

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Martina Florianová

**MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA PŘÍČIN VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH
FORM KOLOREKTÁLNÍ POLYPÓZY**

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE CAUSES OF SELECTED
HEREDITARY FORMS OF COLORECTAL POLYPOSIS**

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 21.6.2012

MARTINA FLORIANOVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

FLORIANOVÁ, Martina. *MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ ANALÝZA PŘÍČIN VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH FOREM KOLOREKTÁLNÍ POLYPÓZY. [MOLECULAR GENETICS ANALYSIS OF THE CAUSES OF HEREDITARY FORMS OF COLORECTAL POLYPOSIS]*. Praha, 2012. Počet stran 141. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze. Školitel Kohoutová, Milada.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla vypracována v laboratořích Oddělení molekulární genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze.

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Miladě Kohoutové, CSc. za odborné vedení, podporu, cenné rady a připomínky a za možnost podílet se na problematice kolorektálního karcinomu.

Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Štekrové a Ing. Věře Kebrdlové za jejich odbornou pomoc a inspiraci při řešení dílčích problémů disertační práce.

Také bych chtěla poděkovat Monice Škodové a Martině Řezníčkové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji svým kolegům a kolegyním RNDr. Kateřině Hirschfeldové, Ph.D., RNDr. Lucii Schwarzové, Ph.D., Mgr. Markétě Urbanové, Ph.D., Mgr. Zdeňkovi Musilovi a Mgr. Petru Lněničkovi za mnoho cenných a podnětných diskuzí při řešení problémů spojených s vypracováním disertační práce a za příjemnou atmosféru v milém kolektivu.

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|--------|--|
| ANOVA | analýza rozptylu (analysis of variance) |
| AFAP | atenuovaná familiární adenomatózní polypóza |
| AK | aminokyselina |
| APC | adenomatous polyposis coli |
| APE1 | AP endonuclease 1, apurinic/apyrimidinic deoxyribonuclease |
| AXIN | axin |
| BER | bázová excizní oprava |
| BCL-2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| BMI | body mass index |
| BMPR1A | bone morphogenetic protein receptor, type IA |
| BRAF | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| BRRS | Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom |
| cDNA | komplementární DNA |
| gDNA | genomová DNA |
| DCE | denaturační gradientová elektroforéza |
| dHPLC | denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| CIMP | metylační fenotyp CpG ostrůvků |
| CIN | chromosomální nestabilita |
| CRC | kolorektální karcinom |
| Ct | cycle threshold |
| DGGE | denaturační gradientová gelová elektroforéza |
| DNMT3A | DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha |
| dNTP | deoxyribonukleotidtrifosfát |
| DCC | deleted in colorectal carcinoma |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EMA | European Medicines Agency |
| ENG | endoglin |
| EpCAM | epithelial cell adhesion molecule |
| FAP | familiární adenomatózní polypóza |
| FEN-1 | flap structure-specific endonuclease 1 |
| FOBT | Fecal Occult Blood Test |
| GIT | gastrointestinální trakt |

| | |
|--------------|--|
| GCHP | hyperplastický polyp - varianta bohatá na Gobletovy buňky |
| GSK3 β | glycogen synthase kinase 3 beta |
| HGMD | Human Gene Mutation Database |
| HGSV | Human Genome Variation Society |
| HNPCC | hereditární nepolypózní kolorektální karcinom |
| HP | hyperplastické polypy |
| HRM | vysokorozlišovací analýza křivek tání; high resolution melting |
| CHRPE | vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny |
| KILLIN | killin, p53-regulated DNA replication inhibitor |
| KRAS | v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |
| LEF | lymphoid enhancer-binding factor |
| LOH | ztráta heterozygoty |
| MAP | MUTYH - asociovaná polypóza |
| MHP | hyperplastický polyp - mikrovesikulární varianta |
| miRNA | mikroRNA |
| MLH1 | mutL homolog 1 |
| MLH3 | mutL homolog 3 |
| MLPA | multiplex ligation-dependent probe amplification |
| MMR | mismatch repair |
| MP | smíšené polypy |
| MPHP | hyperplastický polyp - varianta chudá na mucin |
| MSI | mikrosatelitová nestabilita |
| MSI-H | mikrosatelitová nestabilita - vysoká |
| MSI-L | mikrosatelitová nestabilita - nízká |
| MSH2 | mutS homolog 2 |
| MSH3 | mutS homolog 3 |
| MSH6 | mutS homolog 6 |
| MSS | mikrosatelitová stabilita |
| mRNA | mediátorová RNA |
| MTH1 | mutT human homolog 1 |
| MUTYH | mutY homolog |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ncRNA | non-coding RNA |
| NF1 | neurofibromin 1 |

| | |
|------------|--|
| NMD | nonsense-mediated decay |
| OGG1 | 8-oxoguanine DNA glycosylase |
| ORF | otevřený čtecí rámeček |
| 8-oxoG | 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosin |
| 8-oxo-dGTP | 8-oxo-deoxyguanosintrifosfát |
| 8-oxo-dGMP | 8-oxo-deoxyguanosinmonosfát |
| PAH | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PIC | polymorphic information content |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PDCD4 | programmed cell death 4 |
| PJS | Peutz-Jeghers syndrom |
| PMS1 | postmeiotic segregation increased 1 |
| PMS2 | postmeiotic segregation increased 2 |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog |
| PTHS | <i>PTEN</i> hamartomatous tumor syndrome |
| RB1 | retinoblastoma 1 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RPA | replication protein A |
| S.D. | standardní odchylka |
| SDHB | succinate dehydrogenase complex, subunit B |
| SDHD | succinate dehydrogenase complex, subunit D |
| SMAD4 | SMAD family member 4 |
| SSA | sesilní „serrated“ adenomy |
| STK11 | serine/threonine kinase 11 |
| TACSDT1 | tumor-associated calcium signal transducer 1 |
| TCF | T-cell factor |
| TSA | „traditional serrated“ adenomy |
| TP53 | tumor protein p53 |
| VHL | von Hippel-Lindau tumor suppressor |

Aminokyseliny a jejich použité zkratky

| Název aminokyseliny | Zkratka | Jednopísmenné označení |
|---------------------|---------|------------------------|
| alanin | Ala | A |
| arginin | Arg | R |
| asparagin | Asn | N |
| asparagová kyselina | Asp | D |
| cystein | Cys | C |
| fenylalanin | Phe | F |
| glutamin | Gln | Q |
| glutamová kyselina | Glu | E |
| glycin | Gly | G |
| histidin | His | H |
| izoleucin | Ile | I |
| leucin | Leu | L |
| lyzin | Lys | K |
| metionin | Met | M |
| prolin | Pro | P |
| serin | Ser | S |
| treonin | Thr | T |
| tryptofan | Trp | W |
| tyroxin | Tyr | Y |
| valin | Val | V |

OBSAH

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| I. ÚVOD | 14 |
| II. LITERÁRNÍ ÚVOD | 16 |
| II.1 Molekulární dráhy vedoucí ke vzniku CRC | 17 |
| II.2 miRNA v patogenezi CRC | 19 |
| II.3 Klasifikace nádorů tlustého střeva | 21 |
| II.3.1 Adenom | 22 |
| II.3.2 Kolorektální polypy | 22 |
| II.3.3 Karcinom | 23 |
| II.4 Hereditární gastrointestinální polypózní syndromy | 23 |
| II.4.1 Hereditární hamartomatózní syndromy | 23 |
| II.4.1.1 Peutz-Jeghers syndrom | 23 |
| II.4.1.2 Juvenilní polypóza | 24 |
| II.4.1.3 PTEN hamartomatózní syndromy (PHTS) | 25 |
| II.4.1.3.1 Cowden syndrom | 25 |
| II.4.1.3.2 Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom (BRRS) | 25 |
| II.4.2 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) | 26 |
| II.4.3 Hereditární adenomatózní syndromy | 27 |
| II.4.3.1 Familiární adenomatózní polypóza | 27 |
| II.4.3.1.1 Klasická a atenuovaná familiární adenomatózní polypóza | 27 |
| II.4.3.1.2 Gen <i>APC</i> | 28 |
| II.4.3.1.3 FAP a heterogenita | 29 |
| II.4.3.2 <i>MUTYH</i> - asociovaná polypóza | 30 |
| II.4.3.2.1 Gen <i>MUTYH</i> | 31 |
| II.4.3.2.2 Struktura genu <i>MUTYH</i> | 33 |
| II.4.3.2.3 Interakce proteinu <i>MUTYH</i> | 36 |
| II.4.3.2.4 Charakteristika <i>MUTYH</i> -deficitních kolorektálních tumorů | 36 |
| II.5 Prevence rakoviny | 37 |
| II.5.1 Rizikové faktory | 37 |
| II.5.1.1 Kouření | 37 |
| II.5.1.2 Váha | 38 |

| | |
|---|----|
| II.5.1.3 Fyzická aktivita a cvičení | 38 |
| II.5.1.4 Strava | 39 |
| II.5.1.5 Vitamíny a potravinové doplňky | 39 |
| II.5.1.6 Stopové prvky | 39 |
| II.5.1.7 Alkohol | 40 |
| II.6 Screening kolorektálního karcinomu | 40 |
| II.6.1 Screening kolorektálního karcinomu u lidí v obecném riziku | 40 |
| II.6.2 Screening kolorektálního karcinomu u lidí ve zvýšeném riziku | 41 |
| III. CÍLE PRÁCE | 42 |
| IV. MATERIÁL A METODY | 43 |
| IV.1 SOUBOR | 43 |
| IV.2 METODY | 45 |
| IV.2.1 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN | 45 |
| IV.2.2 TESTOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DLOUHÝCH DELEČÍ V GENU <i>APC</i> | 45 |
| IV.2.2.1 METODA MLPA | 45 |
| IV.2.2.2 METODA PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ EXONU 14 GENU <i>APC</i> | 48 |
| IV.2.2.3 URČENÍ ROZSAHU DLOUHÉ DELECE GENU <i>APC</i> S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ | 50 |
| IV.2.3 FUNKČNÍ ANALÝZA ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU <i>APC</i> NA ÚROVNI RNA | 54 |
| IV.2.3.1 REVERZNÍ TRANSKRIPCE | 54 |
| IV.2.3.2 ANALÝZA <i>APC</i> TRANSKRIPTU | 54 |
| IV.2.3.3 REAL-TIME PCR EXONU 14 GENU <i>APC</i> | 57 |
| IV.2.3.4 TESTOVÁNÍ VÝSKYTU VARIANTY c.1958+8C>T GENU <i>APC</i> U KONTROLNÍCH VZORKŮ S VYUŽITÍM DENATURAČNÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY | 57 |
| IV.2.4 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MUTYH</i> | 59 |
| IV.2.4.1 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MUTYH</i> METODOU dHPLC | 59 |
| IV.2.4.2 MUTAČNÍ ANALÝZA EXONŮ GENU <i>MUTYH</i> METODOU HRM | 64 |
| IV.2.4.3 ANALÝZA VYBRANÝCH SEKVENČNÍCH VARIANT | |

| | |
|--|-----|
| GENU <i>MUTYH</i> U KONTROLNÍHO SOUBORU | 64 |
| IV.2.5 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MSH6</i> METODOU PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ | 69 |
| IV.3 STATISTIKA | 74 |
| IV.4 SOFTWARE A DATABÁZE | 74 |
| IV.4.1 SOFTWARE | 74 |
| IV.4.2 DATABÁZE | 74 |
| V. VÝSLEDKY | 75 |
| V.1 DETEKCE DLOUHÝCH DELECÍ GENU <i>APC</i> | 75 |
| V.2 FUNKČNÍ ANALÝZA DESETI ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU <i>APC</i> | 85 |
| V.2.1 Analýza <i>APC</i> transkriptu | 85 |
| V.2.2 Testování výskytu varianty c.1958+8C>T genu <i>APC</i> u kontrolních vzorků | 93 |
| V.3 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MUTYH</i> | 94 |
| V.3.1 Mutační analýza genu <i>MUTYH</i> s využitím metody dHPLC | 94 |
| V.3.2 Mutační analýza exonů 7 a 13 genu <i>MUTYH</i> s využitím HRM | 102 |
| V.3.3 SNaPshot analýza | 105 |
| V.4 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU <i>MSH6</i> | 108 |
| VI. DISKUZE | 111 |
| VII. SHRNUÍ | 124 |
| VIII. LITERATURA | 126 |

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*, byly 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 *APC* gene was tested, there was looked for germline mutations in *MUTYH* gene, alternatively germline mutations in *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* mutation 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 (the 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 mutation it was detected 12 sequence variants in *MUTYH* gene.

Mutational analysis of *MSH6* gene revealed no germline mutation in probands with monoallelic germline mutation in *MUTYH* gene. By analysis there were detected only polymorphic variants.

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

I. ÚVOD

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí v ekonomicky vyspělých zemích světa a třetí nejčastější příčinou úmrtí v rozvojových zemích (1. místo - kardiovaskulární onemocnění, 2. místo - průjmová onemocnění). V ekonomicky vyspělých zemích je nejčastěji u mužů diagnostikována rakovina prostaty, plic a rakovina tlustého střeva a konečníku, u žen je v těchto státech nejčastěji diagnostikována rakovina prsu, rakovina tlustého střeva a konečníku a rakovina plic.

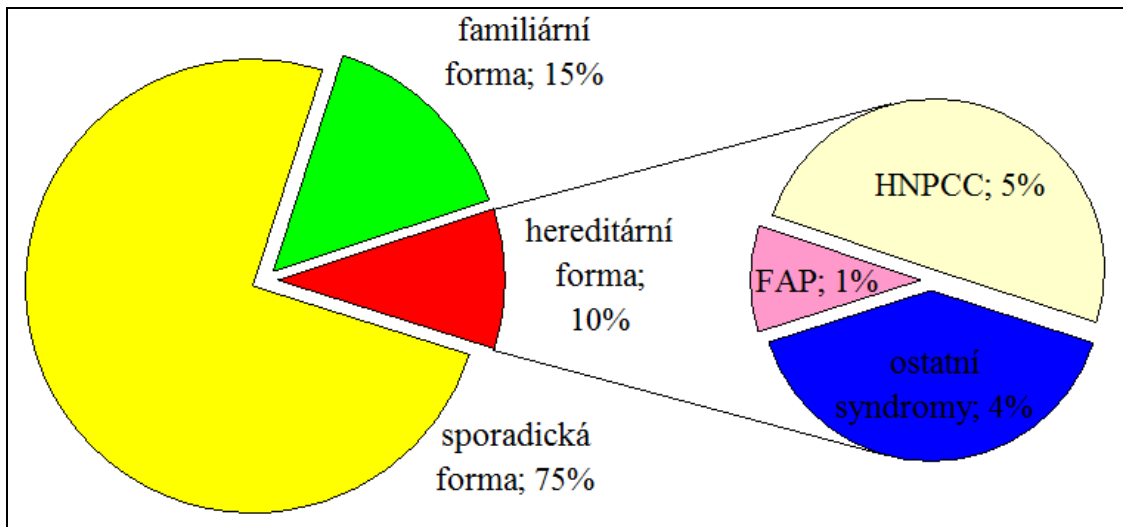
Česká republika drží smutné prvenství. Podle průzkumu Masarykova onkologického ústavu v Brně patří ČR v celosvětových statistikách stále na přední místa s výskytem počtu nádorů tlustého střeva na 100 000 obyvatel, a to i navzdory faktu, že incidence kolorektálního karcinomu v ČR stagnuje a mortalita dokonce mírně klesá. Ročně je u nás zjištěno 3000 nových nádorů střeva a 2600 nádorů konečníku. Alarmující je i to, že prakticky polovina je zjištěna až v pokročilém stadiu, kdy už je naděje na vyléčení menší. U mužů je vyšší výskyt zvláště nádorů konečníku [1][2][3].

Karcinom konečníku a tlustého střeva jsou úzce spojeny. Přes 50% těchto nádorů je lokalizováno v konečníku a 20% postihuje sigmoideum (esovitá klička). Ve vlastním tlustém střevu se nalézá jen asi 15% (v colon transversum (příčný tračník) 6 – 8% a v colon descendens (sestupný tračník) 6 – 7%). Přes rozdíly související s anatomickou lokalizací a chirurgií jsou uvedené nádory považovány za afekci jednoho orgánu, a proto se označují jako kolorektální karcinom (CRC).

Na základě dvojčecích studií a studií příbuzenství bylo odhadnuto, že dědičná forma tohoto onemocnění představuje přibližně 30% všech CRC případů, což je jedno z největších procent familiárních případů mezi malignitami [4][5]. Podle Jaspersona et al. 2010 je přibližně 5% případů asociováno s vysoce penetrantními dědičnými mutacemi a jasnými klinickými příznaky [6]. Etiologie zbývajících 25% CRC případů není dosud jednoznačně popsána. Tyto případy mohou být důsledkem například genetických změn v genech s nízkou penetrancí či genetických změn v „multiple susceptibility“ lokusech, které mají aditivní efekt.

Ve studii Shibata a Aaltonen 2001 či Half et al. 2009 jsou formy kolorektálního karcinomu rozděleny následovně: sporadické formy CRC představují asi 75% případů, dědičné formy tvoří 10 – 15% všech nádorů tlustého střeva a konečníku a familiární formy představují asi 10% všech CRC [7][8]. Familiární forma je charakterizována

výskytem rakoviny střev napříč generacemi stejně jako dědičná forma, ovšem bez jasně definovaného dominantního typu dědičnosti. Na vzniku CRC se v tomto případě podílí také vlivy prostředí [8].



Obrázek 1 Formy kolorektálního karcinomu a jejich četnosti [8]

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) podmíněná zárodečnými mutacemi v genu *APC* a asociovaná polypóza (MAP) podmíněná zárodečnými mutacemi v genu *MUTYH* (Half 2009) [8].

II. LITERÁRNÍ ÚVOD

II.1 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 [9].

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 strukturní chromozomální aberace a ztrátu heterozygoty (Loss of Heterozygosity, LOH)

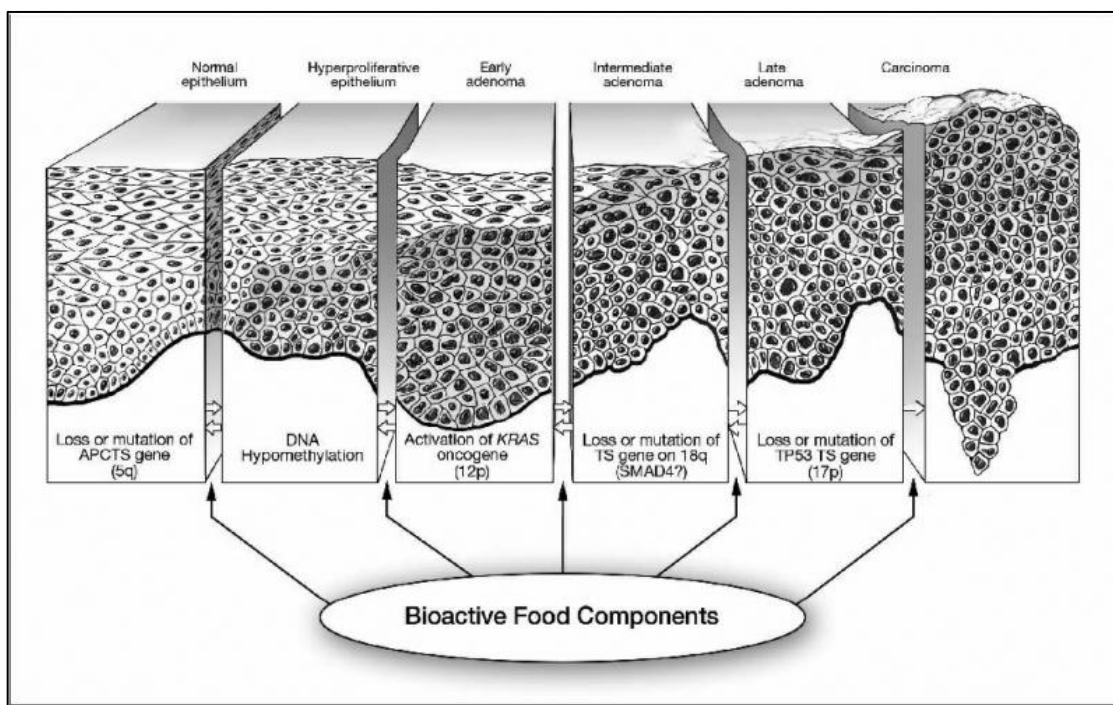
- * dráha mikrosatelitové nestability (Microsatellite Instability, MSI)

- * dráha metylátorového fenotypu CpG ostrůvků (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP)

Dráha CIN je asociována s mutací v tumor supresorovém genu *APC* (adenomatous polyposis coli) a/nebo ztrátou chromozomu 5q, kde je tento gen lokalizován, mutací *KRAS* onkogenu, ztrátou chromozomu 18q (gen *DCC* a gen *SMAD4*) a delecí chromozomu 17p, který obsahuje tumor supresorový gen *TP53*. Přibližně 70 – 85% všech CRC případů se vyvíjí přes dráhu CIN.

Většina kolorektálních karcinomů vykazujících chromozomální nestabilitu se vyvíjí z benigních forem adenomatózních polypů, přičemž doba mezi přeměnou nezhooubného polypu ve zhoubný nádor je relativně dlouhá. Celý proces má klonální charakter, kdy buňky získávají v důsledku mutace růstové výhody, vytvářejí klony, v nichž se akumulují mutace v dalších genech až proces dospěje k maligní formě tumoru. Uznávaný model kolorektální karcinogeneze vychází z konkrétního pořadí genetických změn, které korespondují se změnami ve střevní sliznici, vývojem adenomu a posléze karcinomu [10]. Ukázalo se, že na počátku tohoto procesu se vyskytují mutace v genu *APC*, které jsou považovány za iniciační mutace vzniku benigních forem nádorů – polypózních adenomů ve sliznici střeva, naopak mutace v genu *TP53* se objevují v pozdějších stádiích procesu kolorektální karcinogeneze,

zejména ve stádiu vzniku časných adenokarcinomů, ale ještě ve stádiu před vznikem metastatických lézí [10][11][12].



Obrázek 2 Model karcinogeneze [13]

Dráha MSI 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 [14][15]. MMR je enzymatický systém odpovědný za opravu chyb vznikajících při replikaci DNA. Funkce proteinů této dráhy spočívá v rozpoznání chybných míst v replikovaném řetězci DNA s následnou opravou postiženého úseku DNA a napojením zbylých částí nukleové kyseliny. Nefunkčnost některého z proteinů MMR vede k hromadění bodových mutací v genomové DNA a následně rozvoji karcinogeneze. Mutace v MMR genech se ve fenotypu projevují nestabilitou délky mikrosatelitních lokusů. Mikrosatelitová nestabilita (MSI) tedy slouží jako obecný marker efektivity MMR genů a genomické stability zkoumané tkáně. MSI je jedním z tkáňových nádorových markerů (mikrosatelitovou nestabilitu vykazuje asi 15% všech kolorektálních karcinomů) a je testován panelem 5 mikrosatelitových markerů obsahujícím 2 mononukleotidové mikrosatelity (BAT25 a BAT26) a 3 dinukleotidové markery (D5S346, D2S123 a D17S250). Status mikrosatelitové nestability je posuzován podle počtu nestabilit u testovaných markerů, tj. MSI-H (MSI - high) ≥ 2 (40%) nestabilní mikrosatelity, MSI-L (MSI - low) – jeden nestabilní mikrosatelit [14].

Zárodečné mutace MMR genů jsou příčinou dědičné nepolypózní rakoviny tlustého střeva (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC). Polypy se u pacientů s HNPCC mohou vyskytnout, ale jejich počet nepřesahuje číslo deset. Tyto polypy není možné endoskopicky odlišit od sporadických polypů. Ke změně polypu v karcinom dochází velmi rychle (v rozmezí 1 až 3 let) [16]. Většina adenomů u HNPCC však vykazuje MSI-H na rozdíl od sporadických adenomů, u kterých je demonstrován pouze v 1,8% [17]. Mikrosatelitová nestabilita je detekována až u 90% kolorektálních karcinomů asociovaných s HNPCC.

Dráha CIMP je druhou nejčastěji se vyskytující dráhou u sporadických CRC (asi 15% všech sporadických CRC). Tato dráha 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 (*MLH1*, *BRCA1*). Metylace DNA představuje epigenetickou modifikaci. CpG ostrůvky jsou místa v genomu, kde po bázi cytosinu (C) následuje guanin (G), a kde p označuje fosfodiesterovou vazbu mezi oběma nukleotidy. CpG ostrůvky nejsou metylovány narozdíl od většiny CpG bohatých oblastí, které jsou u savců metylovány [18]. Metylace CpG ostrůvku tak vede k potlačení transkripce (silencing) a následně nedochází k expresi produktů těchto genů, což znemožní opravy genetických chyb, působí deregulaci průchodu buňky buněčným cyklem a otevírá cestu neoplastické transformaci [19]. V případě sporadických kolorektálních karcinomů je tento jev popisován v souvislosti s *MLH1* genem [20].

U dráhy CIMP byly jako prekursorů vzniku rakoviny definovány sesilní „serrated“ adenomy (přisedlé pilovité adenomy), v případě dráhy CIN, ale i MSI (HNPCC), to jsou adenomatózní polypy [21].

Mezi drahami MSI a CIMP dochází asi ve 12% CRC případů k překryvu. K tomuto prolínání dochází v situaci, kdy je promotor genu *MLH1* metylován (a inaktivován), což vede k mikrosatelitové nestabilitě [22][23].

V rámci studia kolorektálních karcinomů, jejichž vznik je popisován v souvislosti s přeměnou adenom – karcinom, byla vyčleněna skupina „serrated“ adenokarcinomů. „Serrated“ adenokarcinomy představují asi 7,5% všech CRC a jsou častěji diagnostikovány u žen (poměr záhytu tohoto typu CRC u žen a mužů je 2:1). „Serrated“ adenokarcinomy se vyvíjejí ze „serrated“ 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.

Nejvíce „serrated“ adenokarcinomů vzniká v asociaci s „traditional serrated“ adenomy. Takové nádory jsou lokalizovány levostranně a vykazují mikrosatelitovou stabilitu nebo MSI-L a jsou asociovány s mutacemi v *KRAS* genu.

