



**XXV** Congrés de la  
Societat Catalana de Digestologia  
28 al 30 de gener de 2016  
firaReus, Centre de Fires i Convencions  
Reus (Tarragona)

## XXI CURS DE FORMACIÓ EN DIGESTOLOGIA:

# Càncer colorectal familiar i hereditari: paper de les noves tecnologies de seqüenciació massiva

**Dr. Francesc Balaguer**

Clínica d'Alt Risc de CCR  
Servei de Gastroenterologia  
Hospital Clínic de Barcelona  
[fprunes@clinic.ub.es](mailto:fprunes@clinic.ub.es)

**Dr. Sergi Castellví-Bel**

Grup de predisposició genètica al càncer colorectal  
Equip d'Oncologia gastrointestinal i pancreàtica  
IDIBAPS / Hospital Clínic / CIBERehd / CEK  
[sbel@clinic.ub.es](mailto:sbel@clinic.ub.es)

**CLÍNIC**  
BARCELONA  
Hospital Universitari

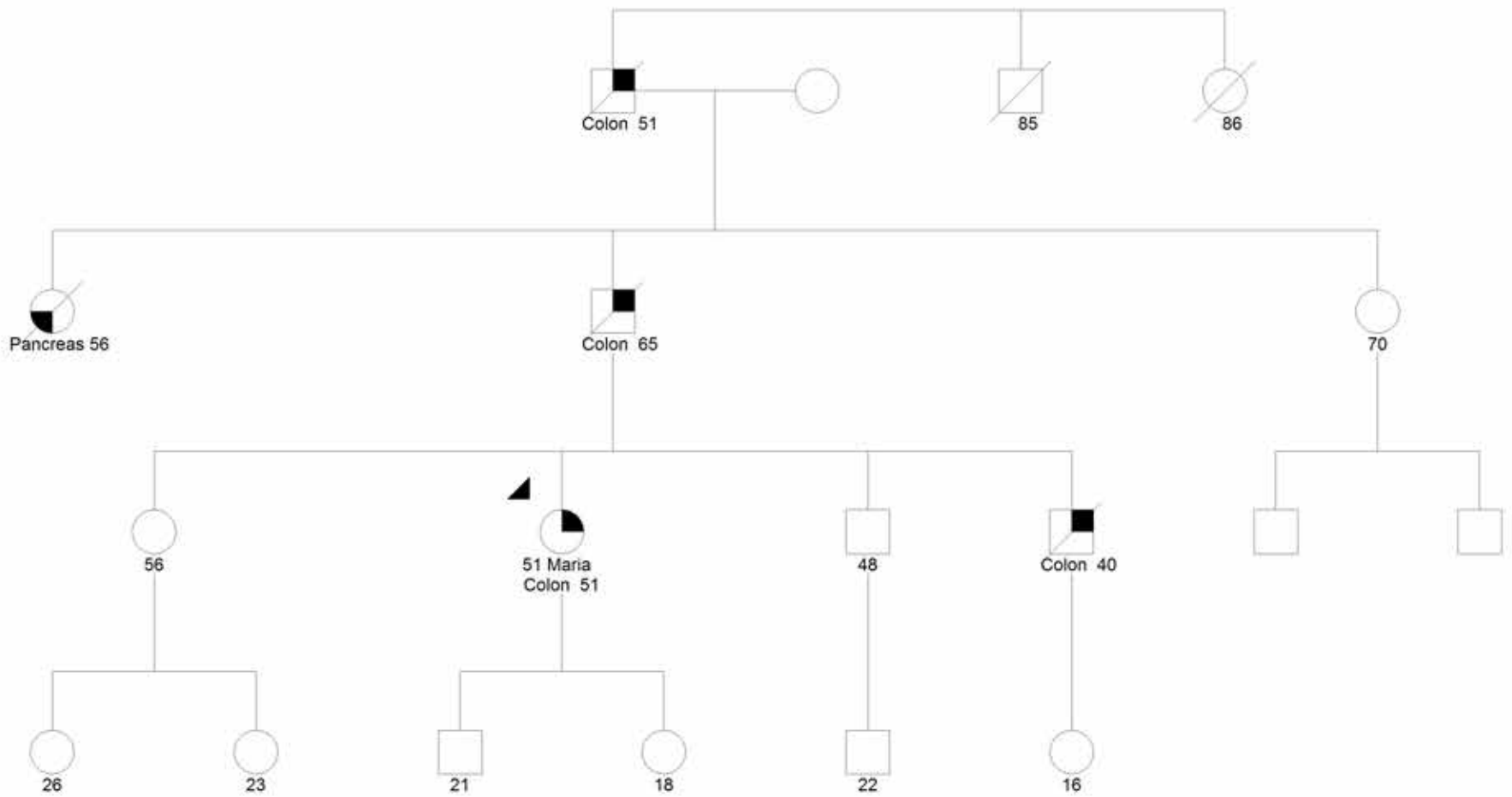
**IDIBAPS**

*ciberehd*

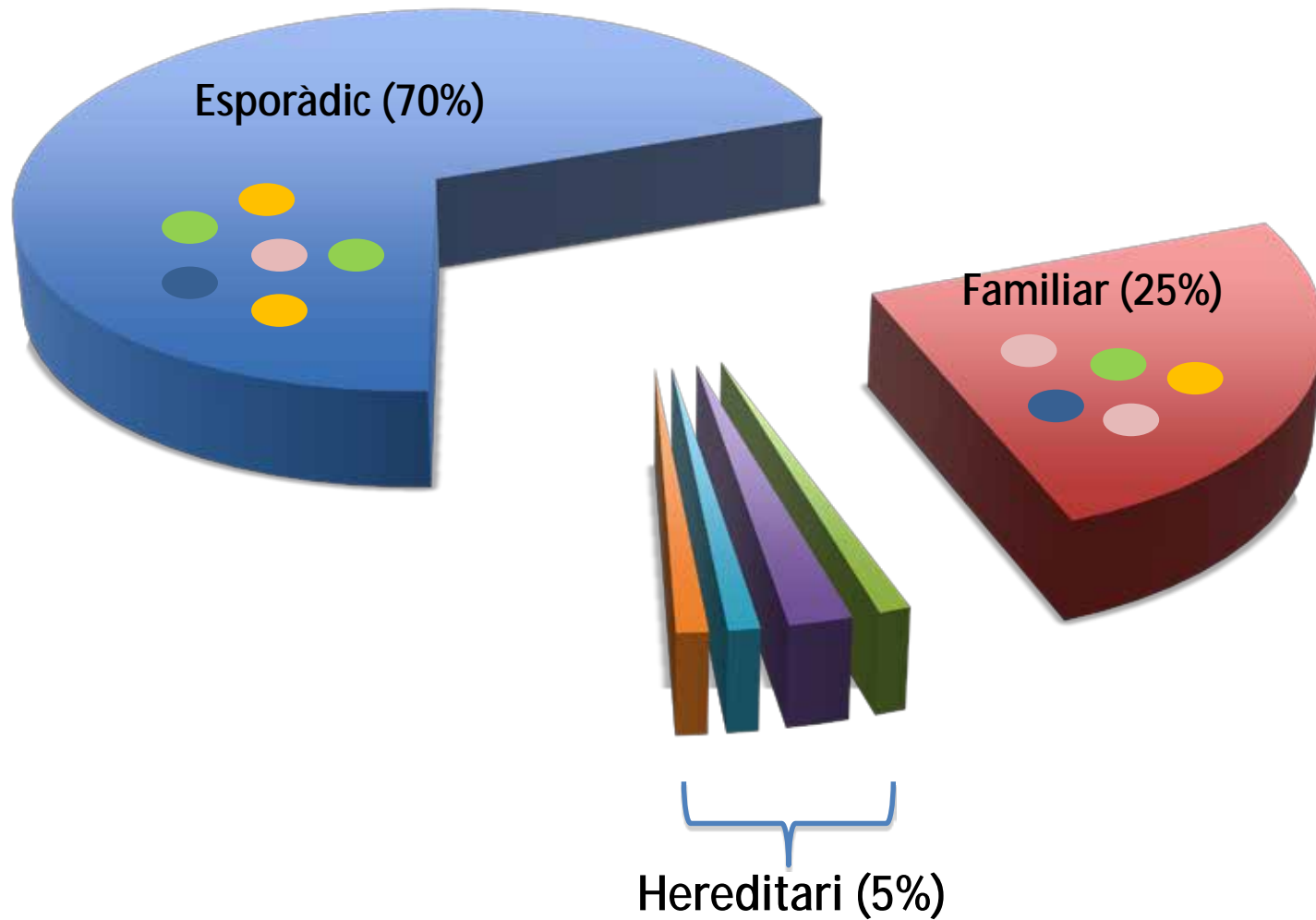
**AEG**  
Asociación Española de Gastroenterología

  
Instituto de Salud Carlos III

# Cas clínic



# CCR familiar i hereditari



# Càncer colorectal hereditari



POLIPÒSIC

NON-POLIPÒSIC

Adenomes

Hamartomes

Pòlips serrats

DEFICIÈNCIA DEL SISTEMA REPARADOR DE L'ADN?

