

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA PŘÍČIN
VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH FOREM KOLOREKTÁLNÍ
POLYPÓZY

Mgr. Martina Florianová

2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|--------|--|
| AFAP | atenuovaná forma familiární adenomatózní polypózy |
| BER | bázová excizní oprava |
| CHRPE | vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny |
| cDNA | komplementární DNA |
| CIN | chromozomální nestabilita |
| CIMP | metylační fenotyp CpG ostrůvků |
| CRC | kolorektální karcinom |
| gDNA | genomová DNA |
| DCE | denaturační kapilární elektroforéza |
| DGGE | denaturační gradientová gelová elektroforéza |
| dHPLC | denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| FAP | familiární adenomatózní polypóza |
| HNPCC | hereditární nepolypózní kolorektální karcinom |
| HRM | vysokorozlišovací analýza křivek tání |
| LOH | ztráta heterozygoty |
| MAP | MUTYH - asociovaná polypóza |
| MIN | mikrosatelitová nestabilita |
| MLPA | multiplex ligation-dependent probe amplification |
| MMR | mismatch repair geny |
| mRNA | mediátorová RNA |
| 8-oxoG | 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosin |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |

OBSAH

| | |
|---|----|
| ABSTRAKT | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| ÚVOD | 7 |
| Molekulární dráhy vedoucí ke vzniku CRC | 7 |
| Hereditární formy CRC | 8 |
| Familiární adenomatózní polypóza | 9 |
| Gen <i>APC</i> | 9 |
| MUTYH - asociovaná polypóza | 10 |
| Gen <i>MUTYH</i> | 10 |
| HYPOTÉZY | 11 |
| CÍLE | 12 |
| MATERIÁL A METODY | 13 |
| SOUBOR | 13 |
| METODY | 15 |
| IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN | 15 |
| DETEKCE DLOUHÝCH DELECI GENU <i>APC</i> | 15 |
| FUNKČNÍ ANALÝZA DETEKOVANÝCH ZÁMĚN | |
| V GENU <i>APC</i> NA ÚROVNI RNA | 16 |
| MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MUTYH</i> | 17 |
| ANALÝZA VYBRANÝCH SEKVENČNÍCH VARIANT | |
| GENU <i>MUTYH</i> U KONTROLNÍHO SOUBORU | 18 |
| MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MSH6</i> | 19 |
| VÝSLEDKY | 20 |
| DETEKCE DLOUHÝCH DELECI GENU <i>APC</i> | 20 |
| FUNKČNÍ ANALÝZA DETEKOVANÝCH ZÁMĚN | |
| V GENU <i>APC</i> NA ÚROVNI RNA | 20 |
| MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MUTYH</i> | 21 |
| MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MSH6</i> | 24 |
| DISKUZE | 25 |
| SHRNUTÍ | 30 |
| LITERATURA | 32 |
| SEZNAM PUBLIKACÍ | 37 |

SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Publikace, které jsou podkladem disertace

a) s IF

Sulova M, Zidkova K, Kleibl Z, Stekrova J, Kebrdlova V, Bortlik M, Lukas M, Kohoutova M. Mutation analysis of the MYH gene in unrelated Czech APC mutation-negative polyposis patients. *Eur J Cancer*. 2007 Jul; 43(10): 1617-21.

IF: 4,454

Stekrova J, Sulova M, Kebrdlova V, Zidkova K, Kotlas J, Ilencikova D, Vesela K, Kohoutova M. Novel *APC* mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med Genet*. 2007; 8: 16.

IF: 2,42

Schwarzova L, Stekrova J, Florianova M, Novotny A, Schneiderova M, Lnenicka P, Kebrdlova V, Kotlas J, Vesela K, Kohoutova M. Novel mutations of the APC gene in the Czech FAP families and genetics consequences of splicing mutations. *Fam Cancer*. V recenzním řízení.

IF (rok 2010): 2,139

b) bez IF

Kohoutová M, Šteková J, Šulová M, Zídková K, Kleibl Z, Vandrovcová J, Kebrdlová V, Kotlas J, Jirásek V. Hereditární formy kolorektální adenomatózní polypózy. *Časopis lékařů českých*, 2006, 145, 475-479.

Šteková J, Šulová M, Zídková K, Kleibl Z, Vandrovcová J, Kebrdlová V, Kotlas J, Kohoutová M. Familiární adenomatózní polypóza – novinky v molekulární diagnostice. *Klinická onkologie*, 2006, suppl. 19, 63-67.

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

Hirschfeldova K, Solc R, Baxova A, Zapletalova J, Kebrdlova V, Gaillyova R, Prasilova S, Soukalova J, Mihalova R, Lnenicka P, Florianova M, Stekrova J. SHOX gene defects and selected dysmorphic signs in patients of idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis. *Gene*. 2012 Jan 10; 491(2): 123-127.

IF: 2,266

- 48 Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ, Barker MA, Arnold S, Wynter CV, Matsubara N, Tanaka N, Young JP, Leggett BA, Jass JR. Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 May; 40(1): 1-9.
- 49 Peterlongo P, Mitra N, Sanchez de Abajo A, de la Hoya M, Bassi C, Bertario L, Radice P, Glogowski E, Nafa K, Caldes T, Offit K, Ellis NA: Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis*, 2006, 27: 2243-2249.
- 50 Niessen RC, Sijmons RH, Ou J, Olthof SG, Osinga J, Ligtenberg MJ, Hogervorst FB, Weiss MM, Tops CM, Hes FJ, de Bock GH, Buys CH, Kleibeuker JH, Hofstra RM. MUTYH and the mismatch repair system: partners in crime? *Hum Genet* 2006; 119(1-2): 206-211.
- 51 Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet*. 2003 Jul 5; 362(9377): 39-41.

ABSTRAKT

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejčastěji diagnostikovaným nádorům. Hereditární formy kolorektální adenomatózní polypózy jsou predispozicí pro vznik CRC. Mezi nejvíce studované syndromy patří familiární adenomatózní polypóza (FAP), podmíněná zárodečnými mutacemi v genu *APC*, a MUTYH - asociovaná polypóza (MAP), podmíněná zárodečnými mutacemi v genu *MUTYH*.

Cílem práce bylo objasnit genetické příčiny kolorektální polypózy v souboru probandů bez detekované zárodečné mutace v genu *APC*. V rámci práce byla testována přítomnost dlouhých delecí genu *APC*, hledány zárodečné mutace v genu *MUTYH*, případně zárodečné mutace v genu *MSH6* u probandů s monoalelickou *MUTYH* mutací a dále byl testován vliv detekovaných *APC* variant na expresi genu.

Vyšetření dlouhých delecí v genu *APC* bylo provedeno metodou MLPA v souboru 310 probandů bez detekované zárodečné mutace v genu *APC*. Mutační analýza celého genu *MUTYH* byla provedena v souboru 120 *APC*-negativních probandů metodou dHPLC. Dále byl vyšetřen exon 7 a exon 13 genu *MUTYH* u 145 *APC*-negativních probandů metodou HRM. Vliv detekované záměny na expresi genu *APC* byl testován u deseti variant.

Metodou MLPA byli ve vyšetřovaném souboru detekováni 4 probandi s dlouhou delecí genu *APC* (frekvence 1,3%), což je nižší záchyt než v zahraničí. Funkční analýza detekovaných *APC* variant potvrdila ve většině zkoumaných případů predikovaný vliv na sestřih. Ačkoli bylo v genu *MUTYH* popsáno více než 80 mutací a frekvence bialelických mutací se celosvětově pohybuje v rozmezí 9 - 40%, v české populaci byly nalezeny jen čtyři zárodečné mutace a frekvence bialelických mutací dosáhla 1,7% v souboru 120 *APC*-negativních probandů a 2,8% v souboru 145 *APC*-negativních probandů, u kterých byla mutační analýza genu *MUTYH* soustředěna pouze na exon 7 a 13. Mutační analýzou genu *MUTYH* bylo odhaleno kromě zmíněných čtyř mutací ještě 12 sekvenčních záměn charakteru polymorfismů. Mutační analýza genu *MSH6* provedená u jedinců s detekovanou monoalelickou mutací genu *MUTYH* neodhalila žádné zárodečné mutace jen záměny charakteru polymorfismů.

