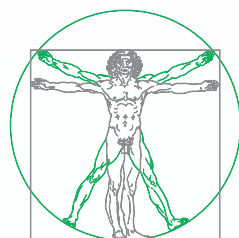




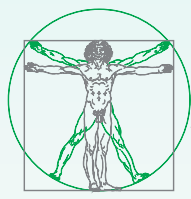
ONCOREVOLUTION¹⁷⁰
Revolution Oncology Diagnostics

Relazione Tecnica



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA



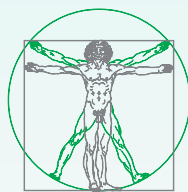
Il laboratorio della **AMES Centro Polidiagnostico Strumentale S.r.l.** il cui amministratore unico è il dott. Antonio Fico; è sito in Casalnuovo di Napoli ed è divenuto nel corso degli anni un centro diagnostico ad elevata specializzazione di rilevanza nazionale.

Il **Centro AMES** nasce nel 1996 come laboratorio di analisi di biochimica clinica per allargare la gamma dei servizi offerti alla medicina del lavoro ed alle analisi ambientali. Nell'ultimo quinquennio l'azienda ha investito in maniera consistente nel settore della genetica medica, diretto dal dott. Giovanni Savarese, divenendo in breve tempo presidio di riferimento per esami ad alta tecnologia, espletando attività di analisi genetiche, citogenetiche e molecolari di elevata specializzazione, con l'obiettivo di fornire un servizio completo capace di soddisfare le più diverse esigenze in campo diagnostico.

I continui investimenti nel settore della genetica medica pongono il **Centro AMES** all'avanguardia a livello nazionale ed internazionale e lo rendono il principale centro di riferimento per tutto il Mezzogiorno.

La nuova divisione dedicata all'oncologia messa a disposizione dal **Centro AMES** comprenderà tutti i test utili alla gestione del paziente oncologico e del paziente ad alto rischio. È noto che le patologie tumorali sono spesso dovute a mutazioni genetiche, ed oggi conoscere le alterazioni del DNA tumorale è di fondamentale importanza per una diagnosi precoce e per la scelta della giusta terapia. In questi ultimi anni, infatti, l'individuazione di un numero crescente di biomarcatori predittivi di risposta a specifici trattamenti con farmaci biologici antineoplastici ha modificato notevolmente i protocolli oncologici. Una delle patologie tumorali che, con l'introduzione nella pratica clinica degli inibitori tirosino-chinasici (TKI) anti-EGFR, ha beneficiato maggiormente di tale rivoluzione farmacologica è l'adenocarcinoma polmonare in fase metastatica. Alla data attuale, l'oncologo può stabilire il trattamento solo dopo che sia stato definito lo stato mutazionale di due importanti marcatori EGFR e ALK predittivi di risposta, ma in un prossimo futuro sarà richiesto anche l'assetto genetico di altri marcatori quali ROS1, BRAF, HER2, KRAS ed altri ancora. Il laboratorio di Genetica Medica del **Centro AMES** ha sviluppato librerie di geni e "pannelli" diagnostici, avendo considerato le esigenze dei pazienti che si rivolgono a noi. I Pannelli di oncologia disponibili riguardano l'analisi dei principali geni mutati più frequentemente nei tumori solidi. Questo tipo di indagine è estremamente utile per completare il quadro diagnostico, a scopo prognostico e nel monitoraggio della malattia minima residua.

In particolare il **Centro AMES** mette a disposizione dei suoi pazienti due tipi di pannelli il TrusightTumor 15 e il TrusightTumor 170. Il primo permette di analizzare 15 geni (AKT1, GNA11, NRAS, BRAF, GNAQ, PDGFRA, EGFR, KIT, PIK3CA, ERBB2, KRAS, RET, FOXL2, MET, TP53) associati a tumori solidi ed è ottimizzato per l'analisi su tessuti tumorali fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Il Trusight 170 è un pannello molto più ampio che consente l'analisi simultanea di DNA e RNA coprendo un ampio range di geni (170) e varianti. L'analisi viene effettuata in NGS (Next Generation Sequencing) su sequenziatore Illumina NovaSeq6000, una nuova tecnologia che consente, grazie alla produzione di miliardi di sequenze di DNA in forma di corti frammenti, di costruire una mappa dei geni coinvolti in numerose patologie, di verificare la predisposizione a diversi tumori es. (BRCA1- BRCA2 per la predisposizione al carcinoma mammario e ovarico), nonché di analizzare la presenza di mutazioni associate ai più frequenti tipi di tumori. Il sequenziatore NovaSeq6000 di Illumina ha determinato una rivoluzione nella genetica medica sia dal punto di vista diagnostico che di ricerca scientifica applicata all'identificazione di nuovi geni malattia. Rapidità, affidabilità e costi limitati sono i vantaggi peculiari di questa tecnica che consente l'analisi in parallelo di numerosi geni. Il sistema NovaSeq6000 integra le caratteristiche delle precedenti piattaforme di Illumina con addizionali innovazioni, rendendolo capace di produrre un output di 6 Tb con 20 milioni di reads in circa due giorni.