Asi 15 – 20% „serrated“ adenokarcinomů vzniká ze sesilních „serrated“ adenomů. Znakem těchto nádorů nacházejících se pravostranně je mikrosatelitová nestabilita, metylace CpG ostrůvků a asociace s mutacemi v *BRAF* genu [24][25][26].

II.2 miRNA v patogenezi CRC

Na patogenezi CRC se podílí řada epigenetických faktorů. Jedná se o DNA metylaci, která byla zmíněna v souvislosti s dráhou CIMP, dále modifikaci chromatinu, resp. histonů a také modifikaci podmíněnou mikroRNA.

MikroRNA (miRNA) jsou malé jednovláknové nekódující RNA (non-coding RNA, ncRNA) o velikosti 18 – 25nt [27]. Tyto evolučně konzervované miRNA zastávají důležitou regulační funkci (regulují až 30% lidských genů) v mnoha biologických procesech – včetně diferenciaci, proliferaci, apoptózy – a ovlivňují tak hlavní biologické systémy jako „stemness“ – kmenovost, imunitní systém a rakovinu. V databázi miRBase bylo v roce 2009 uvedeno přes 700 miRNA lidského genomu. Většina miRNA genů je lokalizována v intergenových oblastech (>1kb od genu), ačkoli část byla nalezena i v intronických oblastech genů. Více než 50% miRNA genů je navíc lokalizováno na chromozomech v místech, která často podléhají zlomům, delecím či duplikacím [28][29].

miRNA regulují řadu známých onkogenových (*oncomiR*) i tumor supresorových (*tsmiR*) drah zahrnutých v patogenezi CRC. Mnoho proteinů zahrnutých v klíčových signálních drahách CRC, včetně členů Wnt/ β -cateninové dráhy a fosfatidylinositol-3-kinázové dráhy, *KRAS*, *p53* a dalších, jsou změněny a ovlivněny během karcinogeneze regulací miRNA.

Wnt/ β -cateninová dráha

Wnt/ β -cateninová dráha je důležitá pro vývoj orgánů, buněčnou proliferaci, morfologii, motilitu a smrt embryonálních buněk. Jedná se o velmi starou signální dráhu, která zahrnuje více než 100 genů. Narušení této dráhy tak vede k patologickým

změnám. Bylo publikováno, že Wnt/ β -cateninová dráha hraje klíčovou roli při vývoji časných stádií kolorektálního karcinomu [30].

Podle Albuquerque et al. 2011 představuje Wnt/ β -cateninová dráha jeden z hlavních regulačních mechanismů tkáňové homeostázy regulací rovnováhy mezi „sebeobnovováním“, diferenciací a apoptózou [31].

V rámci dráhy Wnt je klíčovou úlohou proteinu APC regulace hladiny β -cateninů v cytoplasmě. Protein APC vytváří spolu s AXINem a GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) destrukční komplex, který umožňuje proteolytickou degradaci β -cateninů. Volný β -catenin vstupuje do jádra, kde v komplexu s dalšími faktory (TCF – T cell factors, LEF – Lymphoid enhancer factor) aktivuje transkripci cílových genů (protoonkogen *c-myc*, cyklin D1, transkripční faktor *c-jun* a další), které regulují průběh buněčného cyklu [32].

Wnt/ β -cateninová dráha hraje centrální úlohu během vývoje časných stádií kolorektálních tumorů. Inaktivace genu *APC* je hlavním iniciačním jevem u CRC, který je pozorován u více než 60% kolorektálních adenomů a nádorů, a vede ke stimulaci Wnt dráhy přes volný β -catenin [28]. Zesílená β -cateninová signalizace není zahrnuta jen v iniciaci tumorigeneze, ale také v nádorové progresi [31].

Inaktivace genu *APC* je způsobena mutacemi. Nejčastěji se jedná o mutace bodové, které vedou ke vzniku stop kodonu a tím ke vzniku zkráceného proteinu.

Podle studie Nagel et al. 2008 existuje u CRC i jiný mechanismus *APC* regulace. Tento nový mechanismus regulace představují miRNA [33]. Podle této studie miR-135a a miR-135b snižují translaci *APC* transkriptu *in vitro*. miR-135a a miR-135b se vážou na 3' netranslatovanou oblast genu *APC*, čímž tlumí jeho expresi. miR-135a a miR-135b jsou také popisovány v souvislosti se zvýšenou expresí u kolorektálních adenomů *in vivo* a jsou spojeny s nízkou hladinou *APC*. Tato pozorování podporují teorii, že změny v rodině miR-135 jsou časnými jevy vyskytujícími se v molekulární patologii CRC [28][33].

miR-21

miR-21 představuje miR ze skupiny *oncomiR*. Bylo prokázáno, že miR-21 podporuje migraci buněk a jejich invazi vazbou na *PDCD4* (programmed cell death protein 4) a tumor supresorový gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). Dále nadměrná exprese miR-21 vede ke zvýšené regulaci Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), což vede ke zrychlení růstu nádoru a také ke snížení apoptózy [34]. Bcl-2 je membránový

protein s protiaoptickým efektem kódovaný *BCL-2* genem lokalizovaným na chromozomu 18 (18q21.3).

miR-21 je ve zvýšené míře exprimována u adenomů a CRC v porovnání se zdravou tkání. Tato abnormální exprese miR-21 představuje časnou buněčnou změnu v progresi CRC [27].

miR-143 a miR-145

Lokusy kódující miR-143 a miR-145 jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromosomu 5, přesněji v oblasti 5q23. U CRC jsou miR-143 a miR-145 popisovány v souvislosti se sníženou expresí [35]. Snížená hladina miR-145 je pozorována u proximálně lokalizovaných tumorů a také u nádorů o velikosti >50 mm [36].

Snížená exprese miR-143 byla popsána u adenomů i kolorektálních nádorů. MiR-143 je považován za klíčový regulátor genové exprese, neboť se přímo váže na mRNA kódující řadu proteinů podílejících se na buněčné diferenciaci, proliferaci či apoptóze, včetně KRAS, DNMT3A (DNA metyltransferáza 3a), Bcl-2 [37].

II.3 Klasifikace nádorů tlustého střeva

Nejčastějšími nádory v tlustém střevě jsou nádory epitelové. Přehled nejfrekventovanějších nádorů tlustého střeva dle jejich histogeneze a biologického chování shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1 Přehled primárních nádorů tlustého střeva dle jejich histogeneze a biologického chování [38]

| Histogenetický typ nádoru | Nádory dle biologického chování | | |
|---------------------------|---|------------------------------------|---|
| | benigní | nejisté | maligní |
| epitelové | adenom | karcinoid | adenokarcinom, neuroendokrinní karcinom |
| neepitelové | lipom, hemangiom, neurinom, neurofibrom aj. | gastrointestinální stromální tumor | maligní lymfomy, sarkomy |

II.3.1 Adenom

Adenom je benigní intramukózní nádor epitelového původu lokalizovaný v jakékoli části střeva. Adenomy se ovšem mohou maligně zvrhnout, a proto jsou označovány jako prekanceróza. Riziko transformace adenomu v adenokarcinom se pohybuje v rozmezí 1 – 3%.

Makroskopicky adenom nabývá vzhledu:

- a) polypózní léze (Polyp je klinický termín označující útvar prominující do lumina střeva, spojený se sliznicí tenkou stopkou.)
- b) ploché léze (patologické ložisko ve sliznici, které může být mírně elevované, bez elevace nebo vpáčené) [38].

II.3.2 Kolorektální polypy

Adenomatózní polypy jsou benigní neoplastické polypy charakterizované různým stupněm cytologických i architektonických atypií (dysplazií) sliznice střeva. Dysplazie se hodnotí dle přítomnosti nezralých buněk, ztrátou produkce hlenu, hypercelularitou, hyperchromazií, stratifikací a mitotickou aktivitou ve všech částech epitelových krypt i v povrchovém epitelu [38].

Podle histologické struktury se adenomy dělí na tubulární (85%), tubulovilózní (10%) a vilózní (5%). Podle stupně dysplazie rozlišujeme adenomy s nízkou, střední a těžkou dysplazií. Hlavním makroskopickým kritériem je velikost polypu (do 1 cm, 1 – 2 cm a větší než 2 cm).

Hlavní kritéria pro posuzování maligního potenciálu adenomu představují velikost polypu, histologická struktura a stupeň dysplazie. Větší polypy, přítomnost vilózních změn a vyšší stupeň dysplazie jsou spojeny s vyšším rizikem maligní přeměny polypu.

Hyperplastické (= metaplastické) polypy představují asi 90% všech polypů a obvykle se objevují v oblasti rektosigmoidea v dospělosti. Jedná se o malé (do 5mm) přisedlé polypy (bledší než okolní mukóza) často s cystickou dilatací. Tyto polypy jsou označovány jako benigní léze. Hyperplastické polypy představují heterogenní skupinu, která je členěna dle obsahu mucinu v epiteliálních buňkách:

- * varianta bohatá na Gobletovy buňky (Goblet cell-rich hyperplastic polyp, GCHP)
- * mikrovesikulární varianta (microvesicular hyperplastic polyp, MHP)
- * varianta chudá na mucin (mucin poor hyperplastic polyp, MPHP) [39].

Z různých studií však vyplývá, že tyto polypy mohou mít maligní potenciál.

II.3.3 Karcinom

Karcinom je maligní epitelový nádor, který se ve střevě vyznačuje penetrací přes lamina muscularis mucosae do submukózy, popř. do ostatních částí stěny střeva.

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 (*PTEN* hamartomatous tumor syndrome, PTHS) zahrnující Cowden syndrom, Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom (BRRS) a další syndromy podmíněné zárodečnými mutacemi v genu *PTEN* [40].

Studium těchto dědičných forem je velmi důležité při identifikaci a charakteristice genů zodpovědných za vývoj sporadických nádorů tlustého střeva a konečníku [41].

II.4 Hereditární gastrointestinální polypózní syndromy

II.4.1 Hereditární hamartomatózní syndromy

II.4.1.1 Peutz-Jeghers syndrom

Peutz-Jeghersův syndrom (PJS) je charakterizován asociací gastrointestinálních polypů s mukokutánními pigmentacemi. Incidence tohoto syndromu je přibližně 1 na 25000 až 300000 narozených. PJS je autozomálně dominantně dědičné onemocnění podmíněné mutacemi v tumor supresorovém genu *STK11* (*LKB1*) lokalizovaném na dlouhém raménku 19. chromozomu (19q13.4). Zárodečné mutace v genu *STK11* jsou nalézány až u 70 – 80% pacientů s PJS, přičemž až v 15% případů se jedná o delece části nebo celého genu *STK11* [42].

Gastrointestinální polypy mají charakter hamartomatózních polypů, které se nejčastěji objevují v tenkém střevě (v pořadí četnosti výskytu: jejunum, ileum, duodenum), mohou se objevit též v žaludku a tlustém střevě. U jedinců s PJS je nalézáno méně než 20 polypů, přičemž polypy mohou být velké pouze několik milimetrů anebo mohou dosahovat více než 5cm. Gastrointestinální polypy mohou vést

k chronickému krvácení a anemii, opakovaným obstrukcím a intususcepcím vyžadujícím opakovaně laparotomie a resekce střeva. Tyto projevy se objevují ve druhé nebo třetí dekádě života. Polypy se také u pacientů s PJS vyskytují v respiračním traktu a močových cestách, zejména v močovém měchýři. Mukokutánní hyperpigmentace jsou přítomny v dětství jako tmavě modré až tmavě hnědé makuly v typických lokalizacích okolí úst, očí, nosních křídel, na bukální sliznici a perianální oblasti. Tyto makuly mohou v pubertě a dospělosti vyblednout. Charakteristická pigmentace je přítomna u 95% pacientů s PJS [40][42][43].

II.4.1.2 Juvenilní polypóza

Juvenilní polypóza je autozomálně dominantní onemocnění se vznikem hamartomatózních polypů v gastrointestinálním traktu, zejména v dětství a dospívání. Výskyt onemocnění je odhadován 1 na 100000. Většina polypů má hamartomózní benigní charakter, i když je zde zvýšené riziko vzniku adenokarcinomů. Polypy mohou být až několik cm velké a u postižených pacientů je jich nalézáno deset až sto. Juvenilní polypóza je doprovázena gastrointestinálním krvácením, abdominální bolestí, průjmy a anemií. Solitérní polypy se nejčastěji objevují v konečníku a projevují se rektálním krvácením [40].

Predispozice ke vzniku malignit je u pacientů s JPS omezena na gastrointestinální trakt s tím, že nejčastěji se objevuje kolorektální karcinom, a to až u 40 - 50% pacientů s tímto syndromem.

Jsou známé mutace ve dvou genech spojených s tímto syndromem, a to v genu *SMAD4* (SMAD family member 4) lokalizovaném na chromozomu 18q21.1 a genu *BMPR1A* (bone morphogenetic protein receptor, type IA) lokalizovaném na chromozomu 10q22.3. Proteiny *BMPR1A* a *SMAD4* jsou součástí TGF- β (transforming growth factor – β) signální dráhy, která je důležitá pro mnoho buněčných procesů včetně proliferace, diferenciace a adheze. U pacientů s JPS se pohybuje prevalence zárodečných mutací genů *BMPR1A* a *SMAD4* okolo 20% pro každý gen [40][42].

Nedávno byli u dětských pacientů s PJS detekovány zárodečné mutace v genu *ENG* lokalizovaném na chromozomu 9q34.11. Protein *ENG* je stejně jako proteiny *BMPR1A* a *SMAD4* součástí TGF- β signální dráhy [40].

II.4.1.3 PTEN hamartomatózní syndromy (PHTS)

II.4.1.3.1 Cowden syndrom

Cowden syndrom je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s výskytem mnohočetných hamartomů s vysokým rizikem benigních a maligních tumorů štítné žlázy, prsu a endometria. Postižení jedinci mohou mít makrocefalii, trichilemomy a papilomatózní papuly. Onemocnění se také může manifestovat formou Lehermitte-Dunclosovy choroby (megalocefalie, epilepsie, dysplastický gangliocytom mozečku). Charakteristické (avšak ne vždy přítomné) jsou kožní a slizniční projevy ve smyslu hamartomatózních lézí, včetně papilomů rtů a sliznic, papilomatózní papuly v dutině ústní, trichilemomy, hamartomy prsou a střeva. Může být přítomna akrální keratóza kůže, lipomy, fibromy. Prevalence onemocnění není známa, ale odhaduje se na 1:200000. V 80% případů je onemocnění podmíněno mutacemi v tumor supresorovém genu *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) lokalizovaném na chromozomu 10q23, zbývajících 20% případů nemá objasněnou genetickou příčinu, i když u části těchto případů byly nalezeny mutace v DNA oblastech regulujících aktivitu *PTEN* genu, či mutace v podjednotce sukcinátdehydrogenázy *SDHB* a *SDHD*, nebo byly zaznamenány zárodečné metylace tumor supresorového genu *KILLIN* lokalizovaném na chromozomu 10q23 [40][42][44].

II.4.1.3.2 Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom (BRRS)

Tento syndrom spojuje Bannayan-Zonana syndrom, Riley-Smith syndrom a Ruvalcaba-Myrhe-Smith syndrom. BRRS je vzácně se vyskytující onemocnění charakterizované hamartomy ve střevě, makrocefalií, lipomy a hemangiomy.

U více než 60% pacientů s BRRS jsou detekovány zárodečné mutace v genu *PTEN* – jedná se zejména o delece celého genu či pouze jeho části [40].

II.4.2 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC)

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, OMIM#120435) neboli Lynchův syndrom je nejběžnější vrozenou predispozicí ke vzniku karcinomu tlustého střeva s vysokou penetrancí (představuje asi 3% všech CRC a riziko vzniku CRC se pohybuje kolem 80%) a autozomálně dominantním typem dědičnosti. Onemocnění je podmíněno mutacemi v některém z genů dráhy DNA mismatch repair (MMR) – jedná se o gen *MLH1* (mutL homolog 1) na chromozomu 3p21, gen *MSH2* (MutS homolog 2) na chromozomu 2p21, gen *MSH6* (MutS homolog 6) na chromozomu 2p16 a gen *PMS2* (postmeiotic segregation 2) na chromozomu 7p22 a dále o gen *MLH3* (MutL homolog 3) na chromozomu 14q24 a gen *EpCAM* (epithelial cell adhesion molecule gene) na chromozomu 2p21 (dříve označován *TACSDT1*, tumor-associated calcium signal transducer 1). CRC se u HNPCC vyvíjí převážně na pravé straně narušil od FAP, kde jsou CRC dominantně lokalizovány levostranně. Pacienti s HNPCC mají kromě rizika vzniku CRC, také zvýšené riziko vzniku rakoviny endometria a ovaria, prsou, močových cest, mozku a orgánů GIT – slinivka, žaludek [6][16].

HNPCC se nemanifestuje specifickými projevy, proto je podezření na HNPCC vysloveno u nemocných s karcinomem tlustého střeva s pozitivní rodinnou anamnézou a/nebo s manifestací před 50. rokem věku. Jako diagnostická kritéria se často používají tzv. Amsterdamská kritéria I z roku 1991. Tato kritéria jsou příliš restriktivní, a proto byla v roce 1998 vytvořena Amsterdamská kritéria II.

Většina nemocných s kolorektálním karcinomem však Amsterdamská kritéria nesplňuje. Jako vodítko, zda a kteří z nich by měli podstoupit genetické testování, byla na konferenci v Bethesdě vypracována kritéria – „Bethesda Guidelines“, pro indikaci k vyšetření mikrosatelitové nestability (MSI) v nádoru (MSI je totiž detekována u více než 90% nádorů asociovaných s HNPCC). Pro analýzu MSI pak postačuje splnění jediného z Bethesda kritérií. U nemocných s prokázanou MSI v nádoru je následně provedena mutační analýza *MLH1* a *MSH2* genu [45].

II.4.3 Hereditární adenomatózní syndromy

II.4.3.1 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP, OMIM#175100) je všeobecně pokládána za autozomálně dominantně dědičnou predispozici ke vzniku kolorektálního karcinomu. Příčinou FAP jsou zárodečné mutace v genu *APC* (adenomatous polyposis coli). Toto onemocnění je manifestováno rovnoměrně u obou pohlaví [8][20]. Výskyt onemocnění je v české populaci odhadován na 1 / 5000 – 7500 jedinců. EMEA (European Medicines Agency) v roce 2009 odhadla, že v Evropské unii trpí tímto onemocněním 3 – 10 / 100 000 lidí, což odpovídá 11 300 – 37 600 postiženým jedincům [46].

Většina pacientů s FAP má rodinnou anamnézu výskytu kolorektálních polypů a rakoviny, ačkoli 25 – 30% pacientů jsou „de novo“, tj. bez klinických a genetických údajů o výskytu FAP v rodině či případné neodhalené nonpaternity [47]. Aretz et al. v roce 2007 uveřejnili teorii, že část těchto případů může být následkem somatického *APC* mozaicismu [48]. Kolorektální fenotyp poté závisí na míře mozaicismu v mukóze střevního epitelu a nikoli v krevních buňkách, přičemž se zdá, že mozaicismus je asociován s mírnějšími klinickými příznaky. Podle Hes et al. 2008 se mozaicismus vyskytuje až u 1 z 5 „de novo“ FAP pacientů [49].

Z klinického hlediska se u většiny pacientů dětského a adolescentního věku neprojevují téměř žádné symptomy až do okamžiku, kdy početné množství adenomů způsobí rektální krvácení či dokonce anémii. Další nespecifické příznaky jako zácpa nebo průjem, abdominální bolesti či ztráta hmotnosti u mladých pacientů vedou ke kolonoskopickému vyšetření a následné identifikaci polypů [8].

II.4.3.1.1 Klasická a atenuovaná familiární adenomatózní polypóza

FAP se vyskytuje ve dvou formách. Klasická forma je charakterizovaná výskytem stovek až tisíců adenomatózních polypů v tlustém střevu a rektu a časným nástupem onemocnění (2. dekáda života). Věk pacienta při nástupu kolorektálních adenomů vykazuje značnou variabilitu: ve věku 10 let jsou adenomy manifestovány asi u 15% pacientů, ve věku 20 let jsou manifestovány až u 75% pacientů a ve věku 30 let jsou manifestovány až u 90% pacientů s FAP [50]. Polypy se většinou u dětí objevují hlavně v distální části střeva, tj. v rektosigmoideu, u dospívajících osob jsou polypy nalézány téměř v celém střevě [8]. V některém z velkého množství kolorektálních

polypů se postupně vyvíjejí adenokarcinomy. Polypy mají většinou méně než jeden centimetr v průměru a čím větší je jejich počet, tím vyšší je riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Anatomické umístění nádoru tlustého střeva u pacientů s FAP se podobá rozmístění sporadických nádorů, tzn. levostraně (tračník sestupný, esovitá klička a konečník). 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. CHRPE se vyskytuje přibližně u 80% pacientů a je proto důležitým diagnostickým faktorem. Jeho výskyt závisí na lokalizaci zárodečné mutace v genu *APC*, a proto absence tohoto projevu nevylučuje onemocnění FAP.

Atenuovaná forma (AFAP) je charakterizovaná menším počtem polypů (<100) a pozdějším nástupem onemocnění. Riziko vzniku karcinomu je však rovněž vysoké [51]. U pacientů s AFAP jsou mutace lokalizovány na 5' a 3' konci genu *APC* a dále v exonu 9 tohoto genu. Stejně jako u pacientů s FAP byla popsána u pacientů s AFAP řada extrakolických projevů, zejména polypů v horní části gastrointestinálního traktu, adenomy žaludku a duodena, stejně tak byly dokumentovány adenokarcinomy žaludku či hepatoblastom. Výskyt ostatních extrakolických projevů je vzácný [8]. Pacienti s AFAP mohou být považováni za sporadické případy [50].

I přes značnou variabilitu ve fenotypu postižených je onemocnění vysoce penetrantní a k jeho rozvoji dojde téměř u 100% nosičů mutace. V rodinách s výskytem FAP je proto zásadní včasná diagnóza u osob v 50% riziku vzniku onemocnění a následné zákroky preventující vznik kolorektálního karcinomu.

Somatické mutace v genu *APC* byly identifikovány přibližně u 80% sporadických kolorektálních karcinomů. V obou případech hrají mutace v genu *APC* významnou úlohu v iniciaci mnohastupňového procesu kolorektální karcinogeneze [52].

II.4.3.1.2 Gen *APC*

Gen *APC* je tumor supresorový gen, lokalizovaný na chromozómu 5 (5q21-q22) a identifikovaný pozičním klonováním lokusu FAP [53][54][55]. Kódující sekvenci genu tvoří 15 exonů s alternativním sestřihem exonů 9, 10A a 14. Patnáctý exon tohoto genu patří k největším dosud známým exonům v genomu člověka.

K inaktivaci genu jsou nezbytné mutace v obou jeho alelách. V případě hereditární formy CRC je jedna z mutací genu *APC* zděděna od jednoho z rodičů

(zárodečná mutace). Druhá alela je zmutována v epiteliálních buňkách střeva (somatická mutace). Sporadické CRC mají obě alely genu mutované na somatické úrovni.

Databáze mutací HGMD[®] Professional v roce 2011 uváděla 1500 popsaných mutací v genu *APC*. Tabulka 2 přehledně udává číselné hodnoty zastoupení typů mutací, které byly dosud v genu popsány. Z tabulky je patrné, že nejčastěji jsou v genu *APC* detekovány nonsense mutace (nesmyslné mutace) a frameshift mutace (posunové mutace) způsobené delecí či insercí jedné nebo více bází. Rozsáhlé delece tohoto genu jsou nalézány u limitovaného počtu pacientů s FAP [56].

Tabulka 2 Zastoupení jednotlivých mutací v genu *APC* (databáze HGMD)

| Typ mutace | Počet mutací |
|--------------------------|---------------------|
| missense mutace | 82 |
| nonsense mutace | 300 |
| sestříhová mutace | 89 |
| regulační mutace | 3 |
| malá delece | 623 |
| malá inserce | 264 |
| malá inserce-delece | 36 |
| rozsáhlá delece | 85 |
| rozsáhlá inserce | 10 |
| komplexní přestavba genu | 8 |

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 [32].

II.4.3.1.3 FAP a heterogenita

Přes intenzivní mutační analýzu je zárodečná mutace v genu *APC* zachycena u 60 – 80% rodin s výskytem FAP. Přibližně ve 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), sestříhové mutace a mutace v regulačních oblastech genu *APC*,

ale také zárodečné mutace v genu *MUTYH* či rozsáhlé delece tohoto genu [57][58][59]. 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 [60]. Hypermetylace *APC* se objevují během vývoje benigních forem kolorektálních adenomů, což je raná událost ve vývoji CRC. Hypermetylace promotoru *APC* není vázána jen s CRC, ale je spojena i s extrakolickými karcinomy v gastrointestinálním traktu [61]. Podle studie Zare et al. 2009 dochází k hypermetylaci promotoru *APC* u všech gastrointestinálních tumorů, u sporadických i hereditárních forem [62].

Možnost účasti dalšího genu při vzniku onemocnění byla podpořena nálezy ve skupině pacientů s výskytem tzv. „mnohočetných adenomů“. Termín mnohočetné adenomy vyjadřuje skutečnost, kdy počet polypů v kolorektu kolísá v rozmezí mezi 3 až 100 a je tedy podstatně menší než u klasické formy FAP. Pacienti vykazují mírnější fenotyp, polypy se u nich objevují mezi 40. a 60. rokem života, často jsou jedinými postiženými v rodině a nemusí u nich být nalezena zárodečná mutace v genu *APC* [57]. V této skupině pacientů je třeba v rámci diferenciální diagnostiky uvažovat o AFAP, ale i HNPCC nebo o autozomálně recesivně dědičné formě polypózy nazvané *MUTYH* - asociovaná polypóza (MAP) [59][63].

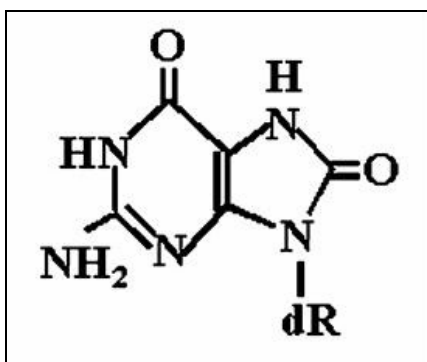
II.4.3.2 *MUTYH* - asociovaná polypóza

MUTYH - asociovaná polypóza podmíněná nálezem bialelických zárodečných mutací v genu *MUTYH* 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 (Fleischmann et al, Int J Cancer 2004) [64].