Klíčová slova: *APC*, CRC, FAP, MAP, *MUTYH*

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. Hereditary colorectal adenomatous polyposis syndromes are a predisposition to colorectal carcinoma development. The most common analyzed syndromes are familial adenomatous polyposis (FAP) that results from germline mutations in the *APC* gene and MUTYH - associated polyposis (MAP) caused by germline mutations in the *MUTYH* gene.

The aim of this study was to clarify genetics causes of colorectal polyposis in a set of probands without the germline mutation in the *APC* gene. Within study's scope the presence of large deletion in the *APC* gene was tested, there were looked for germline mutations in the *MUTYH* gene, alternatively germline mutations in the *MSH6* gene by probands with monoallelic *MUTYH* mutation, item there was tested an effect of detected *APC* variants on gene expression.

Screening for large deletions was performed by multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). A set of 120 *APC*-negative probands was examined for the presence of germline *MUTYH* mutations by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC). Subsequently a set of 145 *APC*-negative probands was screened only for germline *MUTYH* mutations in exon 7 and 13 by high resolution melting (HRM) analysis. Analysis of the effect on expression was tested by ten *APC* variants.

MLPA analysis revealed large deletions in four of 310 probands (frequency 1,3%). Analysis of ten *APC* variants confirmed in most of them predicted effect on splicing. Mutational analysis of *MUTYH* gene revealed only four germline mutations. The frequency of biallelic mutation reached 1,7% in set of 120 *APC*-negative probands and 2,8% in set of 145 *APC*-negative probands by which only exon 7 and 13 of *MUTYH* gene were examined. Besides germline mutations it was detected 12 sequence variants in *MUTYH* gene. Mutational analysis of *MSH6* gene revealed no germline mutation in proband with monoallelic germline mutation in *MUTYH* gene. By analysis only polymorphic variants were detected.

Key words: *APC*, CRC, FAP, MAP, *MUTYH*

- 39 Aceto G, Curia MC, Veschi S, De Lellis L, Mammarella S, Catalano T, Stuppia L, Palka G, Valanzano R, Tonelli F, Casale V, et al. Mutations of *APC* and *MYH* in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat.* 2005 Oct; 26(4): 394.
- 40 Russell AM, Zhang J, Luz J, Hutter P, Chappuis PO, Berthold CR, Maillet P, Mueller H, Heinimann K. Prevalence of *MYH* germline mutations in Weiss *APC* mutation-negative polyposis patients. *Int J Cancer.* 2006; 118: 1937-1940.
- 41 Lefevre JH, Rodrique CM, Mourra N, Bennis M, Flejou JF, Parc R, Tiret E, Gespach C, Parc YR. Implication of *MYH* in colorectal polyposis. *Ann Surg.* 2006; 244: 874-879.
- 42 Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, Engwall Y, Hallberg B, Karlsson G, Gronberg H, Karlsson P, Wallgren A, Wahlstrom J, Hulterantz R, Nordling M. Novel findings in Swedish patients with *MYH* associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4: 499-506.
- 43 Jo WS, Bandipalliam P, Shannom KM, Niendorf KB, Chan-Smutko G, Hur C, Syngal S, Chung DC. Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline *MYH* mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3: 1022-1028.
- 44 Croitoru ME, Cleary SP, Berk T, Di Nicola N, Kopolovic I, Bapat B, Gallinger S. Germline *MYH* mutations in a clinic-based series of Canadian multiple colorectal adenoma patients. *J Surg Oncol.* 2007 May 1; 95(6): 499-506.
- 45 Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R, Milward EA, Spigelman AD, Burgess B, Groombridge C, Kirk J, Tucker K, Ward R, Williams R, Scott RJ. Mutation analysis of the *MYH* gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline *APC* mutations. *Int J Cancer.* 2005 Aug 10; 116(1): 73-77.
- 46 Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, Steenblock KJ, Petersen GM, Halling KC, French AJ, Johnson RA, Burgart LJ, Rabe K, Lindor NM, Thibodeau SN. *MYH* mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology.* 2004 Jul; 127(1): 9-16.
- 47 Nielsen M, Franken P, Reinards T, Weiss M, Wagner A, van der Klift H, Kloosterman S, Houwing-Duistermaat J, Aalfs C, Ausems M, Brocker-Vriends A, Gomez G, Hoogerbrugge N, Menko F, Sijmons R, Verhoef S, Kuipers E, Morreau H, Breuning M, Tops C, Wijnen J, Vasen H, Fodde R, Hes F. Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with *MYH* associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet.* 2005 September; 42(9): e54.

- 28 Sulova M, Zidkova K, Kleibl Z, Stekrova J, Kebrdlova V, Bortlik M, Lukas M, Kohoutova M. Mutation analysis of the MYH gene in unrelated Czech APC mutation-negative polyposis patients. *Eur J Cancer*. 2007 Jul;43(10):1617-1621.
- 29 Olschwang S, Blanché H, de Moncuit C, Thomas G. Similar colorectal cancer risk in patients with monoallelic and biallelic mutations in the MYH gene identified in a population with adenomatous polyposis. *Genet Test*. 2007 Fall; 11(3): 315-320.
- 30 Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res*. 1999 Oct 15; 59(20): 5068-5074.
- 31 Vahteristo P, Ojala S, Tamminen A, Tommiska J, Sammalkorpi H, Kiuru-Kuhlefelt S, Eerola H, Aaltonen LA, Aittomäki K, Nevanlinna H. No MSH6 germline mutations in breast cancer families with colorectal and/or endometrial cancer. *J Med Genet*. 2005 Apr; 42(4): e22.
- 32 Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, Moisio AL, Jarvela I, Arte S, Jarvinen HJ, Peltomäki P. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5651-5659.
- 33 Michils G, Tejpar S, Thoelen R, Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns JP, Legius E, and Matthijs G. Large Deletions of the APC Gene in 15% of Mutation-Negative Patients with Classical Polyposis (FAP): A Belgian Study. *Hum Mutat*. 2005; 25: 125-134.
- 34 Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W. Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J Med Genet*. 2005; 42: 185-192.
- 35 Kohoutova M, Stekrova J, Jirasek V, Kapras J. APC germline mutations identified in Czech patients with familial adenomatous polyposis. *Hum Mutat*. 2002 Apr; 19(4): 460-461.
- 36 Stekrova J, Sulova M, Kebrdlova V, Zidkova K, Kotlas J, Ilencikova D, Vesela K, Kohoutova M. Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med Genet*. 2007; 8: 16.
- 37 Schwarzova L, Stekrova J, Florianova M, Novotny A, Schneiderova M, Lnenicka P, Kebrdlova V, Kotlas J, Vesela K, Kohoutova M. Novel mutations of the APC gene in the Czech FAP families and genetics consequences of splicing mutations. *Fam Cancer*. V recenzním řízení.
- 38 Aretz S, Uhlhaas S, Sun Y, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Möslein G, Schulmann K, Propping P, Friedl W. Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat*. 2004 Nov; 24(5): 370-380.

ÚVOD

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí v ekonomicky vyspělých zemích světa a třetí nejčastější příčinou úmrtí v rozvojových zemích. Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejčastěji diagnostikovaným nádorům. CRC se vyskytuje ve formě sporadické (cca 75%), hereditární (cca 10 - 15%) a familiární (cca 10%).