TruSight 170

Il cancro rappresenta la principale causa di morte in tutto il mondo e può potenzialmente svilupparsi in qualsiasi tessuto. Comprendere i meccanismi genetici alla base dello sviluppo tumorale è importante sia per prevedere la progressione tumorale sia per mettere a punto nuovi metodi di diagnosi e trattamento. Sebbene, ad oggi sono stati identificati numerosi geni coinvolti nello sviluppo e nella progressione tumorale, la maggior parte dei tumori è eterogeneo dal punto di vista genetico, ossia presenta mutazioni multiple in geni diversi. Inoltre, la funzione genica può essere alterata da vari tipi di mutazioni che comprendono: variazioni di singolo-nucleotide (SNVs), variazioni di nucleotide-multiple (MNVs), piccole inserzioni o delezioni, amplificazioni, varianti di splicing e fusione di geni. Tutto ciò rende estremamente difficile l'analisi tumorale ed i metodi attualmente disponibili sono in grado di coprire solo una parte di queste mutazioni. Illumina ha sviluppato un test che utilizza la tecnica Next Generation Sequencing (NGS) per analizzare contemporaneamente 170 geni associati a tumori solidi (TruSight 170). Il test permette di analizzare simultaneamente DNA e RNA e di coprire un ampio range di geni e di varianti. Tutti i geni e le varianti analizzate sono state selezionate sulla base delle linee guida fornite da organizzazioni internazionali, quali il National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO). Il test permette di analizzare, in particolare, 55 geni maggiormente coinvolti in meccanismi di fusione ed alterazioni dello splicing, 151 geni coinvolti in mutazioni di singolo-nucleotide e 59 geni maggiormente sottoposti ad amplificazioni, coprendo così tutte le mutazioni che più frequentemente sono coinvolte nella carcinogenesi (Tabella 1).

SNVs and Indels (from DNA)

AKT1	BRIP1	CREBBP	FANCI	FGFR2	JAK3	MSH3	PALB2	RAD51B	TET2
AKT2	BTK	CSF1R	FANCL	FGFR3	KDR	MSH6	PAX3	RAD51C	TMPRSS2
AKT3	CARD11	CTNBN1	FBXW7	FGFR4	KIT	MTOR	PAX7	RAD51D	TP53
ALK	CCND1	DDR2	FGF1	FLT1	KMT2A(MLL)	MUTYH	PDGFRA	RAD54L	TSC1
APC	CCND2	DNMT3A	FGF2	FLT3	KRAS	MYC	PDGFRB	RB1	TSC2
AR	CCNE1	EGFR	FGF3	FOXL2	MAP2K1	MYCL1	PIK3CA	RET	VHL
ARID1A	CD79A	EP300	FGF4	GEN1	MAP2K2	MYCN	PIK3CB	RICTOR	XRCC2
ATM	CD79B	ERBB2	FGF5	GNA11	MCL1	MYD88	PIK3CD	ROS1	
ATR	CDH1	ERBB3	FGF6	GNAQ	MDM2	NBN	PIK3CG	RPS6KB1	
BAP1	CDK12	ERBB4	FGF7	GNAS	MDM4	NF1	PIK3R1	SLX4	
BARD1	CDK4	ERCC1	FGF8	HNF1A	MET	NOTCH1	PMS2	SMAD4	
BCL2	CDK6	ERCC2	FGF9	HRAS	MLH1	NOTCH2	PPP2R2A	SMARCB1	
BCL6	CDKN2A	ERG	FGF10	IDH1	MLL3	NOTCH3	PTCH1	SMO	
BRAF	CEBPA	ESR1	FGF14	IDH2	MPL	NPM1	PTEN	SRC	
BRCA1	CHEK1	EZH2	FGF23	INPP4B	MRE11A	NRAS	PTPN11	STK11	
BRCA2	CHEK2	FAM175A	FGFR1	JAK2	MSH2	NRG1	RAD51	TERT	

