



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia – Dipartimento di Medicina – DIMED

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico (L/SNT3)

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

Profiling molecolare nel carcinoma ovarico: deficit del complesso di riparazione omologa (HRD) e sequencing dei geni *BRCA1/2*

Relatore: Prof. Matteo Fassan

Correlatrici: Dr. ssa Giada Munari

Dr. ssa Valentina Angerilli

Laureando: Alessandro Scarpa

Matricola 1230070

SOMMARIO

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Epidemiologia.....	5
1.2 Fattori di rischio – Geni BRCA1/BRCA2.....	5
1.3 Ricombinazione Omologa (HR).....	6
1.4 Next Generation Sequencing (NGS).....	7
2. SCOPO DELLO STUDIO	9
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 Selezione dei casi.....	11
3.2 Taglio.....	11
3.3 Estrazione del DNA.....	11
3.4 Preparazione Delle Librerie.....	12
3.4.1 Denaturazione.....	12
3.4.2 Ibridazione e ligazione.....	13
3.4.3 Digestione con esonucleasi.....	13
3.4.4 Amplificazione.....	14
3.4.5 Purifica.....	14
3.5 Controllo di qualità della libreria di DNA (QC).....	14
3.6 Sequenziamento.....	15
3.7 Analisi dei dati.....	15
4. RISULTATI	17
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	21
6. BIBLIOGRAFIA	23

ABSTRACT

Introduzione: Il carcinoma dell'ovaio viene solitamente diagnosticato in fase avanzata e per tale motivo le opzioni terapeutiche risultano spesso limitate. L'avvento del sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha permesso di indagare sistematicamente le alterazioni genomiche e molecolari nel carcinoma ovarico, in modo da rendere le pazienti candidabili a terapie mirate. Il danno al DNA è un fenomeno che si verifica costantemente durante la replicazione e per mantenere l'integrità genomica richiede una complessa rete di vie di riparazione molecolari; tra cui il complesso di riparazione della ricombinazione omologa (*Homologous Recombination Repair*, HRR). In caso di HRR deficitario (*Homologous Recombination Deficiency*, HRD) si verifica la non regolare riparazione dei danni al DNA, con conseguente perdita o duplicazione di regioni cromosomiche o perdita di eterozigosi (LOH).

Scopo dello studio: Le pazienti con carcinoma ovarico HRD, oltre agli inibitori della polimerasi (iPARP), sono candidabili a un elenco crescente di terapie mirate. Questo lavoro si focalizza sulla rilevazione di alterazioni a livello del complesso HRR e il completo sequencing dei geni *BRCA1/2*.

Materiali e metodi: Sono stati analizzati 18 campioni di carcinoma ovarico, precedentemente testati in un altro centro di patologia molecolare, utilizzando il kit HRD Focus Panel (AmoyDx) ed effettuata comparazione tra i dati ottenuti con le due diverse metodiche. Il kit HRD Focus Panel che si basa sulla tecnologia Halo-Shape Annealing and Defer-Ligation Enrichment (HALDLE), oltre ad essere caratterizzato da un'ottima sensibilità diagnostica, consente di ottenere un risultato in soli tre giorni lavorativi con un tempo operatore di circa un'ora. Per il sequenziamento è stato utilizzato lo strumento NextSeq-550 Platform (Illumina).

Risultati: Dei 18 campioni analizzati sono stati individuati 2 casi con mutazione in *BRCA1*, 2 casi con mutazione in *BRCA2* e 1 caso con mutazione sia in *BRCA1* sia in *BRCA2*; mutazioni di *BRCA1* e *BRCA2* con significatività 4 e 5 e quindi con un certo grado di patogenicità presentano anche un Genomic Scar Score elevato, mentre mutazioni con significatività 2 e 3 presentano un GSS inferiore al 50% e di conseguenza negativo.

Conclusioni: La sfida è come valutare la HRD nella pratica clinica di routine, utilizzandolo come biomarcatore predittivo. Negli studi clinici PAOLA1, PRIMA e VELIA, la valutazione della HRD è stata eseguita con il test myChoiceCDx (Myriad), approvato dalla FDA, che considera lo stato *BRCA1* e *BRCA2* e la cicatrice genomica indotta dalla HRD. Tuttavia, questo test è eseguito a livello centralizzato, è costoso e non è rimborsato dal sistema sanitario nazionale. Il tempo medio di risposta di AmoyDx, il pannello utilizzato in questo studio, qualora venisse implementato nella pratica clinica,

essendo molto inferiore rispetto le tempistiche degli altri sistemi, consentirebbe un rapido accesso alle informazioni genomiche, per procedere immediatamente al trattamento mirato delle pazienti affette da neoplasia ovarica con difetto HRD.

1. INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia

Secondo i dati raccolti dall'AIOM nel 2021, il cancro ovarico rappresenta circa il 30% di tutti i tumori maligni dell'apparato genitale femminile e occupa il decimo posto tra tutti i tumori femminili (3%). L'elevata mortalità associata a questo tumore (nel 2021 sono stimati 3200 decessi) è attribuibile a molti fattori tra cui: una sintomatologia aspecifica e tardiva e l'assenza di strategie di screening validate che consentano di effettuare una diagnosi precoce (eccetto per le donne con alterazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*). Circa il 75-80% delle pazienti presenta, infatti, al momento della diagnosi una malattia in fase avanzata. [1] L'incidenza delle neoplasie maligne ovariche varia nelle diverse aree geografiche, con tassi più elevati in Europa e Nord America. In Africa e nel sud-est asiatico si registrano meno di 2 nuovi casi all'anno per 100000 donne, mentre in Europa e Nord America si registrano 15 nuovi casi all'anno per 100000 donne.