Nejčastějšími predispozicemi pro vznik hereditárních forem CRC jsou hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) a kolorektální adenomatózní polypózy, které podmiňují vznik CRC z 5%, resp. 1%. Mezi nejvíce studované polypózní syndromy patří familiární adenomatózní polypóza (FAP) a MUTYH - asociovaná polypóza (MAP).

Molekulární dráhy vedoucí ke vzniku CRC

Vývoj kolorektálního karcinomu je mnohastupňový proces, při kterém dochází k dysfunkci mnoha různých genů. Geny, které jsou mutovány v různých stádiích vývoje kolorektálního karcinomu, zahrnují tumor supresorové geny, protoonkogeny, DNA repair geny [1].

V uplynulých 15 letech molekulární biologové a genetici odhalili základní molekulární a genetické mechanismy vývoje rakoviny střev. Tyto mechanismy byly spojeny s dvěma dráhami, k nimž v nedávné době přibyla ještě jedna dráha:

*dráha chromozomální nestability (Chromosomal Instability, CIN) zahrnující numerické i strukturální chromozomální aberace a ztrátu heterozygosity (Loss of Heterozygosity, LOH)

*dráha mikrosatelitové nestability (Microsatellite Instability, MSI), která je spjata s mutacemi v mutátorových genech (mismatch repair geny, MMR), tj. *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* a *PMS2*, a podmiňuje asi 15% všech CRC případů [2][3].

*dráha metylátorového fenotypu CpG ostrůvků (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP), která je asociována s metylací cytosinů CpG ostrůvků

v promotorových oblastech genů s různými funkcemi, např. tumor supresorových genů (zejména *RBI* genu, *VHL* genu) či DNA reparačních genů (gen *MLH1*, gen *BRCA1*) [4].

V rámci studia kolorektálních karcinomů, jejichž vznik je popisován v souvislosti s přeměnou adenom - karcinom, byla vyčleněna skupina „serrated“ adenokarcinomů. „Serrated“ adenokarcinomy se vyvíjejí ze „serrated“ (pilovitých) polypů, kterých je známo několik typů: hyperplastické polypy (HP), sesilní „serrated“ adenomy (SSA), „traditional serrated“ adenomy (TSA), smíšené polypy (MP). Přeměna „serrated“ polypů v „serrated“ adenokarcinomy je popisována jako „serrated“ dráha [5].

Hereditární formy CRC

Hereditární formy CRC jsou charakterizovány přítomností dědičného nepolypózního nebo polypózního syndromu. Jsou přítomné u 5 - 10% pacientů s tímto onemocněním. Mezi nepolypózní formy patří hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) neboli Lynchův syndrom.

Hereditární gastrointestinální polypózní syndromy jsou rozděleny dle typu polypů, tj. zda se u nich predominantně vyskytují polypy adenomatózní (skupina zahrnující familiární adenomatózní polypózu) nebo polypy hamartomatózní. Hamartomatózní polypózy představují heterogenní skupinu syndromů s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Mezi tyto syndromy patří Peutz-Jeghersův syndrom, juvenilní polypóza a PTEN hamartomatózní syndromy zahrnující Cowden syndrom, Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom a další syndromy podmíněné zárodečnými mutacemi v genu *PTEN* [6].

- „multiple“ colorectal adenomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 March 5; 99(5): 2954-2958.
- 17 Heinimann K, Thompson A, Locher A, Furlanetto T, Bader E, Wolf A, Meier R, Walter K, Bauerfeind P, Marra G, Müller H, Foernzler D, Dobbie Z. Nontruncating APC germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in APC mutation-negative polyposis. Cancer Res. 2001 Oct 15;61(20):7616-7622.
 - 18 Arnold CN, Goel A, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnoli MM, Boland CR. APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. Cancer Biol Ther. 2004 Oct; 3(10): 960-964.
 - 19 Olschwang S, Laurent-Puig P, Groden J, White R, Thomas G.: Germ-line mutations in the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Am J Hum Genet. 1993 Feb; 52(2): 273-279.
 - 20 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. Nucl Acid Res. 1988; 16: 1215.
 - 21 Spirio L, Joslyn G, Nelson L, Leppert M, White R. A CA repeat 30-70 KB downstream from the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Nucleic Acids Res. 1991 Nov 25; 19(22): 6348.
 - 22 Breukel C, Tops C, van Leeuwen C, van der Klift H, Nakamura Y, Fodde R, Khan PM. CA repeat polymorphism at the D5S82 locus, proximal to adenomatous polyposis coli (APC). Nucleic Acids Res. 1991 Oct 25; 19(20): 5804.
 - 23 Eckert WA, Jung C, Wolff G. Presymptomatic diagnosis in families with adenomatous polyposis using highly polymorphic dinucleotide CA repeat markers flanking the APC gene. J Med Genet. 1994 Jun; 31(6): 442-447.
 - 24 Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. N Engl J Med 2003; 348(9): 791-799.
 - 25 Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. Int J Cancer 2006; 119(4): 807-814.
 - 26 Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Giria J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehm A, Ramos JS, Boavida MG. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. Hum Mutat 2004; 24(4): 353-364.
 - 27 Al-Tassan N, Eisen T, Maynard J, Bridle H, Shah B, Fleischmann C, Sampson JR, Cheadle JP, Houlston RS. Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma. Hum Genet 2004; 114 (2): 207-210.

LITERATURA

- 1 Narayan S, Roy D. Role of *APC* and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*. 2003; 2: 41.
- 2 Worthley DL, Leggett BA. Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *Clin Biochem Rev*. 2010 May; 31(2): 31-38.
- 3 Tan WY, Yan XW. A new stochastic and state space model of human colon cancer incorporating multiple pathways. *Biol Direct*. 2010; 5: 26.
- 4 Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011 Feb 14: 1-19.
- 5 Noffsinger AE. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2009; 4: 343-364.
- 6 Zbuk KM, Eng C. Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007 Sep; 4(9): 492-502.
- 7 Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*. 2000 May; 18(9): 1967-1979.
- 8 Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. 1987 Aug 13-19; 328(6131): 614-616.
- 9 Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9; 66 (3): 589-600.
- 10 Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991 Aug 9; 253 (5020): 661-665.
- 11 Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr; 10(7): 721-733.
- 12 Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS. Comprehensive analysis of the contribution of germline *MYH* variation to early-onset colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2004; 109: 554-558.
- 13 Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 1996; Jul; 178(13): 3885-3892.
- 14 Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants 346 of MYH associated with somatic G:C ! T:A mutations in 347 colorectal tumors. *Nat Genet* 2002; 30: 227-232.
- 15 Kairupan C, Scott RJ. Base excision repair and the role of MUTYH. *Hered Cancer Clin Pract*. 2007 Dec 15; 5(4):199-209.
- 16 Sieber OM, Lamlum H, Crabtree M, et al. Whole-gene *APC* deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or

Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP, OMIM#175100) je autozomálně dominantně dědičná predispozice ke vzniku CRC. Příčinou FAP jsou zárodečné mutace v genu *APC* (adenomatous polyposis coli).

FAP se vyskytuje ve dvou formách. Klasická forma je charakterizovaná výskytem stovek až tisíců adenomatózních polypů v tlustém střevě a konečniku a časným nástupem onemocnění (2. dekáda života). V některém z velkého množství kolorektálních polypů se postupně vyvíjejí adenokarcinomy. Charakteristický pro klasickou formu FAP je výskyt řady extrakolických projevů mezi něž patří vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny (CHRPE), výskyt polypů v duodenu, výskyt desmoidních tumorů, epidermoidních cyst, osteomů, nádorů centrálního nervového systému a vzácný není ani výskyt hepatoblastomu.