Frekvence heterozygotních nosičů *MUTYH* mutace v populaci činí 1 – 2% a frekvence nosičů bialelické mutace leží mezi 1 na 10 000 až 40 000 narozených (HALF 2009) [8].

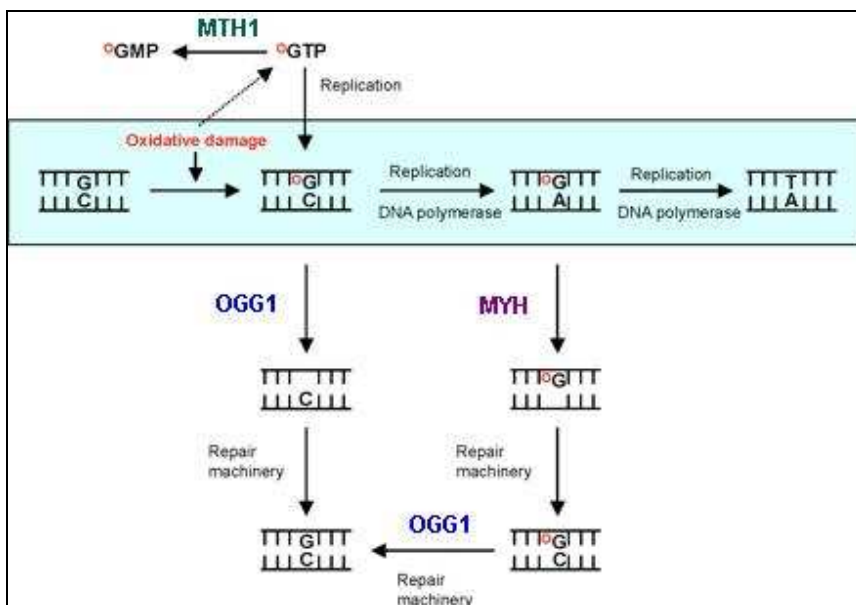
II.4.3.2.1 Gen *MUTYH*

Gen *MUTYH* (MutY homolog *Escherichia coli*) je součástí opravného systému buňky zajišťujícího báze excizní opravy (base excision repair, BER). Tento opravný systém hraje důležitou úlohu při opravě mutací způsobených oxidačními produkty, které vznikají v průběhu aerobního metabolismu. Nejstabilnějším produktem oxidativního poškození DNA je 8-oxoG (8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosin) (Obrázek 3), který se místo s cytosinem páruje s adeninem a vede k záměně bází G:C→T:A [65].



Obrázek 3 Chemická struktura 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosinu [65]

Součástí opravného systému BER jsou kromě *MUTYH* proteinu ještě další dva enzymy MTH1 a OGG1. Protein MTH1 představuje první úroveň systému BER, neboť svou nukleosid-trifosfátovou aktivitou hydrolyzuje 8-oxo-dGTP (8-oxo-deoxyguanosintrifosfát) na 8-oxo-dGMP (8-oxo-deoxyguanosinmonofosfát), čímž brání jeho inkorporaci do řetězce DNA. Protein OGG1 (8-oxo-guanine DNA glykosyláza) odstraňuje z řetězce DNA 8-oxoG a další oxidované formy purinů spárované s cytosinem. Produktem genu *MUTYH* je adenin specifická DNA glykosyláza, která odstraňuje nesprávně spárovaný adenin z vazby na 8-oxoG bez ohledu na délku duplexu, případně guanin, ale pouze v případech, kdy je délka duplexu obsahujícího A•G větší než 23bp (ideální délka je 35 – 45bp) [66][67]. Ohtsubo et al. 2000 dále prokázali, že *MUTYH* protein je schopen odstraňovat i 2-hydroxyadenin z vazby na všechny báze (A, G, C, T), což ilustruje jeho klíčovou roli v ochraně genomické integrity [66]. Působení proteinů *MUTYH*, MTH1 a OGG1 názorně zachycuje obrázek 4.



Obrázek 4 Oprava DNA proteiny dráhy BER [68]

Gen *MUTYH* je 7,1kb dlouhý, obsahuje 16 exonů (15 intronů, většina z nich je kratší než 200bp) a je lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu 1 (1p34.3 – 1p32.1) [65]. Lidský gen *MUTYH* produkuje 3 hlavní třídy mRNA transkriptů – α , β a γ – každá z těchto forem je alternativně stříhána; výsledkem je až 10 alternativně stříhaných transkriptů *MUTYH*; a kóduje mnohočetné proteinové formy, které jsou lokalizovány v jádře nebo mitochondriích [66][69].

Isoforma *MUTYH α* má 4 sestřihové varianty: *MUTYH α 1*, *α 2*, *α 3* a *α 4*. *MUTYH α 3* představuje hlavní isoformu exprimovanou ve většině buněk a koresponduje se sekvencí izolovanou a charakterizovanou Slupskou et al. 1996 [65]. Isoforma *MUTYH α 1* obsahuje navíc 33bp (11AK) a isoforma *MUTYH α 2* má 3bp navíc ve srovnání s isoformou *MUTYH α 3*. Isoformy *MUTYH α 1*, *α 2* a *α 3* jsou translatovány z prvního (iniciačního) tripletu AUG a jsou lokalizovány v mitochondriích, zatímco isoforma *MUTYH α 4* je translatována z třetího AUG a je lokalizována v jádře.

Isoforma *MUTYH β* má 3 sestřihové varianty: *MUTYH β 1*, *β 3* a *β 5*, které jsou translatovány z druhého AUG, který se nachází 42 bází od iniciačního AUG, a jsou lokalizovány v jádře.

Isoforma *MUTYH γ* má také 3 sestřihové varianty: *MUTYH γ 2*, *γ 3* a *γ 4*. Isoformy *MUTYH γ 3* a *γ 4* jsou podobné isoformám *MUTYH β 3* a *MUTYH α 4* jednak v počtu AK, ale i v využitím AUG kodónu a jadernou lokalizací.

V Tabulce 3 jsou přehledně shrnuty jednotlivé *MUTYH* isoformy.

Ačkoli je známo, který transkript kóduje který polypeptid, relativní zastoupení jednotlivých isoformem a funkce těchto isoformem zůstává stále otevřenou otázkou (Parker et al, CMLS 2003) [70].

Tabulka 3 MUTYH isoformy [70]

| | Isoforma | Počet AK v řetězci | AUG kodón | Buněčná lokalizace | Komentář |
|-------|------------------|--------------------|-----------|--------------------|--------------------------|
| typ 1 | MUTYH α 1 | 546 | 1 | mitochondrie | inzerce 33bp |
| | MUTYH α 2 | 536 | 1 | mitochondrie | inzerce 3bp |
| | MUTYH α 3 | 535 | 1 | mitochondrie | původní ref. cDNA |
| typ 2 | MUTYH α 4 | 429 | 3 | jádro | podobná MUTYH γ 4 |
| | MUTYH β 1 | 532 | 2 | jádro | inzerce 33bp |
| | MUTYH β 3 | 521 | 2 | jádro | podobná MUTYH γ 3 |
| | MUTYH β 5 | 521 | 2 | jádro | |
| | MUTYH γ 2 | 522 | 2 | jádro | |
| | MUTYH γ 3 | 521 | 2 | jádro | podobná MUTYH β 3 |
| | MUTYH γ 4 | 429 | 3 | jádro | podobná MUTYH α 4 |
| | MUTYH α 5 | 549 | | | referenční cDNA |

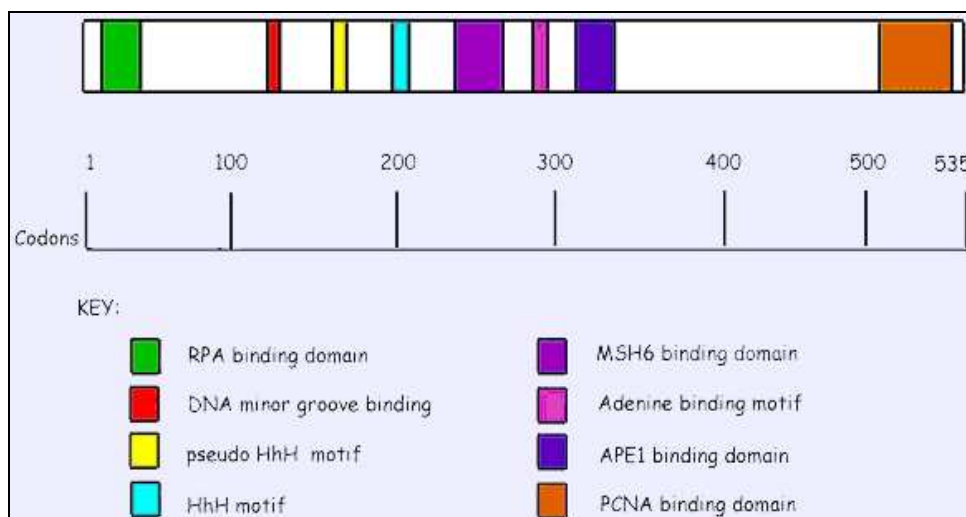
II.4.3.2.2 Struktura genu *MUTYH*

Otevřený čtecí rámec (ORF) genu *MUTYH* (isoforma MUTYH α 3) je translatován do proteinu obsahujícího 535 aminokyselin (AK). Tento protein vykazuje 78% homologii s myším MUTYH proteinem, 74,1% homologii s potkaním proteinem MUTYH a 41% homologii s MUTYH proteinem izolovaným z *Escherichia coli* [65][71]. Isoforma MUTYH α 3 (NM_001048171.1) byla používána jako referenční sekvence genu *MUTYH* až do roku 2008, kdy byla nahrazena isoformou MUTYH α 1 (NM_012222.2) o délce 546AK. Asociace „Human Genome Variation Society“ (HGVS) ve spolupráci s „The National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) v roce 2010 doporučila používání hypoteticky nejdelšího (549AK) známého transkriptu označeného MUTYH α 5 (NM_001128425.1) jako referenční cDNA sekvenci genu *MUTYH* [72].

V sekvenci MUTYH byly nalezeny následující konzervované domény:

- katalytická doména v N-terminální oblasti obsahuje motivy, které byly nalezeny i u dalších glykosyláz BER systému
 - helix – hairpin – helix doména = HhH-GDP (AK: 114 – 273)
 - pseudo HhH
 - doména vázající motiv [4Fe-S] (AK: 290 – 306)
- MutT-like (NUDIX) doména (AK: 367 – 498) v C-terminální oblasti, která se u dalších BER glykosyláz nevyskytuje [73].

Dále obsahuje proteinová sekvence místa pro interakci s PCNA (AK: 523 – 541), APE1 (AK: 309 – 331), MSH6 (AK: 246 – 268) a RPA (AK: 8 – 31), tj. proteiny se kterými interaguje v rámci oprav poškozené DNA, stejně jako předpokládaný mitochondriální (MLS, AK: 1 – 14) a jaderný lokalizační signál (NLS, AK: 16 – 19, 112 – 116, 519 – 523) [70][74].



Obrázek 5 Popsané domény proteinu MUTYH [75]

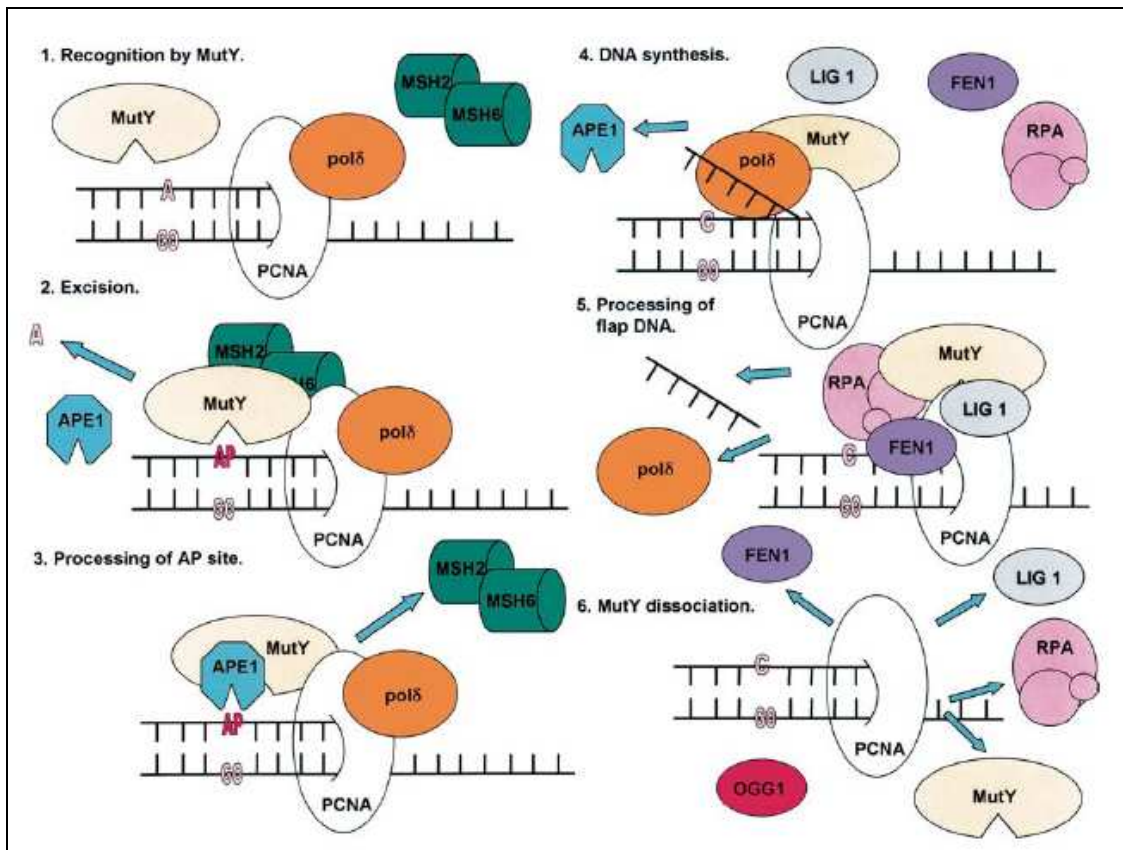
II.4.3.2.3 Interakce proteinu MUTYH

In vitro i in vivo bylo demonstrováno, že protein MUTYH přímo interaguje s několika proteiny zahrnutými v dalších drahách podílejících se na opravě DNA, jedná se o proliferující buněčný jaderný antigen (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), endonukleáza 1 štěpící apurinové/apyrimidinové místo (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1), replikační protein A (replication protein A, RPA) a mutS homolog6 (MSH6) [73].

Oprava nukleotidů s báзовou excizí

MUTYH patří k proteinům, které jsou součástí dlouhé opravné dráhy (long-patch repair pathway) opravující 2 – 6 nukleotidů (na rozdíl od krátké opravné dráhy opravující 1 nukleotid). Boldogh et al. 2001 demonstrovali, že hladina proteinu MUTYH v jádře se v průběhu buněčného cyklu mění a že svého maxima dosahuje během S fáze (3 – 4 násobek normální hladiny) [76]. Hladiny OGG1 a MTH1 zůstávají během buněčného cyklu nezměněny.

V rámci báзовých excizních oprav rozpozná MUTYH protein v řetězci DNA chybně párovaný adenin, případně derivát adeninu, interaguje s PCNA a váže se na chybně spárované báze (=mispair). Interakce MUTYH a PCNA pravděpodobně podmiňuje orientaci proteinu MUTYH k dceřinému vlákně DNA a umožňuje tak správné odstranění adeninu [76]. V této fázi MUTYH protein interaguje s MutS α (heterodimer MSH2/MSH6), čímž je stimulován k excizi adeninové báze z dceřiného řetězce DNA s využitím své glykosylázové aktivity. Po vystřížení adeninu zůstává MUTYH protein ve vazbě k tomuto místu s apurinovou/apyrimidinovou báží (AP site), dokud nedojde k interakci s APE1, která toto místo ošetří a poté disociuje z vazby na MUTYH (MUTYH zůstává ve vazbě pouze s PCNA). Polymeráza δ asociovaná s PCNA inkorporuje cytosin naproti 8-oxoG. Nová DNA (2 – 6 nukleotidů) je syntetizována za tvorby volně visících jednovláknových úseků, které vznikají vytěsněním původního vlákna. V této fázi se na MUTYH protein váže RPA protein a na PCNA se váže endonukleáza 1 štěpící 5' volné konce (flap structure-specific endonuclease 1, FEN-1). Lokalizace RPA a FEN-1 k místu poškození / syntézy DNA vede k odstranění původního vlákna RPA-stimulovanou FEN-1. Po odstranění této struktury je navázána DNA ligáza I a řetězec DNA je spojen. MUTYH, FEN-1 a RPA disociují z komplexu. Produkt (C•8-oxoG) vzniklý touto cestou je substrátem pro OGG1 [70]. Celý proces je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6 Navržený mechanismus působení MUTYH proteinu při odstraňování A•8-oxoG [70]

II.4.3.2.4 Charakteristika MUTYH-deficitních kolorektálních tumorů

Analýzou MUTYH-deficitních kolorektálních tumorů bylo prokázáno, že dvě báze, které následují za somaticky mutovaným G jsou ve většině případů vždy AA a tato převaha G:C→T:A mutací v sekvenci GAA je vysoce signifikantní. Tato sekvenční specifita se objevuje bez ohledu na typ zárodečné mutace v genu *MUTYH*. Možným vysvětlením pro zjevnou specifickou predispozici ke vzniku nádorů tlustého střeva u pacientů s defektem v genu *MUTYH* je vysoká hladina oxidativního poškození postihující tento orgán. Dalším faktorem, který může přispívat ke vzniku těchto nádorů, je vysoký počet GAA v genu *APC* ve srovnání s dalšími geny, které se podílejí na tumorigenezi. Gen *APC* totiž obsahuje celkem 216 sekvencí GAA na rozdíl od genů *TP53*, *RBI*, *NFI* a *VHL*, což jsou geny mutované během tumorigeneze mozku/prsou/plic, retiny, Schwannových buněk a ledvin, které mají pouze 12, 61, 139 a 80 sekvencí GAA. Nádory pacientů s defektem v genu *MUTYH* proto často vykazují G:C→T:A mutace v genu *APC*, což vysvětluje přítomnost příznaků podobných FAP nebo AFAP u těchto pacientů [59][63]. V tumorech MAP pacientů je specifická

somatická transverze G:C→T:A popisována také v genu *KRAS*, ale preferenčně probíhá v sekvenci GGT > TGT, tj. v odlišné sekvenci než v případě *APC* genu [77].

Z uvedených důvodů vyplývá význam molekulárně genetického testování jedinců jak s velkým, tak s malým počtem kolorektálních adenomatózních polypů, včetně sporadicky se vyskytujících polypů. Autozomálně recesivní typ dědičnosti MAP vysvětluje výskyt onemocnění i ve skupině pacientů s negativní rodinnou anamnézou. Diferenciálně diagnostický význam molekulárně genetického testování možných zúčastněných genů v postižené rodině je nesporný z hlediska včasné presymptomatické DNA diagnostiky osob v riziku vzniku onemocnění s možností včasných preventivních zásahů.

II.5 Prevence rakoviny

Podle National Cancer Institute prevence rakoviny zahrnuje vyvarování se rizikovým faktorům a „zvýšení“ protektivních faktorů, které mohou snížit pravděpodobnost vzniku rakoviny u jednotlivce. Obecně lze definovat, že rakovina je způsobena mnohočetnými genetickými defekty, které mohou být následkem vlivů prostředí, stravovacích návyků, životního stylu stejně jako infekčních onemocnění.

II.5.1 Rizikové faktory

II.5.1.1 Kouření

Vliv kouření na vznik rakoviny je vysoce asociován s délkou kouření. V roce 1996 publikovali Giovannucci et al. teorii, že kouření je původcem kolorektální karcinogeneze s tím, že vzrůstající riziko se projeví po 30 – 40 letech po zahájení kouření [78]. Vliv kouření na vznik kolorektálního karcinomu však nebyl jednoznačně potvrzen. Silná korelace je však patrná mezi kouřením cigaret a rizikem vzniku kolorektálních adenomů [79].

Mechanismus spojený s karcinogenním efektem tabáku je podmíněn přítomností velkého množství karcinogenů v cigaretách. V cigaretovém kouři bylo identifikováno 4000 substancí, z nichž více než 60 jsou karcinogeny – př. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), aromatické aminy, N-nitrosaminy, aldehydy a další těžké organické složky (např. benzen, butadien) [80].

Nikotin není považován za karcinogen, i když za určitých podmínek může vyvolat vznik tumoru.

II.5.1.2 Váha

Nadváha (BMI > 25 – 29,9) či obesita (BMI > 30) jsou považovány za rizikový faktor nejen u vysokého krevního tlaku, diabetu, ale také rakoviny. Vztah mezi obesitou a rizikem rakoviny byl zaznamenán nejen u rakoviny střev, prsou, děložní sliznice, ale také slinivky břišní, jícnu a žlučníku [81]. Vysoká hodnota BMI je asociována nejen s vývojem adenomů tlustého střeva a také CRC [82].

Podle Hines et al. 2009 obesita zvyšuje riziko vývoje CRC u mužů více než u žen [82]. Tato asociace je silnější u distálně lokalizovaných kolonických lézí než u proximálních lézí [83].

Mechanismus vlivu obesity na vznik rakoviny je založen na pozměněném mechanismu hormonů, včetně inzulínu, inzulínu podobných růstových faktorů (insulin – like growth factor, IGF) a pohlavních hormonů, které mohou vést k narušení rovnováhy mezi buněčnou proliferací, diferenciací a apoptózou. Také vysoké hladiny některých cytokinů jako interleukin-6 (IL-6) a tumor necrosis factor (TNF) mohou u obézních jedinců podporovat karcinogenezi a proliferaci normálních buněk na buňky nádorové [84].

V případě rakoviny střev či prsou je v souvislosti s vlivem obezity na vzrůstající riziko vzniku tumoru popisován mechanismus hyperinsulinémie a insulinové rezistence ve vztahu k insulinu podobným růstovým faktorům. IGF-1 se váže na inzulín i na IGF receptory, které jsou exprimovány na mnoha buňkách těla, včetně buněk tlustého střeva. Aktivace zprostředkovaná IGF-1 receptory vede k buněčnému růstu, proliferaci a angiogenezi, dále k inhibici apoptózy a buněčné adhezi [83][85].

II.5.1.3 Fyzická aktivita a cvičení

Důkaz pro snížení rizika vzniku rakoviny v souvislosti s fyzickou aktivitou byl nalezen věrohodně u rakoviny střev a prsou, pravděpodobně u rakoviny prostaty a možný vliv byl popsán u rakoviny plic a děložní sliznice [86]. Vztah mezi vznikem rakoviny a fyzickou aktivitou byl nejvíce studován u kolorektálního karcinomu. Dospělí, kteří zvýší svou fyzickou aktivitu, buď intenzitou, délkou nebo četností cvičení, mohou zredukovat riziko vzniku CRC o 30 – 40%. Bylo odhadnuto, že 30 až 60 minut fyzické aktivity denně chrání před rakovinou střev [87].

Fyzická aktivita může ovlivnit riziko rakoviny střev několika způsoby, včetně redukce zánětů a insulinové rezistence či modifikování hormonálního metabolismu, ale hlavně zrychlit peristaltiku a následně snížit dobu průchodu stolice, což vede ke zkracování intervalu, během kterého je střevní sliznice vystavena vlivu karcinogenů [83][88].

II.5.1.4 Strava

Význam stravy jako hlavní příčiny rakoviny byl předložen opakovaně. Strava je považována za druhou nejčastější příčinu rakoviny, jež lze předejít (první je kouření). Stravovací schéma, potraviny, živiny a další složky potravy jsou považovány za rizikové faktory několika typů rakoviny. Více než 40% tumorů je možné připsat na vrub stravovacím faktorům [84]. Bylo odhadnuto, že 30 – 40% dětských nádorů je možné předejít díky zdravému životnímu stylu a jednoduchým stravovacím opatřením – zejména zařazení ovoce a zeleniny do jídelníčku [89].

II.5.1.5 Vitamíny a potravinové doplňky

Navzdory zvýšenému zájmu o tyto látky není doposud jasné, zda a jak velký význam mají v prevenci rakoviny.

Nejvíce studovanou látkou z této skupiny je vitamín D, který se vyskytuje ve 2 formách – vitamín D₂ (ergokalciferol) a vitamín D₃ (cholecalciferol). Vitamín D snižuje epiteliální proliferaci a podporuje diferenciaci buněčných kultur, včetně střevních. Vitamín D je také popisován v souvislosti se zastavením buněčného cyklu a apoptózou v buněčných liniích CRC a buněčných liniích premalignantních adenomů [90]. Úloha vitamínu D při prevenci rakoviny však není jednoznačně potvrzena [84].

II.5.1.6 Stopové prvky

Selen je stopový prvek obsažený v obilninách, mase a rybách. Selen existuje v několika formách a je součástí řady biochemických drah. Selen se podílí na opravách a prevenci oxidativního poškození, změně metabolismu karcinogenních látek, regulaci imunitní odpovědi, p53 zprostředkovaná apoptóza a opravách poškozené DNA [91].

II.5.1.7 Alkohol

Užívání alkoholu může zvyšovat riziko rakoviny. Byla potvrzena asociace mezi konzumací alkoholu a rakovinou dutiny ústní, hrtanu, hltanu, jícnu, jater, střev, konečníku i prsou [92].

Jasný mechanismus, jak alkohol ovlivňuje riziko vzniku nádoru, není dosud plně objasněn, ale jsou známy možné faktory podmiňující tento fakt.

Alkohol působí jednak jako dráždidlo, zejména v ústech a hrdle, ale také jako rozpouštědlo umožňující dalším chemickým látkám (např. látkám obsaženým v cigaretovém kouři) vstup do tělních buněk. Kombinace kouření a alkoholismu je proto častější příčinou rakoviny úst a hrdla než samotné kouření či zvýšená konzumace alkoholu.

Acetaldehyd, produkt odbourávání alkoholu, interaguje s polyamidy, které se podílí na buněčném růstu, čímž spouští reakci, která poškozuje DNA. Polyamidy způsobují přeměnu acetaldehydu na krotonaldehyd, škodliviny s karcinogenním účinkem [92].