>100

20-100

≥20 PS  
≥5 prox

SI

No

PAF CLÀSSICA

PAF ATENUADA

PEUTZ-JEGHERS

POLIPOSI JUVENIL

SINDROME COWDEN

POLIPOSI SERRADA

SINDROME DE LYNCH

CCR HEREDITARI TIPUS X

CCR FAMILIAR

APC  
MUTYH  
POLE/POLD1  
NTHL1

STK11

SMAD4  
BMPR1A  
ENG

PTEN

?

MLH1  
MSH2  
MSH6  
PMS2  
EpCAM

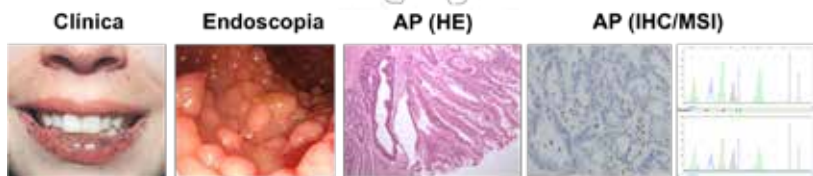
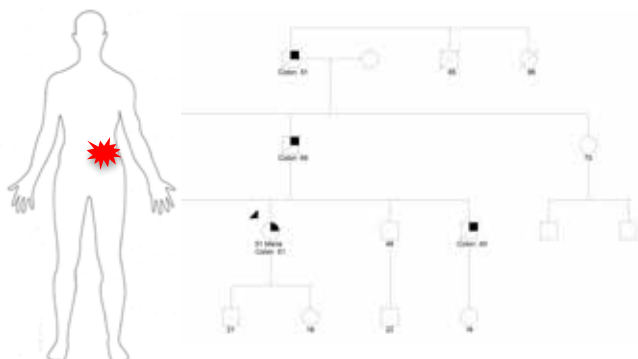
FAN1  
POLE  
POLD1

SNPs

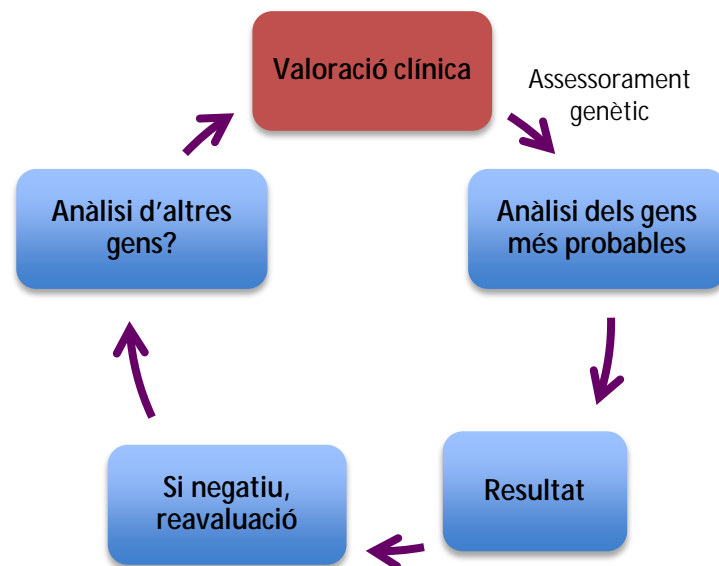
# Predisposició al càncer: estratègia clínica per a l'estudi genètic (1990-2015)

## Fenotip

- Polipòsic
- No polipòsic



## Genotip



# Lliçons apreses de l'aproximació tradicional

## 1. L'estudi genètic és "específic": tan sols s'analitza el cas més probable

- ü Criteris clínics i classificació del fenotip
- ü Immunohistoquímica universal a tots pacients amb CCR per identificació de la síndrome de Lynch

## 1. Cribratge + cirurgia preventiva efectiva a portadors

- ü Colonoscòpia disminueix incidència i mortalitat per CCR a la síndrome de Lynch
- ü Histerectomia + DA a la síndrome de Lynch

## 2. L'estudi genètic permet establir l'estratègia terapèutica:

- ü Adjuvència en el CCR estadi II MSI
- ü Colectomia total (Lynch)

## 1. Variants de significat incert

- ü Cada vegada menys freqüents si anàlisi de pocs gens
- ü Esforç internacional (Insight, ClinVar)

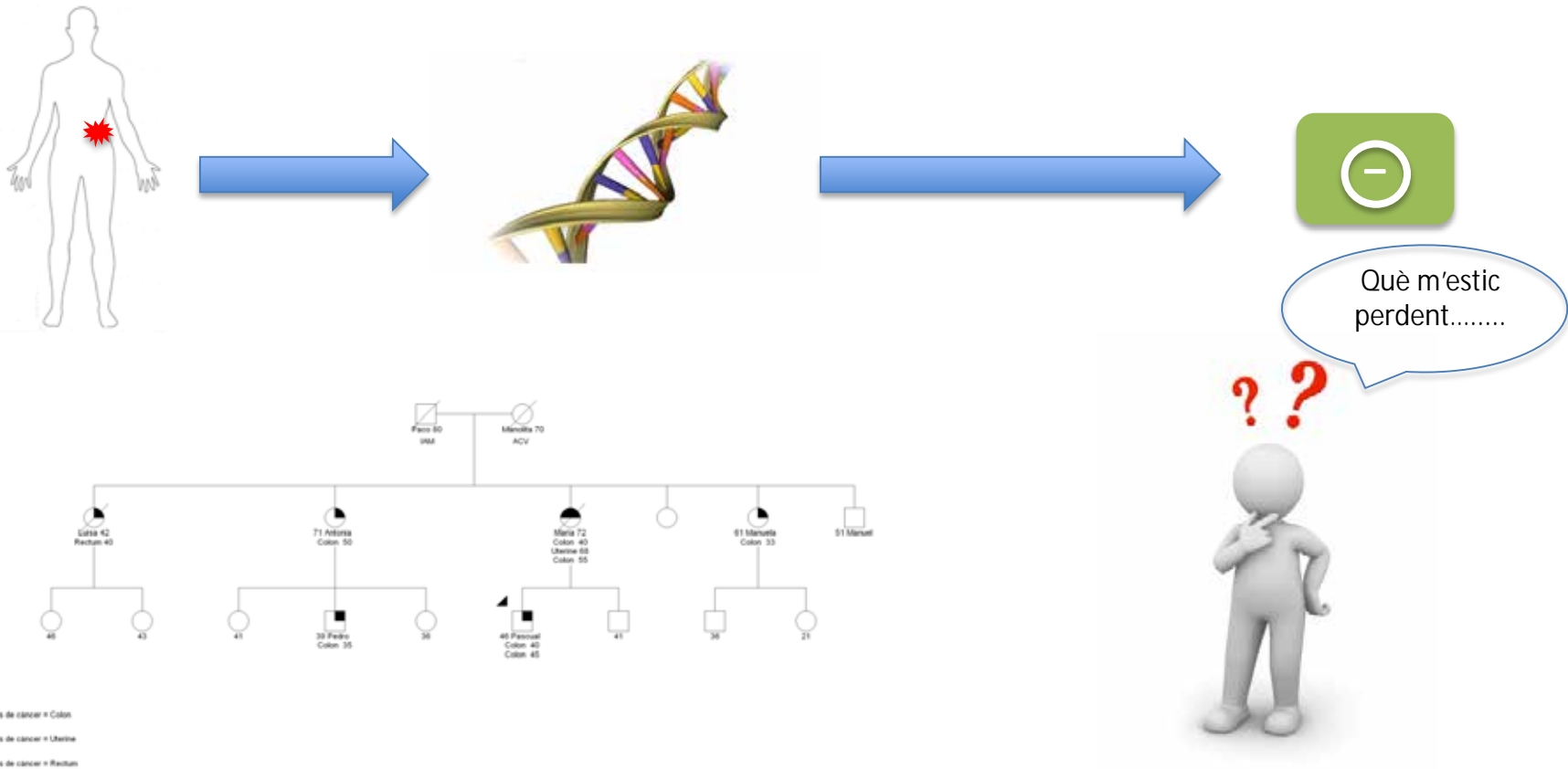


## 2. Consell genètic estandaritzat

- ü Estratègies de comunicació establertes (assessorament pre- i post-prova)
- ü Patrons d'herència d'alta penetrància