Atenuovaná forma (AFAP) je charakterizovaná menším počtem polypů (<100) a pozdějším nástupem onemocnění. Riziko vzniku karcinomu je však rovněž vysoké. U pacientů s AFAP jsou mutace lokalizovány na 5' a 3' konci genu *APC* a dále v exonu 9 tohoto genu [7].

Gen *APC*

Gen *APC* je tumor supresorový gen lokalizovaný na chromozómu 5 (5q21-q22) [8] a identifikovaný pozičním klonováním lokusu FAP [9][10]. Kódující sekvenci genu tvoří 15 exonů s alternativním sestřihem exonů 9, 10A a 14.

Gen *APC* kóduje protein APC o velikosti 310kDa, který je přítomen v buňkách mnoha tkání - nachází se v cytoplazmě i v jádře.

Protein APC se účastní regulace buněčné migrace, buněčné adheze a stability mikrotubulárního cytoskeletu, průběhu buněčného cyklu, segregace chromozomů a apoptózy [11].

MUTYH - asociovaná polypóza

MUTYH - asociovaná polypóza (MAP) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění podmíněné nálezem bialelických zárodečných mutací v genu *MUTYH*. MAP je popisována v souvislosti s přibližně 10% klinicky diagnostikovaných FAP případů, u kterých nebyla detekována mutace v genu *APC*, a dále se vyskytuje u 10 - 40% osob s 15 - 100 střevními adenomatózními polypy. MAP odpovídá za přibližně 0,5% všech případů CRC. Je zajímavé, že u jedné třetiny CRC případů asociovaných s MAP se nevyskytují žádné adenomy [12].

Gen *MUTYH*

Gen *MUTYH* je 7,1kb dlouhý, obsahuje 16 exonů a je lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu 1 (1p34.3 - 1p32.1) [13].

Gen *MUTYH* (MutY homolog *Escherichia coli*) je součástí opravného systému buňky zajišťujícího bázové excizní opravy (base excision repair, BER). BER hraje důležitou úlohu při opravě mutací způsobených oxidačními produkty, které vznikají v průběhu aerobního metabolismu. Nejstabilnějším produktem oxidačního poškození DNA je 8-oxoG (8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosin), který se místo s cytosinem páruje s adeninem a vede k záměně bází G:C→T:A. Produktem genu *MUTYH* je adenin specifická DNA glykosyláza, která odstraňuje nesprávně spárovaný adenin z vazby na 8-oxoG [13][14].

In vitro i in vivo bylo demonstrováno, že *MUTYH* protein přímo interaguje s několika proteiny zahrnutými v dalších drahách podílejících se na opravě DNA, jedná se o proliferující buněčný jaderný antigen (PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen), endonukleáza 1 štěpící apurinové/aprimidinové místo (*APE1*, apurinic/aprimidinic endonuclease 1), replikační protein A (RPA, Replication protein A) a mutS homolog6 (*MSH6*) [15].

populaci byly nalezeny jen čtyři zárodečné mutace a frekvence bialelických mutací dosáhla 1,7% v souboru 120 *APC*-negativních probandů a 2,8% v souboru 145 *APC*-negativních probandů, u kterých byla mutační analýza genu *MUTYH* soustředěna pouze na exon 7 a 13 a teprve v případě nálezů mutace pouze v jednom z uvedených exonů následovala přímá sekvenace zbývajících exonů genu *MUTYH*.

Dvě z detekovaných mutací u vyšetřovaných souborů představují nejčastější mutace detekované v kavkazské populaci. Záchyt bialelických mutací bohužel nenaplnil očekávání, ale i přes tento fakt lze konstatovat, že vyšetřením genu *MUTYH* u *APC*-negativních probandů došlo k nárůstu objasnění příčiny polypózních onemocnění.

Mutační analýza genu *MSH6* u probandů s monoalelickou *MUTYH* mutací neodhalila žádnou zárodečnou mutaci, ale ukázala další možný směr výzkumu v oblasti funkčního vlivu detekovaných záměn na fenotyp probandů.

SHRNUTÍ

Tato práce byla vypracována na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze. Cílem práce bylo objasnění genetických příčin u probandů s FAP/AFAP bez detekované zárodečné mutace.

FAP a AFAP jsou autozomálně dominantní choroby podmíněné zárodečnými mutacemi v genu *APC*. Používané diagnostické metody (DGGE, sekvenování) jsou schopné odhalit příčinu u cca 80% probandů s FAP a 20% probandů s AFAP či mnohočetnými polypy. Probandi bez detekované *APC* mutace byli v rámci této práce vyšetřeni na přítomnost dlouhých delecí genu *APC*, přítomnost zárodečných mutací v genu *MUTYH* a přítomnost zárodečných mutací v genu *MSH6* u probandů s detekovanou monoalelickou *MUTYH* mutací.

Vyšetření dlouhých delecí genu *APC* u FAP/AFAP probandů bez detekované zárodečné mutace v genu *APC* navýšilo procento objasněných případů. Navíc použitá metoda MLPA plně naplnila očekávání v tom smyslu, že se jedná o rychlou, nenáročnou a spolehlivou metodu pro detekci dlouhých delecí.

Dále byl v rámci práce testován funkční dopad detekovaných zárodečných variant na expresi genu *APC*. Všechny testované zárodečné varianty se nacházely v místě střihu nebo jeho blízkém okolí a byl u nich predikován vliv na sestřih. Funkční analýza detekovaných *APC* variant potvrdila ve většině zkoumaných případů predikovaný vliv na sestřih.

Pro mutační analýzu genu *MUTYH* u *APC*-mutačně-negativních probandů byly využity metody dHPLC a HRM. Lze konstatovat, že obě metody jsou na základě získaných výsledků analýzy genu *MUTYH* srovnatelné, ale na základě časové náročnosti analýzy je lepší metoda HRM. Obě metody dosahují maximálních výsledků při využití pozitivních kontrol, kterých se mnohdy při zavádění nové analýzy nedostává.

Ačkoli bylo v genu *MUTYH* popsáno více než 80 mutací a frekvence bialelických mutací se celosvětově pohybuje v rozmezí 9 - 40%, v české

HYPOTÉZY

Přes intenzivní mutační analýzu je zárodečná mutace v genu *APC* zachycena u 60 - 80% rodin s výskytem FAP. Přibližně u 20 - 40% rodin s klinickými příznaky FAP není standardními metodami mutační analýzy molekulárně genetická příčina odhalena.

Příčinou mohou být rozsáhlé delece genu *APC* (standardní metody mutační analýzy je nezachytí) [16], sestřihové mutace a mutace v regulačních oblastech genu *APC* [17], ale také zárodečné mutace v genu *MUTYH* či rozsáhlé delece tohoto genu [14]. Další příčinou vzniku onemocnění by mohla být metylace CpG ostrůvků v promotoru 1A genu *APC*, který se, na rozdíl od promotoru B, podílí na utlumení transkripční aktivity [18].

Na základě těchto předpokladů bylo testováno, zda jsou dlouhé delece genu *APC* a/nebo zárodečné mutace v genu *MUTYH* genetickou příčinou onemocnění u českých FAP/AFAP bez detekované zárodečné mutace v genu *APC*.

CÍLE

Objasnění genetických příčin probandů s FAP/AFAP

- vytvoření souboru *APC*-negativních probandů
- testování přítomnosti dlouhých delecí v genu *APC* u FAP/AFAP probandů, u kterých nebyla rutinní mutační analýzou prokázána zárodečná mutace v genu *APC*
- funkční analýza deseti záměn detekovaných v genu *APC* na úrovni RNA
- mutační analýza genu *MUTYH* u *APC*-negativních probandů FAP/AFAP s cílem nalézt zárodečné mutace
- úloha mutací genu *MSH6* u probandů s monoalelickou mutací v genu *MUTYH*

418 nesl mutaci v exonu 7 (odhalena HRM) a intronu 10 (odhalena sekvenováním) a u probanda 464 byla detekována mutace v exonu 9 (odhalena sekvenováním) a mutace v exonu 13 (odhalena HRM). Nálezem mutace v exonu 9 bylo rozšířeno spektrum mutací, které se vyskytují v naší populaci.

