

OncoNext™ RISK – PGL/PCC

Cos'è il tumore?

Il **tumore**, oggi, può essere considerato una patologia a componente genetica caratterizzata da una crescita cellulare incontrollata. Le cellule del nostro corpo ricevono dei segnali che indicano loro quando crescere e moltiplicarsi e quando tale crescita deve arrestarsi. Nel tumore tali cellule, a causa di alterazioni del proprio patrimonio genetico, non rispondono ai segnali di controllo e crescono e si moltiplicano irregolarmente diffondendosi in diverse parti del corpo.

L'evento che determina l'alterazione della funzione dei geni viene definito "**mutazione**". Quando un gene subisce una mutazione per varie cause (biologiche, chimiche, fisiche), le informazioni che arriveranno alla cellula saranno improprie per le funzioni a cui è deputata.

I tumori sono ereditari?

Le neoplasie sono per lo più patologie multifattoriali alla cui insorgenza partecipano fattori di rischio di tipo costituzionale e ambientale. La maggior parte dei tumori sono cosiddetti "**sporadici**", cioè si manifestano nella popolazione generale senza che ci siano elementi che facciano sospettare la presenza di un chiaro fattore predisponente su base genetica. In questo genere di tumori, le **alterazioni del DNA (mutazioni)** si sviluppano casualmente a livello delle cellule somatiche, cioè quelle cellule che costituiscono ogni organo ed apparato del nostro organismo. Queste mutazioni si originano nel DNA di un ristretto gruppo di cellule e determineranno l'errore genetico che si perpetuerà nelle discendenti di quelle cellule, le quali accumulandosi in un determinato organo si sostituiranno inizialmente al tessuto sano per poi diffondersi in altri organi vicini o a distanza (metastasi).

Esistono però delle forme di tumore che possono essere definite "**familiari**", in quanto le persone affette della famiglia presentano fra di loro uno stretto legame di parentela. La familiarità costituisce, senz'altro, un importante fattore di rischio, per lo più dovuto alla condivisione di fattori di rischio ambientali comuni (abitudini di vita, dieta, inquinanti, etc.), senza che vi sia una specifica alterazione genetica predisponente alla malattia.

Solo una piccola, anche se significativa, percentuale dei tumori sono cosiddetti "**ereditari**". Oggi si stima che circa il **10 % dei tumori colon-rettali** abbiano una componente **ereditaria**. In questi tumori le mutazioni del DNA insorgono a livello delle cellule germinali o riproduttive e quindi potranno essere trasmesse alla progenie. L'individuo avrà alla nascita quel difetto genetico su uno o più geni in tutte le cellule dell'organismo, e sarà quindi predisposto a sviluppare una neoplasia quando, nel corso della vita, altre mutazioni si sommeranno a quella predisponente.

Ogni persona all'atto del suo concepimento, acquisisce due copie di ciascun gene, una copia viene trasmessa dal padre ed una dalla madre: eventuali alterazioni geniche presenti nel patrimonio genetico dei genitori verranno pertanto trasmesse ai figli. Se uno dei genitori presenta una mutazione a livello di uno dei geni coinvolti nell'insorgenza di un determinato tumore (ereditario), **i figli possiedono il 50% di probabilità di ereditare quella mutazione**. Le persone che ereditano una mutazione germinale in questi geni nascono con una copia del gene mutata. Queste persone **non ereditano il tumore, ma solamente la predisposizione a sviluppare più facilmente quel tumore** rispetto alla popolazione generale.

Il test OncoNext™ Risk PGL/PCC

OncoNext™ Risk PGL/PCC è un test diagnostico, sviluppato da GENOMA Group, che permette di eseguire un'analisi genetica multipla **per valutare la predisposizione allo sviluppo del Paraganglioma e Feocromocitoma**. Il test, quindi, permette di identificare i pazienti a rischio di insorgenza della suddetta neoplasia attraverso l'analisi del loro DNA.

Per chi è indicato il test OncoNext™ Risk PGL/PCC?

Il test di predisposizione genetica è indirizzato a quelle persone che ad una approfondita anamnesi familiare risultano con elevata e specifica incidenza di malattie neoplastiche nelle generazioni precedenti, e pertanto ad elevato rischio di essere portatori di mutazione germinale.

