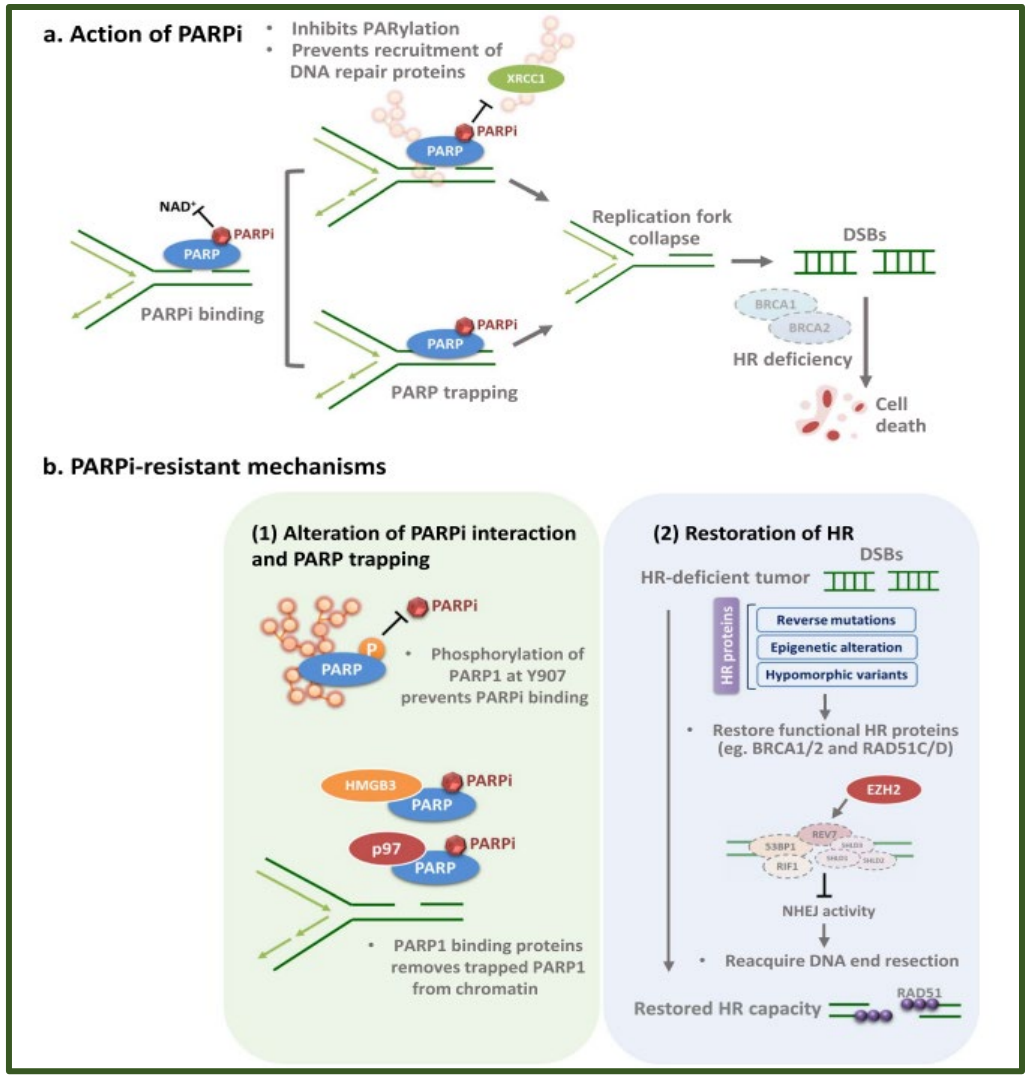
The Oncologist, 2022

- **HRD** è presente in circa il **48%** dei tumori dell'ovaio
- Parp inibitor in pazienti HRD + nel Ca ovaio
- Prossimi alla validazione in laboratorio di:

SOPHiA DDM Homologous Recombination Deficiency (HRD) Solution



RESISTENZA AI PARPinibitor



IL FUTURO....

- Monitorare le mutazioni di resistenza
- Biopsia liquida per il monitoraggio terapia con i Parpi

Chu et al., 2022

CONCLUSIONI

- La genetica oncologica e l'avvento dei **test genetici richiedibili a scopi terapeutici** sono in **continua e rapida evoluzione**
- L'esecuzione dei test genetici in oncologia deve essere subordinata alla **CGO nell'ambito del percorso eredo-familiare e al mini counselling** per il test BRCA ai fini terapeutici
- Il laboratorio deve fornire l'interpretazione del test genetico sulla base alle **informazioni scientifiche più recenti** ed è fondamentale un **costante aggiornamento** ed una **forte interazione** tra tutti gli specialisti coinvolti
- Importanza di **un'equipe multidisciplinare** per una **corretta gestione** e **presa in carico** del paziente

Niente nella vita va temuto, deve essere solamente compreso. Ora è tempo di comprendere di più, così possiamo temere di meno.
(Marie Curie)

Direzione Scientifica IRST
Prof. Giovanni Martinelli

SS Diagnostica Molecolare Avanzata e Predittiva - GERMINALE
Dr. Daniele Calistri (Responsabile)
Dr.ssa Valentina Zampiga
Dr.ssa Ilaria Cangini
Dr.ssa Erika Bandini

Servizio di Genetica Oncologica IRST:
Dr. Fabio Falcini (Direttore)
Dr.ssa Rita Danesi
Dr.ssa Valentina Arcangeli
Dr.ssa Mila Ravegnani

valentina.zampiga@irst.emr.it

Grazie per l'attenzione!!