Všechny detekované mutace v genu *MUTYH* u našeho souboru byly již popsány u *APC*-negativních FAP pacientů jiných národností [14][39][51]. Mutační screening genu *MUTYH* v české populaci tedy neodhalil žádnou dosud nepopsanou mutaci na rozdíl od screeningu genu *APC*, kde dochází k tomuto jevu velmi často.

Celkem byly mezi 145 testovanými probandy odhaleni čtyři probandi s bialelickou mutací (ve dvou případech dokonce homozygotní bialelická mutace), čímž došlo ke zvýšení zachytu *MUTYH* mutací v české populaci, ale i přes tento fakt zůstává frekvence signifikantně nižší v porovnání se zahraničními údaji [25][26][32][39][40][41][42].

V roce 2006 Niessen et al. vyslovili myšlenku, že monoalelická *MUTYH* mutace může přispívat ke vzniku rakoviny u nosičů mutace MMR genů, zejména *MSH6* genu [50]. Na tomto podkladě byli probandi s monoalelickou *MUTYH* mutací (kromě probanda 467) vyšetřeni na přítomnost zárodečných mutací v genu *MSH6*. Mutační analýzou tohoto genu u šesti probandů nebyly detekovány žádné mutace, ale pouze popsané polymorfismy [30][31]. Detekované záměny se nacházely jak v exonech, tak v intronech genu *MSH6*. Žádná z variant neměnila smysl aminokyseliny. O záměnách detekovaných v intronech lze s ohledem na jejich umístění předpokládat, že nemají přímý vliv na expresi genu, i když ani tuto možnost nelze bez další analýzy vyloučit. Nicméně je možné, že tyto varianty zachycené v genu *MSH6* mohou fungovat jako modifikátory. S ohledem na velikost souboru není možné vytvořit jednoznačný názor, i když je zajímavé, že bylo detekováno tolik polymorfismů v genu *MSH6* u testovaných probandů.

Statistická analýza dále prokázala silnou vazebnou nerovnováhu mezi variantami detekovanými v intronu 2 (c.157+30A>G) a exonu 12 (c.972G>C) a dále v intronu 6 (c.462+35G>A) a intronu 14 (c.1435–40G>C) u souboru probandů i kontrol (popsána také autory Aretz et al. 2006 [25]). V případě probandů byla dále prokázána vazebná nerovnováha mezi vzácnou variantou z intronu 11 (c.956–9C>T) a dvěma běžnými variantami z intronu 6 (c.462+35G>A) a intronu 14 (c.1435–40G>C). Vazba může být způsobena relativně nedávným vznikem této varianty na pozadí určitého haplotypu, od vzniku varianty neuběhla ještě dostatečně dlouhá doba, aby vazba byla zcela vymazána. Současně byla u souboru probandů detekována vazba mezi variantou z intronu 6 (c.462+35G>A) a běžnou variantou z exonu 12 (c.972G>C). Tato vazba je u probandů pravděpodobně způsobena opět haplotypem AGCACCGCGC, který má v kontrolním souboru velmi nízkou frekvenci, aby byla tato vazba zachycena. Detekované vazebné nerovnováhy poukázaly na nízkou rekombinační aktivitu v celém rozsahu *MUTYH* genu.

Vysokorozlišovací analýzou křivek tání (HRM analýza) bylo vyšetřeno 145 *APC*-negativních probandů. Mutační analýzou exonů 7 a 13 genu *MUTYH* byli detekováni čtyři probandi s mutací v exonu 7 a tři probandi s mutací v exonu 13. Dva probandi z uvedených sedmi byli nosiči bialelické mutace, konkrétně mutace v exonu 7. U žádného probanda tedy nebylo metodou HRM analýzy prokázáno, že je nositelem bialelické mutace v exonu 7 a 13, přestože z předchozího testování 120 *APC*-negativních probandů bylo možné takový výsledek očekávat.

U probandů s jednou mutací byla následně provedena přímá sekvenace zbývajících exonů genu *MUTYH*. Výsledky přímého sekvenování zbývajících exonů genu *MUTYH* pěti probandů s detekovanou mutací v exonu 7 nebo 13 genu *MUTYH* po HRM analýze přinesly několik zajímavých výsledků. V první řadě byli odhaleni dva probandi s bialelickou mutací v genu *MUTYH*. Proband

MATERIÁL A METODY

SOUBOR

Základní soubor obsahoval DNA 488 nepříbuzných probandů z České republiky, kterým byla kolonoskopicky diagnostikována familiární adenomatózní polypóza či mnohočetné adenomy, případně se jednalo o probandy s podezřením na tuto onemocnění. Všichni probandi podepsali před genetickým vyšetřením informovaný souhlas.

Probandi byly vyšetřeny na přítomnost zárodečných mutací v genu *APC* metodou denaturační gelové gradientové elektroforézy (DGGE) s následnou sekvenací pozitivních úseků (rutinní analýza). Mutační analýza zahrnovala 1. - 14. exon genu *APC* a dále část exonu 15 až do kodónu 1770 [19].

Ze základního souboru byl po mutační analýze genu *APC* vytvořen soubor 310 nepříbuzných *APC*-mutačně-negativních probandů, u kterého byla testována přítomnost dlouhých delecí genu *APC* s využitím metody MLPA. Ze souboru *APC*-mutačně-negativních probandů byl po analýze MLPA vyčleněn soubor *APC*-negativních probandů. Z tohoto souboru byla u 120 probandů testována přítomnost zárodečných mutací v celém genu *MUTYH* s využitím metody dHPLC.

Kontrolní soubor sestával ze 120 nepříbuzných jedinců české národnosti. Vybraný soubor je částí souboru DNA uloženého na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze. Tento kontrolní soubor 120 nepříbuzných jedinců byl použit pro získání hodnot vazebné nerovnováhy a populačních frekvencí nalezených sekvenčních variant v genu *MUTYH*.

Následně bylo vyšetřeno dalších 145 probandů ze souboru *APC*-negativních probandů pouze na přítomnost zárodečných mutací v exonu 7 a exonu 13 genu *MUTYH* metodou HRM.

APC-negativní probandi s detekovanou monoalelickou *MUTYH* mutací byli následně vyšetřeni na přítomnost zárodečných mutací v genu *MSH6*.

V základním souboru 488 nepříbuzných rodin bylo ve 152 rodinách detekováno 88 různých zárodečných mutací v genu *APC*. Detekované mutace představují rozmanitou skupinu, ve které převažují mutace dosud v jiných populacích nepopsané.

Mezi detekovanými 88 zárodečnými mutacemi v genu *APC* bylo identifikováno také 15 sekvenčních variant s možným vlivem na expresi. Analýza vlivu těchto variant na expresi byla provedena u deseti probandů. RNA byla izolována z periferní krve a dále také ze vzorku střevní mukózy nebo polypu, v případě že byly tyto vzorky dostupné.

Pro analýzu vlivu detekované záměny na expresi genu *APC* byly použity 3 kontrolní soubory. Kontrolní soubory 1 a 2 byly využity pro analýzu *APC* transkriptu.

Kontrolní soubor 1 zahrnoval RNA izolované z periferní krve 54 studentů 1. LF UK v Praze bez rodinného výskytu CRC.

Kontrolní soubor 2 zahrnoval RNA izolované z devíti vzorků střevní mukózy osob bez CRC. Vzorky střevní mukózy bez zjevných známek patologických projevů byly získány odběrem během kolonoskopického vyšetření.