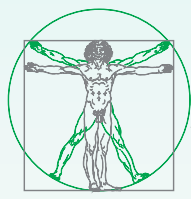
Amplifications (from DNA)

AKT2	BRCA2	CHEK1	ERCC2	FGF5	FGF14	FGFR4	MDM4	NRG1	RAF1
ALK	CCND1	CHEK2	ESR1	FGF6	FGF19	JAK2	MET	PDGFRA	RET
AR	CCND3	EGFR	FGF1	FGF7	FGF23	KIT	MYC	PDGFRB	RICTOR
ATM	CCNE1	ERBB2	FGF2	FGF8	FGFR1	KRAS	MYCL1	PIK3CA	RPS6KB1
BRAF	CDK4	ERBB3	FGF3	FGF9	FGFR2	LAMP1	MYCN	PIK3CB	TFRC
BRCA1	CDK6	ERCC1	FGF4	FGF10	FGFR3	MDM2	NRAS	PTEN	

Fusions and Splice Variants (from RNA)

ABL1	BRAF	EML4	ETV4	FGFR4	KIF5B	MYC	NTRK2	PIK3CA	TMPRSS2
AKT3	BRCA1	ERBB2	ETV5	FLI1	KIT	NOTCH1	NTRK3	PPARG	
ALK	BRCA2	ERG	EWSR1	FLT1	KMT2A(MLL)	NOTCH2	PAX3	RAF1	
AR	CDK4	ESR1	FGFR1	FLT3	MET	NOTCH3	PAX7	RET	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL3	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	

Tabella 1: Geni e varianti analizzate con TruSight 170



Come funziona il test

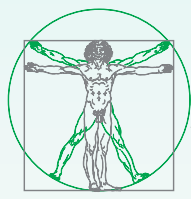
Trusight 170 offre un metodo di analisi integrato per identificare le più comuni varianti somatiche riscontrate nei tumori solidi. Il test sfrutta una tecnologia che permette di ottenere una library mediante un metodo di arricchimento di sequenze, partendo da DNA o RNA che possono essere estratti simultaneamente dallo stesso campione. Uno step iniziale prevede la frammentazione del DNA genomico, i frammenti ottenuti sono modificati in modo da ottenere librerie sequenziabili. Il metodo di arricchimento consiste nell'ibridizzare le regioni di interesse con sonde biotilate, che vengono catturate su beads magnetiche ricoperte di streptoavidina ed, infine, eluite per arricchire il pool della libreria. Le librerie così ottenute vengono quindi raggruppate e sequenziate (Figura 1). Questo permette di migliorare sensibilmente l'affidabilità dei dati ottenuti.

Figura 1: Schema del Workflow di Trusight 170



www.centroames.it

PI: 02992591212 - Reg. Imp. di Napoli 01730460639 - N. REA 316414



Sensibilità e affidabilità nella detection delle varianti

Il punto di forza del test Tumor170 è rappresentato dalla possibilità di ottenere una copertura completa di tutte le regioni targets indagate, permettendo così di identificare le mutazioni somatiche con un tasso di Mutant Allele Frequency inferiore al 5% ed una sensibilità e specificità > 95%. (Tabella 2)

Parameter	Details
System	NextSeqor HiSeq2500 System
PanelSize	533 kb DNA 358 kb RNA
Minimum Insert Size	79 bp DNA 63 bp RNA
DNA Input Requirement	40 ng total
RNA Input Requirement	40 ng total
LibraryPreparationTime	32 hours
Sequence Run Time	24 hours (NextSeqSystems)or 27 hours (HiSeq2500 System)
Sequence Run	2 101 cycles
Kit Size	24 samples(both DNA and RNA)
Sample Throughput	8 samplesper run (NextSeqSystems)or 6 samplesper rapid run (HiSeq2500 System)
Sensitivity	5% Mutant AlleleFrequency > 95% sensitivityand specificity

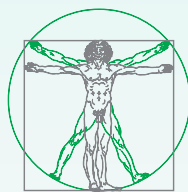
Tabella 2: Specifiche tecniche

Alta copertura di targets provenienti da campioni di bassa qualità

Il DNA estratto da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) spesso non è idoneo all'esecuzione di test molecolari. Il TruSight 170 grazie alla formazione di librerie sulla base di frammenti di piccole dimensioni (79 bp per il DNA e 63 bp per l'RNA) permette di ottenere un'analisi affidabile anche quando la qualità degli acidi nucleici è bassa.