Si può sospettare una forma ereditaria di neoplasia quando in una famiglia vi sono:

- diversi soggetti affetti dallo stesso tipo di tumore o tumori correlati,
- soggetti affetti da tumori multipli,
- tumori insorti in età giovanile.

Lo specialista, con il consenso informato della persona, deciderà se è indicato procedere con il test diagnostico di mutazione del DNA.

Quali sono i benefici del test OncoNext™ Risk PGL/PCC?

La possibilità di individuare i soggetti a rischio di sviluppare una neoplasia rappresenta oggi il miglior metodo per giungere ad una diagnosi precoce del tumore e quindi per ridurre la mortalità in tale patologia.

I membri di famiglie ad alto rischio ereditario, ed in particolare chi è stato interessato direttamente da una neoplasia, può richiedere una consulenza genetica e discutere con il genetista circa la propria situazione clinico-genetica. Tale valutazione potrà promuovere il test genetico per accertare se il paziente è portatore di una mutazione che predispone allo sviluppo di un tumore specifico.

In caso di positività del test l'accertamento potrà essere esteso ai familiari del paziente, al fine di individuare i soggetti a rischio.

L'informazione ottenuta dal test genetico può apportare notevoli **benefici**, quali:

- L'identificazione dei membri di una famiglia che sono ad **alto rischio di sviluppare il tumore**;
- L'organizzazione di un adeguato **programma di controllo medico** riservato ai soggetti ad alto rischio, in maniera tale da facilitare la diagnosi precoce all'insorgenza del tumore;
- La conoscenza della possibilità di **trasmissione delle mutazioni geniche** alla progenie e l'individuazione dei soggetti figli, con mutazioni geniche germinali, ad alto rischio;
- La valutazione di eventuali indicazioni a terapie di **profilassi preventiva**.

Come viene effettuato il test OncoNext™ Risk PGL/PCC?

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA viene isolato dalle cellule nucleate ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento massivo parallelo (MPS)**, che impiega tecniche di **Next Generation Sequencing (NGS)** utilizzando sequenziatori **ILLUMINA**, si sequenziano completamente, ad elevata profondità di lettura, **12 geni** (esoni e regioni introniche adiacenti, ± 5 nucleotidi) (Tabella 1) coinvolti nella maggior parte dei casi di predisposizione ereditaria allo sviluppo del **Paraganglioma e Feocromocitoma**:

FH, MAX, MEN1, NF1, RET, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, TMEM127, VHL.

Le sequenze geniche ottenute vengono analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per determinare la presenza di eventuali mutazioni nei geni in esame.

Risultati ottenibili con il test OncoNext™ Risk PGL/PCC

"POSITIVO" – Presenza di una o più mutazioni: indica che il test ha rilevato una o più mutazioni a livello di uno (o più) geni responsabile della predisposizione ereditaria allo sviluppo del del tumore al Colon-retto o della Poliposi Adenomatosa Familiare, cioè presentano una copia del gene mutata. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, fornendo una stima in termini probabilistici riguardo il rischio di sviluppare il tumore specifico, associato a quel tipo di mutazione riscontrata in un particolare gene.

Un risultato positivo non significa che il paziente ai cui è stata riscontrata una mutazione svilupperanno necessariamente il tumore, ma solamente che quel paziente ha una **predisposizione a sviluppare il tumore**, cioè possiede un **rischio**

maggiore rispetto ad una persona che non presenta la specifica mutazione. Infatti, non tutte le persone che sono portatrici di mutazione sviluppano la patologia neoplastica; sebbene queste mutazioni aumentano notevolmente il rischio di insorgenza del tumore, questo non si sviluppa finché la copia normale del gene corrispondente non viene soggetta a mutazione nel corso della vita.

Poiché ciascuna persona eredita due copie dello stesso gene, deve incorrere un evento mutazionale in ciascuna copia per sopprimere la funzione di quel gene; l'acquisizione di una nuova mutazione può quindi provocare direttamente l'insorgenza del tumore. L'identificazione di una mutazione predisponente permette di stabilire un protocollo di controlli clinici ravvicinati e di valutare l'opportunità di interventi preventivi. Permette inoltre di estendere l'esame ad altri familiari a rischio che desiderino eseguirlo. In questi ultimi l'analisi ha valore di test predittivo, perché consente di distinguere, all'interno di queste famiglie, i soggetti portatori della mutazione dai non portatori, identificando con precisione gli individui che presentano un elevato rischio di tumore e coloro il cui rischio è paragonabile a quello della popolazione generale. In questo modo, i primi potranno essere avviati in maniera mirata a specifici programmi di sorveglianza, al fine di una diagnosi precoce, o di profilassi, mentre i secondi potranno essere indirizzati ai controlli previsti per la popolazione generale.