L'origine dei tumori primitivi dell'ovaio può essere di 3 tipi: epiteliale se si origina dalle cellule epiteliali, germinale se origina dalle cellule germinali destinate a dare origine agli ovuli e stromale se si origina dalle cellule dello stroma gonadico, ossia il tessuto di sostegno dell'ovaio. Le neoplasie epiteliali rappresentano il 60% delle neoplasie ovariche, colpiscono sia le donne in età riproduttiva, sia le donne in età avanzata. A loro volta vengono classificate a seconda del tipo cellulare (sieroso di alto e basso grado, mucinoso, endometrioido, a cellule chiare) e sottoclassificate (borderline, alto, medio e basso grado di malignità) in base agli aspetti architetturali, alle caratteristiche nucleari e alla presenza o assenza di invasione stromale. [2]

1.2 Fattori di rischio - Geni *BRCA1/BRCA2*

Evidenze scientifiche identificano tre categorie di fattori di rischio di insorgenza di neoplasia ovarica: ormonali, ambientali ed eredo-familiari. Infatti ormoni che stimolano le ovaie, come l'Ormone Follicolo Stimolante (FSH) e l'Ormone Luteinizzante (LH), e l'ovulazione ininterrotta possono portare a mutazioni delle cellule e favorire la trasformazione maligna. Allo stesso modo, l'ovaio può entrare in contatto attraverso la vagina e le tube di Falloppio con sostanze che favoriscono lo sviluppo del tumore (cancerogeni); inoltre è stata descritta un'associazione con esposizione di asbesto e talco, con l'abuso di alcol, l'obesità e una dieta ricca di grassi.

La maggior parte dei casi viene identificata in età avanzata, tra i 50 e i 69 anni. Ulteriori fattori di rischio sono la durata del periodo ovulatorio, assenza di prole e donne con un menarca precoce e/o menopausa tardiva hanno maggior probabilità di presentare neoplasie ginecologiche. Sono fattori di

protezione l'aver avuto più figli, l'allattamento al seno e l'uso prolungato di contraccettivi estrogenici in quanto sembra diminuiscano il rischio d'insorgenza del tumore dell'ovaio. [2] [3] Esiste però un altro fattore di rischio importante: le mutazioni ereditarie nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. *BRCA1* (dall'inglese Breast Cancer gene 1) è il gene oncosoppressore che codifica per una proteina denominata “proteina di suscettibilità al cancro della mammella tipo 1” (Breast Cancer Type 1 susceptibility protein) e *BRCA2* (Breast Cancer gene 2) è il gene che codifica per la “proteina di suscettibilità al cancro della mammella tipo 2” ed entrambe intervengono nel controllo del ciclo cellulare.

La presenza di mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* può determinare in contemporanea, o in tempo diverso, il carcinoma dell'ovaio e carcinoma della mammella. I dati epidemiologici, infatti, indicano che il 5-10% di tutti i casi di neoplasia della mammella e/o ovaie è ereditario e le mutazioni germinali presenti nei geni *BRCA* sono responsabili della maggior parte di questi tumori. [4] Nel caso di neoplasia ovarica la presenza di queste alterazioni aumenta le probabilità di sviluppare tale patologia in pazienti in età giovanile rispetto all'insorgenza sporadica di questo non legato a queste alterazioni genetiche. I principali rischi conferiti da *BRCA1* e *BRCA2* nelle donne riguardano i tumori della mammella, delle ovaie, delle tube di Falloppio e del peritoneo. Anche i maschi portatori di mutazioni in *BRCA1* o *BRCA2* sono suscettibili di cancro; tuttavia, i loro rischi rimangono poco conosciuti e la loro gestione clinica ottimale non è ancora stata definita. I maschi portatori di mutazioni *BRCA1* sono a maggior rischio di tumori della prostata e della mammella, ma, a differenza delle donne che hanno un rischio maggiore di cancro nel corso della vita con mutazioni del gene *BRCA1*, *BRCA2* è il gene più importante per gli uomini dal momento che è caratterizzato da uno spettro maggiore di mutazioni. [5]

Le cellule prive di *BRCA1* o *BRCA2* non sono in grado di riparare le rotture a doppio filamento mediante ricombinazione omologa e quindi la riparazione procede attraverso vie meno precise, maggiormente a rischio di errore, come la giunzione di estremità non omologhe *non-homologous end-joining*-NHEJ). La NHEJ provoca l'accumulo di ulteriori mutazioni e l'instabilità cromosomica, aumentando il rischio che una cellula subisca una trasformazione maligna; [6] perciò, dal momento che i geni *BRCA1* e *BRCA2* sono deputati a regolare i meccanismi di riparo del DNA qualora in quest'ultimo si accumulino danni o errori nel corso della replicazione cellulare, se si verificassero varianti patogenetiche in questi 2 geni, essi perderebbero la loro funzione e diverrebbero direttamente responsabili dell'accumulo di mutazioni.

1.3 Ricombinazione omologa (HR)

L'avvento del sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha permesso di studiare maggiormente le alterazioni genomiche e molecolari del carcinoma dell'ovaio, che possono identificare le pazienti come candidate a una terapia mirata. I tumori ovarici con carenza di riparazione della ricombinazione omologa (HR) rappresentano un gruppo di questo tipo e hanno dimostrato sensibilità agli inibitori della poli(ADP-ribosio)polimerasi (iPARP). La maggior parte dei tumori con deficit di ricombinazione omologa (HRD) si verifica in pazienti con mutazioni germinali di *BRCA1* e *BRCA2*. Tuttavia, esistono anche pazienti con mutazioni germinali in altri geni della via HR e pazienti che non sono portatori di una mutazione germinale ereditaria, ma presentano tumori con mutazioni HRD sporadiche. I dati del Cancer Genome Atlas (TCGA) dimostrano che circa il 50% dei tumori ovarici sierosi di alto grado, il sottotipo istologico più comune, presenta aberrazioni nella riparazione HR. [7]