Affidabilità nell'identificare varianti a bassa frequenza in campioni di bassa ed alta qualità

Il test è efficace nell'identificare anche varianti a bassa frequenza in campioni sia di alta che bassa qualità. (Tabella 3)



Gene	Mutation	Reported Frequency	Detected Frequency	Coverage
APC	R2714C	0.33	0.31	2547
ARID1A	P1562fs	0.34	0.31	419
BRAF	V600E	0.10	0.11	2282
BRCA2	A1689fs	0.33	0.30	1097
EGFR	G719S	0.24	0.22	2207
EP300	K291fs	0.08	0.06	1359
FBXW7	G667fs	0.34	0.30	2870
FGFR1	P150L	0.08	0.08	1102
FLT3	S985fs	0.10	0.10	1925
FLT3	V197A	0.12	0.10	1908
IDH1	S261L	0.10	0.09	2052
KIT	D816V	0.10	0.15	1239
KRAS	G13D	0.15	0.14	1507
KRAS	G12D	0.06	0.07	1503
MET	V237fs	0.06	0.06	3700
MLH1	L323M	0.08	0.09	1725
NF1	L626fs	0.08	0.10	1270
NOTCH1	P668S	0.32	0.32	1637
NRAS	Q61K	0.12	0.14	1824
PDGFRA	G426D	0.34	0.29	2018
PI3KCA	E545K	0.09	0.16	773
PI3KCA	H1047R	0.18	0.15	1694

Tabella 3: Piccole varianti caratterizzate da linee cellulari

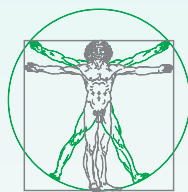
In questa tabella sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi del DNA estratto dalla linea cellulare HD200 fissata in formalina contenente varianti note. Con il test TruSight 170 e sequenziamento con NextSeq500 è stato ottenuto il 100% di concordanza fra la frequenza attesa e quella osservata.

Affidabilità nell'identificare Amplificazioni, Fusioni e Varianti di Splicing in campioni di FFPE

TruSight 170, inoltre, combina la sensibilità dei sistemi di sequenziamento Illumina con una nuova piattaforma di software capace di rilevare amplificazioni, fusioni e varianti di splicing. (Tabella 4 e 5)

Sample	Reported Mutation	Detected Mutation	Detected Frequency	Coverage
FFPE_Colon	TP53R158C	TP53R158C	0.057	1545
FFPE_Bone	TP53P72R	TP53P72R	0.059	515
FFPE_Brain1	PIK3CAE545G	PIK3CAE545G	0.078	289
FFPE_Brain2	PIK3CA H1047R	PIK3CAH1047R	0.076	531
FFPE_Breast	KRASG12D	KRASG12D	0.049	1671
FFPE_Lung1	KRASG12D	KRASG12D	0.059	575
FFPE_Lung2	TP53C242F	TP53C242F	0.080	691
FFPE_Skin	TP53R248Q	TP53R248Q	0.050	1240

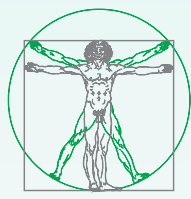
Tabella 4: Rilevamento delle varianti di piccole dimensioni con campioni di tumore in paraffina FFPE



Sample	Reported Amplification	Reported Amplification Level	Detected Amplification	Detected Amplification Level
FFPE_ Bone	<i>FGF19</i>	1.4	<i>FGF19</i>	2.9
FFPE_ Brain2	<i>PDGFRA</i>	2.3	<i>PDGFRA</i>	2.9
FFPE_ Breast	<i>RPS6KB1</i>	2.4	<i>RPS6KB1</i>	2.4
FFPE_ Colon	<i>BRCA2</i>	2.2	<i>BRCA2</i>	2.0
FFPE_ Lung1	<i>PIK3CA</i>	2.4	<i>PIK3CA</i>	2.7
FFPE_ Lung2	<i>FGFR1</i>	2.4	<i>FGFR1</i>	2.9
FFPE_ Lung3	<i>MYC</i>	2.2	<i>MYC</i>	2.8
FFPE_ Lung4	<i>CCNE1</i>	2.1	<i>CCNE1</i>	2.2
FFPE_ Lung5	<i>EGFR</i>	2.2	<i>EGFR</i>	4.5
FFPE_ Lung6	<i>CCND1</i>	2.3	<i>CCND1</i>	2.9
FFPE_ Stomach 1	<i>CDK6</i>	2.3	<i>CDK6</i>	1.7
FFPE_ Stomach 2	<i>MET</i>	1.5	<i>MET</i>	1.4

Tabella 5: Amplificazione ottenuta con campioni di tumore in paraffina FFPE

In tabella 4 e 5 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi effettuata su FFPE con TruSight 170 e sequenziamento con NextSeq500 System. Su tutti i campioni è stato ottenuto il 100% di concordanza tra il risultato riportato e quello ottenuto.