Le mutazioni riscontrabili tramite il test **OncoNext™ Risk PGL/PCC** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

- **con significato patologico noto;**
- **con significato benigno** in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico;
- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

“NEGATIVO” - Assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati. Tuttavia è importante sottolineare che un risultato negativo non significa che il paziente ha rischio zero di sviluppare un tumore; queste persone possiedono lo stesso rischio di tumore riportato per la popolazione generale, ciò perché la maggior parte di questo genere di tumori si estrinseca in forma sporadica.

Parametri utilizzati per la refertazione delle varianti genetiche

L'analisi è mirata esclusivamente ai geni elencati in Tabella 1. Verranno refertate solo le mutazioni classificate come a significato patogenetico noto o con significato incerto, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nel database di riferimento Human Gene Mutation Database (HGMD), aggiornato alla data del prelievo. Inoltre, seguendo le

indicazioni dell'American College of Medical Genetics (ACMG), sono state considerate come patogenetiche o presunte patogenetiche solo le mutazioni con un valore di Minor Allele Frequency (MAF) <5% (1000 Genomes Project), riferibile come la frequenza di ricorrenza dell'allele meno comune all'interno della popolazione.

Target Coverage

Si intende per *Target Coverage*, il numero medio di letture (*reads*) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. Le varianti con una profondità di lettura (numero di *reads*) inferiore a 30X non vengono evidenziate dall'algoritmo di analisi bioinformatica.

Accuratezza del test OncoNext™ Risk PGL/PCC

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99%. Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

Limiti del test OncoNext™ Risk PGL/PCC

Questo esame valuta solo i geni elencati in Tabella 1, e non è in grado di evidenziare:

- mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre ± 5 nucleotidi dai breakpoints;
- delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 20 bp;
- mosaicismi della linea germinale (cioè mutazioni presenti solo nei gameti).

Un risultato "**NEGATIVO**" - **Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità di essere portatori di una mutazione localizzata in una regione del genoma non investigata dall'esame.

E' possibile che alcune zone del proprio DNA non possano essere sequenziate o che abbiano una copertura inferiore ai limiti fissati dagli esperti di GENOMA Group per garantire un'analisi accurata delle varianti. Queste regioni non saranno quindi comprese nell'analisi qualora non superino gli standard qualitativi richiesti.

In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.

L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.

Alcune patologie possono essere causate o regolate da più di una variante nel suo DNA in uno o più geni. Alcune di queste varianti possono non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.

Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di coverage per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.