Il danno al DNA è un fenomeno che si verifica costantemente e che richiede una complessa rete di vie di riparazione molecolare per mantenere l'integrità genomica e prevenire la morte cellulare. La ricombinazione omologa è un'importante via di riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento ed opera durante le fasi S e G2 del ciclo cellulare, basandosi su molte proteine, tra cui *BRCA1* e *BRCA2*. [8] La maggior parte delle cellule contiene più di una copia di materiale genetico e il processo della Ricombinazione Omologa utilizza questa caratteristica per riparare il DNA. La sequenza di DNA identica (omologa) viene infatti usata come stampo ed in questo modo l'integrità del DNA è salvaguardata. Con questo meccanismo il DNA viene riparato in modo molto accurato. [8]

Date le difficoltà nel valutare la presenza di HRD utilizzando le mutazioni nei geni *HRR*, sono stati sviluppati test clinici che tentano di classificare lo stato HRD dei tumori sulla base di metriche genomiche. Le alterazioni del genoma più grandi sono chiamate Genomic Scar Scores (GSS) e sono attualmente alla base dei test clinici disponibili per HRD, che possono essere eseguiti solo su tessuto tumorale. Il GSS della HRD consiste in specifici pattern di mutazioni e aberrazioni strutturali dei cromosomi, tra cui riarrangiamenti, guadagni e perdite di frammenti di DNA; comprendono la perdita di eterozigosi (*Loss of Heterozygosity*, LOH), ossia l'assenza del contributo di un genitore al materiale genetico in un sito specifico del genoma, lo squilibrio allelico telomerico (*Telomeric-Allelic Imbalance*, TAI) uno squilibrio allelico che si estende al subtelomero ma non attraversa il centromero, e transizioni di stato su larga scala (*Large-scale State Transitions*, LST), rotture cromosomiche tra regioni genomiche adiacenti di lunghezza superiore a 10 Mb; queste alterazioni possono coinvolgere i geni *BRCA1* e *BRCA2*. [9]

1.4 Next Generation Sequencing (NGS)

Come detto in precedenza, l'implementazione di metodiche NGS ha permesso di analizzare al meglio il genoma dei pazienti al fine di individuare una terapia mirata che sia la più efficace possibile nel trattare le diverse forme neoplastiche.

Esistono diverse piattaforme NGS che utilizzano differenti tecnologie di sequenziamento; nonostante ciò, tutte le piattaforme NGS eseguono il sequenziamento di milioni di piccoli frammenti di DNA in parallelo. Le analisi bioinformatiche vengono utilizzate per mettere insieme questi frammenti mappando le singole letture al genoma umano di riferimento. [10]

Tutto il processo NGS si divide in 4 fasi principali: preparazione del campione, generazione dei cluster, sequenziamento e analisi dei dati. Ci sono diversi metodi per quanto riguarda la preparazione dei campioni, ma ognuno di essi è basato sull'aggiunta di adattatori alle estremità dei frammenti di DNA. Attraverso un ciclo di amplificazione ridotto vengono aggiunti ulteriori elementi, come il sito di legame per il sequenziamento, index e regioni complementari agli oligonucleotidi presenti sulla flow cell. La flow cell è un vetrino con delle "corsie", dove ogni corsia costituisce un canale rivestito da 2 tipi di oligonucleotidi. Perciò la libreria di DNA viene dispensata sulla flow cell, dove si ibriderà con gli oligonucleotidi per mezzo delle regioni I5 e I7, presenti sia sugli oligonucleotidi che rivestono la flow cell, sia sui filamenti del DNA da sequenziare.

Nella cartuccia che viene inserita nello strumento viene caricato un pool, risultato della miscela tra pool di librerie di DNA e PhiX Control. Il PhiX Control deriva dal genoma di un piccolo batteriofago, il primo genoma di DNA a essere sequenziato da Fred Sanger; si tratta di una libreria concentrata 10 nM in 10 µL con una dimensione media di 500 bp e una composizione di basi bilanciata con circa 45% GC e circa 55% AT. Grazie alla sua sequenza genomica piccola (5386 nucleotidi) e ben definita, PhiX viene comunemente utilizzato come controllo di qualità e calibrazione per le corse di sequenziamento Illumina. [11]

Una volta caricato il pool nella cartuccia si carica lo strumento, il quale svolge tutti i passaggi in automatico: conclusa la fase di PCR il nuovo filamento si ripiega e si appaia all'adattatore complementare formando un ponte a doppio filamento; a questo punto si susseguono una serie di fasi di amplificazione e denaturazione che portano all'eliminazione dalla flow cell di tutti i frammenti reverse per avere un filamento a singola elica. Conclusa la fase di amplificazione vengono aggiunti i primers di Sequenziamento e nucleotidi marcati con fluorocromi. Ogni nucleotide ha un blocco per la polimerasi e di conseguenza viene legata una base alla volta e la lettura viene acquisita dallo strumento mano a mano che la sintesi procede; dopo la lettura il blocco e il fluorocromo vengono scissi e lavati via affinché venga aggiunta la base successiva. La lunghezza d'onda dell'emissione, insieme all'intensità di segnale, determina la chiamata della base specifica da parte dello strumento.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Con questo progetto si è valutato lo stato mutazionale dei geni *BRCA1* e *BRCA2* e del loro risvolto patogenetico sul paziente; inoltre, valutando alterazioni a livello del complesso di ricombinazione omologa e correlandolo con il *Genomic Scar Score* ci permette di individuare una terapia mirata per le pazienti a cui è stata diagnosticata una neoplasia ovarica. L'implementazione di tale pannello di analisi nella pratica diagnostica potrebbe consentire un rapido accesso alle informazioni genomiche, per procedere immediatamente al trattamento mirato delle pazienti affette da neoplasia ovarica con difetto HRD.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SELEZIONE DEI CASI

In questo studio sono stati analizzati 18 campioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) di pazienti affette da carcinoma ovarico.