Kontrolní soubor 3 zahrnoval DNA izolovanou z periferní krve 400 jedinců bez rodinné zátěže CRC a 94 pacientů se sporadickým výskytem CRC, kteří podstoupili vyšetření a/nebo operaci na 1. Chirurgické klinice VFN v Praze. Tento soubor byl využit pro získání populační frekvence sekvenční změny c.1958+8C>T (gen *APC*).

Všechny osoby podepsaly před genetickým vyšetřením informovaný souhlas schválený Etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze.

monoalelických *MUTYH* mutací 2,6% v testované skupině britských probandů, tak studii Nielsen et al. 2005, kde činil záchyt monoalelických *MUTYH* mutací 3,5% v testované skupině nizozemských probandů [24][25][47].

Otázka vlivu přítomnosti pouze jedné mutované alely genu *MUTYH* na vznik a vývoj polypů (či dokonce CRC) je široce diskutovaná, stále však není jednoznačně zodpovězena [46][48][49].

S ohledem na záchyt velkého množství sekvenčních variant v genu *MUTYH* v testovaném souboru 120 probandů byla provedena cílená analýza deseti variant v souboru 120 kontrolních vzorků s následnou statistickou analýzou dat, ve které byly na základě počtu genotypů odhadnuty frekvence alel nalezených polymorfismů, stanovena míra Hardy-Weinbergovy rovnováhy, určena hodnota vazebné nerovnováhy mezi alelami polymorfních lokusů a odhadnuty haplotypové frekvence.

Frekvence recesivních alel testovaných variant v souboru probandů se příliš nelišila od jejich frekvencí v jiných populacích [25][27][49][50]. Analýza však odhalila statisticky vyšší frekvenci variant detekovaných v intronu 4 (c.347-13C>G) a intronu 6 (c.462+35G>A) u probandů v porovnání s kontrolním souborem. Příčin tohoto jevu může být několik. Vzhledem k pozici v intronu není pravděpodobný přímý vliv těchto variant na expresi genu (i když ani tuto možnost nelze zcela vyloučit), nicméně se může jednat o nepřímý vliv způsobený vazbou s neznámými funkčními variantami. V případě varianty z intronu 6 se nabízí možnost vazby celého haplotypu AGCACCGCGC, který je z velké části odpovědný právě za rozdílnou frekvenci minoritní alely c.462+35A mezi oběma testovanými soubory. Nesmí být opomenuta ani možnost stratifikace mezi souborem probandů a kontrolním souborem. Kontrolní soubor totiž zahrnoval osoby žijící v Praze a blízkém okolí, naopak v souboru probandů se vyskytly osoby z celé České republiky, což může mít vliv na detekované frekvence.

z práce Aretz et al. 2004 [35][36][37][38]. Osm testovaných variant bylo možné na základě analýzy *APC* transkriptu označit jako patogenní mutace. Zbylé dvě varianty byly označeny jako polymorfismy - jedna na základě provedené analýzy a také výsledků z publikace Aretz et al. 2004 [38], druhá na základě analýzy *APC* transkriptu a následného testování frekvence této varianty u kontrolního souboru metodou DCE.

Ve skupině českých FAP/AFAP probandů bez detekované zárodečné mutace v genu *APC* bylo na základě publikovaných informací uvažováno také o autozomálně recesivní *MUTYH* - asociované polypóze podmíněné bialelickými mutacemi v genu *MUTYH* [14][24].

Mutační analýza celého genu *MUTYH* byla provedena u 120 *APC*-negativních probandů metodou dHPLC. Ve vyšetřeném souboru byli odhaleni pouze dva probandi s bialelickou mutací v exonu 7 (p.Tyr165Cys) a exonu 13 (p.Gly382Asp). Ve srovnání s údaji mnoha zahraničních prací je frekvence záchytu bialelických *MUTYH* mutací v české populaci (soubor 120 *APC*-negativních jedinců) poměrně nízká, neboť činí pouze 1,7% (dva probandi ze 120 testovaných). V řadě evropských zemí (Francie, Německo, Švédsko, Finsko, Švýcarsko, Itálie, Portugalsko) je záchyt bialelických mutací mnohem větší a kolísá mezi 9 - 40% [25][26][32][39][40][41][42]. Rovněž v zemích vzdálených (USA, Kanada, Austrálie) kolísá množství zachycených bialelických mutací mezi 15 - 30% [43][44][45][46].

Mezi 120 testovanými probandy jsme zachytili čtyři probandy s monoalelickou mutací v genu *MUTYH* (v jednom případě mutaci p.Tyr165Cys, ve dvou případech mutaci p.Gly382Asp a v jednom případě mutaci p.Gly250Trpfs*7). Záchyt monoalelických *MUTYH* mutací tedy v našem souboru činí 3,3%. Výskyt je srovnatelný jak se studií Aretz et al. 2006, kde byl výskyt monoalelických *MUTYH* variant 2,7% u probandů německé národnosti s diagnostikovanou polypózou, či studií Sieber et al. 2003, kde činil záchyt

METODY

IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

IZOLACE DNA

Genomová DNA (gDNA) byla izolována z lymfocytů periferní krve (5ml nesrážlivé krve) pomocí vysolovací metody modifikované podle Miller et al. 1988 [20] nebo byla gDNA izolována izolační linkou QIAcube (Qiagen) s využitím QIAamp DNA Blood Mini Kitu (Qiagen) podle protokolu výrobce.

IZOLACE RNA

Celková RNA byla izolována z lymfocytů periferní krve pomocí PAXgene Blood RNA Kitu (Qiagen).

Z tkáňových vzorků (střevo) byla celková RNA izolována pomocí RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen).

Izolace RNA z krve i z tkáňových vzorků byla provedena dle protokolu výrobce.

DETEKCE DLOUHÝCH DELECÍ GENU *APC*

MLPA

Přítomnost dlouhých delecí v genu *APC* byla zjišťována s využitím metody „Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification“ (MLPA). Tato metoda je schopna detekovat až 40 různých genomových sekvencí v jedné reakci. Pro vyšetření byl použit kit firmy MRC-Holland MLPA SALSA kit P043 (*APC*) a následně novější (vylepšené) verze kitu: SALSA MLPA KIT P043-B1, SALSA MLPA KIT P043-C1. Kity obsahují sondy pro všech 15 exonů genu *APC* a dále sondy pro promotorovou oblast genu *APC*.

Jednotlivé kroky MLPA analýzy byly provedeny dle navrženého protokolu firmy MRC-Holland s výjimkou použití polovičních objemů všech reagensů i množství analyzované DNA.

URČENÍ ROZSAHU DELECE S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

U probandů s dlouhou delecí genu *APC* prokázanou metodou MLPA byl testován rozsah delece s využitím čtyř mikrosatelitových markerů typu CA repetit. Pro analýzu byly využity markery D5S299, D5S82, D5S134 a D5S346 lokalizované v okolí genu *APC* (pozice genu: 112101484bp - 112209533bp).

Pro amplifikaci metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byly využity primery a reakční podmínky publikované ve člancích Spirio et al. 1991, Breukel et al. 1991, Eckert et al. 1994 [21][22][23].

PCR produkty byly separovány na 9% polyakrylamidovém gelu po dobu 5 h a gel byl poté obarven ethidium bromidem. Po elektroforéze byly produkty vizualizovány na transiluminátoru pod UV světlem.

FUNKČNÍ ANALÝZA ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU *APC* NA ÚROVNI RNA REVERZNÍ TRANSKRIPCE

K přepisu mRNA do cDNA byl použit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit. Pro syntézu cDNA byl dodržen firmou Invitrogen navržený protokol ve 20 µl reakční směsi.

ANALÝZA *APC* TRANSKRIPTU

Amplifikace relevantních oblastí byla provedena s využitím primerů navržených pomocí programu Primer3Input a reakčních podmínek dle navrženého protokolu firmy Invitrogen.