II.6 Screening kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinomy jsou ve většině případů asymptomatické až do pozdního stádia, kdy se objevuje abdominální bolest či změny týkající se stolice. Preventivním vyšetřením je možné odhalit raná stádia rakoviny (včetně výskytu kolorektálních adenomů) a zvýšit tak úspěšnost léčby a snížit úmrtnost [93].

II.6.1 Screening kolorektálního karcinomu u lidí v obecném riziku

V rámci screeningu jsou v ČR bezplatně testovány 1krát ročně osoby nad 50 let testem na okultní krvácení (Fecal Occult Blood Test, FOBT). Osoby starší 55let mají nárok na toto vyšetření hrazené zdravotní pojišťovnou pouze 1krát za 2 roky.

FOBT je jednoduchý test založený na testování přítomnosti krve (krevního barviva hemoglobinu) ve stolici, který je možné provést doma. Značnou nevýhodou FOBT je fakt, že přítomnost krve ve stolici nemusí souviset jen s kolorektálním karcinomem. Pozitivní výsledek testu totiž může signalizovat „pouze“ přítomnost polypů, Crohnovu nemoc, či divertikulitidu a také krvácení do horních partií GIT. Je-li FOBT pozitivní, je potřeba postoupit kolonoskopii [94].

Kolonoskopie je nejpřesnější metoda vyšetření tlustého střeva prováděná při podezření na zánětlivé a nádorové onemocnění tlustého střeva či hemoroidy.

Kolonoskopie se provádí od roku 1970 a umožňuje nejen diagnostiku, ale i odstranění postižených oblastí střevní sliznice či odběr vzorku pro histologické vyšetření. V rámci prevence je pro osoby starší 55 let toto vyšetření hrazeno zdravotní pojišťovnou 1krát za 10 let [95]. Volba 10letého intervalu mezi vyšetřeními je podmíněna senzitivitou vyšetření a dobou mezi přeměnou adenomu na adenokarcinom. Transformace adenomu v karcinom však může být mnohem kratší (cca 5 – 8 let), a proto by bylo vhodné interval mezi vyšetřeními zkrátit na 5 let [93].

Další možností vyšetření je irigografie, tj. rentgenové kontrastní vyšetření tlustého střeva. Provádí se pomocí tzv. kontrastní látky, která lékaři na výsledných snímcích vyšetřovaný prostor lépe ozřejmí. Metoda ovšem neumožňuje odstranění polypů ani biopsii, a tak je méně vhodná než kolonoskopie [93][96].

II.6.2 Screening kolorektálního karcinomu u lidí ve zvýšeném riziku

V případě výskytu adenomatózních polypů nebo CRC ve věku pod 60 let u prvostupňových příbuzných (rodiče, děti, sourozenci) je výskyt rakoviny u jedince vyšší než u sporadických případů a navíc se karcinom objevuje průměrně o 10 let dříve. V takovýchto případech by měla být preventivní kolonoskopie provedena ve 40 letech, anebo o 10 let dříve v případě výskytu karcinomu u příbuzného v nižším věku, a měla by se opakovat v 5letém intervalu [97].

Pacienti s genetickými syndromy by měli podstoupit genetickou konzultaci s následným genetickým vyšetřením.

Osoby, u kterých presymptomatické FAP genetické vyšetření odhalí mutaci v genu *APC*, by měly poprvé podstoupit kolonoskopické vyšetření ve věku 10 let a následně v intervalu 1 – 2 roky [6].

V případě onemocnění HNPCC by jedinci s mutací měli podstoupit první kolonoskopické vyšetření mezi 20. a 25. rokem života, a pak v pětiletém intervalu až do 30. narozenin, kdy se interval mezi vyšetřeními zkrátí na 1 rok. Tato frekvence kolonoskopického vyšetření je odůvodněna poznáním, že v adenomech u HNPCC dochází k rychlé a vytrvalé kumulaci mutací, jež vedou ke zrychlení procesu přeměny adenomu v karcinom [6] [93].

III. CÍLE PRÁCE

Objasnění genetických příčin probandů s FAP/AFAP, u nichž nebyla standardními vyšetřovacími metodami mutační analýzy zjištěna zárodečná mutace v genu *APC*

- vytvoření souboru *APC* -negativních probandů
- testování přítomnosti dlouhých delecí v genu *APC* u FAP/AFAP probandů
- funkční analýza 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*

IV. MATERIÁL A METODY

IV.1 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 byli vyšetřeni 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 [93].

Ze základního souboru byl po mutační analýze genu *APC* vytvořen soubor 310 nepříbuzných *APC*-mutačně-negativních probandů, u kterého byla testována přítomnost dlouhých delecí pomocí metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Z tohoto souboru byl po analýze MLPA vytvořen 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 kvalitativní a kvantitativní 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 z kontrolních souborů 1, 2 a 3 podepsaly před genetickým vyšetřením informovaný souhlas schválený Etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze.

IV.2 METODY

IV.2.1 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 [99] 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).

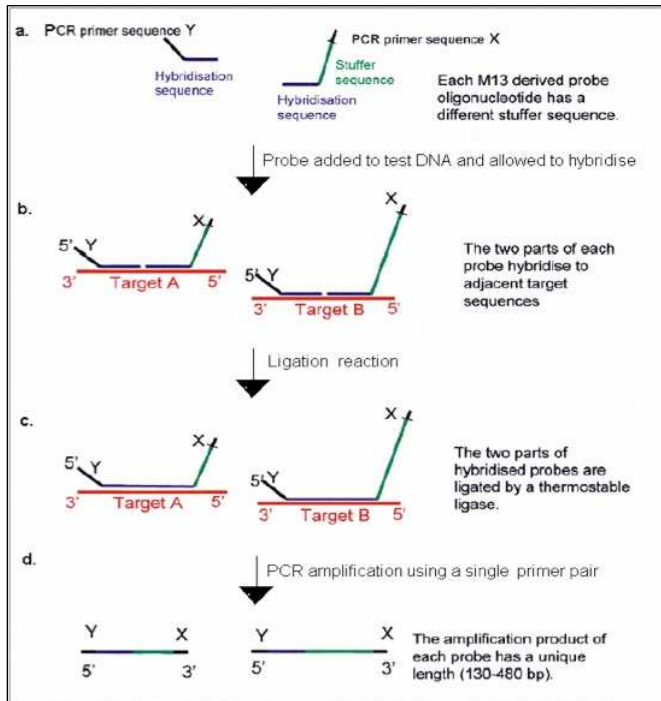
Izolace RNA z krve i z tkáňových vzorků byla provedena dle protokolu výrobce.

IV.2.2 TESTOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DLOUHÝCH DELECÍ V GENU *APC*

IV.2.2.1 METODA 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. Každá sekvence je identifikována jedním párem sond, které jsou po hybridizaci zligovány. Každá sonda z páru má na jednom konci sekvenci různého primeru, přičemž sekvence obou primerů jsou stejné pro všechny páry sond. Po ligační reakci následuje amplifikace zligovaných sond pomocí tohoto páru primerů metodou PCR. Jeden z primerů je značen fluorescenčně a umožňuje fragmentační analýzu naamplifikovaných fragmentů na genetickém analyzátoru, např. ABI Prism™ 310. Jedna ze sond vždy vnáší do vznikajícího fragmentu úsek uměle připravené DNA o charakteristické délce a umožňuje tak odlišit jednotlivé produkty PCR reakce. Na obrázku 7 je shrnut princip

metody MLPA. Kvantitativním porovnáním výtěžku amplifikace lze identifikovat jedince s delecí anebo duplikací jednoho či více exonů. Delece exonu se projeví snížením plochy píku o 40 – 50 %.



Obrázek 7 Princip metody MLPA [100]

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.

Jednotlivé kroky MLPA analýzy byly provedeny dle navrženého protokolu firmy MRC-Holland (univerzální protokol pro všechny MLPA kity) s výjimkou použití polovičních objemů všech reagensů i množství analyzované DNA.

PROTOKOL MLPA ANALÝZY

DNA denaturace a hybridizace SALSA-sond

1. k 1,5 μ l DNA izolované standardní vysolovací metodou přidat 1 μ l H₂O, případně použít 2,5 μ l DNA izolované kitem
2. denarovat při 98 °C po dobu 5 min
3. přidat 0,75 μ l SALSA-prób a 0,75 μ l MLPA pufru
4. promíchat a inkubovat nejprve 1 min při 95 °C, a pak 16 h při 60 °C

Ligační reakce

1. snížit teplotu na 54 °C a přidat 16 µl mixu Ligáza-65 (smíchat 1,5 µl pufru A Ligáza-65 a 1,5 µl pufru B Ligáza-65 a 12,5 µl H₂O a 0,5 µl Ligázy-65)
2. inkubovat 15 min při 54 °C a poté 5 min při 95 °C

PCR reakce

1. k 2 µl SALSA PCR pufru a 13 µl H₂O přidat 5 µl produktu MLPA ligace
2. inkubovat 5 min při 60 °C
3. přidat 5 µl PCR mixu (1 µl SALSA PCR-primerů, 1 µl SALSA pufru, 2,75 µl H₂O a 0,25 µl SALSA polymerázy)
4. PCR

Program PCR

60 °C / ∞

95 °C / 30 s

60 °C / 30 s

72 °C / 60 s

72 °C / 20 min

4 °C / ∞

} 33 cyklů

FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

0,75 µl produktu PCR reakce bylo smícháno s 0,75 µl H₂O a 12 µl formamidu a analyzováno na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 µm; POP-4TM polymer;

modul GS STR POP4 (1 ml) C; teplota 60 °C; nástřik 3-5 s;

napětí při nástřiku 15 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: 30 min

MLPA VÝPOČET

Analýza výsledků byla provedena pomocí nově vytvořeného programu v Microsoft Excel dle doporučení firmy MRC-Holland. Nejprve byly plochy píků amplifikačních produktů pro jednotlivé sondy odpovídající promotorovým oblastem a exonům genu *APC* vyděleny součtem ploch píků referenčních sond obsažených v kitu. Následně byly získané hodnoty porovnány v rámci jedné analýzy a také s průměrnou hodnotou získanou z analýzy vzorků bez detekované dlouhé delece.

Delece se projeví poklesem plochy píku sondy alespoň o 40 %, přičemž pokles by měl být patrný i pouhým okem na elektroforeogramu. Duplikace se analogicky projeví zvýšením plochy píku sondy.

V případě poklesu pouze jedné sondy byla provedena sekvenace příslušné oblasti, aby byl vyloučen pokles sondy vlivem sekvenční změny pod touto sondou, která by ovlivnila hybridizaci a ligaci sondy.

IV.2.2.2 METODA PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ EXONU 14

GENU *APC*

V případě delece exonu 14 prokázané metodou MLPA byla metodou přímého sekvenování ověřována možnost výskytu sekvenční změny v probandově DNA, a to v místě, kde dochází k ligaci sondy pro exon 14 během ligační reakce metody MLPA.

AMPLIFIKAČNÍ REAKCE – exon 14 genu *APC*

Pro PCR exonu 14 byly použity primery (viz tabulka 4) a reakční podmínky publikované ve článku Olschwang et al. 1993 [98].

Tabulka 4 Primery pro PCR – exon 14 genu *APC*

| Primer | Sekvence primeru | Velikost produktu (bp) |
|---------|------------------------------|------------------------|
| APA14A | 5'-TAGATGACCCATATTCTGTTTC-3' | 275 |
| APA14BS | 5'-CTTTAAAAGTAATATAAACTC-3' | |

PCR směs pro amplifikaci exonu 14 genu APC

⇒ 50 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

1,5 mM MgCl₂

1 µM každého primeru

0,2 mM každého dNTP

5 jednotek Taq polymerázy (LC)

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 14 genu APC

95 °C / 5min

95 °C / 1 min

55 °C / 1 min 30s

72 °C / 1 min 30s

} 35 cyklů

72 °C / 7 min

4 °C / ∞

SEKVENAČNÍ REAKCE

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™]).

Směs pro sekvenační reakci

⇒ 5 µl reakční směs

2 µl BigDye[®] Terminator sekvenační mix

0,3 - 0,5 µl PCR produktu

0,3 µl sekvenačního primeru

doplněno H₂O do příslušného objemu

Podmínky sekvenační reakce

96 °C / 1 min

96 °C / 20 s

50 °C / 10 s

60 °C / 4 min

} 25 cyklů

4 °C / ∞

POSTSEKVENAČNÍ PŘEČIŠTĚNÍ

Pro postsekvenační přečištění byl využit následující protokol:

1. k 5 μ l produktu sekvenační reakce přidat 20 μ l směsi etanol-voda (poměr je 4:1)
2. nechat stát 15 min při pokojové teplotě
3. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 20 min
4. odstříknout
5. přidat 60 μ l 70% etanolu
6. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 10 min
7. odstříknout
8. vysušit při 90 °C po dobu 1 min
10. přidat 30 μ l formamidu
11. zdenaturovat při 95 °C po dobu 5 min
12. zamrazit

SEKVENOVÁNÍ - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

Produkt sekvenační reakce byl po postsekvenačním přečištění analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 za následujících podmínek:

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 μ m; Seq POP-6TM polymer;
modul Seq POP6 Rapid (1 ml) E; teplota 50 °C; nástřik 30-60 s;
napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: 28 min

IV.2.2.3 URČENÍ ROZSAHU DLOUHÉ DELECE GENU APC

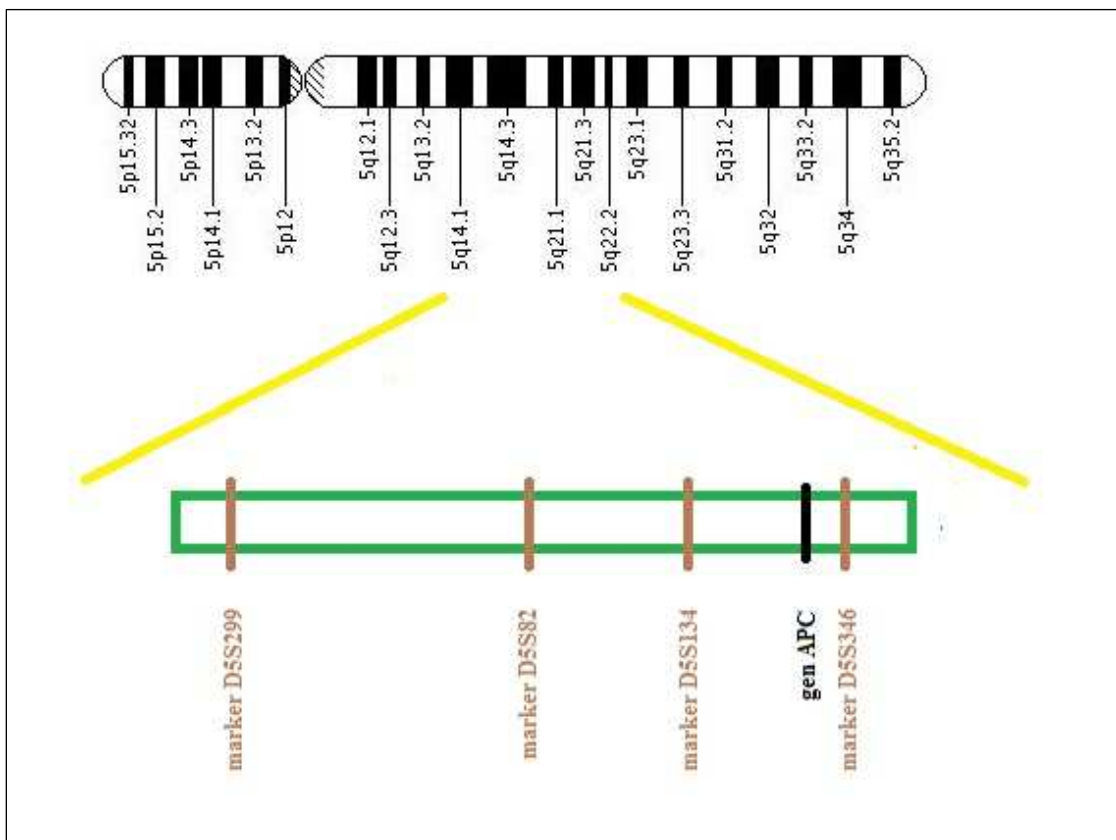
S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

U probandů s dlouhou delecí genu *APC* prokázanou metodou MLPA byl testován rozsah delecí s využitím čtyř mikrosatelitových markerů typu CA repetit. Charakteristika použitých markerů D5S299, D5S82, D5S134 a D5S346 lokalizovaných v okolí genu *APC* (pozice genu: 112101484bp - 112209533bp) je uvedena v tabulce 5 a znázorněna na obrázku 8.

Tabulka 5 Charakteristika mikrosatelitových markerů použitých pro určení rozsahu delece APC [101][102]

| Marker | Lokalizace | Pozice (bp) | PIC* | Velikost (bp) |
|--------|------------|---------------------|------|---------------|
| D5S299 | proximálně | 101675106-101675264 | 0,66 | 156-182 |
| D5S82 | proximálně | 107355570-107355784 | 0,70 | 169-179 |
| D5S134 | proximálně | 110089680-110089848 | 0,54 | 167-183 |
| D5S346 | distálně | 112241523-112241647 | 0,83 | 96-106 |

* PIC (polymorphic/polymorphism information content)



Obrázek 8 Pozice genu APC a použitých mikrosatelitových markerů (chromozom 5)

PCR

DNA byla amplifikována metodou PCR s použitím popsáných primerů uvedených v tabulce 6 [101][102][103].

Tabulka 6 Použité primery pro PCR mikrosatelitových markerů

| Marker | Primer | Sekvence primeru |
|--------|----------|-------------------------------------|
| D5S299 | APCA299F | 5'-GCTATTCTCTCAGGATCTTG-3' |
| | APCA299R | 5'-GTAAGCCAGGACAAGATGACA-3' |
| D5S82 | APC-7 | 5'-ATCAGAGTATCAGAATTTCT-3' |
| | APC-8 | 5'-CCCAATTGTATAGATTTAGAA-3' |
| D5S134 | D5S134F | 5'-ACATCTCCAATATACCCCCCTCTCTTTTC-3' |
| | D5S134R | 5'-TCCTCTGTGGTTGGTGAAATTGCACC-3' |
| D5S346 | APC-1 | 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3' |
| | APC-2 | 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3' |

PCR směs

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

2 mM MgCl₂

1 µM každého primeru

0,2 mM každého dNTP

5 jednotek Taq polymerázy (Fermentas)

PCR podmínky pro použité markery

PCR podmínky pro marker D5S299

96 °C / 3 min

94 °C / 30 s

57 °C / 30 s

72 °C / 20 s

} 35 cyklů

72 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro marker D5S82

94 °C / 5 min

94 °C / 1 min
53 °C / 1 min 30 s
72 °C / 1 min

} 30 cyklů

72 °C / 7 min

4 °C/ ∞

PCR podmínky pro marker D5S134

95 °C / 3 min

94 °C / 30 s
65 °C / 30 s
72 °C / 30 s

} 37 cyklů

72 °C / 3 min

4 °C/ ∞

PCR podmínky pro marker D5S346

94 °C / 5 min

94 °C / 1 min
60 °C / 1 min
72 °C / 1 min

} 30 cyklů

72 °C / 7 min

4 °C/ ∞

ELEKTROFORÉZA

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.

IV.2.3 FUNKČNÍ ANALÝZA ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU APC NA ÚROVNI RNA

IV.2.3.1 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.

IV.2.3.2 ANALÝZA APC TRANSKRIPTU

AMPLIFIKAČNÍ REAKCE VYBRANÝCH OBLASTÍ cDNA

Amplifikace relevantních oblastí byla provedena s využitím primerů navržených pomocí programu Primer3Input (tabulka 7) a reakčních podmínek dle navrženého protokolu firmy Invitrogen.

Tabulka 7 Sekvence použitých primerů pro amplifikace úseků cDNA genu APC

| Testovaná změna (gDNA) | Primer | Sekvence primeru | Délka fragmentu (bp) |
|----------------------------|-------------|---------------------------------|----------------------|
| c.220G>T (intron 2) | APC1F(i2) | 5'-ATCAGTTGTAAAGCAAGTTGAGG-3' | 472 |
| | APC4R(i2) | 5'-TTCTGAAGTTGAGCGTAATACCA-3' | |
| c.531+1G>T (intron 4) | APC3F(i4) | 5'-GGGTTTGTAATGGAAGCAGA-3' | 361 |
| | APC6R(i4) | 5'-CTTCTGTTGCTTGGGACTGTAA-3' | |
| c.645+1G>T (intron 5) | APC4F(i5) | 5'-TACGCTCAACTTCAGAATCTCAC-3' | 331 |
| | APC7R(i5) | 5'-TTTCTCCCACTCCTTGACCT-3' | |
| c.1312+5G>A (intron 9) | APC7F(i9) | 5'-GGCAGAATGAAGGTCAAGGA-3' | 655 |
| | APC10R(i9) | 5'-GGCCTGTAGTCCCCCTAGTT-3' | |
| c.1548+1G>A (intron 11) | APC10F(i11) | 5'-TTCATTTGATGAAGAGCATAGACAT-3' | 232 |
| | APC12R(i11) | 5'-TAGTTGGGCCACAAGTGCT-3' | |
| c.1548+1G>T (intron 11) | APC10F(i11) | 5'-TTCATTTGATGAAGAGCATAGACAT-3' | 232 |
| | APC12R(i11) | 5'-TAGTTGGGCCACAAGTGCT-3' | |
| c.1627G>T (exon 13) | APC11F(e13) | 5'-GCAAGTGGACTGTGAAATGTATG-3' | 347 |
| | APC14R(e13) | 5'-AATTCCATAAGGCACTCAATACG-3' | |
| c.1956C>T (exon 14) | APC13F(e15) | 5'-GTTGCGAGAAGTTGGAAGTGT-3' | 369 |
| | APC15R(e15) | 5'-CACAAAGTTCCACATGCATTACT-3' | |
| c.1958+8T>C (intron 14) | APC13F(e15) | 5'-GTTGCGAGAAGTTGGAAGTGT-3' | 369 |
| | APC15R(e15) | 5'-CACAAAGTTCCACATGCATTACT-3' | |
| c.1959G>A (exon 15) | APC13F(e15) | 5'-GTTGCGAGAAGTTGGAAGTGT-3' | 369 |
| | APC15R(e15) | 5'-CACAAAGTTCCACATGCATTACT-3' | |

PCR reakce pro amplifikaci relevantních úseků cDNA

⇒ 20 µl reakční směs

50 - 80 ng mRNA

1,5 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,2 mM každého dNTP

2,5 jednotky Taq DNA polymerázy v pufru (Invitrogen)

PCR podmínky pro amplifikaci relevantních úseků cDNA

94 °C / 3 min

94 °C / 45 s

55 °C / 30 s

72 °C / 1 min 20 s

} 35 cyklů

72 °C / 10 min

4 °C / ∞

Pro zjednodušení a urychlení práce byl využit kit SuperScript™ III One Step RT-PCR system with Platinum® *Taq* (Invitrogen), který umožňuje provedení reverzní transkripce a amplifikační reakce v jedné zkumavce s využitím specifických primerů. Reakce byla provedena v 10 µl reakční směsi a za reakčních podmínek dle doporučení výrobce.

IZOLACE PCR PRODUKTŮ Z AGARÓZOVÉHO GELU

V případě, že se při kontrolní elektroforéze na agarózovém gelu v jedné jamce objevilo více fragmentů, byly jednotlivé fragmenty před sekvenační reakcí separovány pomocí MinElute® Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle návodu dodávaného ke kitu.

SEKVENAČNÍ REAKCE

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™]).

Směs pro sekvenační reakci

⇒ 5 µl reakční směs

2 µl BigDye[®] Terminator sekvenační mix

0,3-0,5 µl příslušného PCR produktu

0,3 µl sekvenačního primeru

doplněno H₂O do příslušného objemu

Podmínky sekvenační reakce

96 °C / 1 min

96 °C / 20 s

50 °C / 10 s

60 °C / 4 min

} 25 cyklů

4 °C/ ∞

POSTSEKVENAČNÍ PŘEČIŠTĚNÍ

Pro postsekvenační přečištění byl využit následující protokol:

1. k 5 µl produktu sekvenační reakce přidat 20 µl směsi etanol-voda (v poměru 4:1)
2. nechat stát 15 min při pokojové teplotě
3. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 20 min
4. odstříknout
5. přidat 60 µl 70% etanolu
6. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 10 min
7. odstříknout
8. vysušit při 90 °C po dobu 1 min
10. přidat 30 µl formamidu
11. zdenaturovat při 95 °C po dobu 5 min
12. zamrazit

SEKVENOVÁNÍ - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

Produkt sekvenační reakce byl po postsekvenačním přečištění analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 za následujících podmínek:

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 µm; Seq POP-6TM polymer;
modul Seq POP6 Rapid (1 ml) E; teplota 50 °C; nástřik 30-60 s;
napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: dle délky fragmentu – nejdéle 36 min

IV.2.3.3 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. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Primery pro Real-Time PCR (gen APC - exon 14)

| Sekvence primerů a sondy pro konstitutivní sestřih | |
|--|---|
| F | 5'-AAGTTGGAAGTGTGAAAGCATTGATG-3' |
| R | 5'-GCTGACAAATTCATAAGGCACTCA-3' |
| sonda | 5'-TTTGAGGGTTGATTCCTTTTT-3' |
| Sekvence primerů pro alternativní sestřih | |
| F | 5'-GGAAGTGTGAAAGCATTGATGGAAT-3' |
| R | 5'-TTGTAATAAAGTTTGTAGACAGTTGTTCTCTCT-3' |
| sonda | 5'-TAGGATTTGCCTTTTAACTTC-3' |

IV.2.3.4 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 souboru 400 vzorků DNA jedinců bez výskytu CRC v rodině a v souboru DNA 94 osob se sporadickým výskytem CRC (tj. s využitím kontrolního souboru 3).

PCR

Pro PCR byly použity primery pro 14. exon genu *APC* (tabulka 9) popsané v publikaci Olschwang et al. 1993 pouze s jedinou změnou týkající se označení F primeru na jeho 5' konci fluorescenční barvou 6-FAM [98]. Složení PCR směsi a podmínky pro amplifikaci – viz IV.2.2.2.1.