3.2 TAGLIO

I campioni di tessuto FFPE, vengono tagliati attraverso l'utilizzo di un microtomo, il quale permette di ottenere delle sezioni sottili (all'ordine del micrometro) che verranno poste su vetrino. La postazione di taglio è costituita dal microtomo, da una piastra fredda a -20°C e un bagnetto termostato a 45-50°C. I blocchetti FFPE, vengono posti sulla piastra fredda in modo da solidificare la paraffina, rendendo il blocchetto adeguato al taglio.

In commercio esistono 2 tipi di microtomi:

1. il microtomo a slitta, costituito da un porta blocchetto fisso e da una lama mobile, la lama scorrendo orizzontalmente produce delle sezioni sottili singole;
2. il microtomo rotativo, possiede una lama fissa e il blocchetto è mobile, attraverso un moto circolare scorre verticalmente sulla lama formando delle sezioni seriate, cioè "catenelle" di sezioni che consentono di limitare la perdita di materiale.

Prima di cominciare a tagliare, il blocchetto deve essere portato in piano inclinando verticalmente ed orizzontalmente il porta-blocchetto, in modo tale da coprire l'intera sezione di tessuto quando questa viene in contatto con la lama. Queste sezioni vengono successivamente poste nel bagnetto termostato che, grazie all'elevata temperatura, permette alla fetta si distendersi per prevenire la formazione di pieghe; qui le fette vengono pescate con un vetrino e poi lasciate ad asciugare.

Per ogni caso dello studio sono state tagliate 8 sezioni da 5 µm mediante microtomo rotativo, avendo cura di cambiare sempre lama tra un paziente e l'altro per evitare cross-contaminazioni.

3.3 ESTRAZIONE DNA

L'estrazione è avvenuta mediante l'utilizzo del kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Milano). La prima fase dell'estrazione del DNA è la microdissezione dei vetrini precedentemente selezionati, utilizzando una sezione colorata con ematossilina-eosina: dopo aver correttamente identificato i campioni, con una punta di bisturi viene inciso materiale paraffinato e successivamente posto nelle rispettive provette. Per la deparaffinazione si effettuano tre lavaggi: il primo in 900 µL di xilolo per eliminare la paraffina, questo agisce per 20 minuti a 50°C nel bagnetto termostato in agitazione e due lavaggi in 900 µL di etanolo 100% per disidratare i campioni. Ogni lavaggio è stato intervallato

da centrifughe a 14,0 rpm per 3 minuti che consentono di eliminare il surnatante facendo sedimentare il materiale.

Si procede con la lisi enzimatica, aggiungendo 180 μ L di ATL (buffer di lisi) e 20 μ L di proteinasi K necessaria per la rottura delle membrane e la lisi di proteine, eliminate successivamente durante la fase di purifica. La reazione di lisi necessita di incubazione a 56°C, pertanto i campioni vengono posti in bagnetto termostato in agitazione per almeno 3 ore, ed è seguita da 1 ora a 90°C; l'alta temperatura inattiva l'azione enzimatica della proteinasi K.

Conclusa la lisi si effettuano dei lavaggi in colonnina con wash (AW1 e AW2) contenenti concentrazioni saline differenti, fondamentali per eliminare reagenti e residui cellulari diversi dal DNA, il quale invece viene trattenuto dalla membrana presente nella microcolonna.

La fase finale prevede eluizione con H₂O, la quale interagisce con il DNA e provoca il suo distacco dalla membrana; il volume di H₂O viene deciso in precedenza, dopo l'introduzione della proteinasi K, a seconda della torbidità del campione all'interno dell'ependorf. La quantificazione del DNA viene effettuata mediante il fluorimetro Qubit® con il kit Qubit® DNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Il fluorimetro è uno strumento che consente di misurare con precisione la concentrazione di ssDNA, dsDNA ed RNA in base al kit utilizzato attraverso la misurazione della fluorescenza emessa, dal momento che l'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione. La taratura dello strumento viene effettuata utilizzando 2 standard contenenti quantità note di dsDNA, ssDNA o RNA in base al kit utilizzato.

3.4 PREPARAZIONE DELLE LIBRERIE

Il kit AmoyDx® HANDLET si basa sulla tecnologia Halo-shape ANnealing and Defer-Ligation Enrichment system (sistema HANDLE), tecnologia MIP (Molecular Inversion Probe) migliorata per catturare la regione del gene target. Durante il processo di costruzione della libreria, ogni singola molecola di DNA viene etichettata con un indice molecolare unico (UMI) ad entrambe le estremità, il che consente un'elevata sensibilità nella rilevazione delle varianti, eliminando qualsiasi bias di amplificazione della libreria e di sequenziamento.

3.4.1 Denaturazione

Prima di procedere con la denaturazione si portano i campioni e il controllo positivo HRD (presente nel kit) alla concentrazione di 100 ng utilizzando il buffer *TE-low solution*; questo viene fatto in una provetta da PCR da 0.2 mL, con volume finale di 8 μ L. Lo scopo del buffer TE è quello di solubilizzare il DNA, proteggendolo dalla degradazione. Il buffer TE è una soluzione tampone, il cui nome deriva dai suoi componenti: Tris, un comune buffer, ed EDTA, una molecola chelante i cationi,

come Mg^{2+} . Tuttavia anche la DNA polimerasi all'interno della PCR ha bisogno di Mg^{2+} per funzionare, perciò se la quantità di EDTA è troppo elevata può compromettere la reazione di PCR. Dunque viene utilizzata una versione del tampone TE con una quantità di EDTA 10 volte inferiore in modo tale da non interferire con il Mg^{2+} presente nella reazione, la *TE-low solution*. Si procede con la fase di pre-denaturazione con temperatura prossima ai $100^{\circ}C$, la quale permette di separare il doppio filamento di DNA andando a rompere i legami di idrogeno (-H) e avere così un DNA a singola elica (sDNA). Dopo aver preparato i campioni utilizzando un termociclatore impostato a $98^{\circ}C$ per 5 minuti si effettua la denaturazione, poi si ripone tutto in ghiaccio.