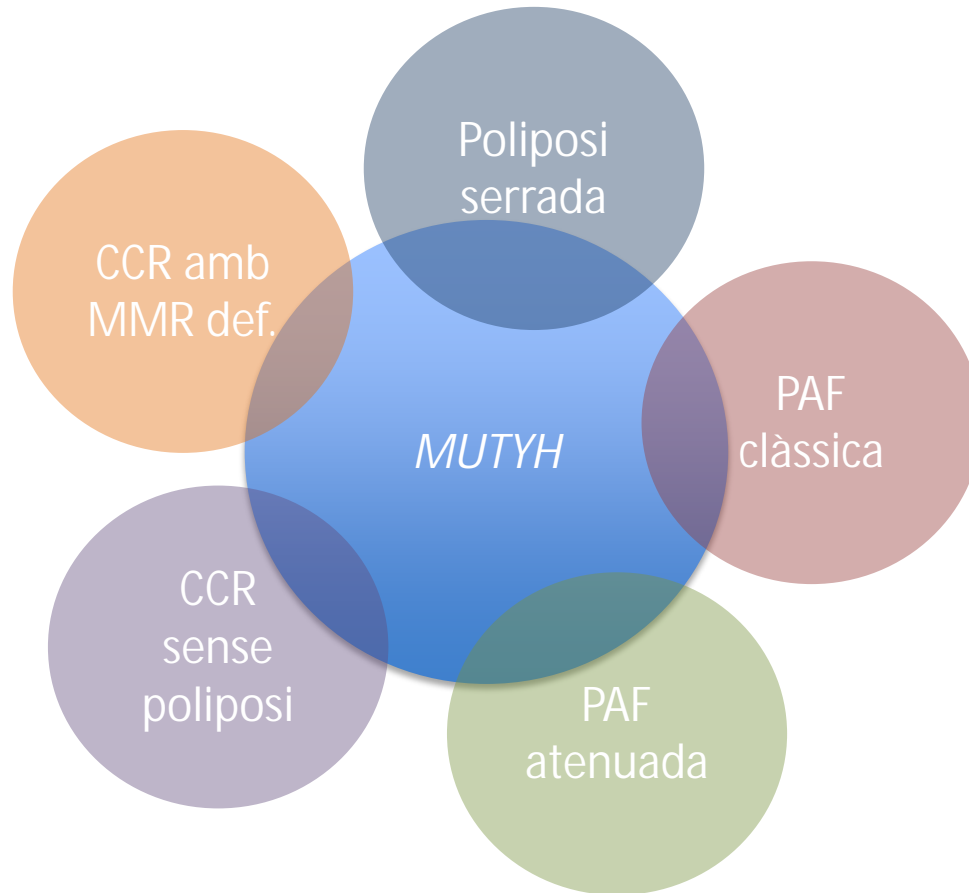
# Problemes del model tradicional

## 1) Incertesa davant un resultat negatiu



# Problemes del model tradicional

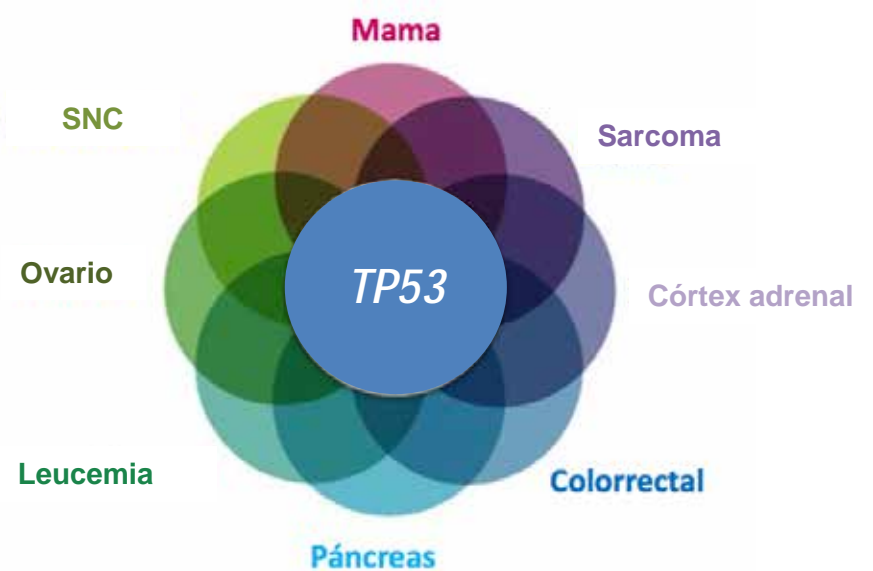
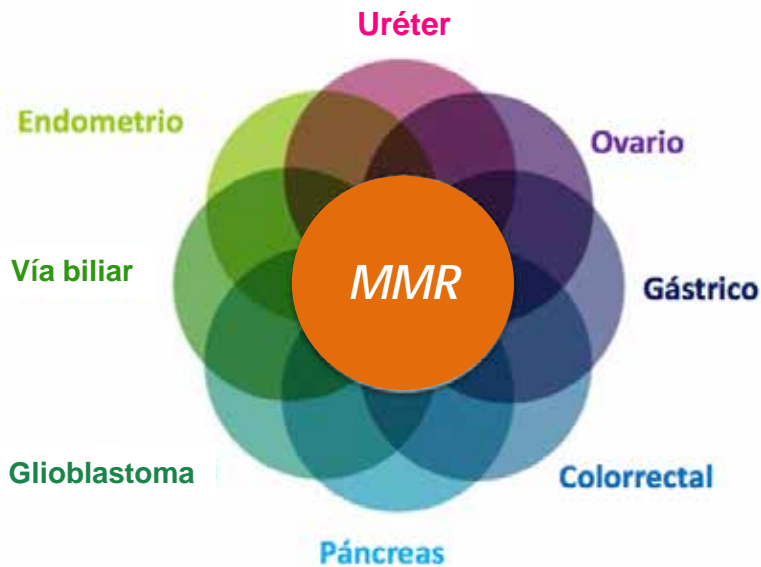
## 2) Un gen: múltiples fenotips