Report TruSight 170

Il risultato ottenuto dall'analisi mediante TruSight Tumor 170 viene visualizzato sotto forma di file BCL che rappresenta i dati grezzi associati ai campioni sequenziati. Questi dati vengono elaborati attraverso sofisticati processi bioinformatici e convertiti in file di output vcf per ciascun campione analizzato. Un software esegue un'analisi di tutte le pubblicazioni scientifiche presenti in letteratura e nei database di oncologia ed in base a questi dati elabora un cancer genome report. In questo report vengono visualizzate tutte le sorgenti da cui sono stati estrapolati i dati. (Figura 1)

Annotation sources

The annotated variants are based on the following underlying tools and knowledge resources:

- VEP v90 - Variant Effect Predictor release 90 (GENCODE v27 as the gene reference dataset)
- dbNSFP - database of non-synonymous functional predictions (v3.4 (March 2017))
- TCGA - The Cancer Genome Atlas (release 9.0 (October 24th 2017))
- gnomAD - germline variant frequencies exome-wide (March 2017)
- dbSNP - database of short genetic variants (build 147 (April 2016))
- 1000Genomes - germline variant (phase 3 (20130502))
- ClinVar - database of clinically related variants (November 2017 (20171102))
- DoCM - database of curated mutations (v3.2 (April 2016))
- CIVIC - clinical interpretations of variants in cancer (November 11th 2017)
- CBMDB - Cancer Biomarkers database (November 11th 2017)
- IntOGen catalog of driver mutations - (2016.05)
- DisGeNET - Database of gene-disease associations (v5.0 (May 2017))
- Cancer Hotspots - a resource for statistically significant mutations in cancer (2016)
- UniProt/SwissProt KnowledgeBase - resource on protein sequence and functional information (release 2017_10)
- Pfam - database of protein families and domains (v31.0 (March 2017))
- DGIdb - database of targeted antineoplastic drugs (v3.0 (September 2017))
- TSGene - tumor suppressor/oncogene database (v2.0 (2016))
- KEGG pathways - KEGG pathway database (September 29th 2017)

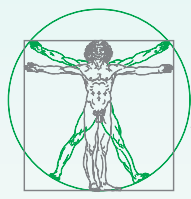
Le variazioni di singolo nucleotide (SNVs), le inserzioni e le delezioni riscontrate nel DNA oggetto di esame e comparate al DNA controllo, vengono riportate e catalogate in base al loro significato genico. (Figura 2)

Somatic SNVs/InDels

Input mode: tumor vs. control

Summary statistics

- Number of SNVs: **195**
- Number of InDels: **0**
- Number of coding variants: **126**
- Number of noncoding variants: **69**



Nel report viene fornito la stima del Tumor mutational burden (TMB) o numero di mutazioni nella regione codificante del genoma tumorale, un parametro che permette di valutare lo stato mutazionale del tumore (espresso come mutazioni/Mb). Il TMB, generalmente utilizzato per il whole exome sequencing (WES) e correlato alla risposta ai trattamenti immunoterapici, è stato per la prima volta utilizzato per calcolare il numero di mutazioni per megabase per il TruSight170. Gli studi effettuati comparando i risultati ottenuti dal WES con quelli ottenuti con il pannello TruSight170 hanno dimostrato che il TruSight170 è in grado di calcolare il TMB per i campioni tumorali in maniera altamente efficace.

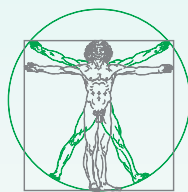
Il report del TruSight170 riporta, per ogni mutazione riscontrata, informazioni sul tipo di mutazione e i suoi effetti a livello proteico e sul tipo di cancro a cui sono associate.