3.4.2 Ibridazione e ligazione

La fase successiva è quella di ibridazione: dopo aver unito agli 8 μL del prodotto della reazione di pre-denaturazione 1 μL di *HRD-hybridization buffer* e 1 μL di *HRD-probe* si trasferiscono le mix nel termociclatore impostato a 95° per 5 minuti e 60° per 2 ore.

Durante l'ibridazione la sonda si lega al DNA genomico: questa contiene un braccio di estensione e un braccio di ligazione che sono complementari alla regione del gene bersaglio. Successivamente, il DNA viene esteso partendo dal braccio di estensione arrivando al braccio di ligazione con l'aiuto della DNA polimerasi, la quale è contenuta nel 1 μL della master mix *HRD-Extension Ligation* che viene inserita direttamente nelle provette che contengono il prodotto di ibridazione. Le provette da PCR vengono riposte nuovamente nel termociclatore a $60^{\circ}C$ per 10 minuti. I bias vengono riparati per generare i prodotti circolari con l'aiuto della DNA ligasi.

3.4.3 Digestione con esonucleasi

Successivamente, le sonde lineari rimanenti, il DNA a singolo e doppio filamento vengono digeriti con l'aiuto dell'esonucleasi. In questa fase i reagenti utilizzati sono gli enzimi *HRD-esonucleasi A* e *HRD-esonucleasi B*; dopo averli scongelati e centrifugati adeguatamente si procede con la preparazione della mix per la digestione enzimatica utilizzando 11 μL del prodotto di estensione, 1.5 μL di *HRD-esonucleasi A* e 1 μL di *HRD-esonucleasi B*. Dopo aver miscelato si procede con il programma $37^{\circ}C$ per 30', $95^{\circ}C$ per 10' e poi mantenuto a $4^{\circ}C$.

3.4.4 Amplificazione

Solo il DNA circolare target viene conservato per l'amplificazione PCR, la quale viene eseguita per arricchire le librerie target. La preparazione della miscela per la reazione di amplificazione è 13.5 μL del prodotto di digestione, 25 μL di *HRD-PCR Master mix*, 1.5 μL di *HRD-N7 Primer*, 1.5 μL di *HRD-S5 Primer* e 8.5 μL di *Nuclease-free water*, per un totale di 50 μL e con programma di

amplificazione dove per 98°C per 30" si ha la fase di denaturazione, fase di amplificazione per 21 cicli a 98°C per 10", 61°C per 30" e 72°C per 20", fase di allungamento a 72°C per 5' e 4°C per ∞. I due tipi di primers hanno un index di sequenza differente per ogni singolo campione, producendo un codice unico specifico per ogni singolo paziente in modo da poter creare successivamente il pool da caricare nel sequenziatore. Durante il sequenziamento gli index vengono utilizzati per il riconoscimento del singolo campione.

3.4.5 Purifica

La purifica consiste nella rimozione di adattatori, primer per PCR, dNTPs, enzimi e altri contaminanti in maniera da consentire la selezione degli ampliconi prodotti durante l'amplificazione, i quali hanno una precisa dimensione. Perciò i metodi di purificazione devono garantire la massima resa e il recupero, riducendo al minimo la presenza di contaminanti biologici e chimici e rimuovere i frammenti di acidi nucleici o le molecole non adeguate per il sequenziamento.

Nella fase di purifica si utilizzano delle biglie magnetiche (*AMPure beads*), le quali catturano selettivamente il DNA; prima di utilizzarle è necessario agitare i flaconi contenenti le biglie molto bene in modo da rendere la soluzione omogenea.. Si vanno ad aggiungere 37 µL di biglie ai 40 µL di prodotto di amplificazione.

Successivamente si utilizza un supporto magnetico per far sedimentare le biglie che hanno legato gli ampliconi e si procede con la rimozione ed eliminazione del surnatante. Successivamente si effettuano 2 lavaggi in etanolo 80%, necessari per disidratare le biglie e si procede con l'eluizione che avviene con *TE-low solution*; a questo punto si trasferisce il surnatante che contiene la libreria di DNA in una provetta da 1.5 mL e si effettua la quantifica e valutazione del prodotto.

3.5 CONTROLLO DI QUALITA' DELLA LIBRERIA DI DNA (QC)

Le librerie vengono immediatamente quantificate con il Qubit® Fluorometer e il kit HS dsDNA Qubit®; per procedere con il sequenziamento la quantità finale delle librerie deve essere maggiore o uguale a 20 ng/µL. Se la concentrazione della libreria risulta inferiore a tale cut off, potrebbe essere dovuto alla scarsa qualità del DNA originale e a questo proposito si raccomanda di ripartire con una quantità di DNA pari a 200 ng.

Dopo la quantifica delle librerie, si procede con la qualità dove si va a misurare le dimensioni dei frammenti utilizzando il sistema "Tape Station 4200 Agilent"; il picco più alto dei frammenti di DNA dovrebbe trovarsi a circa 230-330 paia di basi. Se il picco fosse inferiore a 230-330 bp, si può pensare a una contaminazione avvenuta durante l'esperimento, questo porta a dover riallestire la libreria.

3.6 SEQUENZIAMENTO

Dopo aver superato il controllo di qualità (QC) e quantità le librerie possono essere sequenziate: nel nostro caso si utilizza la piattaforma di sequenziamento Illumina, in particolare il NextSeq 550.

Grazie al Sample Sheet, che contiene tutte le informazioni necessarie per il sequenziamento (numeri di cicli che richiede il pannello, nome campione, sequenza index), una volta terminata la corsa lo strumento genera dei FASTQ che vengono caricati nell'apposito software, il quale procede con l'analisi. Nel nostro caso i dati vengono analizzati dal sistema AmoyDx NGS (ANDAS) che ci permette di individuare le varianti genomiche nella regione target.