Tabulka 9 Primery pro PCR – exon 14 genu *APC*

| Primer | Sekvence primeru * |
|-----------|---|
| APA14AFAM | 5'-TAGATGACCCATATTCTGTTTC-3', modifikace 5' 6-FAM |
| APA14B | 5'- CCCCACGCCACCCGACGCCCCAGCCCGACCCCCCGCGCCCGGCGCCCCC CTTAAAAGTAATATAAACTC-3' |

* kurzívou označen GC-klemp

PŘÍPRAVA HETERODUPLEXŮ

95 °C / 5 min

65 °C / 60 min

15 °C / 1 min

KAPILÁRNĚ ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA HETERODUPLEXŮ

1 µl vzorku byl smíchán s 15 µl H₂O a analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 µm; POP-4TM polymer;

modul GS STR POP4 (1 ml) C; teplota 46 °C; nástřik 5 s;

napětí při nástřiku 7 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: 21 min

IV.2.4 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MUTYH*

IV.2.4.1 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MUTYH* METODOU

dHPLC

AMPLIFIKAČNÍ REAKCE EXONŮ GENU *MUTYH*

Amplifikace 16 exonů a přilehlých intronických oblastí genu *MUTYH* byla provedena pomocí popsaných primerů (tabulka 10) a modifikovaných reakčních podmínek uvedených v publikaci Al-Tassan et al. 2002 [59].

Tabulka 10 Primery použité pro mutační analýzu genu *MUTYH*

| Exon | Primer | Sekvence primeru | Velikost PCR produktu (bp) |
|------|--------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 | myh1F | 5'-GAAGCTGCGGGAGCTGAAA-3' | 133 |
| | myh1R | 5'-ATCCCCGACTGCCTGAACC-3' | |
| 2 | myh2F | 5'-CTGCATTTGGCTGGGTCTTT-3' | 262 |
| | myh2R | 5'-CGCACCTGGCCCTTAGTAAG-3' | |
| 3 | myh3F | 5'-AGCCTGTGCAGGGATGATTG-3' | 272 |
| | myh3R | 5'-CAACCCAGATGAGGAGTTAGG-3' | |
| 4 | myh4F | 5'-CTCATCTGGGGTTGCATTGA-3' | 167 |
| | myh4R | 5'-GGGTTGGCATGAGGACACTG-3' | |
| 5 | myh5F | 5'-GGGCAGGTCAGCAGTGTC-3' | 189 |
| | myh5R | 5'-TACACCCACCCCAAAGTAGA-3' | |
| 6 | myh6F | 5'-TACTTTGGGGTGGGTGTAGA-3' | 185 |
| | myh6R | 5'-AAGAGATCACCCGTCAGTCC-3' | |
| 7 | myh7F | 5'-GGGACTGACGGGTGATCTCT-3' | 186 |
| | myh7R | 5'-TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT-3' | |
| 8 | myh8F | 5'-CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT-3' | 240 |
| | myh8R | 5'-AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC-3' | |
| 9 | myh9F | 5'-AACTCTTTGGCCCCTCTGTG-3' | 196 |
| | myh9R | 5'-GAAGGGAACACTGCTGTGAAG-3' | |
| 10 | myh10F | 5'-GTGCTTCAGGGGTGTCTGC-3' | 262 |
| | myh10R | 5'-TGTCATAGGGCAGAGTCACTCC-3' | |
| 11 | myh11F | 5'-TAAGGAGTGA CTCTGCCCTATG-3' | 247 |
| | myh11R | 5'-GCCAAGAGGGGCTTTAGG-3' | |
| 12 | myh12F | 5'-AGCCCCTCTTGGCTTGAGTA-3' | 297 |
| | myh12R | 5'-TGCCGATTCCCTCCATTCT-3' | |

| | | | |
|----|--------|-------------------------------|-----|
| 13 | myh13F | 5'-AGGGCAGTGGCATGAGTAAC-3' | 242 |
| | myh13R | 5'-GGCTATCCGCTGCTCACTT-3' | |
| 14 | myh14F | 5'-TTGGCTTTTGAGGCTATATCC-3' | 256 |
| | myh14R | 5'-CATGTAGGAAACACAAGGAAGTA-3' | |
| 15 | myh15F | 5'-TGAAGTTAAGGGCAGAACACC-3' | 205 |
| | myh15R | 5'-GTTACCCAGACATTCGTTAGT-3' | |
| 16 | myh16F | 5'-AGGACAAGGAGAGGATTCTCTG-3' | 224 |
| | myh16R | 5'-GGAATGGGGGCTTTCAGA-3' | |

PCR směs pro amplifikaci exonů genu *MUTYH*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

1,5 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,1 mM každého dNTP

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufu

PCR podmínky

PCR podmínky pro amplifikaci exonů 1,2,6,11,12,14,16 genu *MUTYH*

96 °C / 10 min

94 °C / 30 s

57 °C / 30 s

72 °C / 20 s

} 35 cyklů

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonů 3,4,5,7,8,9,10,13,15 genu *MUTYH*

96 °C / 10 min

94 °C / 30 s

60 °C / 30 s

72 °C / 20 s

} 35 cyklů

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PŘÍPRAVA HETERODUPLEXŮ

96 °C / 5 min

↓ 0,5 °C / 1 min - 70 °C } 50 cyklů

4 °C/ ∞

ANALÝZA FRAGMENTŮ METODOU DHPLC

Mutační analýza genu *MUTYH* byla provedena metodou denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dHPLC) na systému WAVE firmy Transgenomic. Tento přístroj vlastní Ústav biochemie a klinické onkologie 1.LF UK v Praze.

Do separační kolony (DNASep kolona) bylo vstříknuto 5 µl produktu PCR reakce. Vzorky byly eluovány v lineárním 8% acetonitrilovém gradientu za optimalizované teploty. Podmínky analýzy jednotlivých PCR produktů pokrývajících všech 16 exonů genu *MUTYH* (tj. acetonitrilový gradient a teplota kolony) byly navrženy pomocí „Navigator“ softwaru firmy Transgenomic a následně pro jednotlivé amplikony optimalizovány (Tabulka 11). Chromatogramy byly zaznamenány pomocí fluorescenčního detektoru při vlnové délce 260 nm a normalizovány pomocí programu „Mutation calling routine“, který je součástí „Navigator“ softwaru firmy Transgenomic.

Tabulka 11 Podmínky pro dHPLC analýzu fragmentů *MUTYH*

| PCR fragment | Délka fragmentu (bp) | Teplota kolony (°C) | Gradient 8% ACN |
|--------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| myh exon 1 | 133 | 66,1 | 45,9 - 54,9 |
| myh exon 2 | 262 | 59,8 | 53,5 - 62,5 |
| myh exon 3 | 272 | 62,5 | 53,8 - 62,8 |
| myh exon 4 | 167 | 62,9 | 48,6 - 57,6 |
| myh exon 5 | 189 | 62,1 | 50,2 - 59,2 |
| myh exon 6 | 185 | 60,4 | 49,9 - 58,9 |
| myh exon 7 | 186 | 61,2 | 49,9 - 58,9 |
| myh exon 8 | 240 | 64,3 | 49,6 - 58,6 |
| myh exon 9 | 196 | 62,4 | 50,5 - 59,5 |
| myh exon 10 | 262 | 63,9 | 51,5 - 60,5 |
| myh exon 11 | 251 | 61,1 | 53,1 - 62,1 |
| myh exon 12 | 297 | 62,9 | 54,6 - 63,6 |
| myh exon 13 | 242 | 64,5 | 52,7 - 61,7 |
| myh exon 14 | 256 | 59,6 | 53,3 - 62,3 |
| myh exon 15 | 205 | 58,9 | 51,1 - 60,1 |
| myh exon 16 | 224 | 61,1 | 51,9 - 60,9 |

Vzorky vykazující aberantní eluční profil píku na dHPLC chromatogramu byly sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru ABI Prism™ 310.

SEKVENAČNÍ REAKCE – verze A

Presekvenační přečištění PCR produktu

Pro přečištění produktu PCR reakce byl použit výrobcem doporučovaný protokol (QIAquick PCR Purification kit Protocol) dodávaný ke kitu (QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN GmbH).

Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™).

Složení směsi

⇒ 10 µl reakční směs

4 µl BigDye™ Terminator sekvenační mix

1-3 µl příslušného PCR produktu (po presekvenačním přečištění)

0,3-0,5 µl sekvenačního primeru

doplněno H₂O do příslušného objemu

Podmínky sekvenační reakce

96 °C / 1 min

96 °C / 20 s

50 °C / 10 s

60 °C / 4 min

} 25 cyklů

4 °C / ∞

Postsekvenační přečištění produktu sekvenace

Pro přečištění produktu sekvenační reakce byl použit výrobcem doporučovaný protokol (DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator removal) dodávaný ke kitu DyeEx™ 2.0 Spin Kit (QIAGEN GmbH).

SEKVENAČNÍ REAKCE – verze B

S ohledem na použití velmi kvalitní polymerázy AmpliTaq Gold (Roche) v PCR reakci a malého zbytkového objemu po analýze na dHPLC byl využit protokol navržený firmou Applied Biosystems. Tento protokol umožňuje provedení sekvenační reakce bez předchozího přečištění PCR produktu.

Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™]) a dle doporučeného protokolu jen s využitím polovičních objemů všech reagensů.

Složení směsi

⇒ 5 µl reakční směs

- 2 µl BigDye[®] Terminator sekvenační mix
- 0,3-0,5 µl příslušného PCR produktu
- 0,3 µl sekvenačního primeru
- doplněno H₂O do příslušného objemu

Podmínky sekvenační reakce

96 °C / 1 min

| | |
|---------------|------------|
| 96 °C / 20 s | } 25 cyklů |
| 50 °C / 10 s | |
| 60 °C / 4 min | |

4 °C / ∞

Postsekvenační přečištění

Pro postsekvenační přečištění byl firmou Applied Biosystems pro analyzátor ABI PRISM 3130 navržen následující postup (lze použít i pro analyzátor ABI PRISM 310):

1. k 5 µl směsi přidat 13 µl směsi složené z 0,5 µl octanu sodného a 12,5 µl 96% etanolu (tato směs je připravena vždy před použitím)
2. nechat stát 15 min při pokojové teplotě
3. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 30 min
4. odstříknout
5. přidat 60 µl 70% etanolu

6. odstředit při 13500 otáčkách po dobu 15 min
7. odstříknout
8. opakovat body 5, 6 a 7
9. vysušit při 40 °C po dobu 1 min
10. přidat 30 µl formamidu
11. zdenaturovat při 95 °C po dobu 5 min
12. zamrazit

SEKVENOVÁNÍ - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

Produkt sekvenační reakce (verze A i B) byl po postsekvenačním přečištění analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 za těchto podmínek:

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 µm; Seq POP-6TM polymer;
modul Seq POP6 Rapid (1 ml) E; teplota 50 °C; nástřik 30-60 s;
napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: dle délky fragmentu – nejdéle 36 min

nebo na nebo ABI PRISM 3130 za následujících podmínek:

Podmínky analýzy: délka kapiláry 36 cm; 50 µm; Seq POP-7TM polymer;
modul RapidSeq36_POP7; teplota 50 °C;
nástřik 30-60s; napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: max 2000 s

IV.2.4.2 MUTAČNÍ ANALÝZA EXONŮ 7 A 13 GENU

MUTYH METODOU HRM

V roce 2008 byl do laboratoře Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN v Praze zakoupen přístroj LightCycler[®]480 od firmy Roche. Tento přístroj je možné použít jako nástroj pro mutační analýzu díky vysokorozlišovací analýze křivek tání (HRM, high resolution melting). Na základě faktu, že výsledky mutační analýzy

touto metodou u všech exonů genu *MUTYH* jsou identické s výsledky mutační analýzy provedených na systému WAVE u vybraných probandů se zachycenou sekvenční variantou v genu *MUTYH*, byla mutační analýza prováděna od tohoto roku na přístroji LightCycler® 480. Nezanedbatelný pro toto rozhodnutí byl i fakt, že mohly být použity stejné primery jako u dHPLC metody.

PCR směs pro HRM analýzu:

⇒ 5 µl reakční směs

- 0,4 µl H₂O (komerčně dodávaná, Roche)
- 2,5 µl směsi (komerčně dodávaná, Roche)
- 0,65 µl MgCl₂ (komerčně dodávaná, Roche)
- 0,25 µl F primeru
- 0,25 µl R primeru
- 1 µl DNA

Podmínky PCR a HRM analýzy

Podmínky PCR a následné HRM analýzy exonů 1,2,6,11,12,14,16 genu *MUTYH*

95 °C / 5 min

| | |
|---------------|------------|
| 95 °C / 30 s | } 50 cyklů |
| 60 °C / 30 s | |
| 72 °C / 1 min | |

72 °C / 3 min

95 °C / 1 min

40 °C / 1 min

60 °C / 10 s

98 °C / 25 min

40 °C / 10 s

Podmínky PCR a následné HRM analýzy exonů 3,4,5,7,8,9,10,13,15 genu *MUTYH*

95 °C / 5 min

| | |
|---------------|------------|
| 95 °C / 30 s | } 50 cyklů |
| 62 °C / 30 s | |
| 72 °C / 1 min | |

72 °C / 3 min

95 °C/ 1 min
40 °C/ 1 min
60 °C/ 10 s
98 °C/ 25 min
40 °C/ 10 s

Vzorky s odlišnou HRM křivkou byly následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru ABI Prism™ 310 (Applied Biosystems™) za použití sekvenačního kitu BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™) dle postupu uvedeného v kapitole IV.2.4.1.1 (SEKVENAČNÍ REAKCE – verze B).

IV.2.4.3 ANALÝZA VYBRANÝCH SEKVENČNÍCH **VARIANT GENU *MUTYH* U KONTROLNÍHO** **SOUBORU**

SNaPshot ANALÝZA

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.

„LONG RANGE“ PCR

Fragment pokrývající oblast od exonu 2 do exonu 15 genu *MUTYH* byl amplifikován „Long Range“ PCR metodou s využitím jednoho páru primerů, jejichž sekvence je uvedena v tabulce 12 a které byly navrženy pomocí programu Primer3Input. Délka amplifikovaného fragmentu činí 4 112 bp.

Tabulka 12 Sekvence primerů použitých pro „Long Range“ PCR

| Exon | Primer | Sekvence primeru |
|------|------------|--|
| 2-15 | myhlong2F | 5'-GGAGTGGAGAATGTTACCCAGACATTCGTTAG-3' |
| | myhlong15R | 5'-CATTGTGACTGACTGCTTTGGCTGGGT-3' |

Složení PCR směsi

⇒ 15 µl reakční směs

120-250 ng genomové DNA

1,25 mM MgCl₂

0,3 µM každého primeru

0,2 mM každého DNTP

0,15 jednotky polymerázy Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

PCR podmínky

94 °C / 2 min

94 °C / 20 s

68 °C / 3 min s 3s prodlužováním doby v každém cyklu

68 °C / 5 min

} 30 cyklů

4 °C / ∞

Jednonukleotidové polymorfní varianty nacházející se v tomto fragmentu byly detekovány pomocí ABI Prism[®] SNaPshot[™] Multiplex Kit (Applied Biosystems[™]) podle instrukcí dodávaných k tomuto kitu s výjimkou použití polovičních objemů všech reagensů. Pro tuto SNaPshot analýzu bylo navrženo 10 primerů (tabulky 13, 14) tak, aby po jejich nasednutí byl polymorfní nukleotid první sekvenovanou bazí.

Postup při SNaPshot analýze – složení směsí a program

1. přečištění produktu „long-range“ PCR

směs: 7,5 µl PCR produktu

2,5 µl SAP (1 U/ 1 µl)

0,1 µl Exo1 (10 U/ 1 µl)

program:

37 °C / 60 min

75 °C / 15 min

4 °C / ∞

2. SNaPshot

směs: 1,5 µl přečištěného PCR produktu

0,5 µl H₂O

0,5 µl směsi primerů

2,5 µl SNaPshot reakční směsi

program:

96 °C / 20 s

96 °C / 10 s

55 °C / 5 s

60 °C / 30 s

} 25 cyklů

4 °C / ∞

3. Přečištění

ke směsi přidat 0,5 µl SAP

program:

37 °C / 60 min

75 °C / 15 min

4 °C / ∞

Deset analyzovaných sekvenčních změn bylo rozděleno do 2 systémů po 5 fragmentech (viz Tabulky 13 a 14)

Tabulka 13 Primery pro SNaPshot analýzu - systém I:

| Detekovaná záměna | Primer | Sekvence primeru * |
|-------------------|----------|--|
| c.157+30A>G | snp2myh | 5'-TAGAATCTGCCTTTCATGGCCAA-3' |
| c.347-13C>G | snp5myh | 5'-CGTGTCAGCAGTGTCCTCATGCCAAC-3' |
| c.462+35G>A | snp6myh | 5'- GTAGCCGATCAAGAGATCACCCGTCAGTCCCTCTAT -3' |
| c.972G>C | snp12myh | 5'-CCAGCTCCCAACACTGGACA-3' |
| c.1435-40G>C | snp15myh | 5'-GACTGCAGAACACCGGTTTATCTCTTTTG-3' |

* kurzívou jsou označeny nekomplementární části primeru

Tabulka 14 Primery pro SNaPshot analýzu - systém II:

| Detekovaná záměna | Primer | Sekvence primeru * |
|-------------------|---------------|---|
| c.346+56G>A | snp4myh | 5'-TACTAAGTAGTCCCCTACCTGGCCCACAGC-3' |
| c.648+21C>A | snp8myh | 5'-GCTCGGCTGGGCACGCACAAAGT-3' |
| c.956-9C>T | snp12(-9)myh | 5'-TAGCTGCCAGTGTTGGGAGCTGGGAAC-3' |
| c.1145-27C>T | snp13myh | 5'-AATGTGAACGTAGTCTGATTATCGGCAGCTGAGGCCTGA-3' |
| c.1435-17C>G | snp15(-17)myh | 5'-ATAGCTTTGTGTAAAAAGTGCCAGCCCTCACCTC-3' |

* kurzívou jsou označeny nekomplementární části primeru

FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

Produkt reakce byl analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

Podmínky analýzy: délka kapiláry 47 cm; 50 µm; POP-4TM polymer;

modul GS STR POP4 (1 ml) E5; teplota 60 °C; nástřik 3-5 s;

napětí při nástřiku 15 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: 14 min

IV.2.5 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MSH6* METODOU

PŘÍMÉHO SEKVENOVÁNÍ

AMPLIFIKAČNÍ REAKCE EXONŮ GENU *MSH6*

Amplifikace 10 exonů a přilehlých intronických oblastí genu *MSH6* byla provedena pomocí primerů navržených pomocí programu Primer3Input (viz Tabulka 15) a obdobných reakčních podmínek jako u genu *MUTYH*. Exon 4 genu *MSH6* je dlouhý 2545 bp a není možné jej najednou osekvenovat na použitých analyzátoch, a proto byl rozdělen na 8 částí.

Tabulka 15 Primery použité pro mutační analýzu genu *MSH6*

| Exon | Primer | Sekvence primeru | Velikost PCR produktu (bp) |
|------|-----------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1 | MSH6ex1F | 5'-AGATGCGGTGCTTTTAGGAG-3' | 473 |
| | MSH6ex1R | 5'-TGCACTCATTCAAGCCAAC-3' | |
| 2 | MSH6ex2F | 5'-AACTGCCTTTAAGGAACTTGAC-3' | 291 |
| | MSH6ex2R | 5'-AAACACACACACATGGCAGT-3' | |
| 3 | MSH6ex3F | 5'-GGTCTTGAAGTCTGGGATTA-3' | 296 |
| | MSH6ex3R | 5'-TCCCCATCACCTAACA-3' | |
| 4 | MSH6ex4aF | 5'-ACTGTCTTACATTATGGTTTTCCAA-3' | 350 |
| | MSH6ex4aR | 5'-CACCATTCTCTCCGCTTT-3' | |
| 4 | MSH6ex4bF | 5'-GAGTGAAGGCCTGAACAGC-3' | 389 |
| | MSH6ex4bR | 5'-TCTGCCACCACTTCCTCA-3' | |
| 4 | MSH6ex4cF | 5'-TCTACACTCTATGTGCCTGAGGA | 412 |
| | MSH6ex4cR | 5'-GATCACCTTCCAGCACACTG | |
| 4 | MSH6ex4dF | 5'-GATAGAGTGGTGAGGAGGGAGA-3' | 366 |
| | MSH6ex4dR | 5'-AAACTGGGAGCCGGGTAT-3' | |
| 4 | MSH6ex4eF | 5'-AGTTCATTGTCCTGTTCTCTTCAG-3' | 324 |
| | MSH6ex4eR | 5'-GCTGACTGTGTCAGAATCCAA-3' | |
| 4 | MSH6ex4fF | 5'-TCCCTTGGATTCTGACACAG-3' | 367 |
| | MSH6ex4fR | 5'-CAGGGGAGACCCAACATTA-3' | |
| 4 | MSH6ex4gF | 5'-TAAAATTCATAATGTTGGGTCTCC-3' | 390 |
| | MSH6ex4gR | 5'-TCCAGGAGGCTCTGTTCAT-3' | |
| 4 | MSH6ex4hF | 5'-GCTCTTGCTGACATAAGAGAAAAT-3' | 413 |
| | MSH6ex4hR | 5'-CAGCTGGCAAACAGCACTA-3' | |
| 5 | MSH6ex5F | 5'-AGCCTCACTTTTACCCTCTCTTT-3' | 348 |
| | MSH6ex5R | 5'-ATTCCTAATGTCACAAATGACTTTCT-3' | |
| 6 | MSH6ex6F | 5'-ACGTAAGGGTTCATAAGAAAGACA-3' | 283 |
| | MSH6ex6R | 5'-AAAGGCTCATATACAAGAAGCAAA-3' | |
| 7 | MSH6ex7F | 5'-CGGCCAATAATTGCATAGTC-3' | 264 |
| | MSH6ex7R | 5'-GTCTTCAAATGAGAAGTTTAATGTCTT-3' | |
| 8 | MSH6ex8F | 5'-CCGATGTTGCTTTTCTGTCC-3' | 307 |
| | MSH6ex8R | 5'-CAAGAGAAGTGCCCTCTCAAAA-3' | |
| 9 | MSH6ex9F | 5'-TTGAGAGGGCACTTCTCTTG-3' | 334 |
| | MSH6ex9R | 5'-CATCATCCCTTCCCCTTTT-3' | |
| 10 | MSH6ex10F | 5'-GGAAGGGATGATGCACTATGA-3' | 187 |
| | MSH6ex10R | 5'-CACCTTTGTCAGAAGTCAACTCA-3' | |

Složení PCR směsi

PCR reakce pro amplifikaci exonu 1 genu *MSH6*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

2,5 mM MgCl₂

0,4 µM každého primeru

0,4 mM každého dNTP

10% DMSO

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufru

PCR reakce pro amplifikaci exonů 2, 3, 4a, 4b, 4d – 4h, 5, 6, 8, 9 genu *MSH6*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

1,5 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,1 mM každého dNTP

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufru

PCR reakce pro amplifikaci exonu 4c genu *MSH6*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

2,5 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,1 mM každého dNTP

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufru

PCR reakce pro amplifikaci exonu 7 genu *MSH6*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

1,5 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,1 mM každého dNTP

6% DMSO

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufru

PCR reakce pro amplifikaci exonu 10 genu *MSH6*

⇒ 25 µl reakční směs

120-250 ng genomické DNA (gDNA)

2 mM MgCl₂

0,2 µM každého primeru

0,1 mM každého dNTP

0,75 jednotky AmpliTaq Gold polymerázy v pufru

PCR podmínky

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 1 genu *MSH6*

95 °C / 10 min

| | |
|--------------|------------|
| 94 °C / 45 s | } 37 cyklů |
| 57 °C / 60 s | |
| 72 °C / 60 s | |

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 2, 4a, 4d, 4f, 4g, 4h, 6, 9 genu *MSH6*

95 °C / 10 min

| | |
|--------------|------------|
| 94 °C / 30 s | } 35 cyklů |
| 58 °C / 30 s | |
| 72 °C / 20 s | |

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 4b, 4c, 5, 10 genu *MSH6*

95 °C / 10 min

| | |
|--------------|------------|
| 94 °C / 30 s | } 35 cyklů |
| 59 °C / 30 s | |
| 72 °C / 20 s | |

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 4e genu *MSH6*

95 °C / 10 min

94 °C / 30 s
57 °C / 30 s
72 °C / 20 s

} 35 cyklů

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 3, 8 genu *MSH6*

95 °C / 10 min

94 °C / 30 s
60 °C / 30 s
72 °C / 20 s

} 35 cyklů

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

PCR podmínky pro amplifikaci exonu 7 genu *MSH6*

95 °C / 10 min

94 °C / 30 s
47 °C / 30 s
72 °C / 20 s

} 35 cyklů

70 °C / 3 min

4 °C / ∞

SEKVENAČNÍ REAKCE

Sekvenační reakce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole IV.2.4.1.1 (SEKVENAČNÍ REAKCE – verze B) a postsekvenační přečištění bylo provedeno podle postupu uvedeného tamtéž.

SEKVENOVÁNÍ - GENETICKÝ ANALYZÁTOR

Produkt sekvenační reakce byl po postsekvenačním přečištění analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130 za následujících podmínek:

Podmínky analýzy: délka kapiláry 36 cm; 50 μm ; Seq POP-7TM polymer;
modul RapidSeq36_POP7; teplota 50 °C;
nástřík 30-60 s; napětí při nástřiku 2 kV; napětí při analýze 15 kV

Doba analýzy: max 2000 s

IV.3 STATISTIKA

1-way ANOVA, vazebná nerovnováha, Hardy-Weinbergova rovnováha, χ^2 -test

IV.4 SOFTWARE A DATABÁZE

IV.4.1 SOFTWARE

Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.)

STATISTICA Ver. 9.1 (StatSoft, Inc.)