	SYMBOL	CONSEQUENCE	PROTEIN_CHANGE	VARIANT_CLASS	TIER
+ 1	PIK3CA	missense_variant	p.His1047Arg	SNV	TIER 1
+ 2	TP53	missense_variant	p.Val272Met	SNV	TIER 2
+ 3	ABL2	missense_variant	p.Asp227Tyr	SNV	TIER 2
+ 4	CAD	missense_variant	p.Met759Ile	SNV	TIER 2
+ 5	ASXL1	missense_variant	p.Pro1331Gln	SNV	TIER 3
+ 6	UNC5C	missense_variant	p.Val701Ile	SNV	TIER 3
+ 7	FAT4	missense_variant	p.Ser4814Cys	SNV	TIER 3
+ 8	YES1	missense_variant	p.Ser46Leu	SNV	TIER 3
+ 9	GUCY2C	missense_variant	p.Arg502Lys	SNV	TIER 3
+ 10	ATR	missense_variant	p.Ala2575Val	SNV	TIER 3

Showing 1 to 10 of 195 entries

Previous 1 2 3 4 5 ... 20 Next

Per ogni mutazione riscontrata nei campioni analizzati, il report fornisce informazioni sul significato clinico delle stesse, indicando il numero di evidenze prognostiche, diagnostiche, di risposta alla terapia e di predisposizione, rilevate in letteratura. Queste informazioni sono di estrema importanza per l'oncologo che in questo modo può decidere di intraprendere una strategia mirata ed efficace per il trattamento del tumore.



Tier 1 - Genomic biomarkers for diagnosis, prognosis, predisposition, and drug response

- A total of **1** unique, somatic variant(s) in the tumor sample can be mapped to genomic biomarkers in the database for clinical interpretations of variants in cancer, CIViC or Cancer bioMarkers database, with the following number of evidence items:
 - Tier 1 - Predictive: **20** evidence items linked to drug sensitivity/resistance
 - Tier 1 - Prognostic: **1** evidence items linked to prognosis
 - Tier 1 - Diagnostic: **0** evidence items linked to diagnosis
 - Tier 1 - Predisposing: **0** evidence items linked to predisposition

Predictive biomarkers

Prognostic biomarkers

Diagnostic biomarkers

Predisposition biomarkers

Cancer type

Breast Cancer

Biomarker mapping

Clinical significance

Therapeutic context

Evidence level

The table below lists all variant-evidence item associations:

CSV

Excel

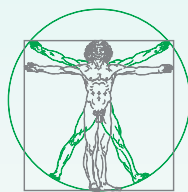
Search:

	SYMBOL	PROTEIN_CHANGE	CANCER_TYPE	EVIDENCE_LEVEL
+ 2	PIK3CA	p.His1047Arg	Breast Cancer	B: Clinical evidence
+ 3	PIK3CA	p.His1047Arg	Breast Cancer	B: Clinical evidence
+ 8	PIK3CA	p.His1047Arg	Breast Cancer	C: Case study
+ 19	PIK3CA	p.His1047Arg	Breast Cancer	D: Preclinical evidence
+ 20	PIK3CA	p.His1047Arg	Breast Cancer	D: Preclinical evidence

Showing 1 to 5 of 5 entries (filtered from 20 total entries)

Previous 1 Next

Nella sezione Tier2 del cancer report vengono riportate informazioni sulle mutazioni che sono annoverate tra quelle note come "hotspot" mutazionali, la lista delle altre malattie associate a queste mutazioni e le "driver mutation" previste. Tutte queste informazioni possono essere utili al medico per capire in che modo il tumore potrebbe evolvere.



Tier 2 - Other cancer mutation hotspots, curated mutations, or predicted driver mutations

- A total of 3 unique, somatic variant(s) in the tumor sample are curated as disease-causing, predicted as driver mutations, or occur in known cancer mutation hotspots.

Known mutation hotspots Other disease-causing mutations Other predicted driver mutations

The table below lists variants detected as mutation hotspots according to cancerhotspots.org:

CSV Excel

	CANCER_MUTATION_HOTSPOT	SYMBOL	PROTEIN_CHANGE	GENE_NAME
+ 1	TP53 V272 1.43e-05	TP53	p.Val272Met	tumor protein p53

Showing 1 to 1 of 1 entries

Nella sezione Tier3 vengono riportate ulteriori varianti riscontrate nei campioni analizzati che ricadono in geni codificanti per proto-oncogeni o per onco-soppressori.

Tier 3 - Other coding mutations in proto-oncogenes or tumor suppressor genes

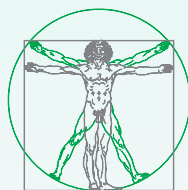
- A total of 9 unique, somatic variant(s) in the tumor sample are found within known proto-oncogenes or tumor suppressor genes.