Prima di procedere con il sequenziamento è necessario portare tutte le librerie a una concentrazione di 4 nM, diluendole con *TE low solution*, le librerie a 4nM vengono unite in un unico pool.

Il pool deve essere denaturato e portato a una concentrazione di 1.4 pM prima di essere caricato nella cartuccia che andrà inserita nel NextSeq550. Per denaturare il pool si utilizza NaOH 0.2 N e 200 mM Tris-HCl pH 7 che serve per riequilibrare il pH della soluzione. Parallelamente al pool si procede con diluizione e denaturazione del PhiX Control, il quale sarà l'1% del pool finale di caricamento. Si carica il pool nella cartuccia, questa a sua volta viene inserita nello strumento insieme al buffer e alla flow cell e si avvia la corsa di sequenziamento.

3.7 ANALISI DEI DATI

L'intero processo di sequenziamento genera milioni di letture rappresentanti le sequenze di tutti i frammenti; le singole librerie vengono separate dal pool per mezzo degli index univoci introdotti durante la preparazione dei campioni. Una volta terminato il Sequenziamento, è stato adottato AmoyDx NGS Data System (ANDAS) per analizzare le sequenze e rilevare mutazioni dei geni *BRCA 1/2* e lo stato di HRD.

4. RISULTATI

Devono essere accertati determinati parametri affinché la corsa di Sequenziamento venga considerata valida: Q20, ossia 1 errore di chiamata ogni 100 paia di basi deve essere uguale o superiore all'85%; Q30, ossia un errore di chiamata ogni 1000 paia di basi deve essere uguale o superiore al 75%; *Coverage*, ossia la percentuale di regione target che è stata coperta dal sequenziamento deve essere maggiore del 98%; l'uniformità delle regioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* e l'uniformità degli SNPs, ossia la proporzione delle aree dei target dove la profondità di lettura è più alta del 20% rispetto alla profondità media, deve essere maggiore o uguale rispettivamente al 95 e al 90%; la profondità effettiva media delle regioni BRCA, ossia la media della profondità di tutte le singole basi nei geni *BRCA1* e *BRCA2* dopo la calibrazione delle basi nel singolo filamento di DNA, deve essere maggiore o uguale a 400x; la profondità effettiva media delle regioni degli SNPs, ossia la media della profondità di tutte le singole basi nelle regioni degli SNPs dopo la calibrazione delle basi nel singolo filamento di DNA, deve essere maggiore o uguale a 200x.

Mutazioni SNV o InDel vengono riconosciute se sono rispettate le seguenti richieste: la profondità effettiva deve essere maggiore o uguale a 100x, la frequenza delle mutazioni alleliche deve essere maggiore o uguale al 3%, la profondità della mutazione allelica (ADP) che non sia (C>T, G>A) e la mutazione *non-polymer* deve essere maggiore o uguale a 6, l'ADP di C>T, G>A e la mutazione *polymer* deve essere maggiore o uguale ad 8. Per *polymer mutation* si intendono, in questo caso, le regioni con più di 4 nucleotidi identici consecutivi.

In entrambe le corse NGS sono stati inseriti i controlli positivi, i quali, oltre a presentare mutazioni note a livello di *BRCA1* e *BRCA2* con grado di significatività rispettivamente di 5 e 4, presentano un GSS del 100%: la mutazione nel gene *BRCA1* è "NM_007294:esone20:c.5251C>T:p.(R1751*)" con una frequenza allelica del 65%, mentre la mutazione nel gene *BRCA2* è "NM_000059:esone11:c.4777G>T:p.(E1593*)" con una frequenza allelica del 20%.

Nella seconda corsa, invece, oltre al controllo positivo, è stato inserito anche un controllo Horizon (CH), ossia un controllo esterno costituito da DNA genomico che va a definire lo standard di riferimento, in maniera tale da standardizzare le corse NGS. Del CH, come per gli altri campioni che costituiscono lo studio in questione, sono state valutate le variazioni nucleotidiche rispetto a quelle di riferimento, con differenti tipi di mutazioni: 2 delezioni frameshift, 1 duplicazione frameshift, 1 mutazione intronica, 1 mutazione nonsense e 1 sostituzione non-sinonima. Le analisi del CH sono andate tutte a buon fine (PASS) e i risultati sono riportati nella Tabella 1.

Campione	Chr	Ref	Var	Profondità	Frequenza	Gene	Tipo	Significatività
CH	13	A	-	4525	33,24%	<i>BRCA2</i>	Delezione frameshift	5
CH	13	A	-	4609	40,59%	<i>BRCA2</i>	delezione frameshift	5
CH	13	-	A	695	12,37%	<i>BRCA2</i>	Duplicazione frameshift	5
CH	13	T	-	2996	24,23%	<i>BRCA2</i>	Intronica	2
CH	17	G	A	292	29,79%	<i>BRCA1</i>	Nonsense	5
CH	17	C	A	3029	7,20%	<i>BRCA1</i>	Sostituzione non-sinonima	3

Tabella I - Risultati controllo Horizon

Una mutazione frameshift è dovuta all'inserzione o la delezione di un numero di nucleotidi non divisibile per 3 e ciò comporta lo slittamento della cornice di lettura a valle della mutazione con la formazione di un codone di STOP, il quale andrà a codificare una proteina tronca che perciò non sarà in grado di svolgere la sua funzione; una mutazione nonsense, invece, si verifica quando una mutazione ad un nucleotide di una tripletta determina la trasformazione di un codone codificante un amminoacido in un codone di stop e perciò anche qui verrà prodotta una proteina tronca non funzionante; una sostituzione non sinonima è una mutazione nucleotidica che altera la sequenza amminoacidica di una proteina. Le sostituzioni non sinonime differiscono dalle sostituzioni sinonime, che non alterano le sequenze di amminoacidi e sono, per la maggior parte dei casi, mutazioni silenti.