Arlequin Ver 3.1

WinMeltTM verze 2.0.13 (Bio-Rad Laboratories)

IV.4.2 DATABÁZE

HGMD (<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>)

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

LOVD (www.lovd.nl)

GeneCards (<http://www.genecards.org/>)

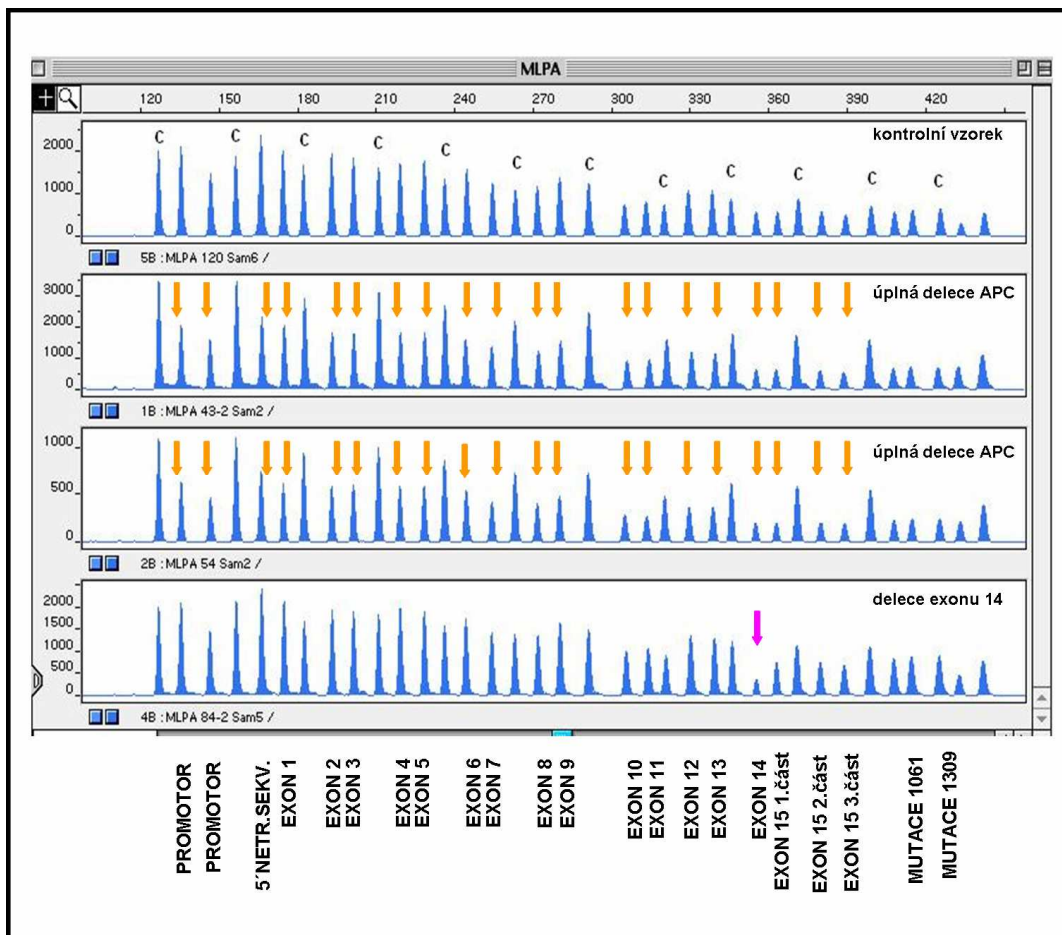
V. VÝSLEDKY

V.1 DETEKCE DLOUHÝCH DELECÍ GENU APC

Základní soubor využitý pro tuto práci zahrnoval DNA 310 nepříbuzných FAP a/nebo AFAP probandů z České republiky, u kterých nebyla standardní mutační analýzou prokázána mutace v genu *APC*.

DNA všech 310 *APC*-mutačně-negativních probandů byla nejprve podrobena MLPA analýze pro zjištění přítomnosti dlouhých delecí v genu *APC*. Komerčně dostupný SALSA MLPA KIT P043 APC obsahuje sondy pro všech 15 exonů genu *APC* a dále sondy pro promotorovou oblast genu *APC*.

Metoda MLPA s využitím SALSA MLPA KITu P043 APC odhalila ve vyšetřeném souboru 4 probandy s dlouhou delecí genu *APC*. Delece celého genu včetně promotorových oblastí byla nalezena u 3 probandů (probandky 43, 54, 335) a u probanda 84 byla detekována delece exonu 14. Obrázek 9 zobrazuje výsledek MLPA analýzy u kontrolního vzorku, u dvou probandek s detekovanou dlouhou delecí genu *APC* (probandka 43 a 54) a jednoho probanda s delecí exonu 14 genu *APC* (proband 84).



Obrázek 9 Výsledek MLPA analýzy u kontrolního vzorku a 3 probandů s detekovanou dlouhou delecí genu *APC*

Anamnéza probandů s prokázanou delecí celého genu *APC*

O probandce 43 se podařilo dohledat málo detailních informací. Víme pouze to, že u ní byla diagnostikována FAP – pravděpodobně s rodinnou anamnézou tohoto onemocnění. U probandky byly popsány tyto extrakolické projevy – CHRPE, desmoidní tumory a osteomy.

Probandce 54 byla ve 29 letech diagnostikována FAP (mnohočetné polypy různého stupně dysplázie) a o osm let později provedena kolektomie pro adenoca recta.

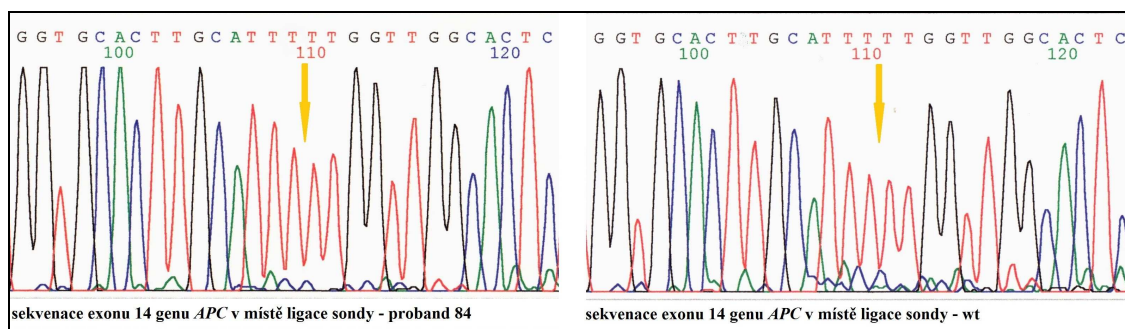
Probandce 335 byl ve věku 53 let diagnostikován karcinom tlustého střeva. V rodině probandky se stejná diagnóza vyskytla u její sestry (zemřela ve 40 letech), u její matky (zemřela ve 44 letech) a a dále u syna probandky, u kterého byl karcinom diagnostikován ve 28 letech. Probandka i její syn jsou po operaci nádoru tlustého střeva.

Anamnéza probanda 84 s prokázanou delecí exonu 14 genu *APC*

Probandovi 84 (muž) byla ve věku 17 let kolonoskopicky diagnostikována FAP (nález polypů od recta až do coeca) a následně podstoupil kolektomii. Probandova matka zemřela ve 27 letech na karcinom rectosigmoidea, který ji byl diagnostikován o dva roky dříve. Probandově starší sestře při kolonoskopii detekovali četné polypy (histologicky tubulární adenomy s lehkým stupněm dysplastických změn) a navíc oční vyšetření prokázalo kongenitální hypertrofii pigmentového epitelu retiny (CHRPE). MLPA u sestry probanda 84 prokázalo delecí exonu 14 genu *APC*.

V případě metodou MLPA prokázané delecce exonu 14 genu *APC* u probanda 84 byla metodou přímého sekvenování ověřována možnost výskytu sekvenční změny v probandově DNA, která mohla ovlivnit ligaci sondy a následně způsobit pokles plochy píku sondy pro exon 14 genu *APC*.

Obrázek 10 zachycuje sekvenaci okolí místa ligace sondy pro exon 14 genu *APC* u probanda 84 a zdravého jedince (wt).



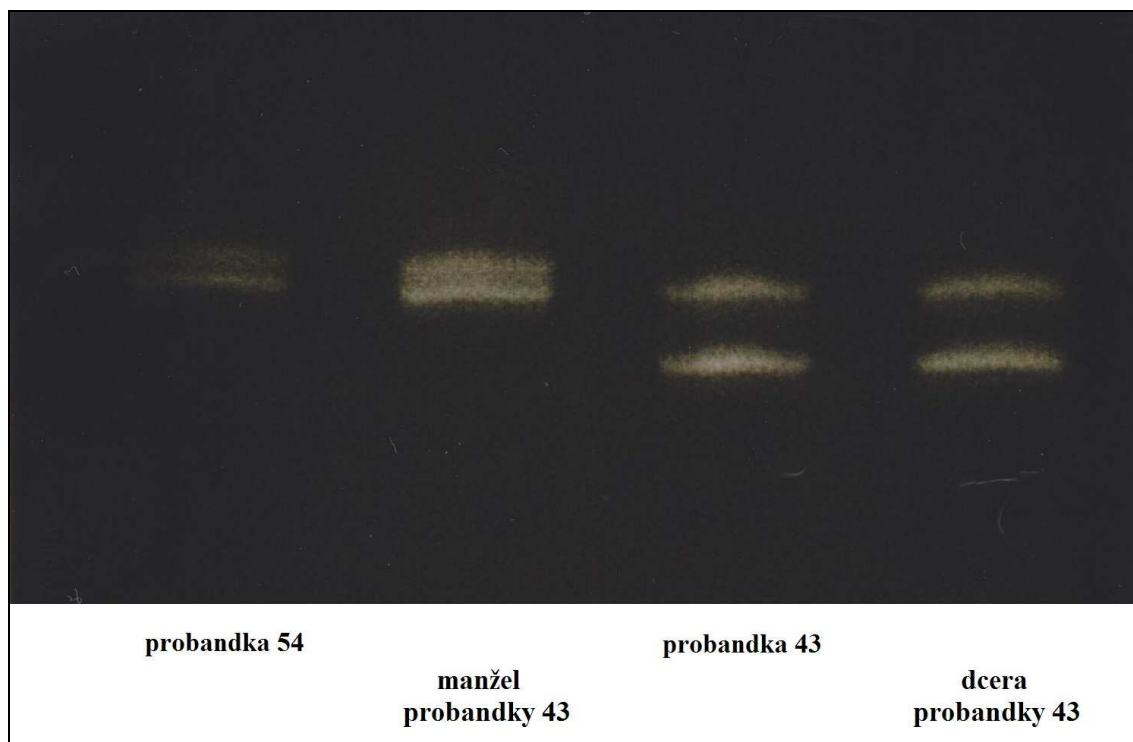
Obrázek 10 Sekvenace exonu 14 genu *APC* v místě ligace sondy u probanda 84 a u zdravého jedince - wt (šipkou je označeno místo ligace sondy)

Uvedeným postupem nebyla detekována žádná sekvenční změna v místě ligace sondy a tudíž lze předpokládat, že se jedná o delecí exonu 14 u probanda 84.

V případě probandek 43 a 54, u kterých byla metodou MLPA detekována delecce celého genu *APC* včetně promotorových oblastí, byla snaha detekovat skutečný rozsah delecce v oblasti kolem genu *APC* (pozice 112101484 bp – 112209533 bp). K tomu účelu byly využity 4 mikrosatelitové (STR, short tandem repeat) markery typu (CA)_n lokalizované v okolí genu *APC*: D5S299, D5S82, D5S134 a D5S346.

V době analýzy nebyla dostupná DNA žádného příbuzného probandky 54, z rodiny probandky 43 byla pro analýzu použita DNA jejího manžela a dcery.

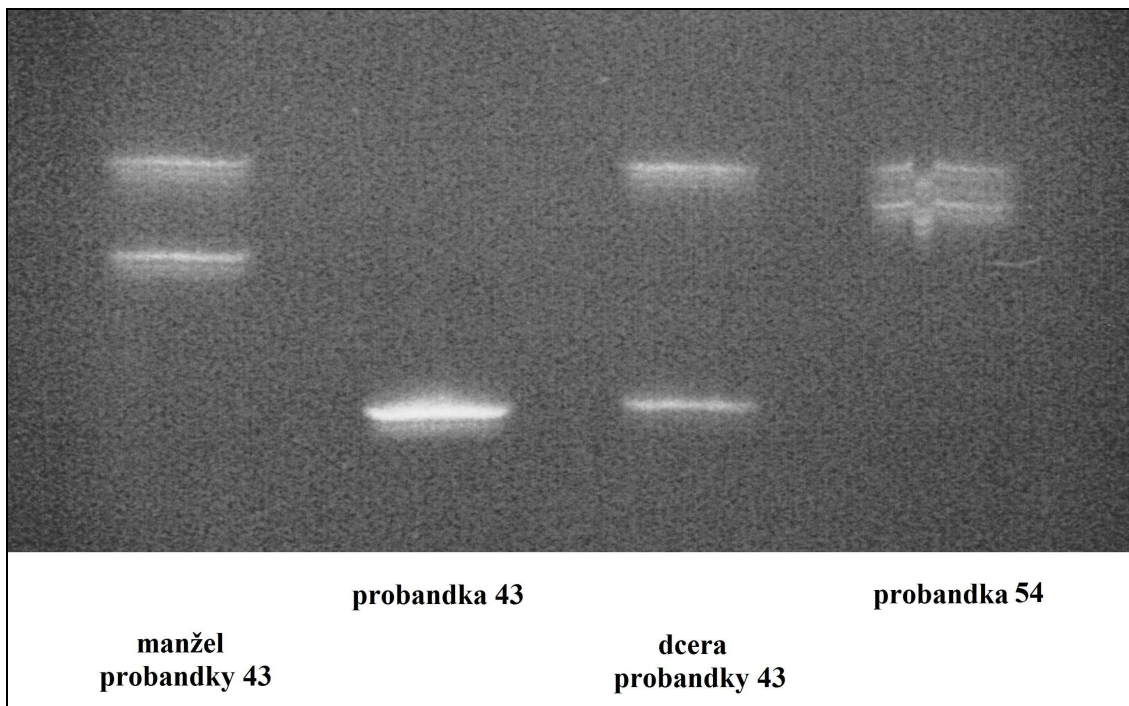
Výsledkem vyšetření při použití distálního mikrosatelitového markeru D5S346 (obrázek 11) je heterozygocie obou testovaných probandů. To znamená, že delece nezasahuje až do místa, kde nasedá tento marker (vzdálenost od genu *APC* je 30-70kb).



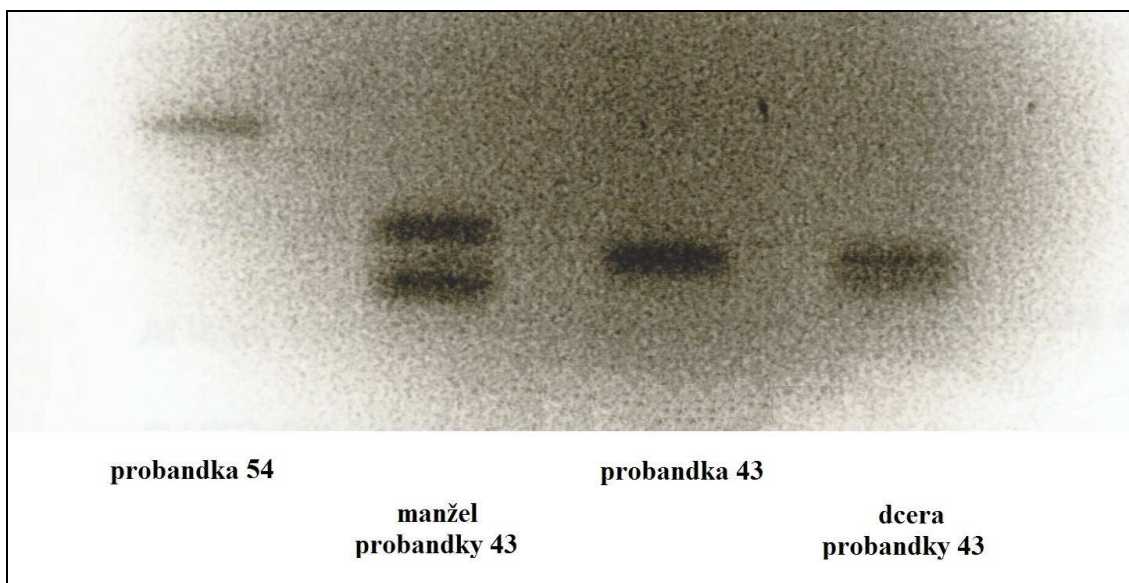
Obrázek 11 Vyšetření mikrosatelitového markeru D5S346 u probandky 43 a 54

Při použití proximálních mikrosatelitových markerů D5S299 (obrázek 12), D5S82 (obrázek 13) a D5S134 (obrázek 14) bylo zjištěno, že u probandky 43 delece nezasahuje do oblasti markeru D5S134 a u probandky 54 delece nezasahuje do oblasti markeru D5S299 (heterozygot).

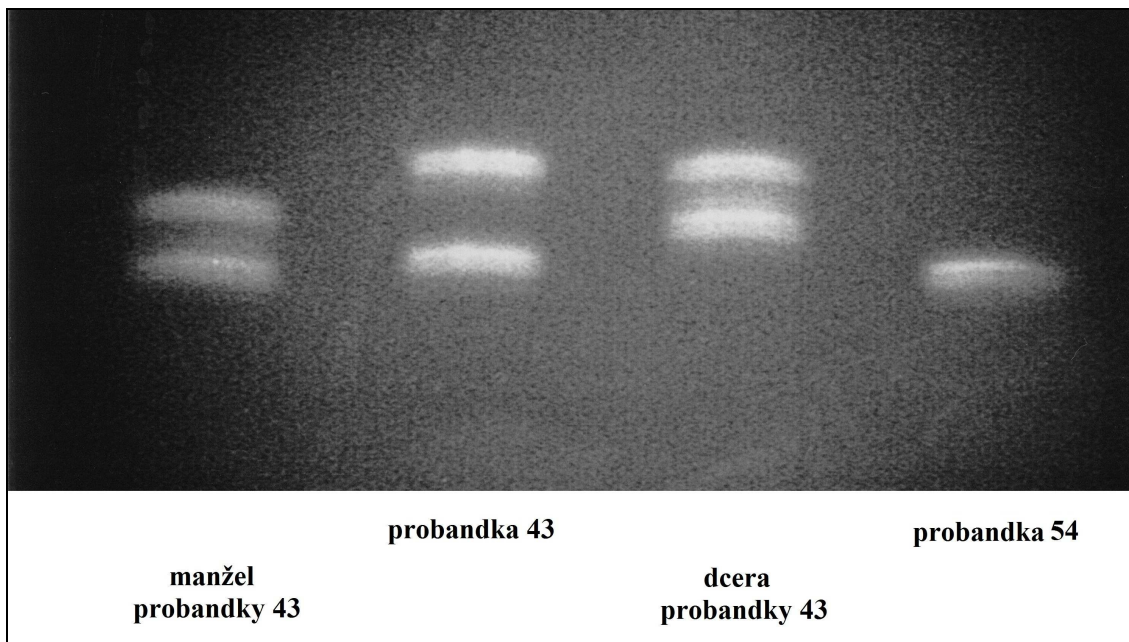
Velikost deletované oblasti zahrnující i gen *APC* byla tedy vypočtena ze vzdáleností mezi markery, pro které je probandka heterozygotkou, neboť pouze u nich s jistotou víme, že byly detekovány obě alely. U probandky 43 je na chromozomu 5 v okolí genu *APC* deletována oblast o velikosti maximálně 2Mb, u probandky 54 maximálně o velikosti 10,5Mb.



Obrázek 12 Vyšetření mikrosatelitového markeru D5S299 u probandky 43 a 54



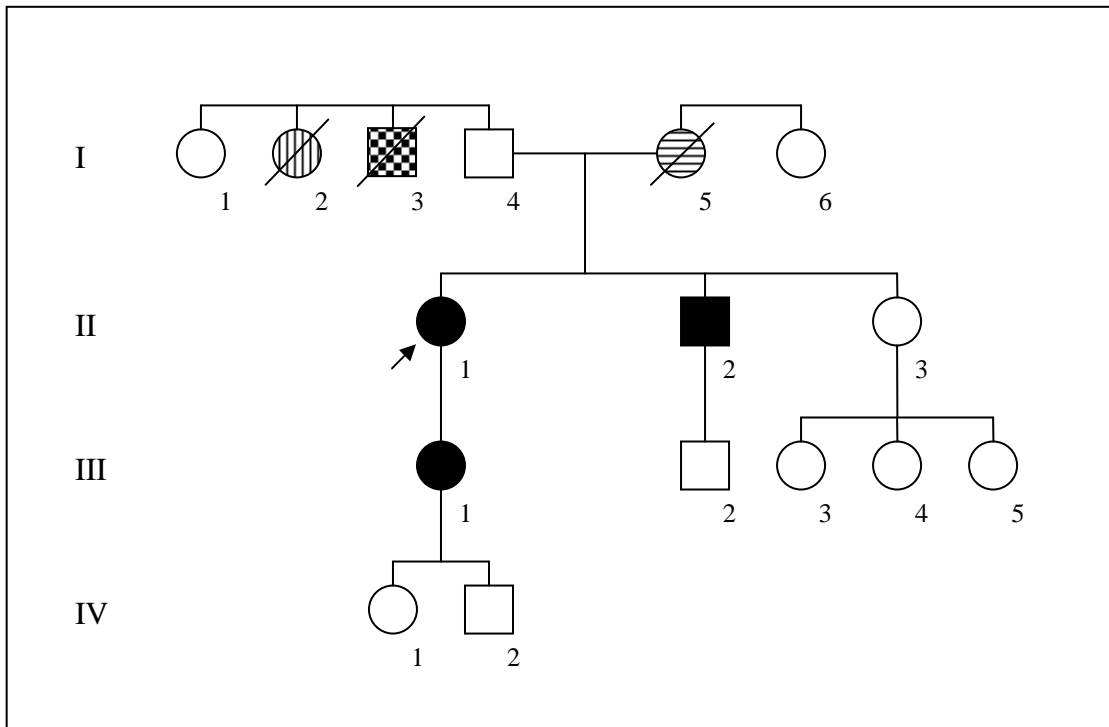
Obrázek 13 Vyšetření mikrosatelitového markeru D5S82 u probandky 43 a 54



Obrázek 14 Vyšetření mikrosatelitového markeru D5S134 u probandky 43 a 54

V průběhu následujících let byli k vyšetření metodou MLPA indikováni příbuzní probandek 54 a 335 s detekovanou delecí celého genu *APC*, kteří jsou v 50% riziku, že zdělili mutovanou alelu.

Metodou MLPA byli vyšetřeni příbuzní probandky 54. Jednalo se o dceru probandky (III/1) a její dvě děti (IV/1 a IV/2) - viz obrázek 15 s rodokmenem. Metodou MLPA byla stejně jako v případě probandky 54 u všech testovaných příbuzných prokázána delece celého genu *APC* včetně promotorových oblastí (obrázek 16). U dcery probandky byla FAP diagnostikována kolonoskopicky a už v 18 letech provedena kolektomie. U vnoučat (9 a 13 let) nebyla kolonoskopie před genetickým vyšetřením provedena.



Obrázek 15 Genealogické schéma rodiny probandky 54 (II/1)

Legenda:

I/2 žena, úmrtí na CRC v 59 letech

I/3 muž, úmrtí na karcinom plic kolem 50. roku

I/5 žena (*1943), úmrtí na karcinom v „gynekologické oblasti“

II/1 žena (*1962), **probandka**, ve 30 letech dg. FAP, ve 37 letech kolektomie

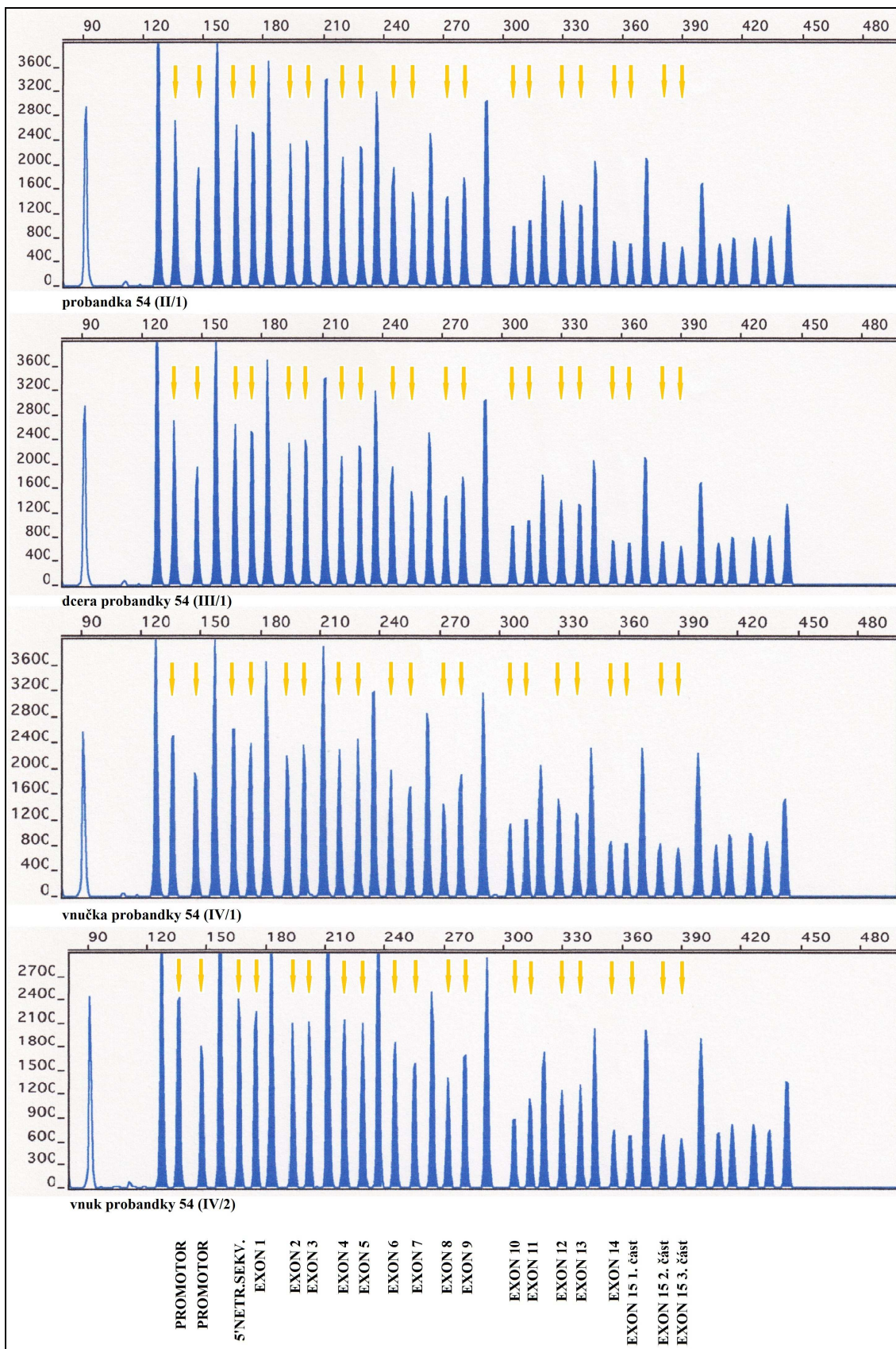
II/2 muž, FAP s Ca recta

III/1 žena (*1982), FAP, kolektomie v 18 letech

III/2 muž (*2000)

IV/1 žena (*1999)

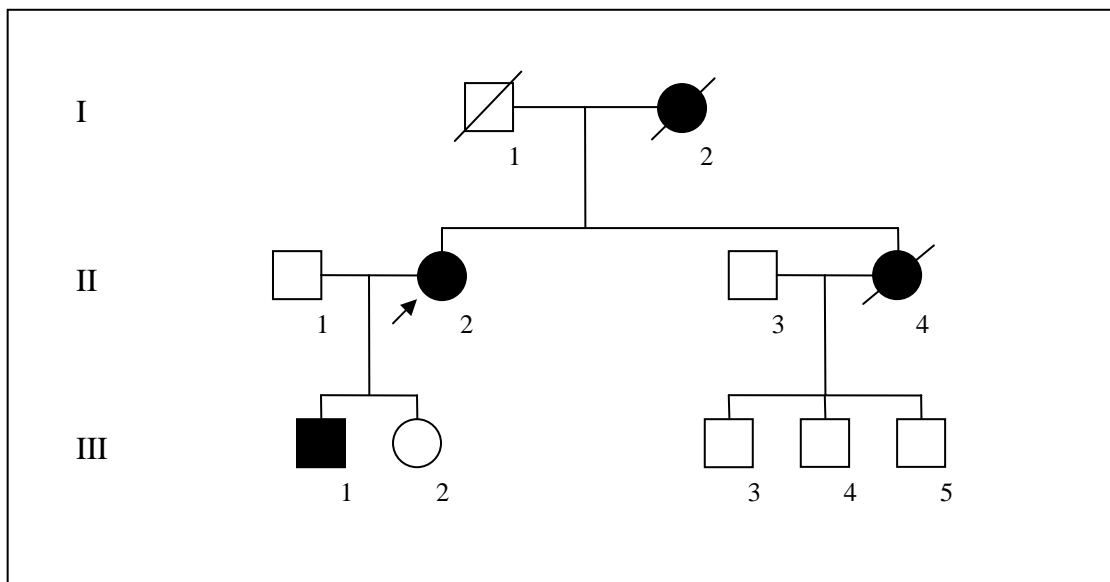
IV/2 muž (*2003)



Obrázek 16 Výsledek MLPA analýzy u probandky 54, její dcery a vnuček

V následujícím roce byli vyšetřeni metodou MLPA ještě další dva příbuzní probandky 54. Jednalo se o bratra probandky (II/2) a jeho syna (III/2). U bratra probandky byla diagnostikována polypóza s karcinomem recta a metodou MLPA prokázána delece celého genu *APC* včetně promotorových oblastí. U synovce probandky (III/2) nebyla delece genu *APC* prokázána.