CSV Excel

Search:

	SYMBOL	ONCOSCORE	PROTEIN_CHANGE	GENE_NAME	PROTEIN_DOMAIN
+ 1	ASXL1	0.8703	p.Pro1331Gln	additional sex combs like 1, transcriptional regulator	
+ 2	UNC5C	0.6406	p.Val701Ile	unc-5 netrin receptor C	
+ 3	FAT4	0.6242	p.Ser4814Cys	FAT atypical cadherin 4	
+ 4	YES1	0.5229	p.Ser46Leu	YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase	
+ 5	GUCY2C	0.5193	p.Arg502Lys	guanylate cyclase 2C	
+ 6	ATR	0.2556	p.Ala2575Val	ATR serine/threonine kinase	
+ 7	EPB41	0.2339	p.Pro357Arg	erythrocyte membrane protein band 4.1	FERM central domain
+ 8	EGR2	0.224	p.Arg405Gln	early growth response 2	Zinc-finger double domain
+ 9	PAFAH1B1	0.0963	p.Leu354Phe	platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1	WD domain, G-beta repeat

Showing 1 to 9 of 9 entries



Nella sezione Tier4 vengono riportate altre mutazioni indentificate nelle regioni codificanti di altri geni.

Tier 4 - Other coding mutations

• A total of 113 unique, coding somatic variant(s) are also found in the tumor sample.

CSV Excel Search:

	SYMBOL	ONCOSCORE	PROTEIN_CHANGE	GENE_NAME	PROTEIN_DOMAIN
1	PLXDC1	0.6675	p.Asp228Asn	plexin domain containing 1	
2	ULBP3	0.6674	p.Glu52Gln	UL16 binding protein 3	Class I Histocompatibility antigen, domains alpha 1 and 2
3	MUC4	0.6169	p.Leu4230Phe	mucin 4, cell surface associated	
4	FAP	0.6118	p.Thr404Ala	fibroblast activation protein alpha	Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) N-terminal region
5	USP9X	0.5744	p.Asp1140His	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	
6	TLN1	0.5651	p.Tyr308Ter	talin 1	FERM central domain
7	TLN1	0.5651	p.Tyr308Cys	talin 1	FERM central domain
8	NPAT	0.523	p.Glu363Lys	nuclear protein, coactivator of histone transcription	
9	TMPRSS11E	0.5036	p.Pro95Gln	transmembrane protease, serine 11E	SEA domain
10	RGS22	0.5036	p.Leu72Val	regulator of G protein signaling 22	

Showing 1 to 10 of 113 entries Previous 1 2 3 4 5 ... 12 Next

Nella sezione Tier5 sono riportate le mutazioni che ricadono in regioni non codificanti e pertanto ritenute verosimilmente benigne.

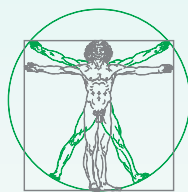
Tier 5 - Non-coding mutations

• A total of 69 unique, somatic variant(s) are also found in the tumor sample.

CSV Excel Search:

	SYMBOL	ONCOSCORE	CONSEQUENCE	GENE_NAME
1	MUC16	0.7896	synonymous_variant	mucin 16, cell surface associated
2	MUC4	0.6169	synonymous_variant	mucin 4, cell surface associated
3	AGAP2	0.5715	synonymous_variant	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2
4	SMO	0.5197	synonymous_variant	smoothened, frizzled class receptor
5	KIAA1522	0.5036	3_prime_UTR_variant	KIAA1522
6	KIAA1522	0.5036	3_prime_UTR_variant	KIAA1522
7	DLG1	0.4928	synonymous_variant	discs large MAGUK scaffold protein 1
8	GTPBP4	0.452	synonymous_variant	GTP binding protein 4
9	POU6F2	0.4345	synonymous_variant	POU class 6 homeobox 2
10	HNRNPL	0.4204	intron_variant	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L

Showing 1 to 10 of 69 entries Previous 1 2 3 4 5 6 7 Next



Infine vengono riportate informazioni sulle eventuali amplificazioni e le delezioni rilevate.

Somatic CNA analysis

Segments - amplifications and homozygous deletions

The following user-defined thresholds determine copy number aberrations shown here:

- **Copy number amplifications:** Log(2) ratio ≥ 0.8
- **Homozygous deletions:** Log(2) ratio ≤ -0.8

A total of 133 unfiltered aberration segments satisfied the above criteria.

A total of 133 copy number segments satisfy the current filtering criteria.