All'interno della casistica analizzata in questo studio sono stati individuati: 2 casi con mutazione in *BRCA1*, 2 casi con mutazione in *BRCA2* e 1 caso con mutazione sia in *BRCA1* sia in *BRCA2*.

Secondo gli standard dell'Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (*International Agency of Research on Cancer*, IARC) e *American College of Medical Genetics* (ACMG) le varianti dei geni *BRCA1* e *BRCA2* possono essere suddivise in 5 classi, a cui sono stati assegnati dei gradi di significatività con un range che va da 1 a 5: variante benigna (1), variante probabilmente benigna (2), variante di significato incerto (*Variant of Uncertain Significance*, VUS) (3), variante probabilmente maligna (4) e variante maligna (5).

Per i casi analizzati il cut-off del Genomic Scar Score è impostato al 50% e perciò i campioni che presentano un GSS superiore al 50% vengono considerati positivi, se presentano un GSS inferiore al 50% vengono considerati negativi. Per quanto riguarda lo status della ricombinazione omologa, invece, i campioni che presentano sia la presenza varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche in *BRCA1* e/o *BRCA2*, sia un GSS superiore o uguale al 50% (positivo) presentano un deficit di ricombinazione omologa e perciò vengono considerati HRD-positivi. (Tabella 2)

I corsa	Chr	Gene	Mutazione	Significatività	ClinVar	COSMIC	GSS
PD_1							77,7
PD_2	17	BRCA1	exon11:c.864del;p.(S288Rfs*10);p.(Ser288ArgfsTer10)	4	-	-	98,7
PD_3							92,7
PD_4							88,3
PD_5							17,1
PD_6							4,1
PD_7							11,8
PD_8	13	BRCA2	exon11:c.2874T>C;p.(S958=);p.(Ser958=)	3	Probabilmente benigna	NA	7,2
PD_9							19
CP	13	BRCA2	exon11:c.4777G>T;p.(E1593*);p.(Glu1593Ter)	4	NA	Patogenetica	100
	17	BRCA1	exon20:c.5251C>T;p.(R1751*);p.(Arg1751Ter)	5	Patogenetica	Patogenetica	
II corsa							
PD_12	17	BRCA1	exon7:c.425C>A;p.(P142H);p.(Pro142His)	2	Benigna	Neutrale	6,5
PD_13	13	BRCA2	exon10:c.1786G>C;p.(D596H);p.(Asp596His)	3	Benigna	Patogenetica	99,3
PD_14							7,9
PD_15	13	BRCA2	exon27:c.9956C>T;p.(S3319F);p.(Ser3319Phe)	3	Interpretazioni contrastanti di patogenicità	NA	0,7
	17	BRCA1	exon11:c.1096G>T;p.(D366Y);p.(Asp366Tyr)	3	-	-	
PD_16							89,7
PD_17							50,1
PD_19							97,2
PD_20							19,3
CP	13	BRCA2	exon11:c.4777G>T;p.(E1593*);p.(Glu1593Ter)	4	NA	Patogenetica	100
	17	BRCA1	exon20:c.5251C>T;p.(R1751*);p.(Arg1751Ter)	5	Patogenetica	Patogenetica	

Tabella 2 – Risultati corse NGS

La sigla *c.* indica la sostituzione nucleotidica, mentre la sigla *p.* indica la sostituzione aminoacidica. La Sigla *Ter* sta ad indicare la formazione di un codone di stop, il quale andrà a codificare per una proteina tronca che sarà di conseguenza non funzionante.

Come si evince dai risultati (tabella 2) mutazioni di *BRCA1* e *BRCA2* con significatività 4 e 5 e quindi con un certo grado di patogenicità presentano anche un Genomic Scar Score elevato, mentre mutazioni con significatività 2 e 3 presentano un GSS inferiore al 50% e di conseguenza negativo. I dati ottenuti sono stati confrontati con 2 database che ci hanno permesso di definire se le mutazioni fossero patogenetiche oppure benigne: ClinVar e COSMIC.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella maggior parte dei tumori ovarici sierosi di alto grado si riscontrano mutazioni in *TP53*, che determinano un aumento o una perdita di funzione del suo prodotto proteico, p53, coinvolto nell'oncogenesi. Le mutazioni *BRCA* sono presenti nel 22% dei tumori ovarici sierosi di alto grado e possono essere di origine germinale (~2/3) o somatica (~1/3). Circa il 13% delle HGSOc è attribuibile a mutazioni *BRCA* germinali. Le mutazioni *BRCA* inducono instabilità del genoma a causa della perdita della riparazione del DNA attraverso la ricombinazione omologa.

Il progetto Cancer Genome Atlas (TCGA) ha descritto che il ~50% dei tumori ovarici sierosi di alto grado (HGSOc) presenta deficit ricombinazione omologa (HRD), attraverso una miriade di meccanismi sottostanti, alcuni dei quali rimangono poco definiti. Finora, le mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* sono considerate le principali responsabili dell'HRD. Tuttavia, altre cause chiave di HRD includono modifiche epigenetiche in *BRCA1/2* o mutazioni in geni che codificano altri attori chiave nella via HRR, tra cui *RAD51C/D*, *PALB2*, *ATM*, *H2AX*, *MRE11*, *RPA*, *BRIP1*, *BARD1*, *RAD51* e geni dell'anemia di Fanconi. Questo gruppo di geni è indicato collettivamente come geni HRD. [12]