Riferimenti Bibliografici

1. Fishbein L, Nathanson KL. Pheochromocytoma and paraganglioma: understanding the complexities of the genetic background. *Cancer genetics*. 2012;205(1-2):1-11.
2. Welander J, Soderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-Related Cancer*. 2011;18(6):R253-76.
3. DeLellis RA. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon, France: IARC Press; 2004.
4. Fishbein L, *et al*. Inherited mutations in pheochromocytoma and paraganglioma: why all patients should be offered genetic testing. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20(5):1444-50.
5. Mannelli M, *et al*. Clinically guided genetic screening in a large cohort of Italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1541-7.
6. Mannelli M, *et al*. Subclinical phaeochromocytoma. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(4):507-15.
7. Gardie B, *et al*. Novel *FH* mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J Med Genet*. 2011;48(4):226-34.
8. Barrisford GW, *et al*. Familial renal cancer: molecular genetics and surgical management. *International Journal of Surgical Oncology*. 2011;2011:658767.
9. Coleman JA, Russo P. Hereditary and familial kidney cancer. *Current Opinion in Urology*. 2009;19(5):478-85.
10. Rini BI, Campbell SC, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*. 2006;18(3):289-96.
11. Castro-Vega LJ, *et al*. Germline mutations in *FH* confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet*. 2014;23(9):2440-6.
12. Clark GR, *et al*. Germline *FH* mutations presenting with pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10):E2046-50.
13. Comino-Mendez I, *et al*. Exome sequencing identifies *MAX* mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2011;43(7):663-7.
14. Hannan FM, *et al*. Familial isolated primary hyperparathyroidism caused by mutations of the *MEN1* gene. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2008;4(1):53-8.
15. Machens A, *et al*. Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers. *Clinical Endocrinology*. 2007;67:613-22.
16. Thakker RV, *et al*. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(2990-3011):2990.
17. Carty SE, *et al*. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery*. 1998;124(6):1106-14.
18. Gibril F, *et al*. Prospective study of thymic carcinoids in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1066-81.
19. Marx SJ, *et al*. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Ann Intern Med*. 1998;129:484-94.
20. Waldmann J, *et al*. Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening. *Langenbecks Arch Surg*. 2007;392:437-43.
21. Chandrasekharappa SC, *et al*. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science*. 1997;276:404-7.
22. Eng C, *et al*. The relationship between specific *RET* proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET Mutation Consortium analysis. *JAMA*. 1996;276(19):1575-9.
23. Carney JA, Stratakis CA. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Genet*. 2002;108(2):132-9.
24. Ricketts C, *et al*. Germline *SDHB* mutations and familial renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(17):1260-2.
25. Vanharanta S, *et al*. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of *SDHB*-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):153-9.

26. Ricketts CJ, *et al.* Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in *SDHB* and *SDHD*. Hum Mutat. 2010;31(1):41-51.
27. Baysal BE. Mitochondrial complex II and genomic imprinting in inheritance of paraganglioma tumors. Biochim Biophys Acta. 2013;1827(5):573-7.
28. Hao HX, *et al.* *SDH5*, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. Science. 2009;325(5944):1139-42.
29. Kunst HP, *et al.* *SDHAF2 (PGL2-SDH5)* and hereditary head and neck paraganglioma. Clin Cancer Res. 2011;17(2):247-54.
30. Ni Y, *et al.* Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. Am J Hum Genet. 2008;83(2):261-8.
31. Neumann HP, *et al.* Germline mutations of the *TMEM127* gene in patients with paraganglioma of head and neck and extraadrenal abdominal sites. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(8):E1279-82.
32. Lonser RR, *et al.* von Hippel-Lindau disease. Lancet. 2003;361(9374):2059-67.
33. Lenders JWM, *et al.* Pheochromocytoma and paraganglioma: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99:1915-42.
34. Mu W, *et al.* Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. J Mol Diagn. 2016. 18(6):923-932.

Tabella 1:

OncoNext™ **RISK PGL/PCC:** Elenco dei geni analizzati e delle patologie neoplastiche correlate

	DISEASE NAME	PhenoMIM	GENE
1	Leiomyomatosis and renal cell cancer Kidney, leiomyomas	150800	FH
2	Pheochromocytoma, susceptibility to	171300	MAX
3	Multiple endocrine neoplasia 1	131100	MEN1
4	Neurofibromatosis, type 1 Paraganglioma / Pheochromocytoma, neurofibromas, Gastrointestinal stromal tumor, breast, CNS, optic glioma	162200	NF1
5	Medullary thyroid carcinoma Multiple endocrine neoplasia IIA Multiple endocrine neoplasia IIB Pheochromocytoma Hirschsprung disease, susceptibility to, 1	155240 171400 162300 171300 142623	RET
6	Paragangliomas 5	614165	SDHA
7	Paragangliomas 2	601650	SDHAF2
8	Paragangliomas 4 Gastrointestinal stromal tumor Paraganglioma and gastric stromal sarcoma Pheochromocytoma	115310 606764 606864 171300	SDHB
9	Paragangliomas 3 Gastrointestinal stromal tumor Paraganglioma and gastric stromal sarcoma	605373 606764 606864	SDHC
10	Carcinoid tumors, intestinal Paraganglioma and gastric stromal sarcoma Paragangliomas 1, with or without deafness Pheochromocytoma	114900 606864 168000 171300	SDHD
11	Pheochromocytoma, susceptibility to	171300	TMEM127
12	von Hippel-Lindau syndrome Erythrocytosis, familial, 2 Pheochromocytoma Renal cell carcinoma, somatic	193300 263400 171300 144700	VHL