V případě, že se při kontrolní elektroforéze na agarózovém gelu v jedné jamce objevilo více fragmentů, byly jednotlivé fragmenty před sekvenační reakcí

DISKUZE

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně děděná predispozice ke vzniku CRC. Příčinou FAP jsou zárodečné mutace v genu *APC*.

Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda se velké delece postihující gen *APC* nebo některé jeho exony podílejí na vzniku FAP v populaci českých pacientů a jak velkou část mutací tvoří.

Dosud publikovaná data uvádějí záchyt dlouhých delecí genu *APC* mezi 12% a 15% ve skupině pacientů s klasickou FAP (ve skupině pacientů s AFAP je dle těchto studií záchyt 0%) [16][32][33].

Velké delece detekované v našem souboru FAP/AFAP probandů byly zachyceny u pacientů s klasickou formou FAP a nikoliv ve skupině pacientů s AFAP, což je v souladu s publikovanými údaji [16][33][34]. I přes nižší frekvenci výskytu velkých delecí v genu *APC* u českých pacientů (frekvence činí 1,3%) lze uzavřít, že jejich screening zvyšuje záchyt *APC* mutací u pacientů s FAP, a proto bylo navrženo, aby se stal součástí rutinního vyšetření. Toto vyšetření se od roku 2010 provádí v rámci diagnostiky u FAP probandů, u kterých nebyla mutační analýzou detekována zárodečná mutace v genu *APC*.

Rovněž bylo potvrzeno, že metoda MLPA je velmi vhodná, jednoduchá a rychlá pro screening velkých delecí v genu *APC*.

Ve vyšetřeném souboru 488 nepříbuzných probandů z České republiky, kterým byla kolonoskopicky diagnostikována familiární adenomatózní polypóza či mnohočetné adenomy, bylo detekováno rutinní analýzou 15 sekvenčních variant v genu *APC* s nejasným funkčním vlivem. Získat krev pro izolaci RNA či již izolovanou RNA se podařilo pouze u deseti z 15 detekovaných variant.

Analýza *APC* transkriptu umožnila definovat funkční dopad u dosud nepopsaných záměn (včetně variant zachycených pouze v české populaci, které byly publikovány v publikacích Kohoutova et al. 2002 a Stekrova et al. 2007 a Schwarzova et al. 2012 - v recenzním řízení), případně potvrdila výsledky

MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MSH6*

Mutační analýzou genu *MUTYH* bylo celkem detekováno sedm probandů s monoalelickou *MUTYH* mutací. Všichni probandi s monoalelickou *MUTYH* mutací kromě probanda 467 byli vyšetřeni na přítomnost zárodečných mutací v genu *MSH6*. Mutační analýzou tohoto genu u šesti probandů nebyly detekovány žádné mutace, ale pouze popsané polymorfismy. Detekované záměny se nacházely jak v exonech, tak v intronech genu *MSH6* (tabulka 2).

Tabulka 2 Detekované sekvenční varianty v genu *MSH6* u probandů s monoalelickou mutací genu *MUTYH*

| Pozice | Záměna nukleotidu | Záměna AK | Charakter změny |
|----------|---------------------|-------------|-------------------|
| exon 1 | c.186C>A | p.Arg62Arg | SNP [30] |
| intron 1 | c.260+22C>G | | SNP [30] |
| exon 2 | c.276A>G | p.Pro92Pro | SNP [30] |
| exon 3 | c.540T>C | p.Asp180Asp | SNP [30] |
| intron 5 | c.3438+14A>T | | SNP [30] |
| intron 7 | c.3646+91T>C | | neznámý [nová] |
| intron 7 | c.3646+29_32delCTAT | | SNP [31] |

separovány pomocí MinElute® Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle návodu dodávaného ke kitu.

Fragmenty byly následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru ABI Prism 310.

REAL-TIME PCR exonu 14 genu *APC*

Analýza pomocí Real-Time PCR byla provedena na přístroji 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Pro analýzu byla použita TaqMan sonda (Applied Biosystems). Množství alternativně stříhaného produktu exonu 14 u testovaných probandů bylo porovnáno s množstvím tohoto produktu u kontrolních vzorků z kontrolního souboru 1 a 2.

Testování výskytu varianty c.1958+8C>T genu *APC* u kontrolních vzorků s využitím denaturační kapilární elektroforézy (DCE)

Frekvence výskytu varianty c.1958+8C>T byla testována v kontrolním souboru 3.

Amplifikace exonu 14 byla provedena PCR s využitím primerů a podmínek publikovaných v článku Olschwang et al. 1993 [19]. Produkty PCR reakce byly následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru.

MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MUTYH*

dHPLC

Pro mutační analýzu celého genu *MUTYH* u 120 *APC*-negativních probandů byla využita metoda denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dHPLC). Amplifikace 16 exonů a přilehlých intronických oblastí genu *MUTYH* byla provedena pomocí popsaných primerů a

modifikovaných reakčních podmínek uvedených v publikaci Al-Tassan et al. 2002 [14].

Podmínky dHPLC analýzy jednotlivých PCR produktů (tj. acetonitrilový gradient a teplota kolony) byly navrženy pomocí „Navigator“ softwaru firmy Transgenomics a následně pro jednotlivé amplikony optimalizovány. Chromatogramy byly zaznamenány pomocí fluorescenčního detektoru při vlnové délce 260 nm a normalizovány pomocí programu „Mutation calling routine“, který je součástí „Navigator“ softwaru firmy Transgenomics.

Vzorky s odlišným elučním profilem byly sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru.

HRM

Pro mutační analýzu exonu 7 a 13 genu *MUTYH* u 145 *APC*-negativních probandů byla využita metoda vysokorozlišovací analýzy křivek tání („high resolution melting“, HRM).

PCR reakce byla provedena s využitím komerčně dodávaných reagensů pro amplifikaci fragmentů a za použití stejných primerů jako u dHPLC.

Vzorky s odlišnou křivkou tání byly sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru.

ANALÝZA VYBRANÝCH SEKVENČNÍCH VARIANT

GENU *MUTYH* U KONTROLNÍHO SOUBORU

Stodvacet kontrolních vzorků bylo genotypizováno na 10 vybraných polymorfních variant lokalizovaných jak v intronických sekvencích, tak v exonech genu *MUTYH*, které byly detekovány v souboru 120 *APC*-negativních probandů.

SNaPshot ANALÝZA

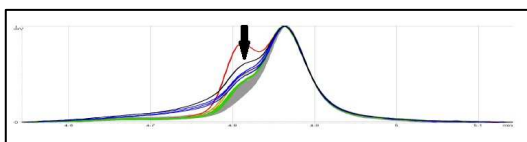
S ohledem na záhyt velkého množství sekvenčních variant v genu *MUTYH* v testovaném souboru 120 probandů byla provedena cílená analýza deseti variant v souboru 120 kontrolních vzorků. Statistickou analýzou vycházející z počtu detekovaných genotypů byly odhadnuty frekvence alel nalezených polymorfismů, stanovena míra Hardy-Weinbergovy rovnováhy, určena hodnota vazebné nerovnováhy mezi alelami polymorfních lokusů a odhadnuty haplotypové frekvence. Porovnání významnosti rozdílů ve frekvenci jak jednotlivých alel, tak haplotypů bylo provedeno pomocí statistického programu STATISTICA Ver. 9.1.

Hardy-Weinbergova rovnováha byla v souboru probandů i v kontrolním souboru pro všechny testované varianty zachována.