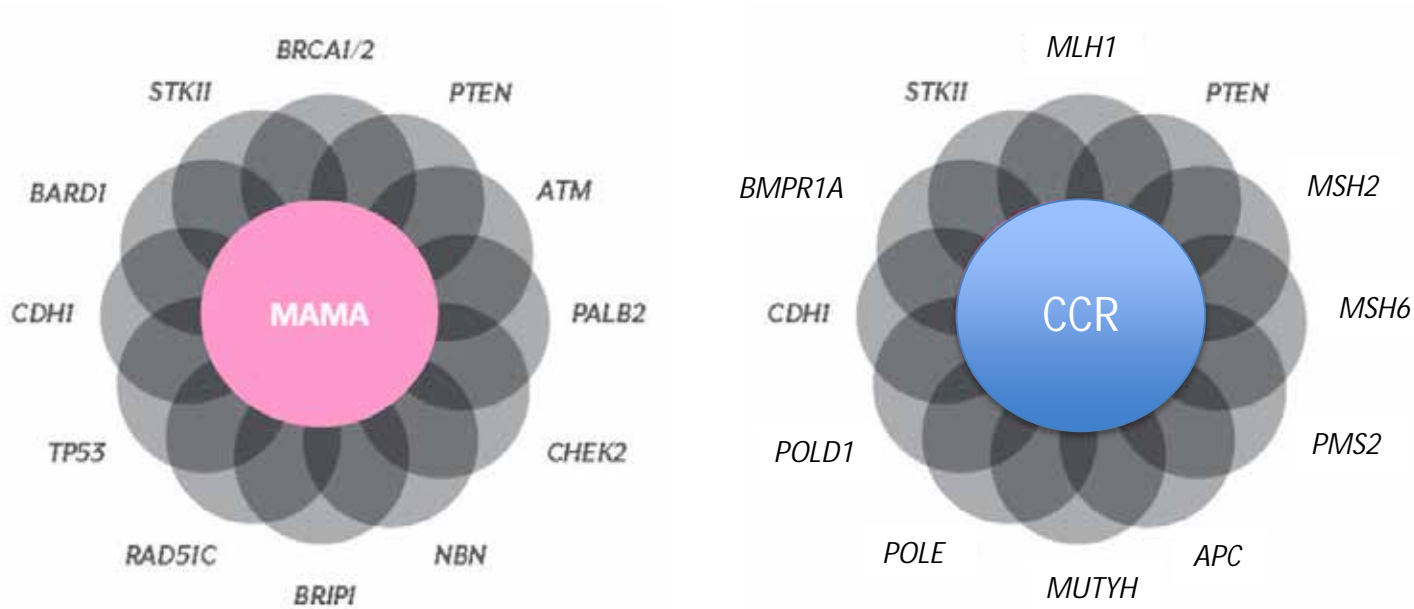
# Problemes del model tradicional

## 3) Un gen: diversos tumors (pleiotropisme)



# Problemes del model tradicional

## 4) Un tumor: diversos gens

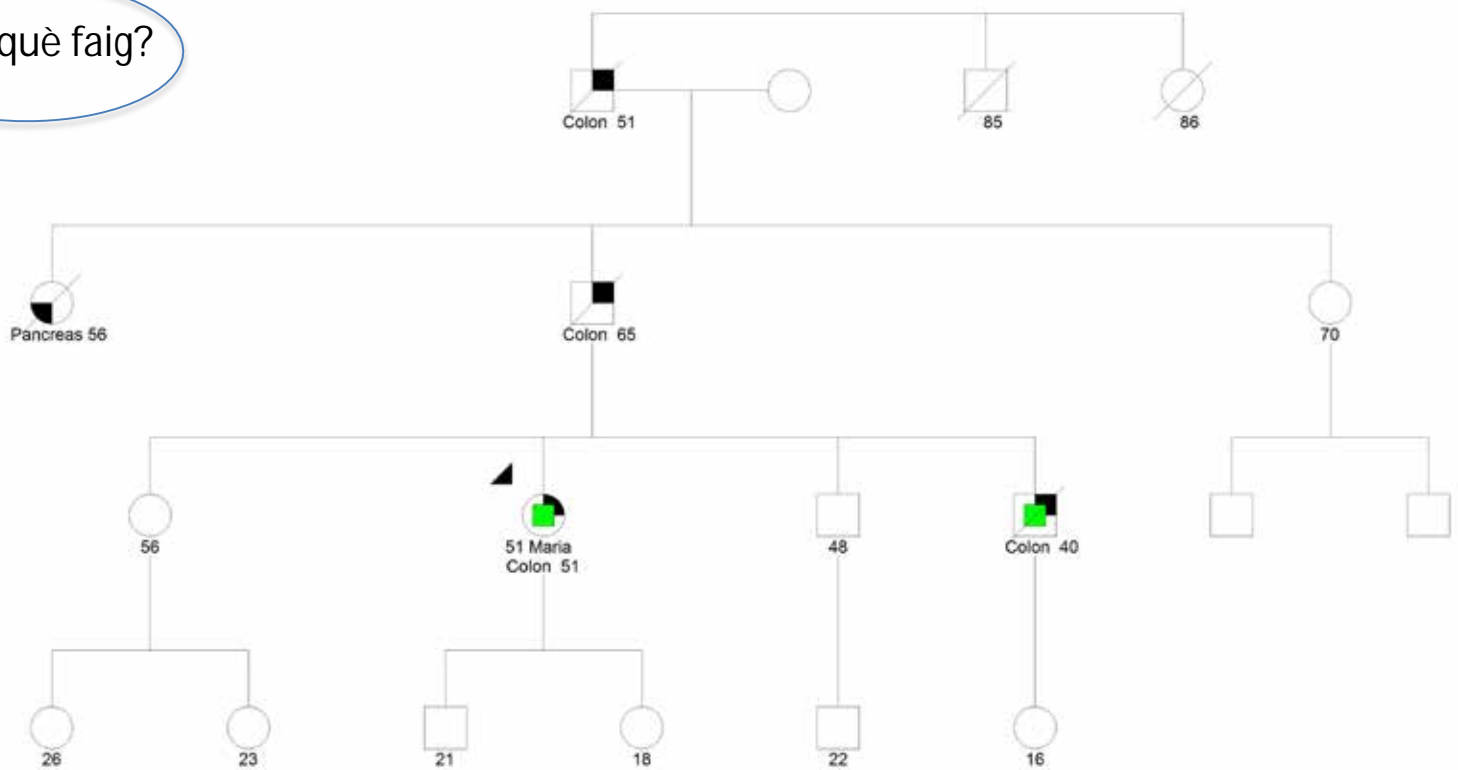


El análisis gen a gen resulta lent i costós

# Cas clínic

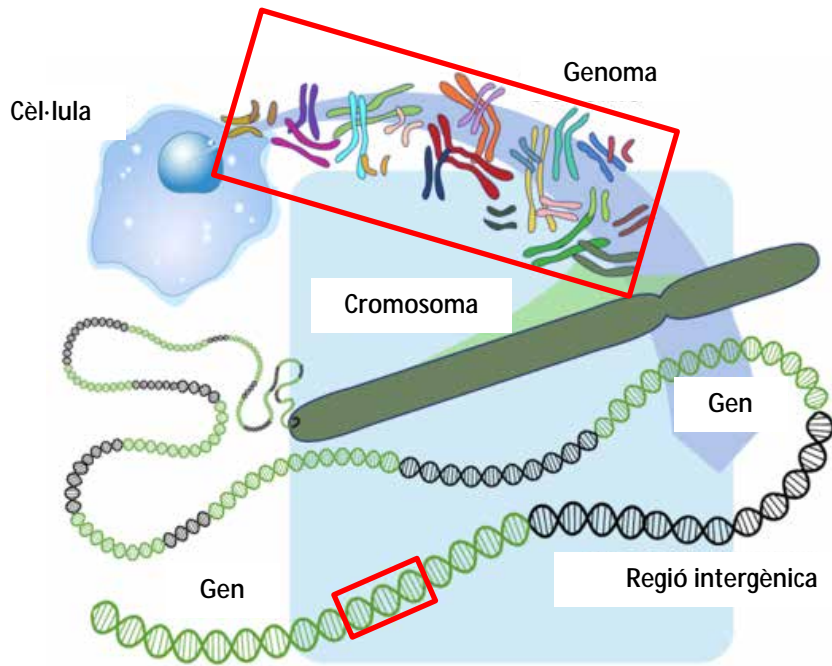
## Estudi del sistema de reparació de l'ADN:

- Immunohistoquímica amb expressió conservada de MLH1/MSH2/MSH6/PMS2
- Estudi d'inestabilitat de microsatèl.lits: estable

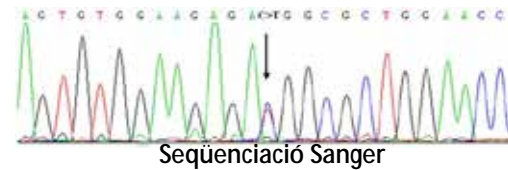




# Seqüenciació de l'ADN



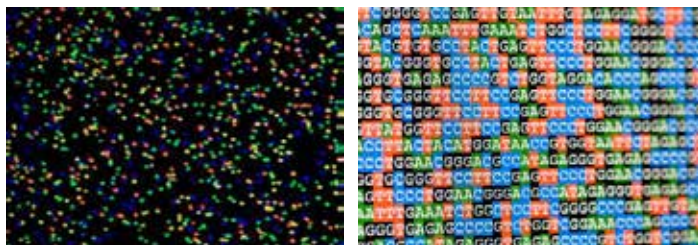
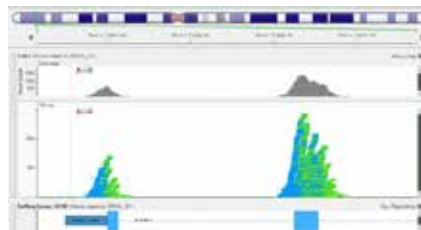
- 1977: seqüenciació Sanger



- 1990-2003: seqüenciació del primer genoma humà (13 anys, 2,7 bilions de \$)



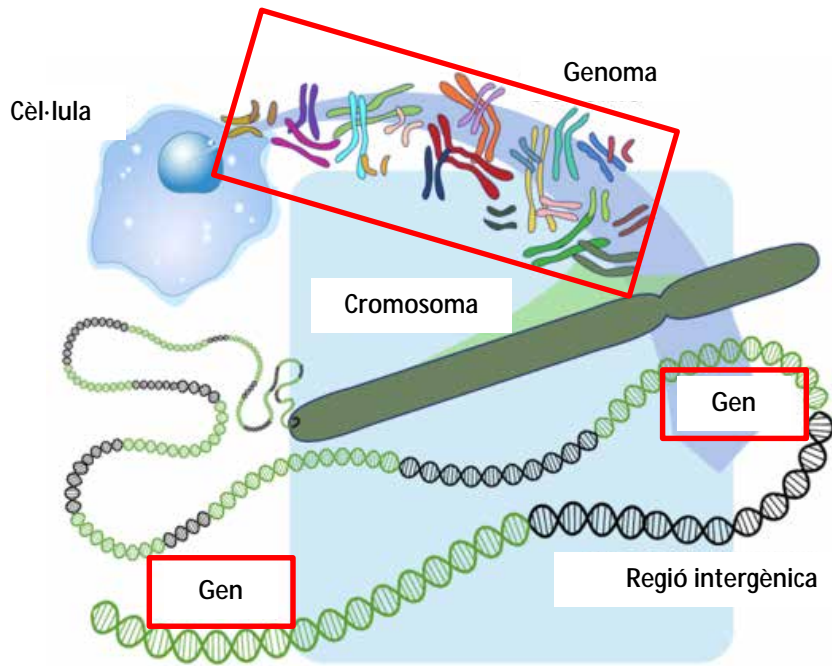
Seqüenciació de nova generació



- 2005: seqüenciació de nova generació (*next generation sequencing*, NGS), paral·lela de forma massiva

- 2008: seqüenciació del primer genoma humà per NGS (5 mesos, 1,5 milions de \$)

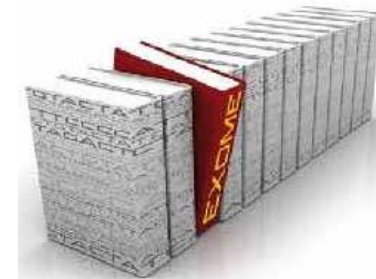
# Tipus de seqüenciació de nova generació



- Dirigida: gens seleccionats, ex. panell de gens implicats en càncer hereditari



- Exoma complet: tots els gens codificants del genoma



- Genoma complet: tot el genoma codificant i no codificant

Tecnologia	Cobertura	Biaix	Cost	Anàlisi
Dirigida	Gens seleccionats	Si	Assequible	Molt senzilla
Exoma complet	Tots els gens codificants	Si, menor	Assequible	Senzilla
Genoma complet	Tot el genoma	No	Car	Complexa

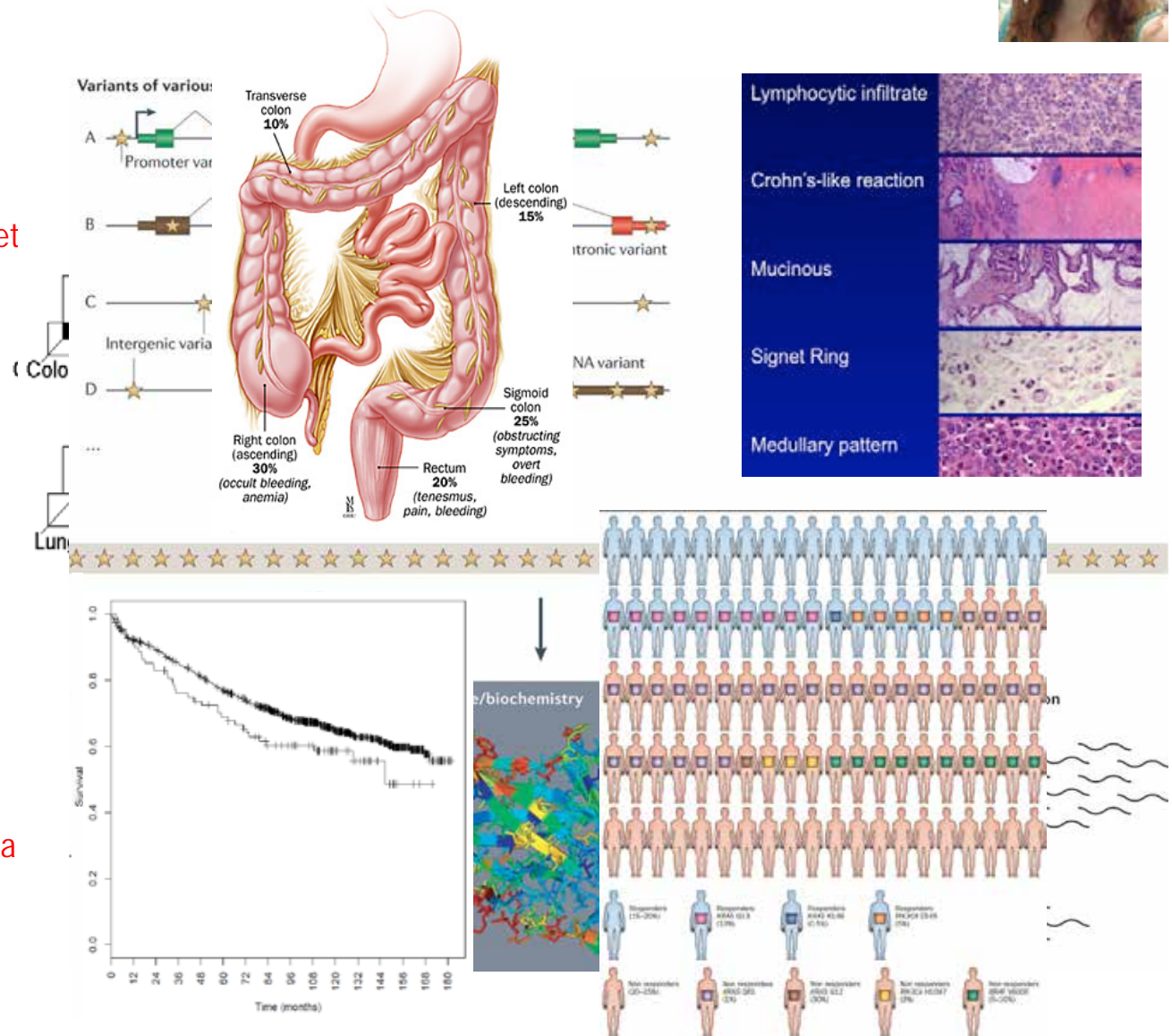
# Projecte de seqüenciació de l'exoma - objectius



Objectiu principal: Identificació de nous gens responsables de predisposició a CCR familiar

## Objectius específics:

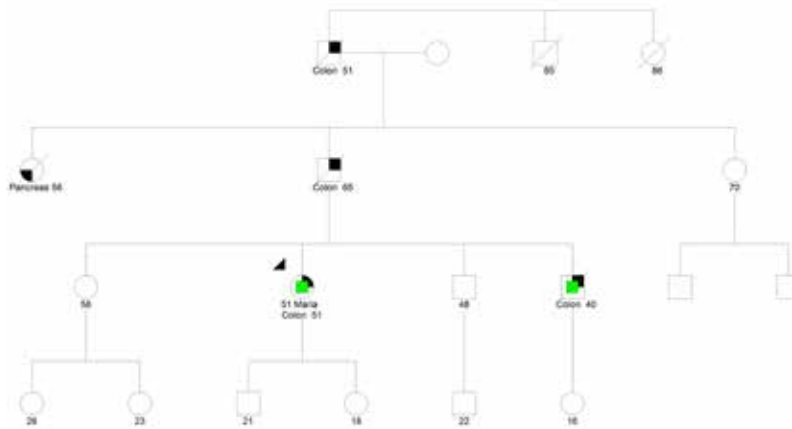
1. Seqüenciació de l'exoma complet (WES)
2. Estudi de segregació (SEG)
3. Anàlisi mutacional somàtic
4. Estudis funcionals
5. Avaluació de la rellevància clínica



# Projecte de seqüenciació de l'exoma – selecció de pacients

## Criteris de selecció pacients

- Sense alteracions a *APC*, *MUTYH* o els gens reparadors
- 3 o més familiars afectats
- Al menys 2 generacions consecutives afectades
- Al menys un cas de CCR diagnosticat abans dels 60



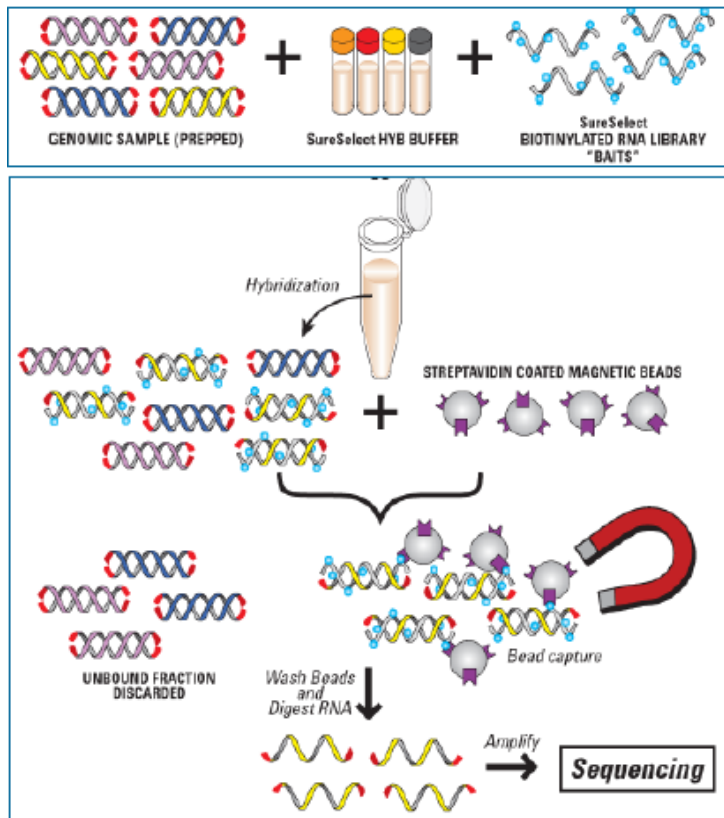
Seqüenciació de l'exoma del ADN germinal de **74 patients** amb CCR familiar no filiat (**40 families**) de clíniques d'alt risc de CCR (H. Clínic Barcelona, Trinidad Caldes-San Carlos Madrid, Luis Bujanda-Donosti, Joaquín Cubiella-Ourense, EPICOLON)



# Enriquiment de l'exoma i seqüenciació

## Enriquiment:

SureSelectXT Human All Exon V4 Agilent Kit



Seqüenciació de nova generació:  
Illumina HiSeq2000

**cnag**

centre nacional d'anàlisi genòmica  
centro nacional de análisis genómico

# Processament de les dades crues al CNAG

## Mapatge

- Filtrat i eliminació de les regions no ben mapajades
- Eliminació dels duplicats
- *Variant calling*
- Eliminació del biaix de cadena
- Realignement local



## Anotació de les variants

- Freqüència bases de dades: dbSNP, 1000Genomes, Exome Variant Server (EVS), ExAC, CIBERER Spanish Variant Server, CNAG
- Prediccions de SnpEff (codó stop, pèrdua pauta lectura, splicing, canvi aminoàcid, sinònima)
- Eines de predicció bioinformàtica per patogenicitat (PhyloP, SIFT, PolyPhen, MutationTaster, GERP, LRT, CADD)



# Anotació de les variants (plataforma de Bioinformàtica CIBERehd)

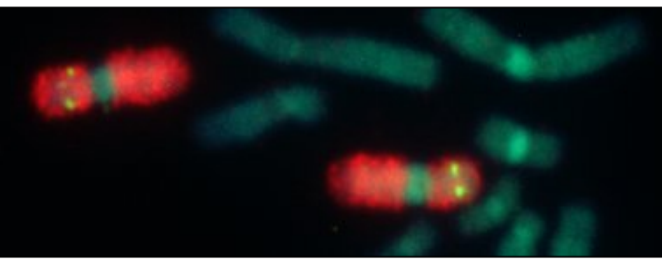


## Termes descrivint la funció biològica del gen

- Gene Ontology biological process terms
- KEGG pathway
- REACTOME

## Termes descrivint la prèvia implicació del gen en malaltia

- Entrez gene
- GeneRIF: Gene reference into function



## Gene

Gene integrates information from a wide range of species. A record may include nomenclature, Reference Sequences (RefSeqs), maps, pathways, variations, phenotypes, and links to genome-, phenotype-, and locus-specific resources worldwide.

## DADES CRUES

Mapatge genoma referència  
Anotació variants



## FILTRAT VARIANTS

Freqüència en controls sans (0-0.05%)  
Predicció efecte deleteri a la proteïna  
Gens amb funció compatible amb càncer  
Gens prèviament implicats en CCR



## SANGER

Confirmació de les variants seleccionades per seqüenciació Sanger



## SEGREGACIÓ

Segregació en familiars addicionals amb CCR, AA o altra neoplàsia



## ESTUDIS SOMÀTICS

Alteracions en el tumor dels gens seleccionats (2<sup>on</sup> hit)

GEN	MUTACIÓ	SEG CCR i AA	Alteració tumor	FUNCIÓ	OMIM
<i>CDKN1B</i>	c.195G>T (p.Q65H)	Y 4/4	Y	resposta al dany a l'ADN, inducció de l'apoptosi, regulació negativa de la proliferació cel·lular	600778 neoplàsia endocrina múltiple, càncer de pròstata hereditari
<i>XRCC4</i>	c.497_498delTG (p.V166Efs*3)	Y 2/2	Y	l·ligació de l'ADN implicada en reparació de l'ADN, reparació de trencaments de doble cadena	194363 limfoma de cèl·lula B perifèrica
<i>EPHX1</i>	c.293G>A (p.R98Q)	Y 2/2	Y	metabolisme de xenobiòtics pel citocrom P450	132810 desordre limfoproliferatiu
<i>NFKBIZ</i>	c.2153_2154dupAT (p.*719Ifs*10)	Y 4/4	N	via de senyalització TNF-alfa/NF-kB	608004
<i>SMARCA4</i>	c.295C>T (p.R99W)	Y 3/3	N	regulació del creixement cel·lular, regulació del cicle cel·lular mitòtic, remodelat de la cromatina	603254 síndrome de predisposició a tumors rabdoïdes, SCCOHT(5)
<i>BARD1</i>	c.1811-2A>G	Y 2/2	N	reparació de l'ADN, apoptosi, aturada del cicle cel·lular	601593 susceptibilitat a càncer de mama
<i>BRCA2</i>	c.7759C>T (p.L2587F)	Y 2/2	N	reparació de trencaments de doble cadena, resposta al dany a l'ADN	600185 susceptibilitat a càncer familiar de mama i ovari, susceptibilitat a càncer pancreàtic, anèmia de Fanconi

*Esteban-Jurado C et al. Genetics in Medicine 2015*

*Garre P et al. Clinical Genetics 2014*

# Projecte de seqüenciació de l'exoma – variants de número de còpia (copy-number variants, CNV)

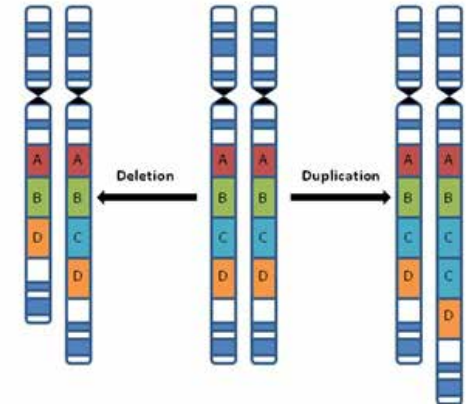
ü Caracterització de CNV amb eines bioinformàtiques emprant les dades de seqüenciació de l'exoma

ü Selecció de CNV rars com potencials candidats a ser l'esdeveniment mutacional en de predisposició genètica a CCR

ü Validació de les CNV i anàlisi de segregació mitjançant hibridació genòmica comparativa (*comparative genomic hybridization, CGH*)

ü Anàlisi de l'expressió gènica en mostres germinals i tumorals dels portadors

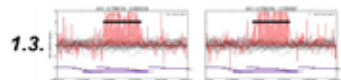
ü Estudis funcionals addicionals



## 1. CoNIFER's steps

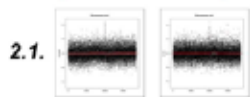
1.1.  $RPKM = \frac{10^6 \cdot \text{Read Starts}}{\text{Total Mapped Reads} \cdot \text{Target Size (bp)}}$

1.2. Singular Value Decomposition (SVD)



1.4. Exporting data

## 2. DNACopy

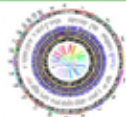


## 3. Filtering data

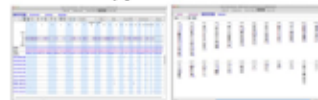
3.1. Shared variants & values > 1.5 and < -1.5

## 4. Visualization

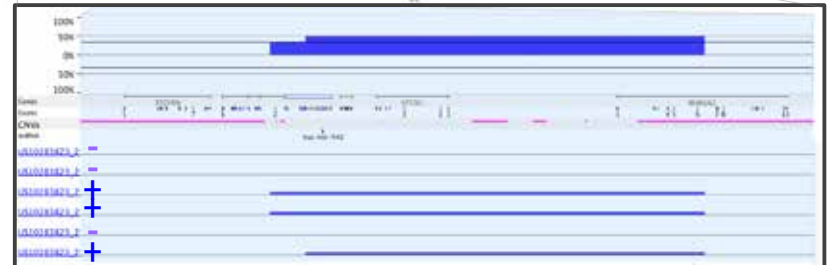
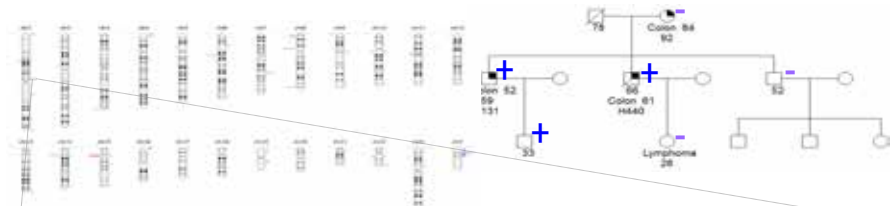
4.1. RCircos



4.2. Nexus Copy Number



## 5. DGV matching



# Projecte de seqüenciació de l'exoma – síndrome de poliposi serrada (SPS)



ù Els pòlips serrats se'ls ha considerat tradicionalment sense potencial maligne fins recentment

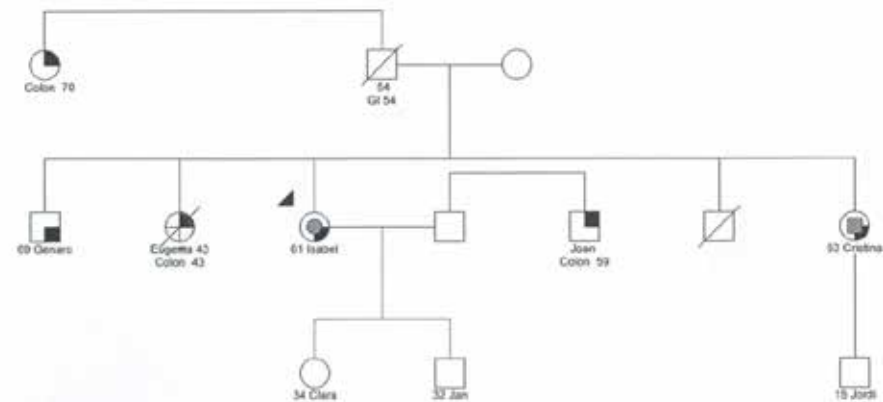
ù No es coneix cap gen de predisposició genètica en aquest subgrup de pacients CCR

ù Seqüenciació de l'exoma en famílies amb agregació per aquesta síndrome

ù  $\geq 2$  pacients seqüenciats per família

ù Seqüenciació aparellada de l'exoma germinal i el tumor/pòlip serrat en alguns pacients: gens supressors de tumors candidats amb 2 hits

ù Total dades SPS: **38 mostres, 16 famílies**



# Conclusions

ü La seqüenciació de nova generació constitueix un avenç important pel diagnòstic genètic de malalties hereditàries

ü Permet inspeccionar diversos gens, l'exoma codificant o tot el genoma en un mateix experiment

ü Implica una reducció en el temps d'obtenció d'un resultat

ü Comporta un reducció de costos important

ü Es poden identificar variants puntuals o de número de còpia

✓ És una tecnologia que ha revolucionat la recerca, es troba implantada i que ja s'ha diversificat per estudiar altres àcids nucleics, modificacions, cèl·lules, ...

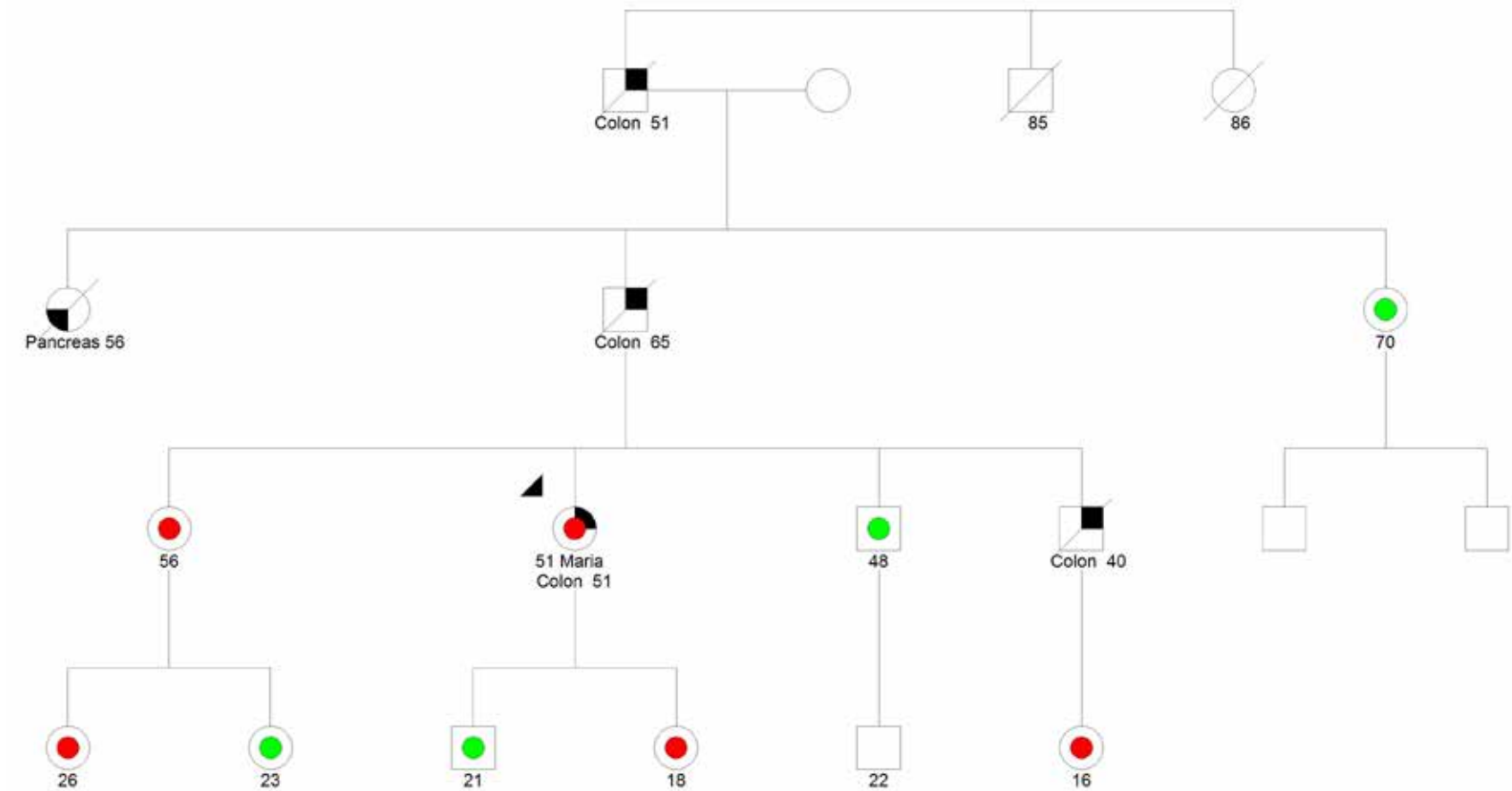
✓ Es preveu una implantació general en els centres de diagnòstic molecular per constituir-se en la principal aproximació per trobar mutacions de predisposició hereditària a malaltia







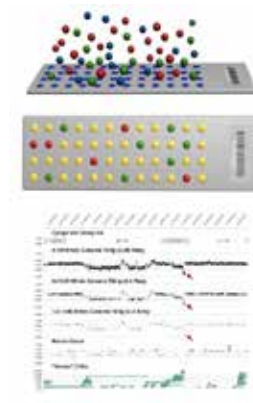
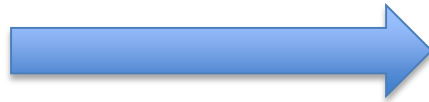
# Cas clínic



La identificació de la mutació causant de la predisposició al càncer permet:

- **Identificar als portadors** que estan "en risc"
- **Aplicar mesures preventives** (colonoscòpia)

# NGS: aplicació a l'anàlisi de predisposició al càncer

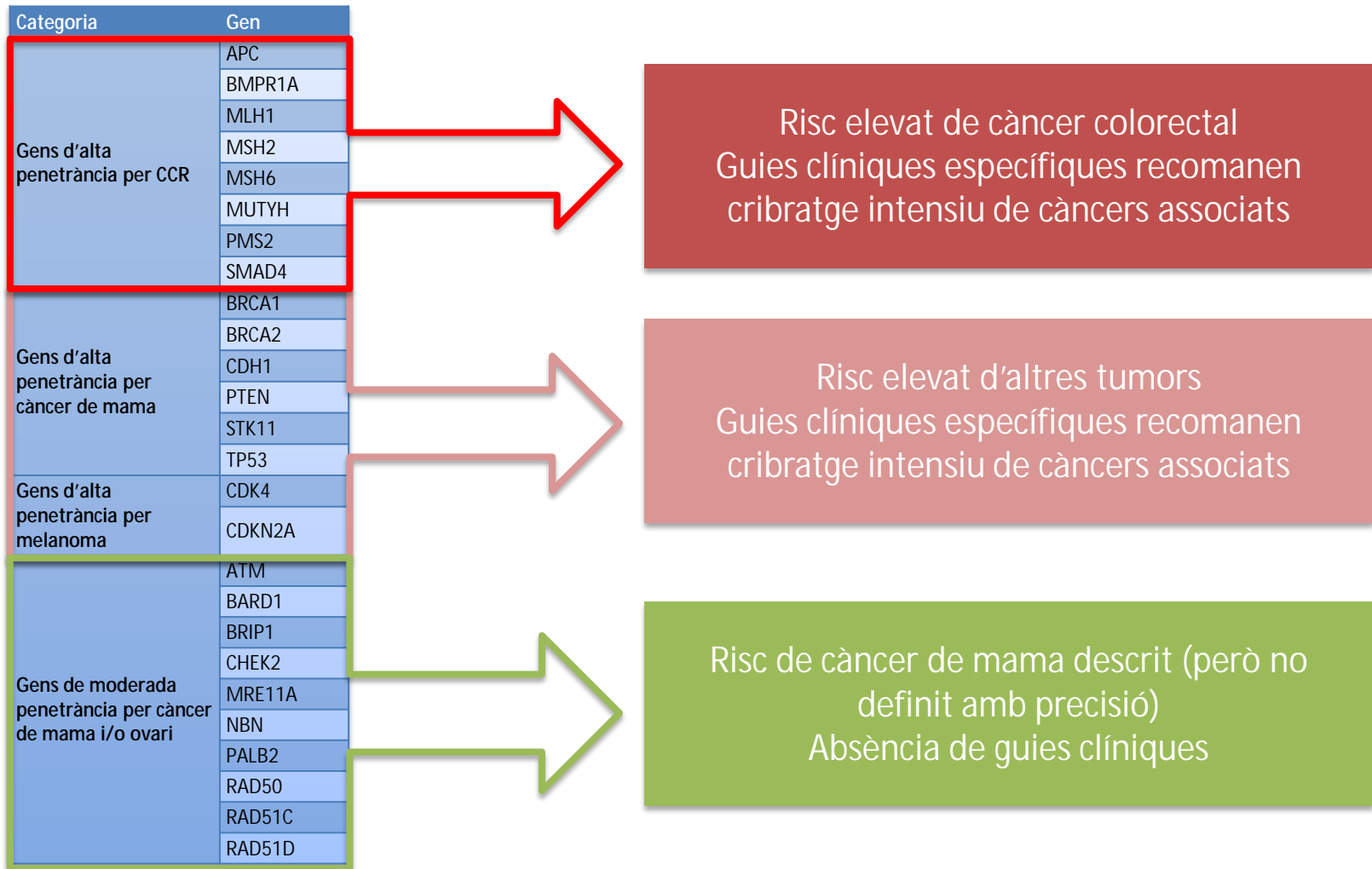


# Nous panells de gens en el càncer colorectal

Ambry Genetics	ColoNext	<i>APC, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, and TP53.</i>
Emory Genetics Laboratory	High Risk Colorectal Cancer Panel	<i>APC, ATM, BLM, BMPR1A, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11, TP53</i>
Fulgent Diagnostics	Colon Cancer NGS Panel	<i>APC, AXIN2, BMPR1A, BUB1B, CDH1, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, EXO1, FLCN, GALNT12, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS1, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11, TP53</i>
GeneDx	Colorectal Cancer Panel	<i>APC, ATM, AXIN2, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SCG5/GREM1, SMAD4, STK11, TP53</i>
Illumina	TruSight Cancer	<i>94 genes and 284 SNPs associated with a predisposition towards cancer</i>
Invitae	Colorectal cancer panel	<i>APC, AXIN2, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53, BUB1B, ENG, FLCN, GALNT12, MLH3</i>
Myriad Genetics	MyRisk	<i>APC, ATM, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A (P16INK4a y p14ARF), CHECK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, TP53, RAD51C, RAD51D, SMAD4 y STK11</i>

# Nous panells de gens en el càncer colorectal

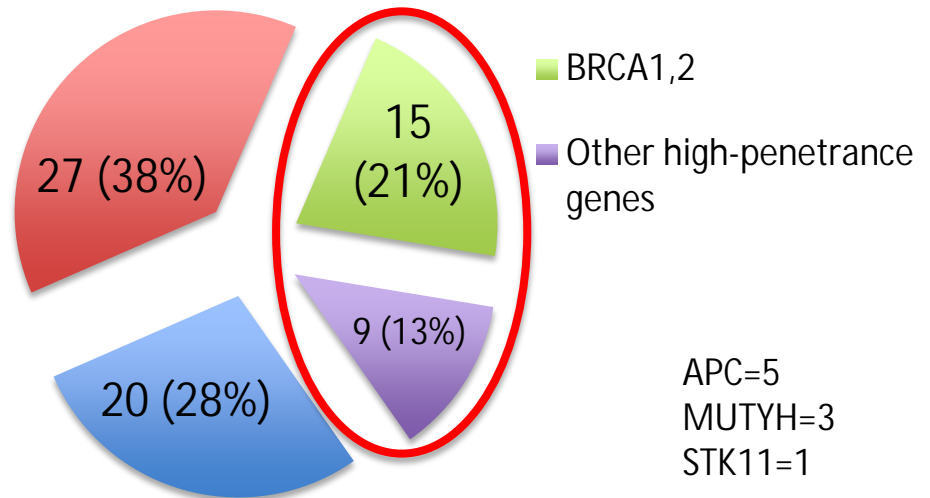
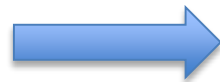
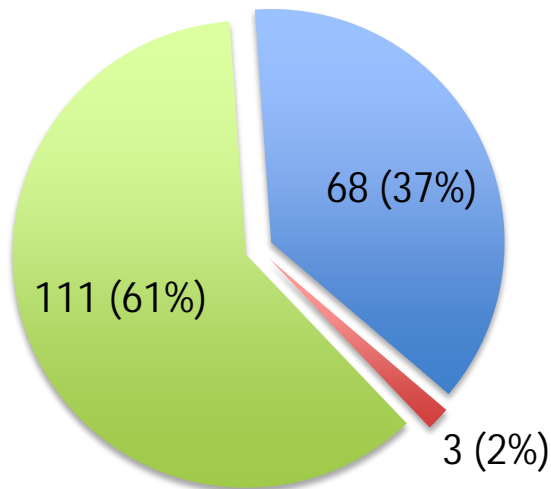
¿Quins gens hi ha a un panell?



# Exemple d'ús de panells en el CCR

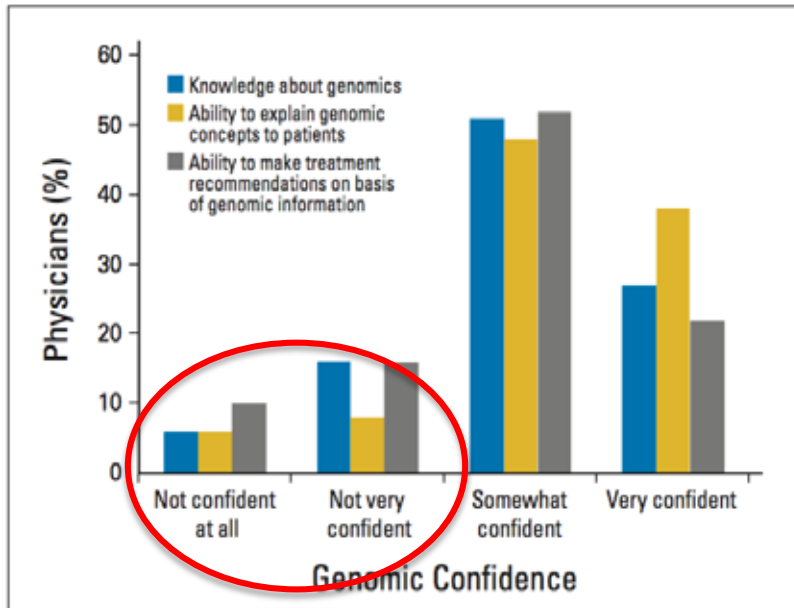
- N=1260 individus (Myriad Genetics)
- 182 (14.4%) individus amb  $\geq 1$  mutació patològica
  - 114 (9%) mutació Lynch
  - 71 (5.6%) mutació no Lynch
    - 3 pacients amb 2 mutacions: *MSH6+STK11*; *MSH2+ATM*; *MSH2+MUTYH* (mono)

- Non-Lynch only
- Both
- Lynch only

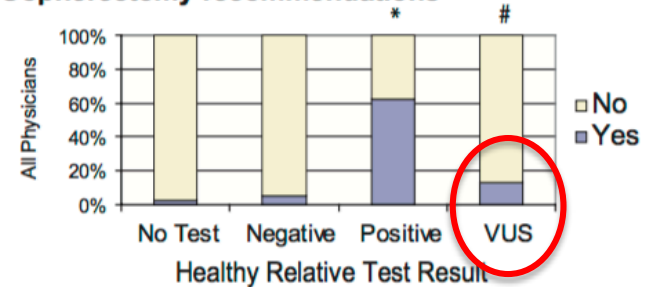


# Variants de significat incert

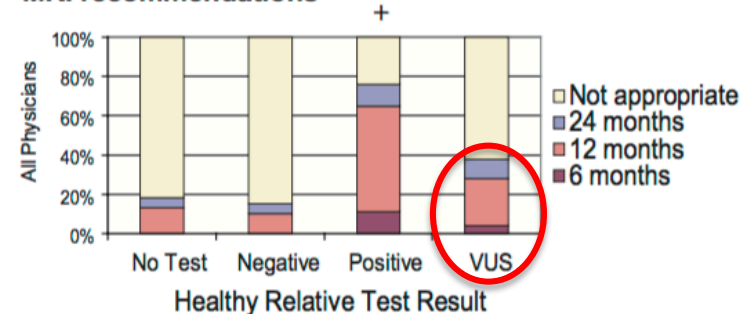
- 682 VSI a 479 individus (38% de la cohort)
- Gens: *ATM* (N=128), *APC* (N=51), *NBN* (N=51), and *BRIP1* (N=50)



## Oophorectomy recommendations



## MRI recommendations



# Panells a la clínica: preguntes obertes

## Integració dels panells multigen a l'enfoc "tradicional"

- ¿Quins individus/pacients hem d'analitzar?
- ¿Paper dels criteris clínics?
- Assessorament genètic: ¿qui i com? (ex: *TP53*, *CDH1*)

## Risc de càncer associat a les noves variant detectades

- ¿Quin risc absolut tenen les variants?
- ¿Quina és la magnitud del risc?
  - ∅ Baix risc (variants de susceptibilitat): 1-2 vegades més que població general
  - ∅ Risc moderat: 2-4 vegades
  - ∅ Alt risc: > 4 vegades superior
- ¿Quins mètodes s'han utilitzat per estimar els riscos?

## ¿Quin és el panell òptim?

- Ràpida evolució, nous gens

## ¿Tenen utilitat clínica les variants que analitzem?

- Variants de risc moderat: no hi han dades sobre l'impacte clínic!



# Conclusions

## La implementació de panells:

- Incrementarà la sensibilitat per a la detecció de mutacions
- Disminuirà els temps fins el diagnòstic
- Augmentaran les VSI (impacte desconegut en els pacients)
- Augmentarà la complexitat de l'assessorament genètic

## Necessitat de:

- Realitzar estudis ben dissenyats per avaluar la validesa i utilitat clínica.
- Avaluació global (història personal i familiar, altres factors de risc)
- Formació del personal sanitari involucrat en el maneig d'aquests pacients

# Membre de l'equip, col·laboradors i finançament

Antoni Castells, Meritxell Gironella, Eva Vaquero, Jordi Camps, Cristina Fillat, Jenifer Muñoz, Anna Serradesanferm, Miriam Cuatrecasas, Esther Samper, Isabel Quintanilla, Irene Sangrador, Clara Esteban, Elena Vila, Saray Durán, Asensio, J. Antonio García, Sebastià Franch, Sergi Castellví-Bel

Clínica d'Alt Risc de CCR: Francesc Balaguer, Maria Pellisé, Teresa Ocaña, María López-Ceron, Leticia Moreira, María Leoz, Sabela Carballal

Plataforma Bioinformàtica CIBERehd: Juanjo Lozano, Maria Vila, Pau Erola

CNAG: Anna Pristoupilova, Enric Serra, Sergi Beltrán, Lidia Àgueda, Berta Fusté, Mònica Bayés, Ivo Gut

Hospital San Carlos Madrid: Trinidad Caldés, Pilar Garre

Hospital Donostia: Luis Bujanda, Maribel Gómez

Hospital del Mar Barcelona: Anna Abulí, Montse Andreu, Xavier Bessa, Juan Ramón González

Santiago de Compostela: Clara Ruiz-Ponte, Ángel Carracedo, Ceres Fernández-Rozadilla, Alejandro Brea-Fernández, María Castro, Antonio Salas

CIC bioGUNE: Ana M<sup>a</sup> Aransay, Aintzane González, Nuria Macias

IRB Barcelona: Eduard Batlle

Hospital Santa Lucía Cartagena: Pablo Conesa-Zamora, Miguel Pérez-Guillermo

Hospital Universitario de Móstoles: Daniel Rodríguez-Alcalde

EuCOLONGENE: Ian Tomlinson, Luis Carvajal-Carmona, Jean-Baptiste Cazier, Axel Walther, Alan Pittman, Richard Houlston, Malcolm Dunlop, Albert Tenesa, Kari Hemminki, Jochen Hampe, Stephan Buch, Clemens Schafmayer, Annika Lindblom, Juul Wijnen, Tom van Wezel, Pavel Vodicka, Lauri Aaltonen, Roland Kuiper, Paolo Peterlongo, Pavel Vodicka, Andrea Gsur, Hilal Ozdag

