



Validação e implementação do diagnóstico molecular em cancro colorectal hereditário (CCRH) por sequenciação de nova geração

João Gonçalves

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

Unidade de Genética **M**olecular



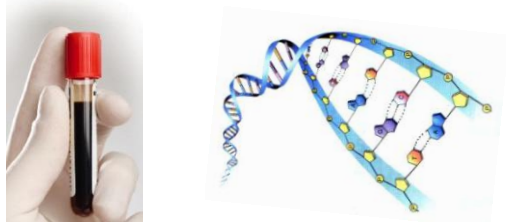


CCRH (Cancro Colorectal Hereditário)					
Tipo	% CCR	Genes	Outros Genes/Loci	Herança	Análise Molecular
S. Lynch (HNPCC)	~3%	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	PMS1, TGFB2, MLH3, EPCAM, BRAF	AD	PCR e Seq.
FAP	~1%	<i>APC</i>	-	AD	PCR e Seq.
MAP (familiar CCR<20 adenomas)	0.7% (2%)	<i>MUTYH</i>	-	AR	PCR e Seq.

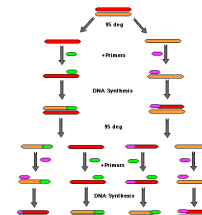
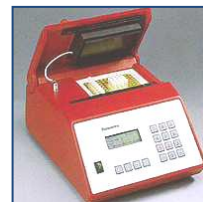


ANÁLISE CONVENCIONAL – Baseada na PCR (exão a exão) e Sequenciação de Sanger

Extracção de DNA Genómico



PCR – Amplificação Enzimática de DNA/exão/gene



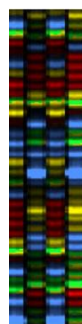
Purificação

Reação de Sanger

```
GC GAT CG CT CC A C AG CT A C AG GT G
GC G AT C G CT CC A C AG CT A C AG GT
GC G AT C G CT CC A C AG CT A C AG G
GC G AT C G CT CC A C AG CT A C AG
GC G AT C G CT CC A C AG CT A C
GC G AT C G CT CC A C AG CT A C
GC G AT C G CT CC A C AG CT A
GC G AT C G CT CC A C AG CT
GC G AT C G CT CC A C AG
GC G AT C G CT CC A C
GC G AT C G CT C C
GC G AT C G CT
GC G AT C G CT
GC G AT C G
GC G AT C
GC G AT
```

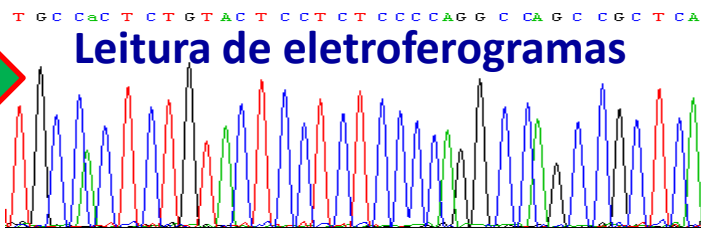
Purificação

Eletroforese capilar Sequenciador



Validação Técnica

Leitura de eletroferogramas



Validação e Interpretação dos resultados

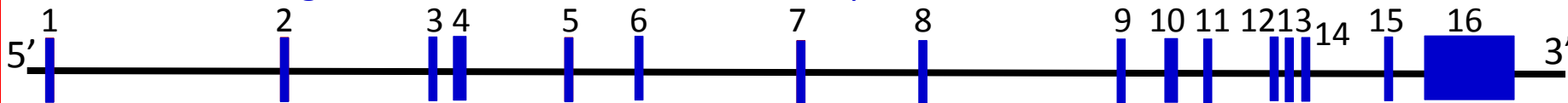
Relatório



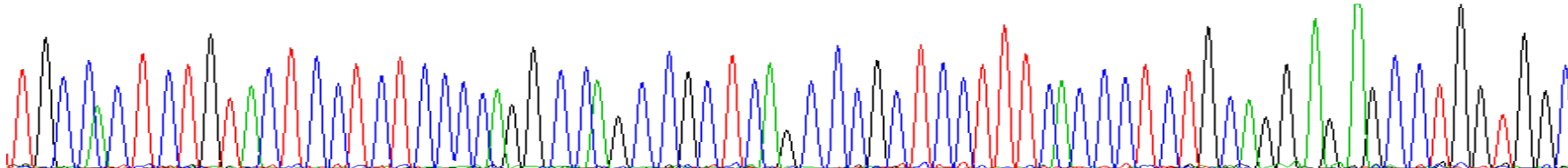
MLH1: 19 exões; g.DNA:57.59 kb; mRNA: 2.750 pb; 756 aa



APC: 16 exões; g.DNA:108.35 kb; mRNA: 10.701 pb; 2.843aa



T G C C a c T C T G T A C T C C T C T C C C C A G G C C A G C C G C T C A G C C C G C T C C T T T C A C C C T C T G C A G G A G A G C T G G T G G C



Exemplo Análise Convencional, S. Lynch (HNPCC):

MSH2 (16Ex) → MSH6 (10Ex) ; MLH1 (19Ex) → PMS2 (15Ex)

? NGS

Next Generation Sequencing



NGS

Next Generation Sequencing

CCRH (com/sem polipose)

S. Lynch: MSH2; MLH1; MSH6; PMS2; EPCAM-3'c

FAP: APC; MUTYH

S. Peutz-Jeghers: STK11 (LKB1)

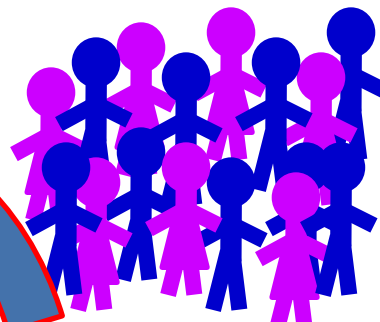
FJP: SMAD4; BMPR1A; ENG

Tumor Hamartoma : PTEN

Hereditary Gastric Cancer: CDH1

S. Li-Fraumeni: TP53; CHEK2

DNA
Genómico

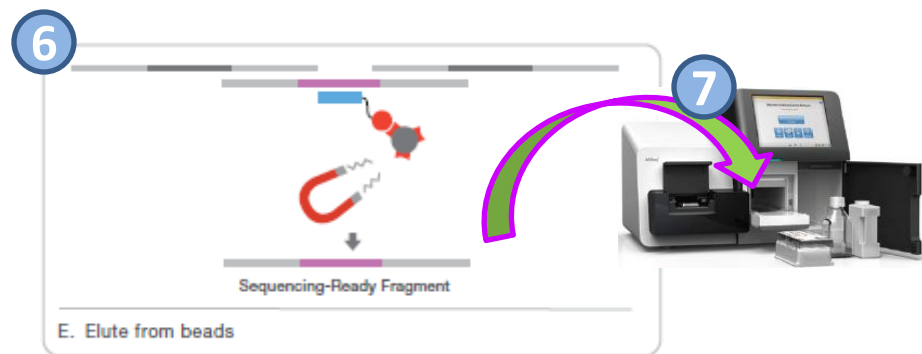
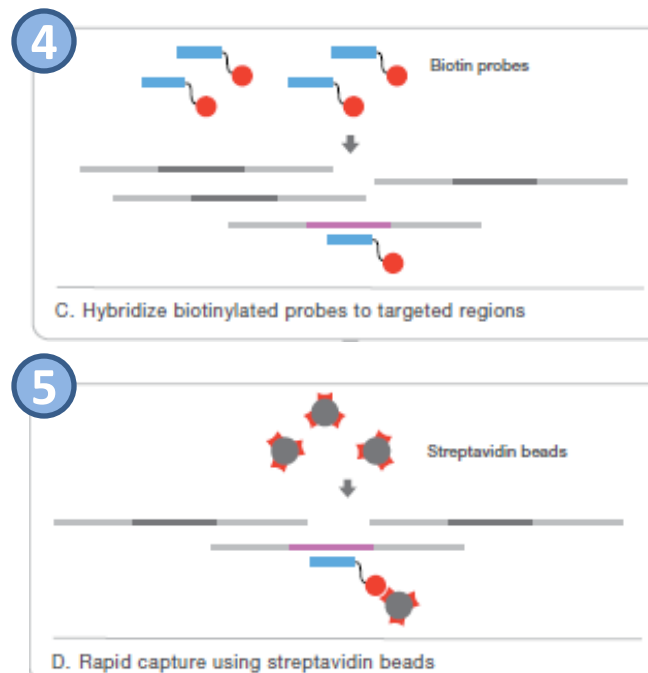
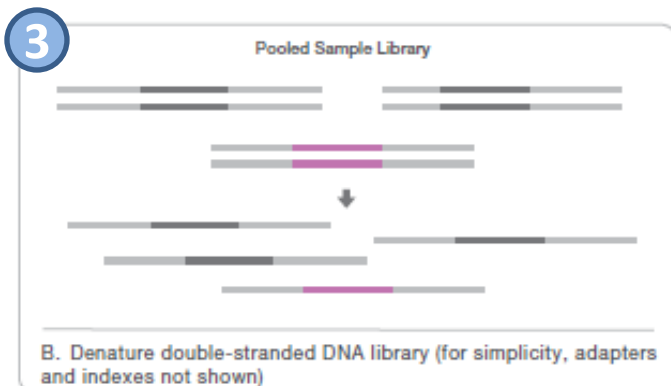
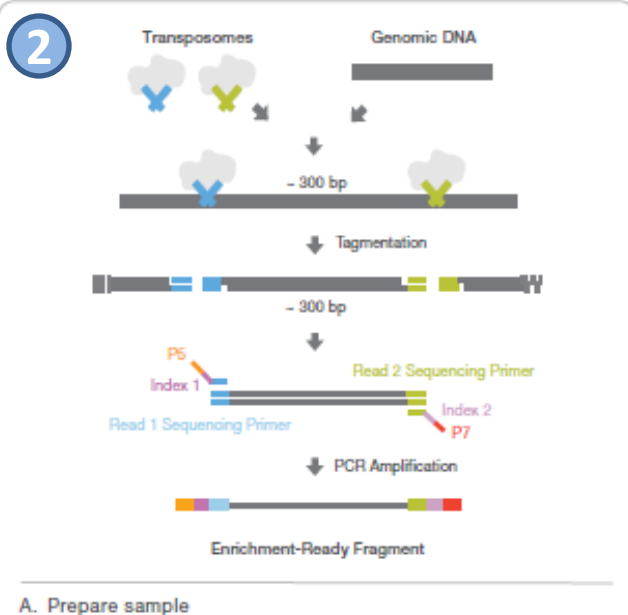


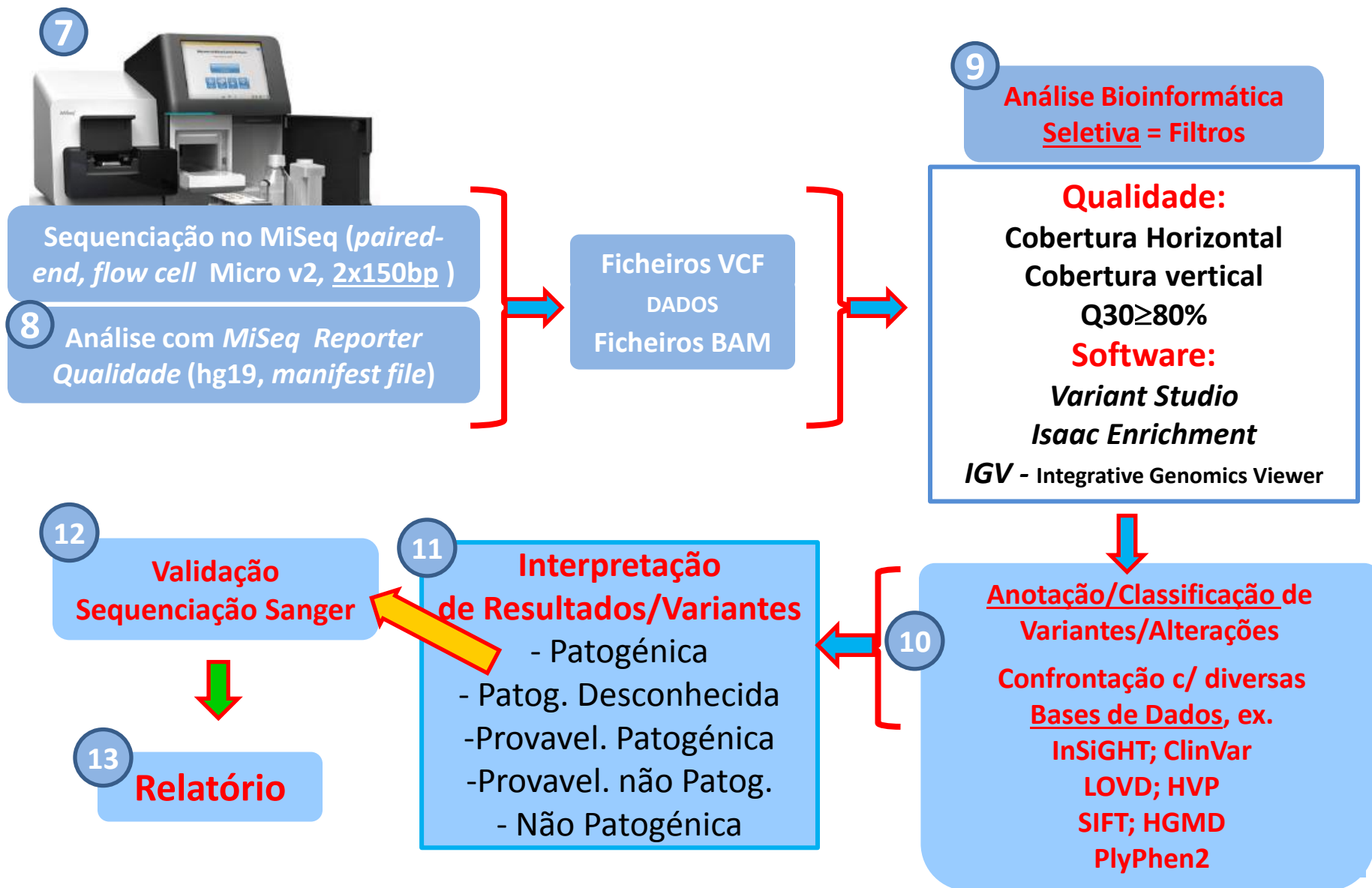
Illumina's compact MiSeq system



1 Extração e
Quantificação
DNA

TruSight Cancer Sequencing Panel (Illumina)







Objetivo a Validação da NGS:

TruSight Cancer Sequencing Panel (Illumina) 94 genes

e 284 SNPs associados a predisposição para diversos tipos de cancro

DNA genómico (Sangue periférico) 34 doentes com CCRH

Previamente estudados por PCR – Seq. Sanger para: APC, MLH1, MSH2, STK11, MUTYH

CCRH

(com/sem polipose)
(14 genes)

1	AIP	21	DDB2	45	GATA2	69	RAD51C
2	ALK	22	DICER1	46	GPC3	70	RAD51D
3	APC	23	DIS3L2	47	HNF1A	71	RB1
4	ATM	24	EGFR	48	HRAS	72	RECQL4
5	BAP1	25	EPCAM	49	KIT	73	RET
6	BLM	26	ERCC2	50	MAX	74	RHBDF2
7	BMPR1A	27	ERCC3	51	MEN1	75	RUNX1
8	BRCA1	28	ERCC4	52	MET	76	SBDS
9	BRCA2	29	ERCC5	53	MLH1	77	SDHAF2
10	BRIP1	30	EXT1	54	MSH2	78	SDHB
11	BUB1B	31	EXT2	55	MSH6	79	SDHC
12	CDC73	32	EZH2	56	MUTYH	80	SDHD
13	CDH1	33	FANCA	57	NBN	81	SLX4
14	CDK4	34	FANCB	58	NF1	82	SMAD4
15	CDKN1C	35	FANCC	59	NF2	83	SMARCB1
16	CDKN2A	36	FANCD2	60	NSD1	84	STK11
17	CEBPA	37	FANCE	61	PALB2	85	SUFU
18	CEP57	38	FANCF	62	PHOX2B	86	TMEM127
19	CHEK2	39	FANCG	63	PMS1	87	TP53
20	CYLD	40	FANCI	64	PMS2	88	TSC1
		41	FANCL	65	PRF1	89	TSC2
		42	FANCM	66	PRKAR1A	90	VHL
		43	FH	67	PTCH1	91	WRN
		44	FLCN	68	PTEN	92	WT1
						93	XPA
						94	XPC

C. Mama/Ovário,...
Penetrância elevada
Penetrância moderada
(14 genes)



Resultados NGS:

111 variantes/alterações (110 confirmadas por Seq. Sanger; 29 patogénicas)

Cobertura média em profundidade: 35 e 329X

Q30>94

1 FP: *STK11* gene (c.375-49G>A) associado a baixa cobertura (17 leituras do nt alterado /a total of 23 leituras).

Gene	<i>APC</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>STK11</i>	<i>MUTYH</i>	
Nº Variantes únicas	13	11	12	2	7	45
Nº Variantes Repetidas	30	11	19	1	15	76
Nº Total de Variantes	43	21	21	3+1*	22	110+1*
						1*- FP



Alterações Patogénicas Identificadas por NGS

Gene	cDNA (HGVS)	Proteína (HGVS)	Exão/ Intrão	Tipo Mutação	Significado Clínico	Nº de vezes
APC	c.646C>T	p.(Arg216Ter)	7	Nonsense	Pathogenic	1
	c.730-1G>T	Afeta <i>splicing</i>	7	Substitution	Pathogenic	2
	c.1312+3A>G	Afeta <i>splicing</i>	IVS10	Substitution	Pathogenic	2
	c.3202_3205delTCAA	p.(Ser1068GlyfsTer57)	16	Frameshift	Pathogenic	1
	c.3588_3589insT	p.(Ser1198LeufsTer10)	16	Frameshift	Pathogenic	1
MLH1	c.18_34del	p.(Val7ArgfsTer18)	1	Frameshift	Pathogenic	1
	c.293_304delGCTTCGAGGTG	p.(Gly98_Gly101del)	3	Deletion	Pathogenic	1
	c.1459C>T	p.(Arg487Ter)	13	Nonsense	Pathogenic	1
	c.1620_1621delGG	p.(Leu540PhefsTer16)	14	Frameshift	Pathogenic	1
	c.1852_1853delAAinsGC	p.(Lys618Ala)	16	Missense	Pathogenic	1
	c.1894G>T	p.(Glu632Ter)	16	Nonsense	Pathogenic	1
MSH2	c.388_389delCA	p.(Gln130ValfsTer2)	3	Frameshift	Pathogenic	2
	c.970C>T	p.(Gln324Ter)	6	Nonsense	Pathogenic	1
	c.1909_1910delTCinsACA	p.(Ser637ThrfsTer7)	12	Frameshift	Pathogenic	2
	c.2021G>A	p.(Gly674Asp)	13	Missense	Pathogenic	1
	c.2729_2735delAGCTAAinsTTTAG	p.(Gln910LeufsTer2)	16	Frameshift	Pathogenic	1
STK11	c.718T>C	p.(Ser240Pro)	5	Missense	(Pathogenic)	2
MUTYH	c.389-1G>C	Afeta <i>Splicing</i>	IVS4	Substitution	Pathogenic	1
	c.453_458dupATGGAT	p.(Trp152_Met153insIleTrp)	5	Duplication	Pathogenic	1
	c.536A>G	p.(Tyr179Cys)	7	Missense	Pathogenic	3
	c.1187G>A	p.(Gly396Asp)	13	Missense	Pathogenic	2



Validação por NGS:

TruSight Cancer Sequencing Panel (Illumina) 94 genes
34 doentes com CCRH; 111 variantes; 29 Patogénicas

Sensibilidade = 100%

$(n^{\circ}VP/n^{\circ}VP+n^{\circ}FN)$

Especificidade= 98,78%

$(n^{\circ}VN/n^{\circ}VN+n^{\circ}FP)$

Exatidão (Prob. Diagnóstico Correto por NGS)= 99,10%

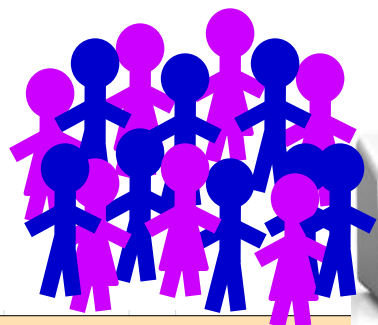
$(n^{\circ} \text{ resultados corretos} / n^{\circ} \text{ Res. Corretos} + n^{\circ} \text{ Res. Falsos})$

NGS: Pode ser usada para Diagnóstico molecular em CCRH



1ª Fase:
Ensaaios Bancada e Sequenciador

2ª Fase:
Análise *in silico* (no computador)



Análise Bioinformática Seletiva
dos Dados Gerados na 1ª Fase

TruSight Cancer Target Genes and SNPs

1	AIP	21	DDB2	45	GATA2	69	RAD51C
2	ALK	22	DICER1	46	GPC3	70	RAD51D
3	APC	23	DIS3L2	47	HNF1A	71	RB1
4	ATM	24	EGFR	48	HRAS	72	RECQL4
5	BAP1	25	EPCAM	49	KIT	73	RET
6	BLM	26	ERCC2	50	MAX	74	RHBDF2
7	BMPR1A	27	ERCC3	51	MEN1	75	RUNX1
8	BRCA1	28	ERCC4	52	MET	76	SBD5
9	BRCA2	29	ERCC5	53	MLH1	77	SDHAF2
10	BRIP1	30	EXT1	54	MSH2	78	SDHB
11	BUB1B	31	EXT2	55	MSH6	79	SDHC
12	CDC73	32	EZH2	56	MUTYH	80	SDHD
13	CDH1	33	FANCA	57	NBN	81	SLX4
14	CDK4	34	FANCB	58	NF1	82	SMAD4
15	CDKN1C	35	FANCC	59	NF2	83	SMARCB1
16	CDKN2A	36	FANCD2	60	NSD1	84	STK11
17	CEBPA	37	FANCE	61	PALB2	85	SUFU
18	CEP57	38	FANCF	62	PHOX2B	86	TMEM127
19	CHEK2	39	FANCG	63	PMS1	87	TP53
20	CYLD	40	FANCI	64	PMS2	88	TSC1
		41	FANCL	65	PRF1	89	TSC2
		42	FANCM	66	PRKAR1A	90	VHL
		43	FH	67	PTCH1	91	WRN
		44	FLCN	68	PTEN	92	WT1
						93	XPA
						94	XPC



S. Lynch		S. Li-Fraum.	FJP	FAP/AFAP	C. mama	
MSH2	APC	TP53	SMAD4	APC	BRCA1	TP53
MLH1	BMPR1A	CHEK2	BMPR1A	MUTYH	BRCA2	STK11
MSH6	CDH1					CDH1
PMS2	CHEK2					PTEN
	PMS1					
	PMS2					
	PTEN					

Selecionar Paineis de Genes para analisar/indivíduo



Vantagens NGS:

- 1 – Possibilita a sequenciação/análise de múltiplos genes em paralelo, em dezenas de amostras/doentes, de forma rápida e com um custo significativamente mais baixos.
- 2 - Permite oferecer o diagnóstico molecular a indivíduos que não tenham uma história familiar significativa de cancro ou que não cumpram outros critérios para realização do diagnóstico genético.
- 3 - Alargar o diagnóstico a >nº de genes de predisposição para cancro; reduzir o tempo de resposta e aumentar a capacidade de análise; contributo directo para um diagnóstico mais completo e melhorar a prevenção da doença em familiares / população.

Limitações NGS:

- 1 – Detecção de algumas duplicações e inserções
- 2 – Detecção de mutações em sequências de homopolímeros
- 3 – Não é ainda reconhecida como metodologia de referência

} MLPA
Seq. Sanger



Muito Obrigado pela Atenção

AGRADECIMENTOS

Departamento de Genética Humana

Unidade Genética Molecular



Patrícia Theisen

Pedro Rodrigues

Unidade de Tecnologia

e

Inovação

Catarina Silva

Luís Vieira