Come biomarcatore, l'HRD ha un valore sia predittivo che prognostico nell'HGSOc. Gli inibitori della poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARPi) sono stati sviluppati sulla base della loro prevista letalità nel contesto delle cellule HRD-positive. La poli(ADP-ribosio) polimerasi 1 (PARP1) è un enzima con funzioni cellulari pleiotropiche, ma è noto soprattutto per il suo ruolo nella riparazione delle rotture del DNA a singolo filamento attraverso la via dell'escissione delle basi. Sulla base di ciò, l'HRD è stato identificato come potenziale biomarcatore predittivo per la terapia con PARPi nei tumori HGSOc, della mammella e della prostata. Inoltre, nel carcinoma ovarico avanzato di nuova diagnosi, punteggi HRD più elevati sono stati associati a una migliore *Progression Free Survival* (PFS), indicando un significato prognostico di questo marcatore. Olaparib è stato il primo PARPi della categoria a ricevere l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti nel 2014 per il trattamento di pazienti con carcinoma ovarico avanzato con mutazione *BRCA1/2* germinale deleteria o sospetta deleteria, trattate con tre o più linee precedenti di chemioterapia. Successivamente, i miglioramenti clinicamente significativi riportati in studi recenti hanno portato all'approvazione di PARPi da solo o in combinazione con una terapia antiangiogenetica per il trattamento di mantenimento di pazienti con carcinoma ovarico avanzato HRD-positivo (Food and Drug Administration, Agenzia Europea del Farmaco nel 2020, Agenzia Italiana del Farmaco nel 2022). [13]

Come recentemente riportato nelle raccomandazioni di consenso degli esperti europei, la valutazione del tumore *BRCA1/2* dovrebbe essere associata alla valutazione dello stato di riparazione della

ricombinazione omologa (HRR), come passo fondamentale per estendere un trattamento PARPi efficace al maggior numero di pazienti.

La sfida è come valutare la HRD nella pratica clinica di routine. Negli studi clinici PAOLA1, PRIMA e VELIA, la valutazione della HRD è stata eseguita con il test myChoiceCDx (Myriad), approvato dalla FDA, che considera lo stato BRCA1 e BRCA2 e la cicatrice genomica indotta dalla HRD. Tuttavia, questo test è eseguito a livello centrale, è costoso e non è rimborsato dal sistema sanitario nazionale. [14]

In questo lavoro, descriviamo la nostra esperienza con l'HRD Focus AmoyDx (CE-IVD) nel nostro flusso di lavoro diagnostico, concentrandoci sulla fattibilità e sull'affidabilità in un contesto diagnostico reale, valutando una serie consecutiva di carcinomi sierosi avanzati che potrebbero cambiare le loro indicazioni di trattamento. Inoltre, il tempo mediano di risposta di AmoyDx dalla richiesta del test al referto disponibile è stato di 3 giorni, un tempo significativamente inferiore a quello di Myriad, pari a 18 giorni, che è più lungo anche a causa della logistica e del trasporto.

Diversi inibitori di PARP sono già stati approvati per il trattamento di pazienti affetti da tumore al seno, alle ovaie, alla prostata e, più recentemente, al pancreas in stadio avanzato, con mutazioni BRCA germinali o somatiche. In questo contesto, l'uso dei test interni HRD può essere esteso ad altri tipi di cancro. Questi risultati molto promettenti potrebbero portare all'introduzione di test HRD sviluppati internamente in ambito accademico, ma naturalmente sono necessari strumenti NGS efficaci per eseguire questo test.

6. BIBLIOGRAFIA

1. I numeri del Cancro in Italia, AIOM, 2021
2. Linee guida Tumori dell'ovaio, AIOM, 2019
3. "Cancro dell'ovaio". Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro ETS, 2021
www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-delle-ovaie
4. Levanat S, Musani V, Cvok ML, Susac I, Sabol M, Ozretic P, Car D, Eljuga D, Eljuga L, Eljuga D. Three novel BRCA1/BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer families in Croatia. *Gene*. 2012 May 1;498(2):169-76. doi: 10.1016/j.gene.2012.02.010. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22366370
5. Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 15;22(4):735-42. doi: 10.1200/JCO.2004.05.055. PMID: 14966099
6. Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med*. 2011 Nov;12(66):445-53. PMID: 22127115
7. Frey MK, Pothuri B. Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2017 Feb 22;4:4. doi: 10.1186/s40661-017-0039-8. PMID: 28250960; PMCID: PMC5322589
8. Gonzalez D, Stenzinger A. Homologous recombination repair deficiency (HRD): From biology to clinical exploitation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2021 May;60(5):299-302. doi: 10.1002/gcc.22939. Epub 2021 Feb 10. PMID: 33486842
9. Stover EH, Fuh K, Konstantinopoulos PA, Matulonis UA, Liu JF. Clinical assays for assessment of homologous recombination DNA repair deficiency. *Gynecol Oncol*. 2020 Dec;159(3):887-898. doi: 10.1016/j.ygyno.2020.09.029. Epub 2020 Oct 2. PMID: 33012552
10. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013 Dec;98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986538; PMCID: PMC3841808
11. Mukherjee S, Huntemann M, Ivanova N, Kyrpides NC, Pati A. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by Illumina PhiX control. *Stand Genomic Sci*. 2015 Mar 30;10:18. doi: 10.1186/1944-3277-10-18. PMID: 26203331; PMCID: PMC45115567
12. "The Cancer Genome Atlas program (TCGA)", 2019

13. “The role of homologous recombination deficiency testing in ovarian cancer and its clinical implications: do we need it?”. Elsevier Ltd a nome della Società Europea di Oncologia Medica, 17 Maggio 2021 [https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029\(21\)00103-4/fulltext](https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029(21)00103-4/fulltext)
14. Fumagalli, C., Betella, I., Ranghiero, A., Guerini-Rocco, E., Bonaldo, G., Rappa, A., Vacirca, D., Colombo, N. and Barberis, M. 2022. In-house testing for homologous recombination repair deficiency (HRD) testing in ovarian carcinoma: a feasibility study comparing AmoyDx HRD Focus panel with Myriad myChoiceCDx assay. *Pathologica - Journal of the Italian Society of Anatomic Pathology and Diagnostic Cytopathology*. 114, 4 (Sep. 2022), 288-294. DOI: <https://doi.org/10.32074/1591-951X-791>