Log-ratio **Cytoband**

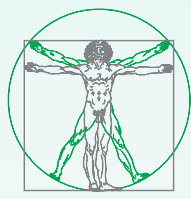
Event type
 focal

Search:

	Segment	Length_Mb	Cytoband	LogR	Event_type
1	chr20:19094302-19102422	0.0081	chr20:p11.23	2.17	focal
2	chr7:106257023-106257086	0.0001	chr7:q22.3	2.08	focal
3	chr6:143087391-143246881	0.1595	chr6:q24.2	2.07	focal
4	chr20:23160798-23402774	0.242	chr20:p11.21	1.97	focal
5	chr6:128626470-128880212	0.2537	chr6:q22.33	1.96	focal
6	chr6:107330864-107400655	0.0698	chr6:q21	1.91	focal
7	chr17:37881371-38428206	0.5468	chr17:q12 - q21.2	1.84	focal
8	chr6:142991082-143087003	0.0959	chr6:q24.2	1.82	focal
9	chrX:21434667-21626119	0.1915	chrX:p22.12	1.82	focal
10	chr4:72179357-73371982	1.1926	chr4:q13.3	1.79	focal

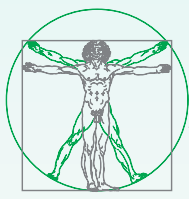
Showing 1 to 10 of 133 entries. Previous ... Next

In conclusione, possiamo affermare che il cancer genome report ottenuto dall'analisi TruSight170 è uno strumento dinamico che fornisce all'oncologo tutte le informazioni necessarie per poter mettere a punto strategie terapeutiche mirate in base alla mutazione riscontrata, di fare previsioni sulla prognosi e inoltre può essere utilizzato per monitorare nel tempo l'andamento della risposta terapeutica.

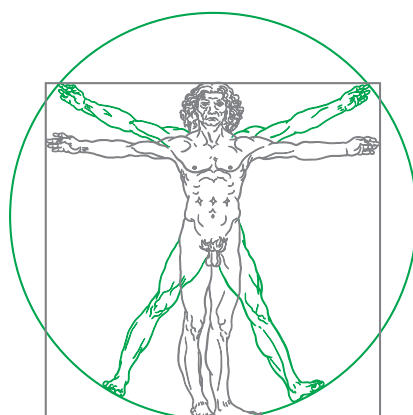


Referenze

1. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):e542-e551. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
2. Champiat S, Ferté C, Lebel-Binay S, Eggermont A, Soria JC. Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology.* 2014;3(1):e27817.
3. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 2016;8(328):328rv4. doi:10.1126/scitranslmed.aad7118.
4. Pitt J, Vétizou M, Daillère R, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity.* 2016;44(6):1255-1269.
5. Morrison C. Financial toxicity looms as cancer combinations proliferate. *Nat Biotechnol.* 2015;33(8):783-784.
6. Michot J, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer.* 2016;54:139-148.
7. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348 (6230):124-128.
8. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2189-2199.
9. van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science.* 2015;350(6257):207-211.
10. Garofalo A, Sholl L, Reardon B, et al. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. *Genome Med.* 2016;8(1):79. doi:10.1186/s13073-016-0333-9.
11. Campesato, L, Barroso-Sousa, R, Jimenez, L, et al. Comprehensive cancer gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget.* 2015;6(33):34221-34227.
12. Ashord, M. Cancer Gene Panels Could Help to Identify Patients for Immunotherapy, Studies Suggest. *GenomeWeb.* www.genomeweb.com/cancer/cancer-gene-panels-could-help-identifypatients-immunotherapy-studies-suggest. Updated April 29, 2016. Accessed February 2, 2017.
13. TruSight Tumor 170. www.illumina.com/TruSightTumor170. Accessed January 18, 2017.
14. The Cancer Genome Atlas. cancergenome.nih.gov/. Accessed January 16, 2017.
15. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-311.
16. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
17. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). evs.gs.washington.edu/EVS/. Accessed January 27, 2017.
18. ExAC Browser. exac.broadinstitute.org/. Accessed January 27, 2017.
19. Tennesen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science.* 2012;337(6069):64-69.



20. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016;536(7616):285-291.
21. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res. 2015;43:D805–D811. doi: 10.1093/nar/gku1075.
22. Illumina (2016) TruSeq Exome Library Prep Kit (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/truseq-exome-data-sheet-770-2015-007.pdf).
23. van Nimwegen KJ, van Soest RA, Veltman JA, et al. Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost Analysis of Next-Generation Sequencing. Clin Chem. 2016;62(11):1458-1464.
24. Feliubadaló L, Tonda R, Gausachs M, et al. Benchmarking of Whole Exome Sequencing and Ad Hoc Designed Panels for Genetic Testing of Hereditary Cancer. Sci Rep. 2017;7:37984. doi: 10.1038/srep37984.



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA