



**Přínos sekvenování nové generace  
pro diagnostiku dědičných  
nádorových syndromů  
gastrointestinálního traktu**

**Doc. MUDr. Lenka Foretova PhD.**

**Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů**

**Masarykův onkologický ústav**

**Brno**

# Syndromy s hereditárním rizikem GI malignit

- **Polyposní/nepolyposní**
  - FAP, MYH associated polyposis, HNPCC, Turcot syndrome
- **Hamartomatosní polyposy**
  - Juvenile, Cowden's disease, PJS, Ruvalcaba-Myhre-Smith, Gorlin, McCune-Albright, Cronkhite-Canada, Tuberous sclerosis, HMPS
- **Difusní hereditární ca žaludku**
- **Další nádorové syndromy**
  - HBOC-BRCA1/2
  - Li-Fraumeni syndrom –TP53 aj.
- Dosud známe přes 200 nádorových syndromů

# Klasická forma genetického testování

- Hodnocení klinických údajů a údajů rodokmenu klinickým genetikem
- Indikace testování individuálních rizikových genů genetikem
- Postupný proces testování screeningovými metodami a Sangerovým sekvenováním, MLPA, event. NGS
- Testování pouze vysoce penetrantních genů s jasným klinickým účinkem

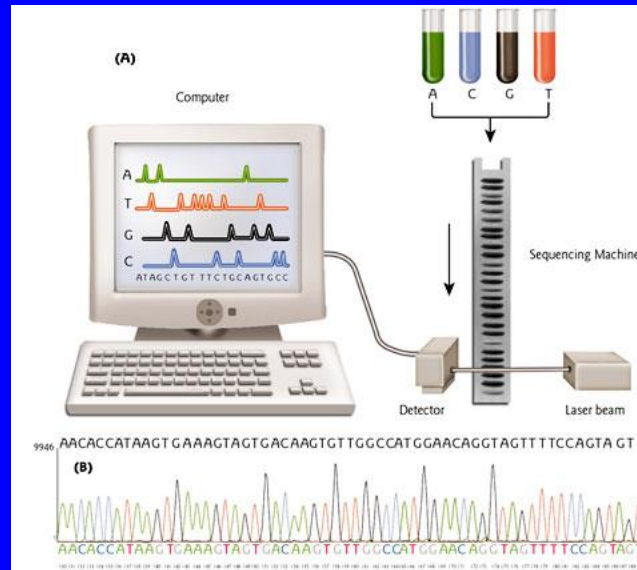
# Klasické genetické testování

Postupné testování jednotlivých genů

Použití Sangerova sekvenování nebo

screeningových metod

k detekci patologických fragmentů a následná sekvenace



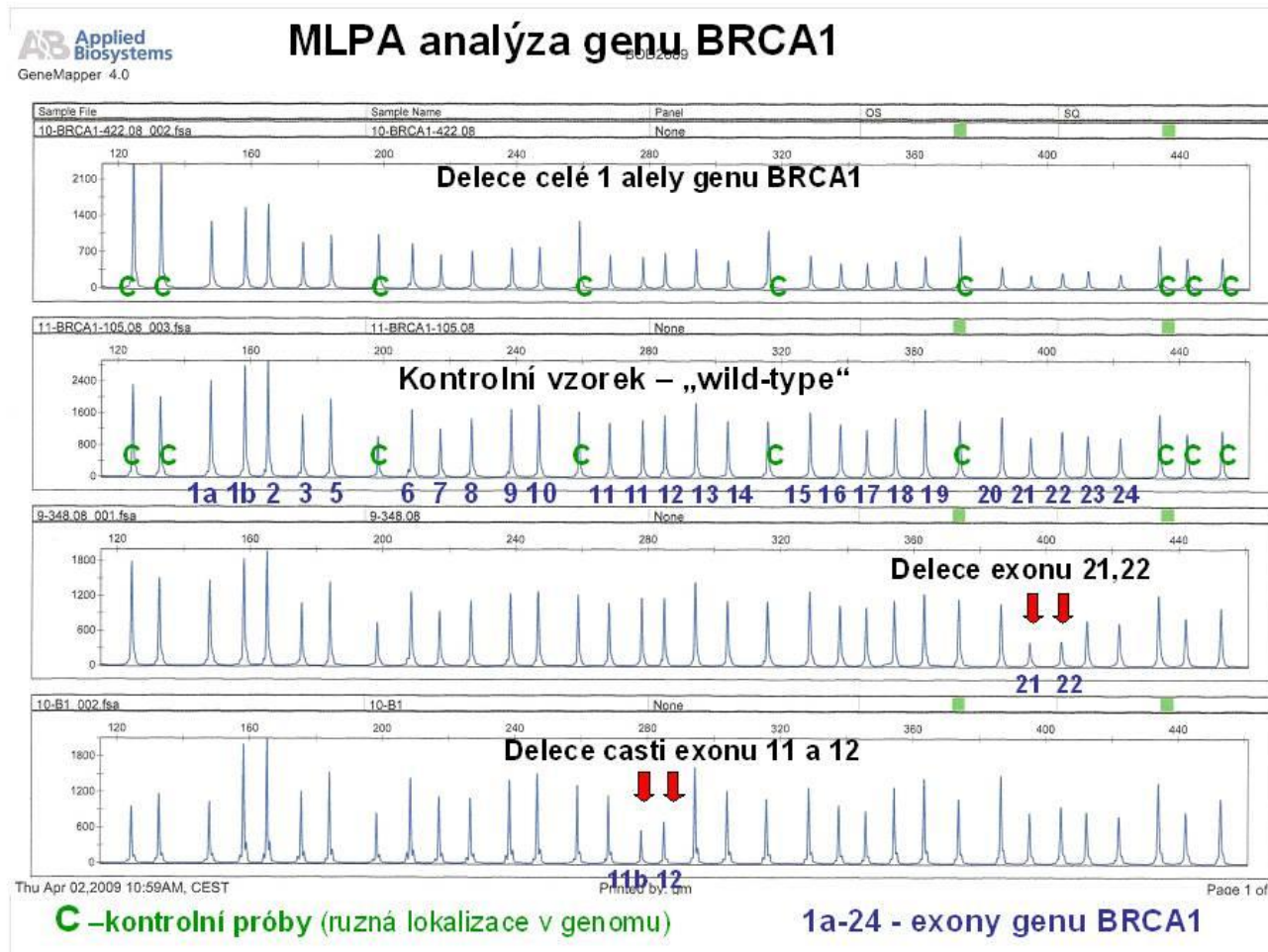
**High resolution melting – vysokorozlišovací analýza křivek tání) s  
využitím přístroje LightScanner (Idaho Tech)  
nebo**

**Vysokorozlišovací kapalinová chromatografie**



# MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe amplification)

detekuje rozsáhlé genomické delece/duplikace zasahující celé exony genu  
Zařazení do MLPA do rutinního vyšetření od r. 2005



# NGS – sekvenování nové generace

Umožňuje genotypizaci desítek až stovek genů najednou v jednom sekvenačním běhu a identifikaci patogenní mutace i u populačně vzácných mutací u genů, které v současné době nejsou v rámci ČR rutinně vyšetřovány.

Na MOU testovány 2 postupy:

- **TruSight Cancer Target Genes (Illumina)**
- Princip postupu – tagmentace genomické DNA a enrichment/hybridizační postup (Sekvenování na MiSeq (Illumina))
  
- **NimbleGen – Sequence Capture EZ Choice (Roche)**
- Princip postupu – fragmentace genomické DNA sonikací (Covaris) a enrichment/hybridizační postup (KAPA Library Preparation Kit > Double capture protocol). Sekvenování na MiSeq (Illumina)



# NGS metoda

1. Schopná zachytit mutace v desítkách i stovkách genů
2. Dobře zachytí bodové mutace, naopak delece několika basí mohou být hůře diagnostikovatelné
3. Geny s pseudogeny se špatně vyšetřují, např. PMS2
4. Genetická diagnostika může být rychlejší a může zahrnovat větší spektrum možných genetických příčin
5. Analýza výsledků je poměrně složitá a pracná, je nutná filtrace nevýznamných polymorfismů a variant (stovky až tisíce) a ověření potenciálně patogenních variant
6. Sangerovo sekvenování musí potvrdit předpokládanou mutaci
7. Nezachytí velké delece/ inserce celých exonů, je nutné doplnění MLPA – mnohdy pro více různých genů



# Možné nálezy u panelů

- Vysoce penetrantní geny, související s onemocněním v rodině – konkordantní mutace
- Vysoce penetrantní geny bez zjevné souvislosti s onemocněním v rodině – diskordantní mutace
- Geny středního rizika, RR 2-5, s ne příliš jasně popsanými riziky dalších maligních onemocnění
- Sekvenční UV varianty nejasného významu (IARC kategorie I-IV) – kategorie IV: likely pathogenic
- Polymorfní (neutrální) varianty

| TruSight Cancer Target Genes - 94 genů |                    |                     |                    |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|
| <i>AIP</i>                             | <i>ERCC2 (XPD)</i> | <i>MEN1</i>         | <i>SBDS</i>        |
| <i>ALK</i>                             | <i>ERCC3 (XPB)</i> | <i>MET</i>          | <i>SDHAF2</i>      |
| <i>APC</i>                             | <i>ERCC4 (XPF)</i> | <b><i>MLH1</i></b>  | <i>SDHB</i>        |
| <i>ATM</i>                             | <i>ERCC5 (XPG)</i> | <b><i>MSH2</i></b>  | <i>SDHC</i>        |
| <i>BAP1</i>                            | <i>EXT1</i>        | <b><i>MSH6</i></b>  | <i>SDHD</i>        |
| <i>BLM</i>                             | <i>EXT2</i>        | <b><i>MUTYH</i></b> | <i>SLX4</i>        |
| <b><i>BMPR1A</i></b>                   | <i>EZH2</i>        | <i>NBN</i>          | <i>SMAD4</i>       |
| <b><i>BRCA1</i></b>                    | <i>FANCA</i>       | <i>NF1</i>          | <i>SMARCB1</i>     |
| <b><i>BRCA2</i></b>                    | <i>FANCB</i>       | <i>NF2</i>          | <i>STK11</i>       |
| <i>BRIP1</i>                           | <i>FANCC</i>       | <i>NSD1</i>         | <i>SUFU</i>        |
| <i>BUB1B</i>                           | <i>FANCD2</i>      | <i>PALB2</i>        | <i>TMEM127</i>     |
| <i>CDC73</i>                           | <i>FANCE</i>       | <i>PHOX2B</i>       | <b><i>TP53</i></b> |
| <b><i>CDH1</i></b>                     | <i>FANCF</i>       | <i>PMS1</i>         | <i>TSC1</i>        |
| <i>CDK4</i>                            | <i>FANCG</i>       | <i>PMS2</i>         | <i>TSC2</i>        |
| <i>CDKN1C</i>                          | <i>FANCI</i>       | <i>PRF1</i>         | <i>VHL</i>         |
| <b><i>CDKN2A</i></b>                   | <i>FANCL</i>       | <i>PRKAR1A</i>      | <i>WRN</i>         |
| <i>CEBPA</i>                           | <i>FANCM</i>       | <i>PTCH1</i>        | <i>WT1</i>         |
| <i>CEP57</i>                           | <i>FH</i>          | <i>PTEN</i>         | <i>XPA</i>         |
| <b><i>CHEK2</i></b>                    | <i>FLCN</i>        | <i>RAD51C</i>       | <i>XPC</i>         |
| <i>CYLD</i>                            | <i>GATA2</i>       | <i>RAD51D</i>       |                    |
| <i>DDB2</i>                            | <i>GPC3</i>        | <i>RB1</i>          |                    |
| <i>DICER1</i>                          | <i>HNF1A</i>       | <i>RECQL4</i>       |                    |
| <i>DIS3L2</i>                          | <i>HRAS</i>        | <i>RET</i>          |                    |
| <i>EGFR</i>                            | <i>KIT</i>         | <i>RHBDF2</i>       |                    |
| <i>EPCAM</i>                           | <i>MAX</i>         | <i>RUNX1</i>        |                    |

# CZECANCA

- NGS panel vytvořený pro spolupráci v ČR (VFN, doc. Kleibl, EZ Choice Roche)
- 219 genů vysokého, středního a nízkého rizika pro hereditární nádorové syndromy
- Jednotný systém testování a analýzy dat
- Možnost využití i pro výzkumné účely

# Postup při sekvenování

## Technická příprava vzorku

- Izolace genomové DNA
- Příprava vzorků DNA
  - fragmentace DNA, úprava konců, ligace adaptorů a indexace
- Sequence capture **CZECANCA** (EzChoice; Roche)
- Příprava sekvenační knihovny

## Sekvenování

- MiSeq (Illumina) – (V3; 150-cycle; Illumina)

## Bioanalytické zpracování

(v závislosti na konkrétní laboratoři)

„CZECANCA pipeline“ – zpracování dat pro účely jednotné databáze

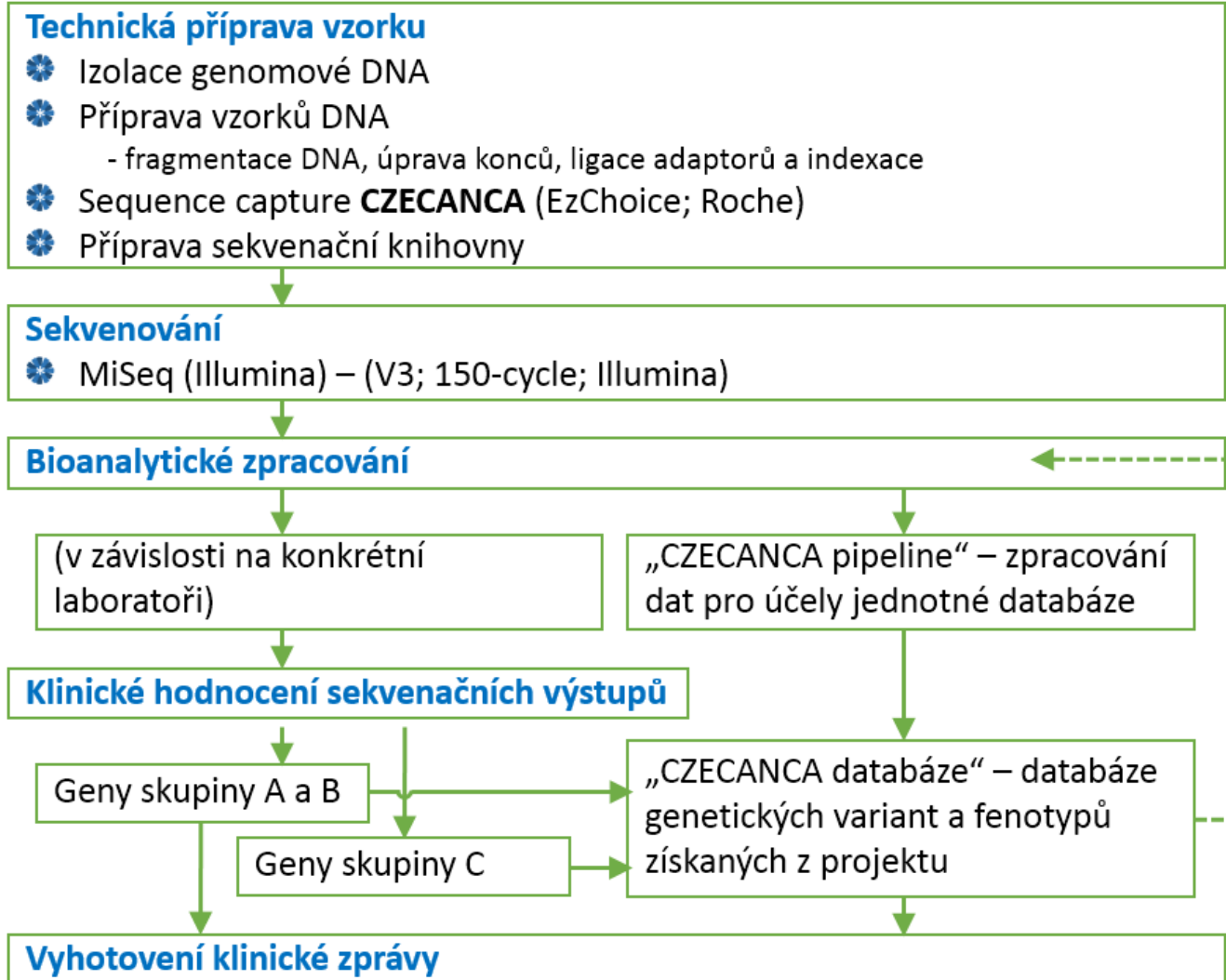
## Klinické hodnocení sekvenačních výstupů

Geny skupiny A a B

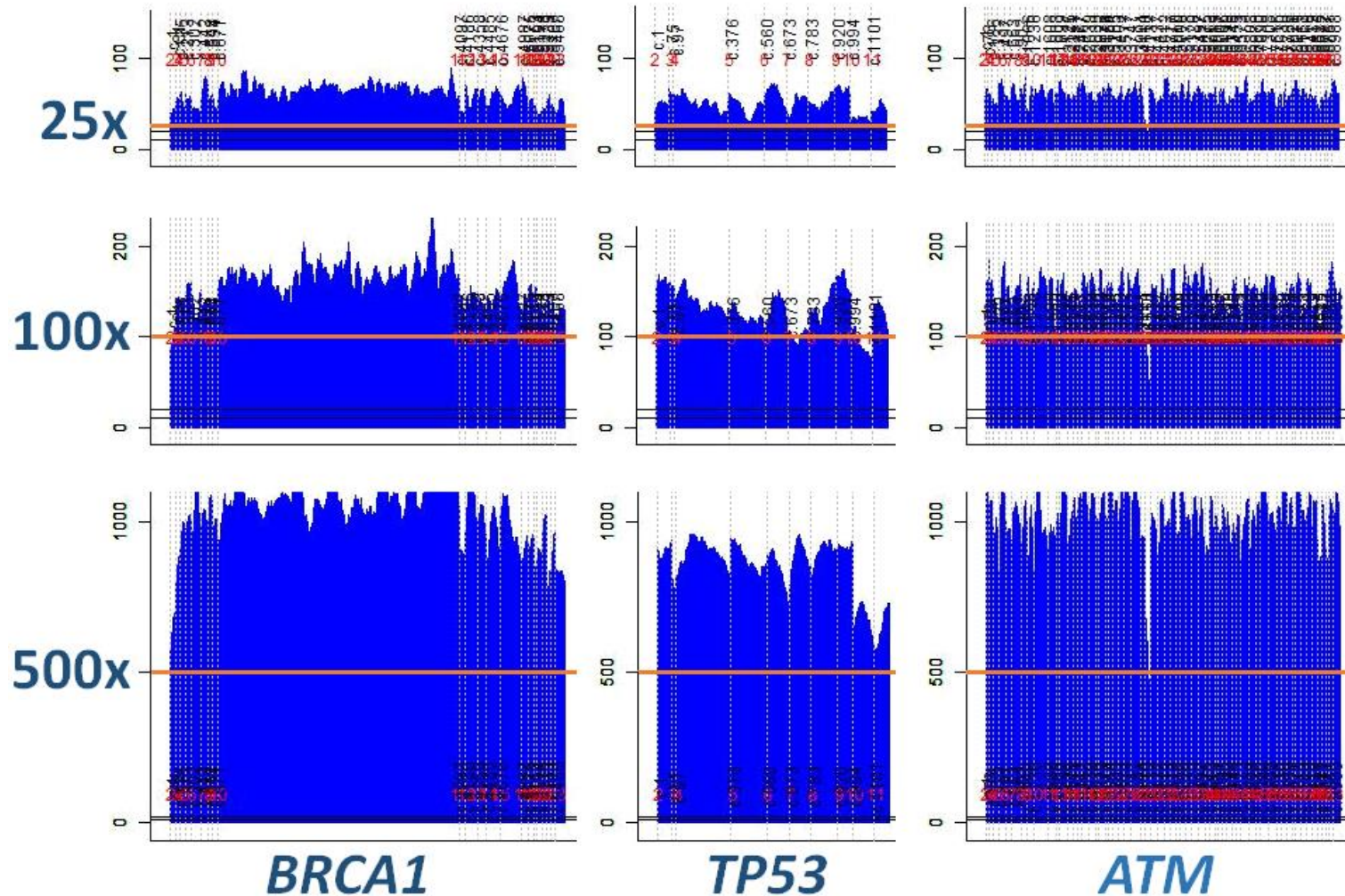
Geny skupiny C

„CZECANCA databáze“ – databáze genetických variant a fenotypů získaných z projektu

## Vyhotovení klinické zprávy



# Nutné homogenní sekvenační pokrytí všech 219 genů – počet čtení jednotlivých nukleotidů sekvenovaných úseků DNA





# Kasuistika PMS2 bialelické mutace

- Chlapec nar. 1999, od 14 let průjmy, krvácení z konečníku, zjištěn květákovitý tumor, adenoca, bifokální, v 70 cm od anu, colon descendens. KRAS pozitivní. Levostranná hemikolektomie, FOLFOX.
- RA: bez onkol. onemocnění
- Testování pomocí NGS (TruSight Cancer gene set, 94 genů)
- **Bialelická mutace PMS2:**

**1. Missense mutace inaktivující iniciační kodon**, úplná inaktivace syntézy proteinu

**2. Frameshift mutace**, způsobená delecí jedné base T, zastavení translace 22 aminokyselin před koncem, oblast důležitá pro dimerizaci PMS2 proteinu v MMR.

Další varianty v genech MET, PRKAR1A, pravděpodobně nevýznamné.

**Syndrom konstitučního deficitu „mismatch“ reparačního systému CMMR-D**

Kávové skvrny, malignity- lymfomy, astrocytomy, glioblastomy, a tumory LS

Výskyt již od 2 let věku

Nádory v sourozenecké linii

# Kasuistika PJS – STK11 delece celé alely

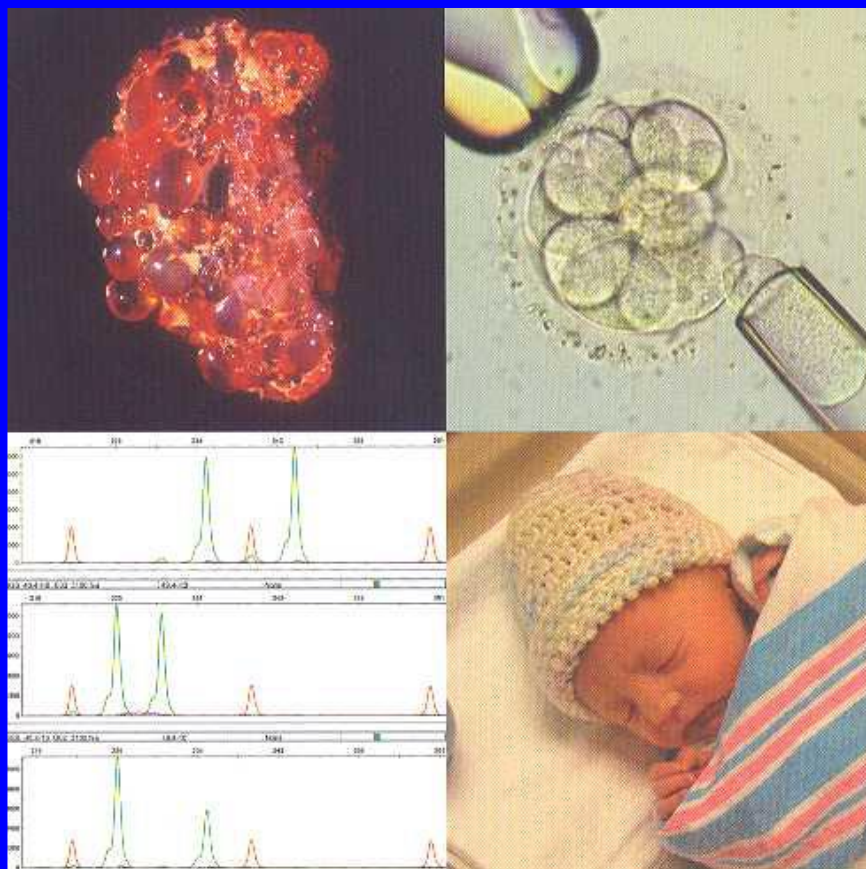
- Pacientka 1980, ve 20 letech dg. ca céka, pravostranná hemikolektomie, bez polyposy, bez pigmentace rtů
- RA: bez onkol. onemocnění u rodičů
- Testování 2002 – HNPCC negativní (MLH1, MSH2)
- Další onemocnění: 2014 operována pro polyposu GI, snesení 6 velkých polypů tenkého střeva, vícečetné invaginace, adenomové polypy s dysplazií. Drobné čokkovité polypy, drobná polyposa žaludku
- **Testování NGS (TruSight Cancer Gene set, 94 genů)**
- Zjištěny pouze mutace MUTYH – UV, CHEK2, FANCA, FANCF, ERCC2 aj. varianty.
- **Doplněno MLPA pro PJS, JP, FAP**
- **Velká delece celé alely STK11, exon 1-10. Potvrzen Peutz-Jeghersův syndrom**
- Vysoké riziko ca tenkého střeva, žaludku, jícnu, slinivky, nádorů prsu, vaječníků vejcovodů, děl. hrdla.
- Doporučena adekvátní prevence včetně MR prsou, EUS a preventivní gynekologická operace do 40 let věku.



# Nynější testování na MOU

- Postupný přechod od testování jednotlivých genů k testování panelu mnoha genů
- Dosud používáme komerční panel 94 genů (Illumina), přecházíme na Czacancu (Roche) s 219 geny
- Poměrně náročné změny v metodice práce laboratoře
- Nové nároky na hodnocení výsledků lékařským genetikem – mnoho genů není dosud příliš známo, nejsou jasně známá rizika, nejsou guidelines pro prevenci

# Využití genetické diagnostiky i při plánování rodičovství – preimplantační diagnostika



# Závěr

- Je nutná úzká spolupráce indikujících lékařů s genetikou (dostatek klinických údajů pro testování)
- Spolupráce genetických center a laboratoří při hodnocení sekvenačních výsledků, klinických dat, při vytváření doporučení pro další prevenci
- NGS panelu vybraných genů je pouze další stupeň v postupném přechodu k celoexomovému nebo celogenomovému sekvenování u pacientů, které se zatím spíše užívají ve výzkumu.

Děkuji za pozornost