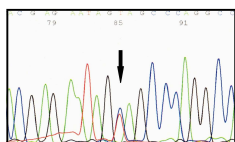
V kontrolním souboru byla potvrzena silná vazebná nerovnováha ($\chi^2=52,6801$ d.f. 1, $p=0,0000$) mezi variantou c.462+35A z intronu 6 a variantou c.1435–40C z intronu 14. Dále byla nalezena silná vazebná nerovnováha ($\chi^2=14,1675$ d.f. 1, $p=0,0002$) mezi variantou c.157+30G z intronu 2 a variantou c.972C z exonu 12. V souboru probandů byly obě vazebné nerovnováhy rovněž detekovány se srovnatelnou silou. Navíc však byla zachycena vazebná nerovnováha mezi následujícími lokusy: mezi variantou c.462+35A z intronu 6 a variantou c.972C z exonu 12 ($\chi^2=5,0743$ d.f. 1, $p=0,0243$), mezi variantou c.462+35A a variantou c.956–9T z intronu 11 ($\chi^2=5,9508$ d.f. 1, $p=0,0147$) a mezi variantou c.956–9T a variantou c.1435–40C z intronu 14 ($\chi^2=7,5738$ d.f. 1, $p=0,0059$).

Provedená statistická analýza odhalila pouze dva haplotypy s vyšší frekvencí u souboru probandů v porovnání se souborem kontrol.

v exonech byly u probandů nalezeny čtyři publikované změny v intronických sekvencích: c.157+30A>G (intron 2), c.462+35G>A (intron 6), c.648+21C>A (intron 8), c.1435–40G>C (intron 14) [26][27]. Dále byly detekovány sekvenční změny c.956–9C>T v intronu 11 a c.1145–27C>T intronu 12. Mutační analýza v testovaném souboru dále odhalila čtyři nové sekvenční varianty umístěné jak v exonech genu *MUTYH*, tak v intronech: c.1506G>A (p.Pro502Pro), c.347–13C>G a c.1435–17C>G [28][29]. Tichá varianta p.Pro502Pro (c.1506G>A) byla detekována pouze u 1 probanda z testovaného souboru. Dále byly nalezeny nové varianty v intronu 4 (c.347–13C>G) a intronu 14 (c.1435–17C>G) [28].



Obrázek 1 Chromatogram exonu 7 genu *MUTYH*



Obrázek 2 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.494A>G v genu *MUTYH*

HRM

Mutační analýzou exonů 7 a 13 genu *MUTYH* v souboru 145 *APC*-negativních probandů byli detekováni čtyři probandi s mutací v exonu 7 (p.Tyr165Cys) a tři probandi s mutací v exonu 13 (p.Gly382Asp). Dva probandi z uvedených sedmi byli nosiči bialelické mutace, konkrétně mutace v exonu 7. U probandů s jednou mutací byla proto následně provedena přímá sekvenace zbývajících exonů genu *MUTYH*. Tímto postupem byla odhalena druhá zárodečná mutace v genu *MUTYH* u dvou probandů. Jednalo se o zárodečnou mutaci v exonu 9 (p.Arg231His) a mutaci v intronu 10 (p.Gly250Trpfs*7).

Fragment pokrývající oblast od exonu 2 do exonu 15 genu *MUTYH* byl amplifikován metodou „Long Range“ PCR s využitím jednoho páru primerů navrženého pomocí programu Primer3Input.

Jednonukleotidové polymorfni varianty nacházející se v tomto fragmentu byly detekovány pomocí ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems™) podle instrukcí dodávaných k tomuto kitu. Pro tuto SNaPshot analýzu bylo navrženo 10 primerů tak, aby po jejich nasednutí byl polymorfni nukleotid první sekvenovanou bází.

MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MSH6*

Pro mutační analýzu celého genu *MSH6* u probandů s detekovanou monoalelickou *MUTYH* mutací byla využita metoda přímého sekvenování.

Amplifikace 10 exonů a přilehlých intronických oblastí genu *MSH6* byla provedena metodou PRC s využitím primerů navržených pomocí programu Primer3Input a obdobných reakčních podmínek jako u genu *MUTYH*.

Fragmenty byly následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru.

VÝSLEDKY

DETEKCE DLOUHÝCH DELECÍ GENU *APC*

Metoda MLPA s využitím SALSA MLPA KITu P043 *APC* odhalila ve vyšetřeném souboru 310 *APC*-negativních probandů 4 probandy s dlouhou delecí genu *APC*. Delece celého genu včetně promotorových oblastí byla nalezena u 3 probandů a u jednoho probanda byla detekována delece exonu 14. Frekvence velkých delecí v genu *APC* v testovaném souboru činí 1,3% (4/310).

Testováním rozsahu delecí s využitím mikrosatelitových markerů bylo zjištěno, že deletovaná oblast na chromozomu 5 u testovaných probandek činí maximálně 2Mb, resp. 10,5Mb.

FUNKČNÍ ANALÝZA ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU *APC* NA ÚROVNI RNA

Analýza *APC* transkriptu, včetně Real-Time PCR

K testování funkčního vlivu detekovaných variant na expresi genu *APC* byl využit in vitro přístup (analýza *APC* transkriptu). Deset jednonukleotidových záměn, jejichž vliv na expresi byl testován, představovalo heterogenní skupinu z hlediska predikovaného vlivu na funkci proteinu (jednalo se o záměny měnící i neměňící smysl aminokyseliny a dále intronické záměny s možným vlivem na sestřih).

Analýza *APC* transkriptů v testovaném souboru deseti vzorků odhalila, že u sedmi probandů testovaná zárodečná záměna podmiňuje vznik aberantního transkriptu (u šesti probandů bylo analýzou zjištěno vystřížení exonu, u jednoho probanda byla detekována exonizaci intronu), u jednoho probanda bylo změněno množství alternativně sestřihovaného produktu (zjištěno Real-Time PCR) a u dvou probandů nebyl zjištěn žádný efekt studované záměny na expresi. Výsledky analýzy jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1 Výsledek analýzy *APC* transkriptů u deseti testovaných záměn detekovaných mutační analýzou genu *APC*

| Proband | Detekovaná záměna v genu <i>APC</i> | Lokalizace | Analýza <i>APC</i> transkriptu |
|----------|-------------------------------------|------------|--|
| 147 | c.220G>T | exon 2 | vystřížen exon 2 |
| 179 | c.531+1G>T | intron 4 | vystřížen exon 4 |
| 164 | c.645+1G>T | intron 5 | vystřížen exon 5 |
| 392 | c.1312+5G>A | intron 9 | vystřížen exon 9 |
| 11 | c.1548+1G>A | intron 11 | vystřížen exon 11 |
| 47 | c.1548+1G>T | intron 11 | vystřížen exon 11, nevystřížen intron 11 |
| 295 | c.1627G>T | exon 13 | vystřížen exon 13 |
| 334 | c.1956C>T | exon 14 | změněno množství alternativního produktu |
| 142, 392 | c.1958+8C>T | intron 14 | bez efektu |
| 381 | c.1959G>A | exon 15 | bez efektu |

MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MUTYH*

dHPLC

Mutační analýzou genu *MUTYH* u 120 *APC*-negativních probandů metodou denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dHPLC) bylo detekováno 16 sekvenčních variant.

Pouze ve třech případech z 16 detekovaných záměn se jednalo o kauzální mutace (mutace v exonu 7 a 13 a intronu 10). Obrázek 1 zachycuje dHPLC analýzu exonu 7 a na obrázku 2 je zachycena sekvenace vzorku s odlišným elučním profilem v exonu 7, která odhalila mutaci p.Tyr165Cys.

Tři z detekovaných záměn představují popsání polymorfismy v exonech genu *MUTYH*: p.Val22Met (c.64G>A) v exonu 2, p.Gln324His (c.972G>C) v exonu 12 a p.Arg412Cys (c.1234C>T) v exonu 13 [14][24][25]. Kromě polymorfismů