Dále byl vyšetřen jeden příbuzný probandky 335. Rodokmen rodiny je uveden na obrázku 17. K vyšetření byl indikován synovec probandky (III/3), u kterého sice nebyla kolonoskopicky odhalena žádná patologická odchylka, přesto s ohledem na nepříznivou rodinnou anamnézu (dg. FAP a karcinom tlustého střeva u matky, její sestry (II/2; probandka 335) a bratrance (III/1)) a odhalenou dlouhou delecí genu *APC* v rodině (teta, II/2), bylo vyšetření provedeno.



Obrázek 17 Rodokmen rodiny 335

Legenda:

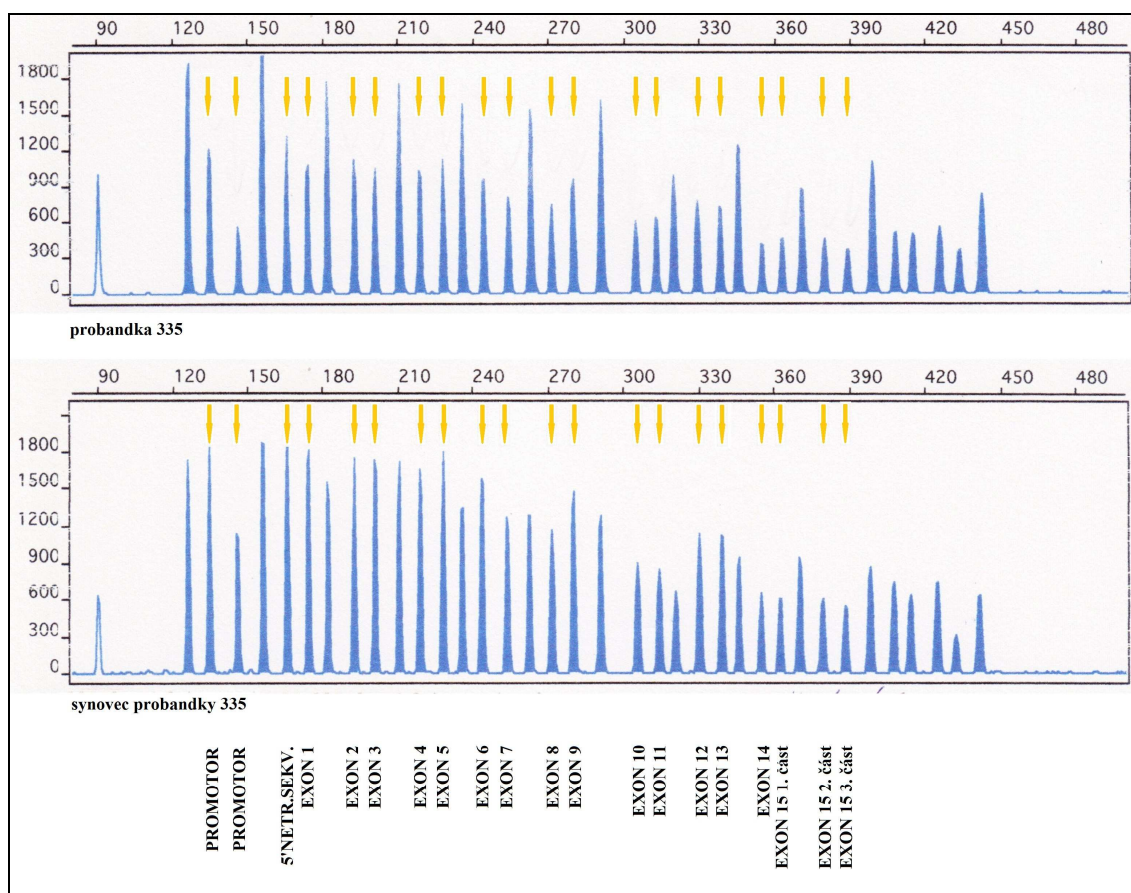
II/2 žena (*1952), **probandka**, CRC (stav po operaci)

II/4 žena, mnohočetná polypóza, úmrtí ve 44 letech na CRC

III/1 muž (*1979), CRC (stav po operaci)

III/3 muž (*1979), kolonoskopie negativní

Vyšetření metodou MLPA nebyla u synovce probandky 335 prokázána delece celého genu *APC* (obrázek 18).



Obrázek 18 Výsledek MLPA analýzy probandky 335 a jejího synovce

V.2 FUNKČNÍ ANALÝZA ZÁMĚN DETEKOVANÝCH V GENU APC

V průběhu rutinního testování genu *APC* bylo nalezeno 15 variant, jejichž dopad na expresi genu *APC* nebyl jednoznačný. Pro analýzu bylo získáno pouze deset vzorků RNA. Jednalo se o RNA deseti probandů, u nichž bylo detekováno deset různých variant v genu *APC*. 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 neměující smysl aminokyseliny a dále intronické záměny s možným vlivem na sestřih) – tabulka 16.

Tabulka 16 Přehled záměn detekovaných v genu *APC* (včetně predikovaného dopadu na protein), jejichž vliv na expresi genu byl testován

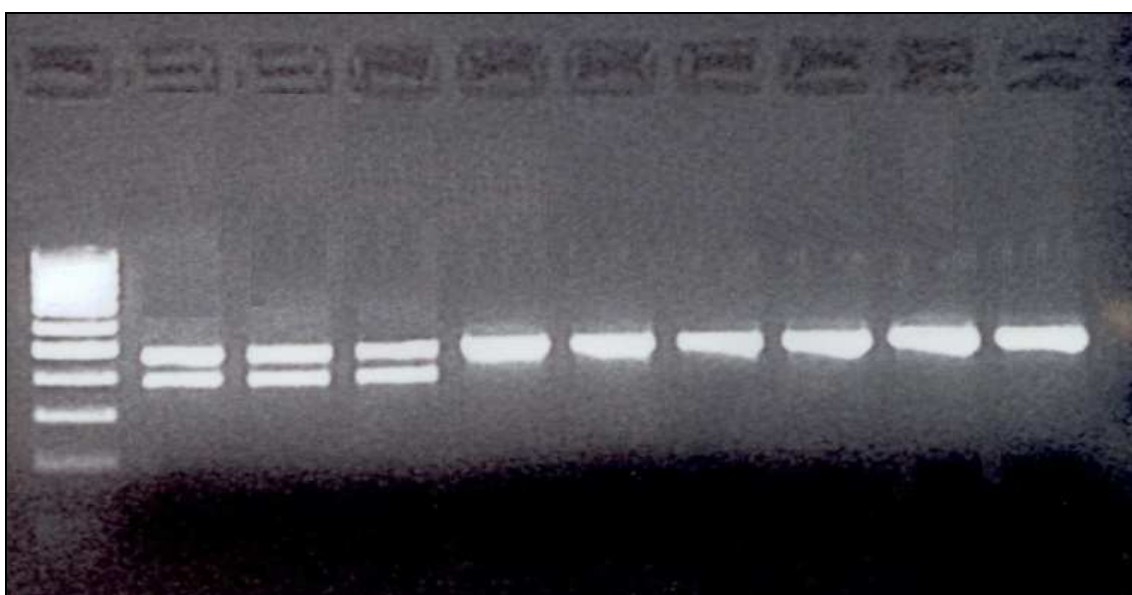
| Proband | Fenotyp | Záměna nukleotidu | Predikovaný vliv | Citace |
|-----------|---------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| 147 | AFAP | c.220G>T | p.Glu74X | Stekrova et al. 2007 |
| 179 | AFAP | c.531+1G>T | sestřihová mutace | Stekrova et al. 2007 |
| 164 | FAP | c.645+1G>T | sestřihová mutace | Stekrova et al. 2007 |
| 392 | AFAP | c.1312+5G>A | ? | Aretz et al. 2004 |
| 11 | FAP | c.1548+1G>A | sestřihová mutace | Kohoutova et al. 2002 |
| 47 | FAP | c.1548+1G>T | sestřihová mutace | Kohoutova et al. 2002 |
| 295 | AFAP | c.1627G>T | p.Phe543Val | Schwarzova et al. 2012 |
| 334 | v riziku AFAP | c.1956C>T | p.His652His | Aretz et al. 2004 |
| 142 (392) | v riziku AFAP | c.1958+8C>T | ? | Schwarzova et al. 2012 |
| 381 | AFAP | c.1959G>A | p.Arg653Arg | Aretz et al. 2004 |

V.2.1 Analýza *APC* transkriptu

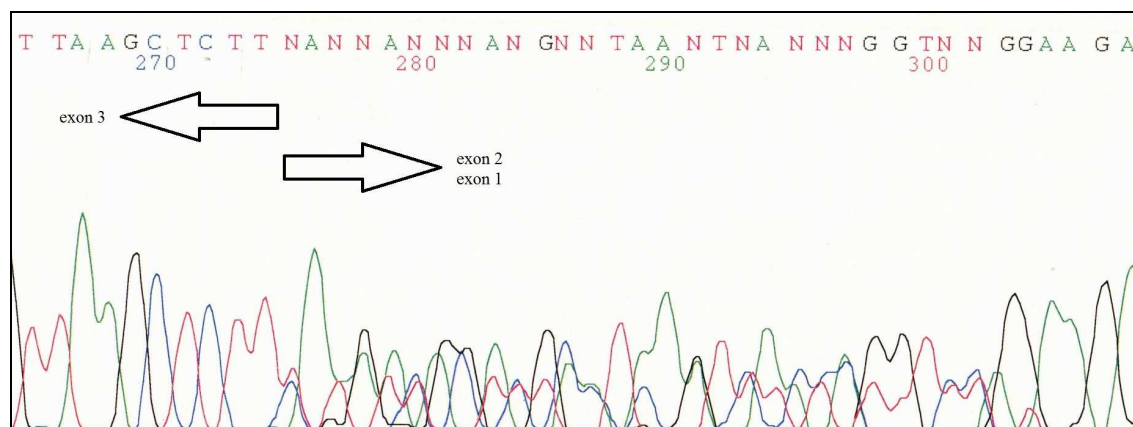
K testování funkčního vlivu detekovaných variant na expresi genu *APC* byl využit in vitro přístup (analýza *APC* transkriptu). Z krevních či tkáňových vzorků byla vyzolována RNA, která byla následně přepsána metodou reverzní transkripce do cDNA. Pro amplifikaci vybraných úseků byla využita PCR s následnou separací produktů na 2% agarózovém gelu a vizualizací pod UV světlem. Sekvenováním amplifikované cDNA byla určena sekvence produktu a následně také určena místa sestřihu.

U probandky 147 s detekovanou záměnou c.220G>T (poslední báze exonu 2 genu *APC*) byl jako první symptom diagnostikován CRC v 62 letech a klinickým lékařem byla vyslovena diagnóza AFAP. Stejný typ mutace byl prokázán u sestry a dvou bratrů probandky a dále u dvou dcer probandky. Výsledek kolonoskopického vyšetření u příbuzných probandky není bohužel znám.

Elektroforeticky byly detekovány 2 produkty – očekávaný produkt o délce 472bp a produkt o délce 387bp (obrázek 19). Sekvenováním kratšího produktu bylo zjištěno, že tento produkt vzniká vystřížením celého exonu 2 (obrázek 20). Vystřížení exonu 2 vede k posunu čtecího rámce, jehož následkem je vznik proteinu o délce pouhých 48 AK.

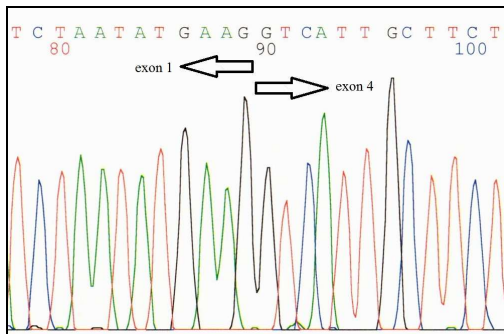


Obrázek 19 Marker (jamka 1). PCR produkty u probandky 147 (jamka 2 – 4), kontrolního krevního vzorku (jamka 5 – 7) a kontrolního vzorku střeva (jamka 8 – 10)



Obrázek 20 Sekvence vzorku probandky 147 s vystříženým exonem 2 na jedné alele

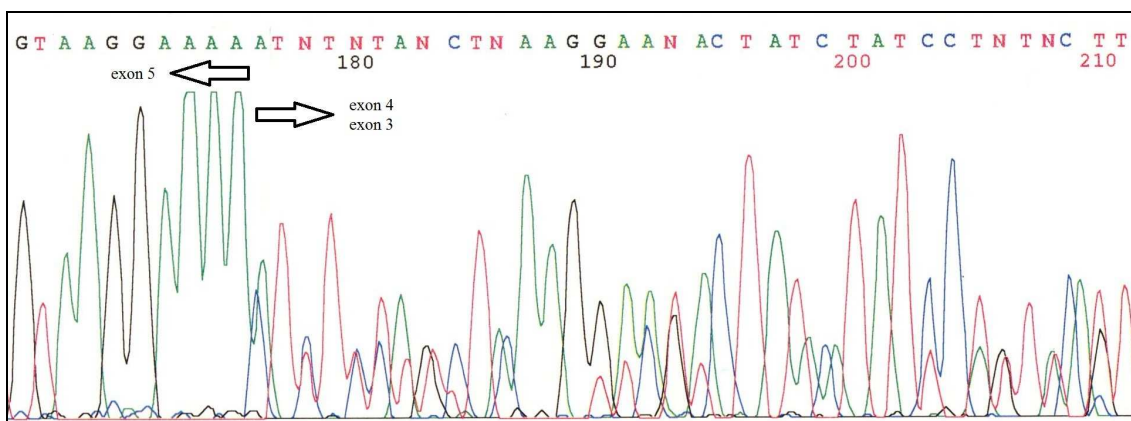
Analýzou střevní mukózy kontrolních vzorků však byly odhaleny další alternativně sestříhané transkripty, např. exon 1 následovaný exonem 4 v kanonickém místě (obrázek 21). Tento transkript byl také detekován v probandově krevním vzorku (probandka 147), nikoli však v krevních vzorcích kontrol.



Obrázek 21 Sekvence vzorku střevní mukózy kontrolního vzorku s vystříženým exonem 2 a 3

Proband 179 podstoupil ve věku 22 let kolonoskopické vyšetření s nálezem 3 polypů (diagnostikován jako AFAP). Bratr probanda byl kolonoskopicky vyšetřen už v 15 letech s nálezem <100 polypů. Otcí probanda byl ve 41 letech diagnostikován CRC a podstoupil kolektomii. Z těchto údajů je patrná značná variabilita ve fenotypu v probandově rodině.

Analýza mRNA u probanda 179 nesoucího mutaci v první bázi intronu 4 (c.531+1G>T) odhalila aberantní vystřížení exonu 4. Při elektroforéze PCR produktů byly totiž detekovány 2 produkty – očekávaný produkt o délce 361bp a produkt o délce 252bp. Sekvence produktu o velikosti 252 bp prokázala vystřížení exonu 4 (obrázek 22), jehož následkem je posun čtecího rámce a vznik zkráceného proteinu (stop kodon následuje po 147 AK).

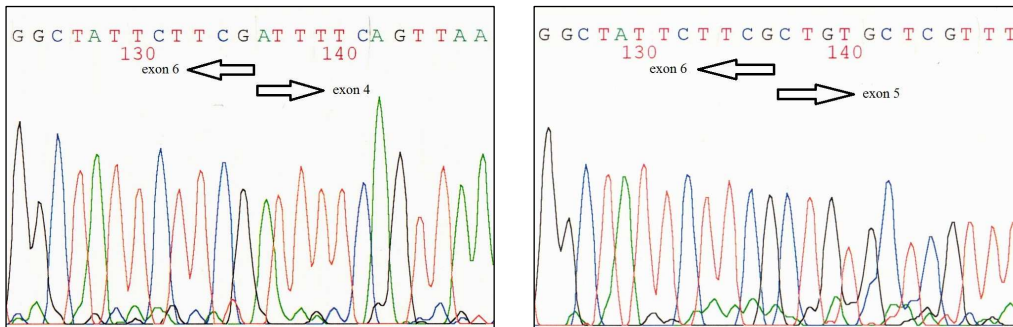


Obrázek 22 Sekvence vzorku probanda 179 s vystříženým exonem 4 na jedné alele

U probandky 164 (FAP, >100 polypů) s mutací v 1. bázi 5. intronu (c.645+1G>T) mRNA analýza odhalila, že vlivem této mutace dochází k aberantní delecí 5. exonu (obrázek 23 a 24). Vlivem vystřížení exonu 5 (114bp) však nedochází k posunu čtecího rámce a protein vznikající z takového transkriptu má velikost 2805 AK (je tedy o 38 AK kratší).



Obrázek 23 PCR produkty kontrolních vzorků a vzorku probandky 164 (jamka 1 – marker, jamka 2 – negativní kontrola, jamky 3 a 4 – kontrolní vzorky, jamka 5 – probandka 164)



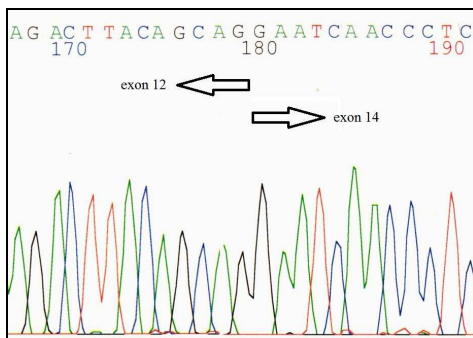
Obrázek 24 Sekvenace PCR produktů (v R směru) probandky 164 o velikosti
a) 217bp – alela bez exonu 5 (vlevo)
b) 331bp – normální alela (vpravo)

Mutační analýza odhalila u probanda 392 dvě sekvenční varianty: c.1312+5G>A v 9. intronu a c.1958+8C>T v intronu 14 (varianta c.1958+8C>T byla prokázána i u zdravého bratra probanda). Kolonoskopické vyšetření probanda v 55 letech prokázalo přítomnost >100 adenomatózních polypů s nízkým stupněm dysplázie. mRNA analýza oblasti obsahující záměnu c.1312+5G>A prokázala, že dochází

ke kompletnímu vystřížení exonu 9. Vystřížení exonu 9 vede k posunu čtecího rámce a vzniku zkráceného proteinu (stop kodon následuje po 326 AK).

Proband 295 s detekovanou mutací c.1627G>T (1. báze 13.exonu) v genu *APC* podstoupil v 60 letech pro záchyt CRC v místě polypózy částečnou kolektomii (fenotypově se jevil jako AFAP). Bratr probanda i matka probanda zemřeli na CRC ve věku 62, resp. 69 let. Děti probanda (dcera 38let, syn 41let) byly kolonoskopicky vyšetřeny s negativním nálezem. Genetické vyšetření u dětí probanda neproběhlo.

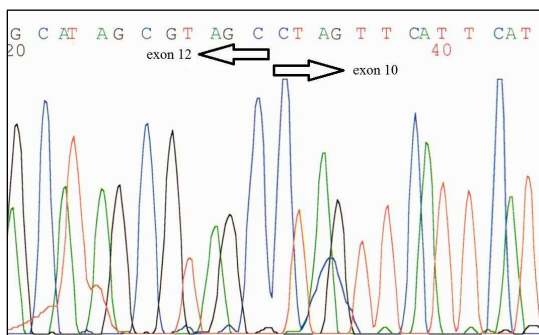
Vzorek probanda 295 byl podroben mRNA analýze, jejímž výsledkem bylo zjištění, že u probanda dochází k aberantnímu vystřížení exonu 13 (obrázek 25). Vystřížení exonu 13 (117bp) nemá vliv na čtecí rámec, ale má vliv na vznikající protein APC, kterému chybí 39 AK. Výsledný protein tak díky vystřížení exonu 13 postrádá některé z motivů Armadillo, které jsou kódovány exony 10 až 14.



Obrázek 25 Sekvenace produktu probanda 295 (alela bez exonu 13)

U dvou probandů byla detekována záměna v 1. bázi 11. intronu. V případě probanda 11 se však jednalo o záměnu c.1548+1G>A, zatímco v případě probanda 47 se jednalo o záměnu c.1548+1G>T. Proband 11 a další rodinní příslušníci vykazovali známky FAP s výskytem CHRPE či osteomů nebo desmoidních tumorů. U probanda 47 byla klinickým lékařem vyslovena také diagnóza FAP. Údaje o počtu polypů či extrakolických příznaků nejsou dostupné.

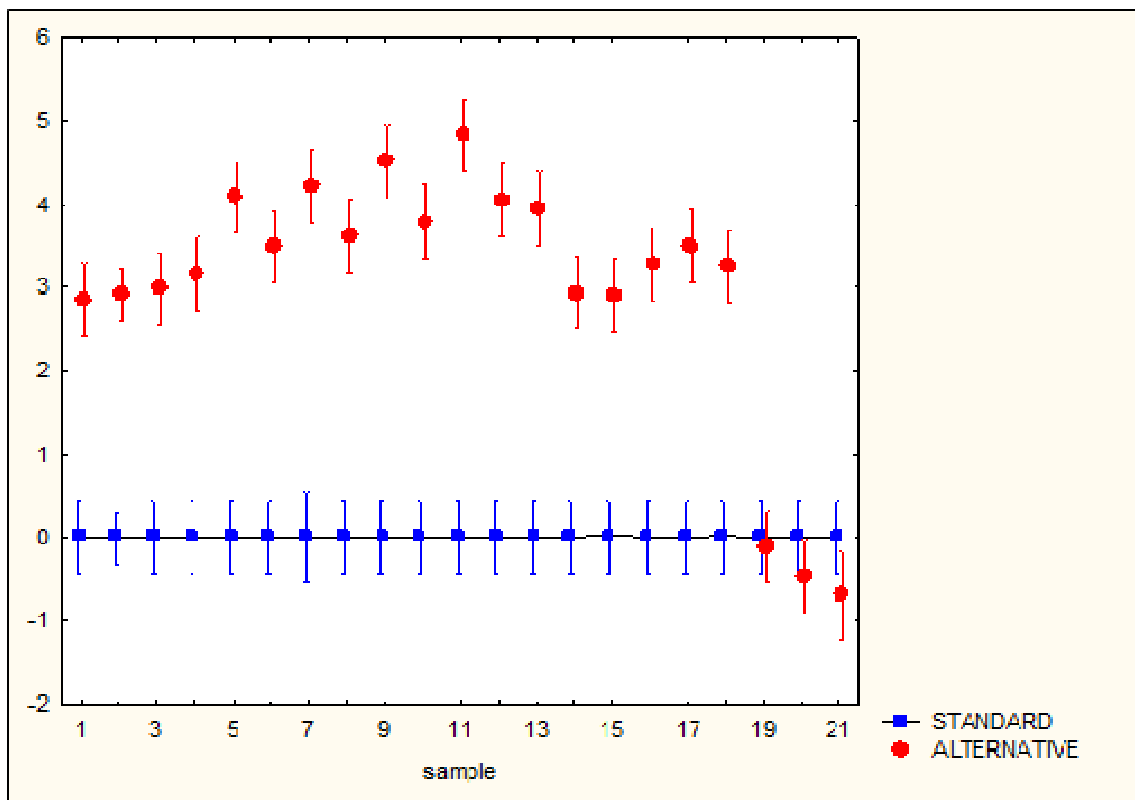
mRNA analýza vzorku 11 odhalila, že ve výsledném transkriptu chybí exon 11 (obrázek 26), což vede k expresi kratšího proteinu o délce 490AK. U probanda 47 byly mRNA analýzou detekovány 2 produkty – jeden, ve kterém chyběl exon 11 (stejně jako u probanda 11) a dále produkt, který obsahoval i nevystřížený intron 11. Předpokládaný důsledek exonizace intronu 11 je vytvoření proteinu APC o délce 526 AK.



Obrázek 26 Sekvenace produktu probanda 47 (alela bez exonu 11)

Analýza mRNA u 4 probandů s detekovanými variantami ve 14. exonu (proband 381 – c.1956C>T) a ve 14. intronu (proband 142, 392 – c.1958+8T>C) či v 1. bázi exonu 15 (proband 334 – c.1959G>A) prokázala alternativní vystřížení exonu 14, které je ovšem běžné i u kontrolních vzorků. U probandů byly totiž detekovány 2 produkty – očekávaný o délce 369 bp a kratší produkt o délce 154 bp (tj. bez exonu 14).

S ohledem na běžně se vyskytující vystřížení exonu 14 byla provedena Real Time PCR. Analýza (měření množství alternativního produktu, tj. transkript bez exonu 14) byla provedena u všech 10 mRNA vzorků probandů izolovaných z krve a dále u vzorků střevní mukózy u probandů 392 a 381 a dále u vzorku polypu probanda 381 (tkáňové vzorky dalších probandů se nepodařilo získat). Takto získané hodnoty byly porovnány s množstvím alternativního produktu 51 krevních vzorků kontrol (tj. kontrolní soubor 3 bez 3 vzorků, které se nepodařilo zanalyzovat) a 9 vzorků střevní mukózy zdravých jedinců (tj. kontrolní soubor 1). Hodnoty Ct (threshold cycle) alternativních produktů byly vztaženy k průměrným hodnotám Ct konstitutivního sestřihu a porovnány mezi probandy / kontrolami s využitím statistické analýzy testu ANOVA: $F(20,44)=75,78$, $P<0,0001$. V této statistické analýze byly za účelem vytvoření balancovaného modelu zahrnuty pouze 4 vzorky mRNA z krve kontrolních vzorků. Nicméně u zbývajících 47 vzorků normálů se hodnota Ct konstitutivního a alternativního sestřihu pohybuje v rozmezí 1,9 až 4,3 cyklu a tyto hodnoty jsou jednoznačně odlišné od získaných Ct hodnot probanda 381: -0,1 pro krev, -0,47 pro zdravou střevní tkáň, -0,69 pro polyp.



Obrázek 27 Expres konstitutivního a alternativního transkriptu exonu 14 genu *APC*. **Vzorky 1 – 4:** krevní vzorky kontrol, **5 – 13:** vzorky střevní mukózy kontrol, **14:** vzorek bratra probanda 392, **15:** vzorek krve probanda 392, **16:** vzorek střevní mukózy probanda 392, **17, 18:** vzorky krve probandů 334 a 142, **19 – 21:** vzorky krve, střevní mukózy a polypu probanda 381.

Fenotypově proband 381 vykazuje známky AFAP – ve 35 letech mu bylo ve střevě diagnostikováno cca 50 polypů. Matka probanda podstoupila chirurgické odstranění CRC ve 40 letech. U probanda 381 mutovaná alela c. 1956C>T dává vzniknout výhradně transkriptu postrádajícímu exon 14.

U probandů 142, 392 (c.1958+8T>C) a 334 (c.1959G>A) nebylo při Real-Time analýze zaznamenáno signifikantně změněné množství produktu alternativního sestřihu (tj. transkriptu bez alternativně vystřiženého exonu 14).

Probandka 334 (24 letá žena) byla testována jako dosud zdravá osoba v riziku onemocnění, neboť u ní byla prokázána záměna c.1959G>A stejně jako u jejího otce (AFAP, 59 let). Matka otce probandky podstoupila kolektomii z důvodu CRC ve věku 73 let (není známo, zda byla nositelkou dané záměny). Také otcův bratranec, u něhož nebyla detekována záměna c.1959G>A, podstoupil chirurgické odstranění CRC a nedávno mu byly opět kolonoskopicky zjištěny četné tubulovilózní adenomy s dysplastickými změnami.

Výsledky analýzy *APC* transkriptů jsou shrnuty v tabulce 17.

Tabulka 17 Výsledek analýzy *APC* transkriptů u deseti testovaných záměn detekovaných mutační analýzou genu *APC*

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

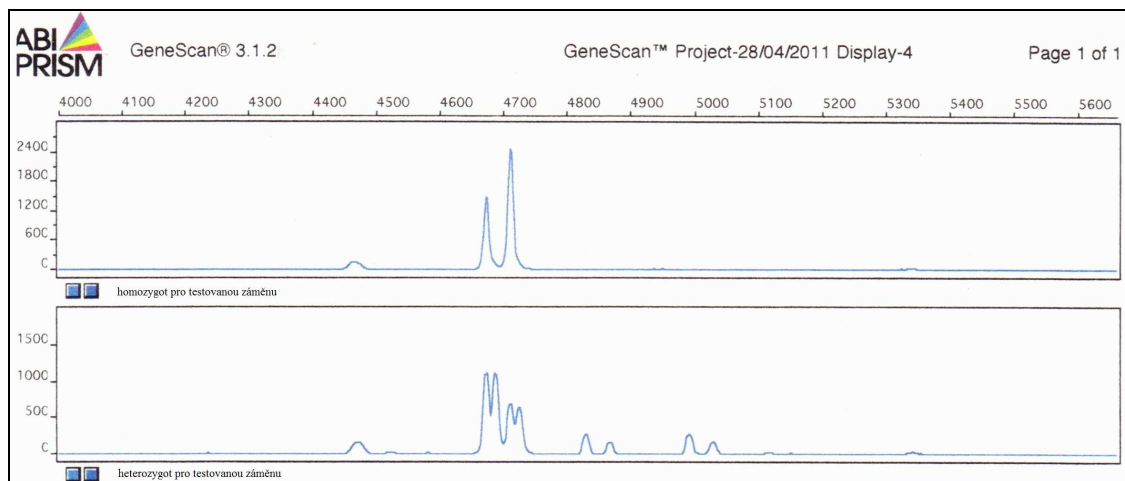
Analýza *APC* transkriptů tedy v testovaném souboru deseti vzorků odhalila, že u sedmi probandů zárodečná záměna podmiňuje vznik aberantního transkriptu (u šesti probandů bylo analýzou zjištěno vystřížení exonu, u jednoho probanda byla navíc detekována exonizace intronu), u jednoho probanda bylo změněno množství alternativně sestřihovaného produktu a u dvou probandů nebyl zjištěn žádný efekt studované záměny na expresi.

V.2.2 Testování výskytu varianty c.1958+8C>T genu *APC*

u kontrolních vzorků

Záměna c.1958+8T>C detekovaná u probandů 142 a 392 nebyla dosud publikována. Funkční analýza této záměny neodhalila žádný vliv na transkripci. Proto byla zjišťována frekvence výskytu této varianty v populaci, konkrétně v souboru 400 zdravých jedinců a 94 jedinců s výskytem CRC (tj. kontrolní soubor 3). Pro testování výskytu varianty c.1958+8C>T genu *APC* u kontrolních vzorků byla využita metoda denaturační kapilární elektroforézy (DCE) (obrázek 28). Varianta c.1958+8T>C byla v souboru 400 zdravých jedinců detekována 4krát v heterozygotním stavu a v souboru 94 jedinců s výskytem CRC byla detekována 1krát v heterozygotním stavu

(v homozygotním stavu nebyla detekována, což lze připsat na vrub použité metodě, ale na základě Hardy – Weinbergovy rovnováhy lze předpokládat výskyt 1 – 2 homozygotů pro recesivní alelu v souboru 400 zdravých jedinců).



Obrázek 28 Výsledek analýzy výskytu c.1958+8T>C metodou DCE u kontrolních vzorků (homozygot pro testovanou záměnu nahoře a heterozygot dole)

Frekvence výskytu recesivní alely ve vyšetřovaném souboru je 0,5% a v obou kontrolních souborech cca 1%, a proto lze uzavřít, že se jedná o polymorfismus.

V.3 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MUTYH*

V.3.1 Mutační analýza genu *MUTYH* s využitím metody dHPLC

Pro mutační analýzu genu *MUTYH* u 120 *APC*-negativních probandů byla využita metoda denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dHPLC) na přístroji WAVE umístěného na Ústavu biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze.

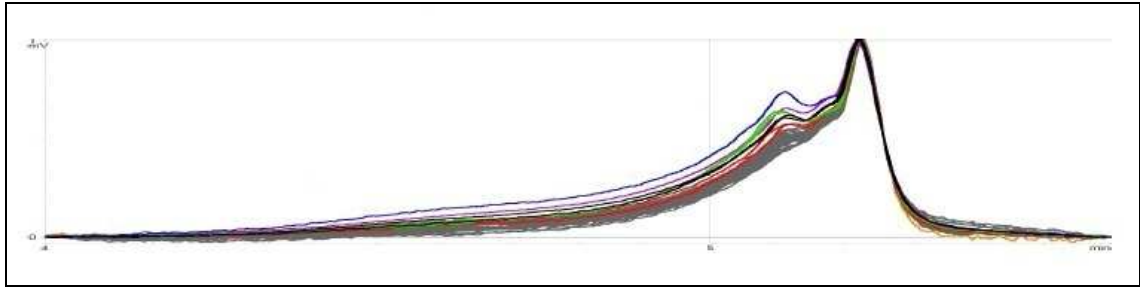
Uvedenou metodou bylo v souboru 120 *APC*-negativních probandů detekováno 16 sekvenčních variant (tabulka 18). Chromatogramy exonu 1 – 16 a sekvenace všech detekovaných variant jsou znázorněny na obrázcích 29 – 57.

Pouze ve třech případech z 16 detekovaných záměn se jednalo o kauzální mutace: mutace c.494A>G (p.Tyr165Cys) v exonu 7, mutace c.891+3A>C (p.Gly250Trpfs*7) v intronu 10 a mutace c.1145G>A (p.Gly382Asp) v exonu 13. Tři detekované záměny představují popsání polymorfismy v exonech genu *MUTYH*: c.64G>A (p.Val22Met) v exonu 2, c.972G>C (p.Gln324His) v exonu 12 a c.1234C>T (p.Arg412Cys) v exonu 13 [59][104][105]. Tyto polymorfismy byly detekovány s frekvencí alel 2,92%,

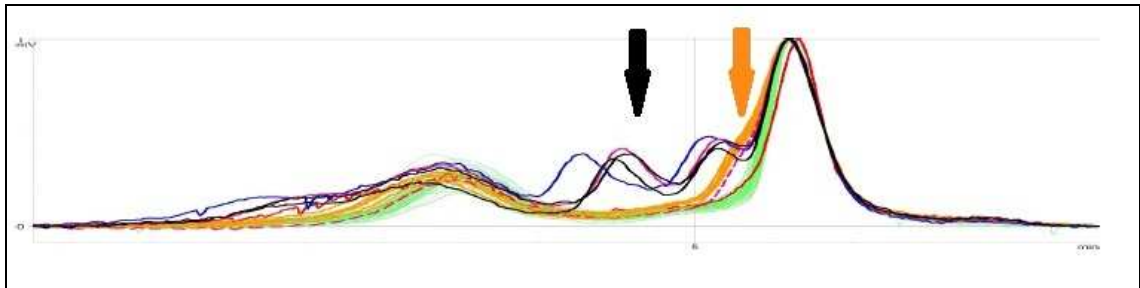
20%, resp. 0,42%. Frekvence těchto polymorfismů jsou v souladu s publikovanými daty [59][64][106][107]. Kromě polymorfismů v exonech byly u probandů nalezeny čtyři publikované změny v intronických sekvencích: c.157+30A>G (intron 2), c.462+35G>A (intron 6), c.648+21C>A (intron 8), c.1435–40G>C (intron 14) [107][108]. Dále byly detekovány sekvenční změny c.956–9C>T v intronu 11 a c.1145–27C>T intronu 12. Frekvence minoritních alel těchto dvou variant (0,83%, resp. 1,25%) byly v souladu s publikovanými daty [105][109][110]. 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 (Sulova, Olschwang 2007) [111][112]. Tichá varianta c.1506G>A (p.Pro502Pro) byla detekována pouze u 1 probanda z testovaného souboru (frekvence alely 0,42%). Nové varianty v intronu 4 (c.347–13C>G) a intronu 14 (c.1435–17C>G) byly detekovány s frekvencí alel 2,50%, resp. 0,83%.

Tabulka 18 Přehled sekvenčních změn nalezených v genu *MUTYH* detekovaných v souboru 120 *APC* - negativních probandů (použita NM_001048171.1)

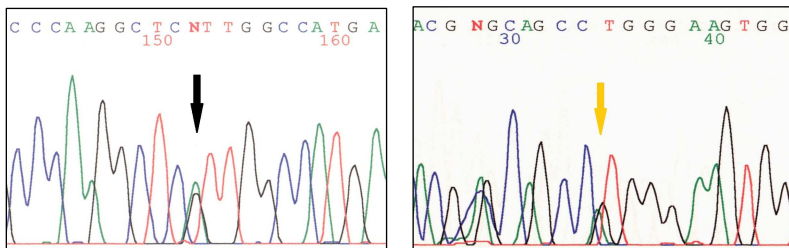
| Lokalizace | Záměna nukleotidu | Záměna AK | Charakter změny |
|------------|-------------------|-----------------|---------------------|
| exon 2 | c.64G>A | p.Val22Met | polymorfismus [107] |
| intron 2 | c.157+30A>G | | neznámý [108] |
| intron 4 | c.346+55G>A | | neznámý [111][112] |
| intron 4 | c.347–13C>G | | neznámý [111] |
| intron 6 | c.462+35G>A | | neznámý [107] |
| exon 7 | c.494A>G | p.Tyr165Cys | mutace [59] |
| intron 8 | c.648+21C>A | | neznámý [107] |
| intron 10 | c.891+3A>C | p.Gly250Trpfs*7 | mutace [113] |
| intron 11 | c.956–9C>T | | neznámý [105] |
| exon 12 | c.972G>C | p.Gln324His | polymorfismus [59] |
| intron 12 | c.1145–27C>T | | neznámý [109] |
| exon 13 | c.1145G>A | p.Gly382Asp | mutace [59] |
| exon 13 | c.1234C>T | p.Arg412Cys | polymorfismus [59] |
| intron 14 | c.1435–40G>C | | neznámý [107] |
| intron 14 | c.1435–17C>G | | neznámý [111] |
| exon 16 | c.1506G>A | p.Pro502Pro | neznámý [111][112] |



Obrázek 29 Chromatogram exonu 1 genu *MUTYH*

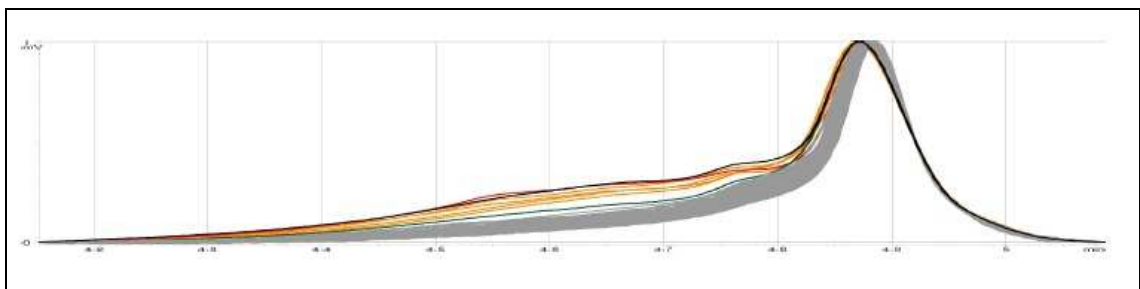


Obrázek 30 Chromatogram exonu 2 genu *MUTYH*

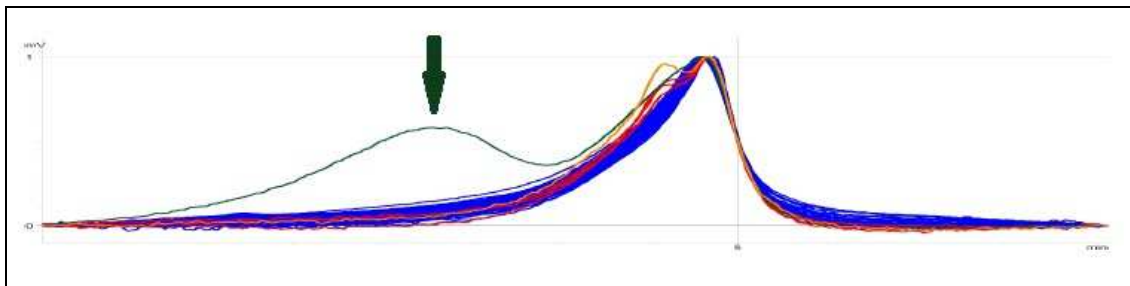


Obrázek 31 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou v genu *MUTYH*

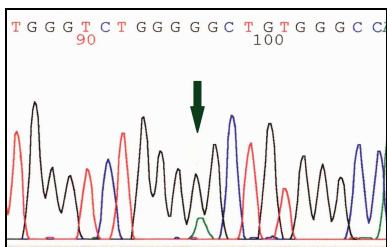
- a) c.64G>A (vlevo)
- b) c.157+30A>G (vpravo)



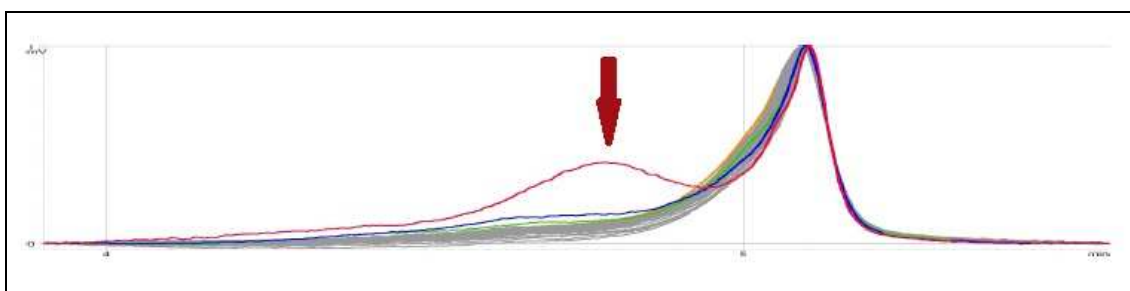
Obrázek 32 Chromatogram exonu 3 genu *MUTYH*



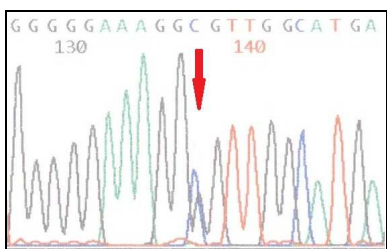
Obrázek 33 Chromatogram exonu 4 genu *MUTYH*



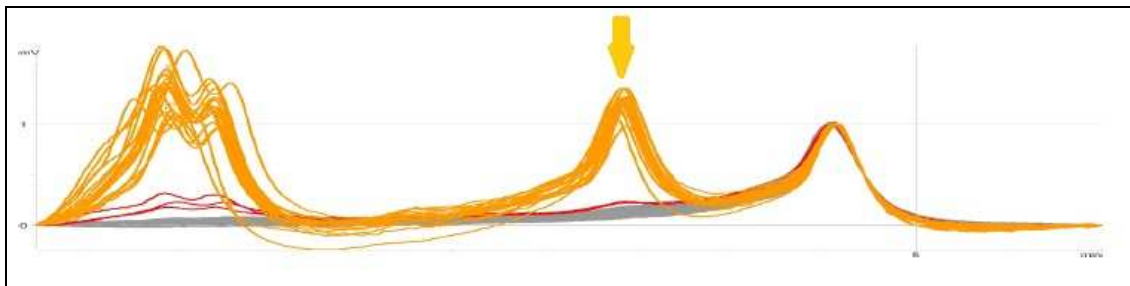
Obrázek 34 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.346+55G>A v genu *MUTYH*



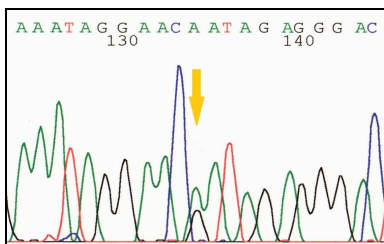
Obrázek 35 Chromatogram exonu 5 genu *MUTYH*



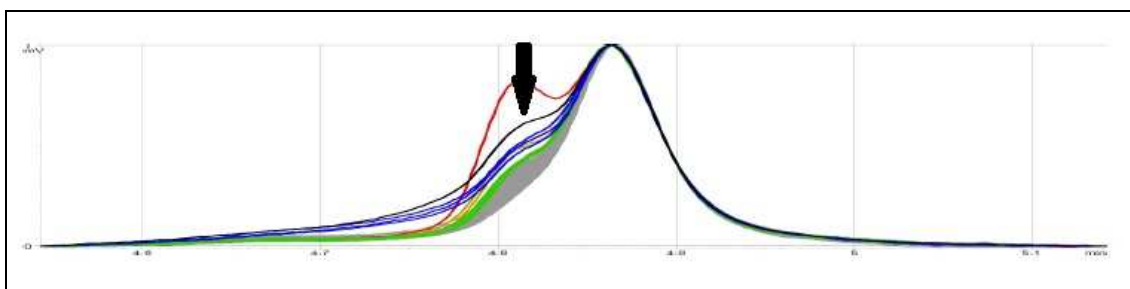
Obrázek 36 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.347-13C>G (v R směru) v genu *MUTYH*



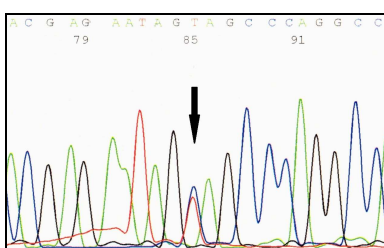
Obrázek 37 Chromatogram exonu 6 genu *MUTYH*



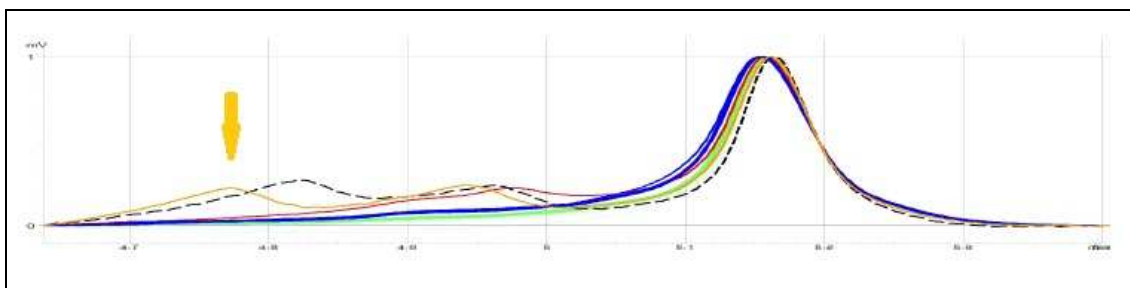
Obrázek 38 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.462+35G>A v genu *MUTYH*



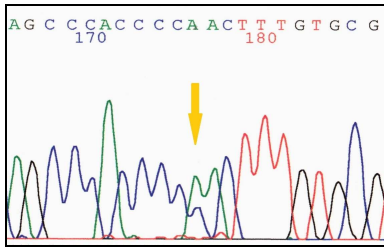
Obrázek 39 Chromatogram exonu 7 genu *MUTYH*



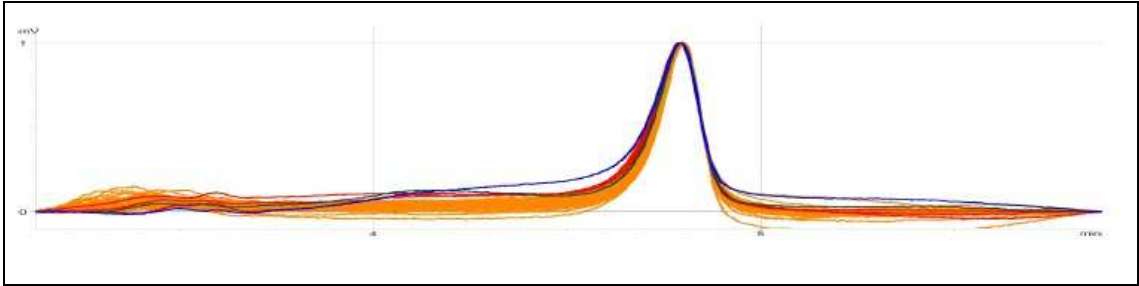
Obrázek 40 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.494A>G v genu *MUTYH*



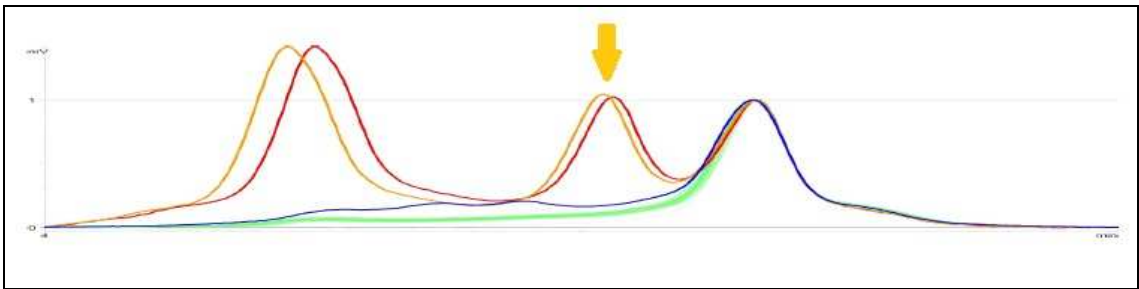
Obrázek 41 Chromatogram exonu 8 genu *MUTYH*



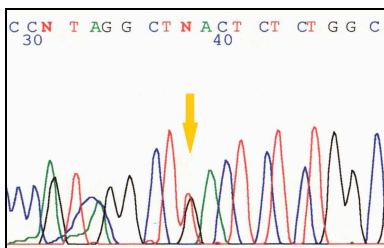
Obrázek 42 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.648+21C>A v genu *MUTYH*



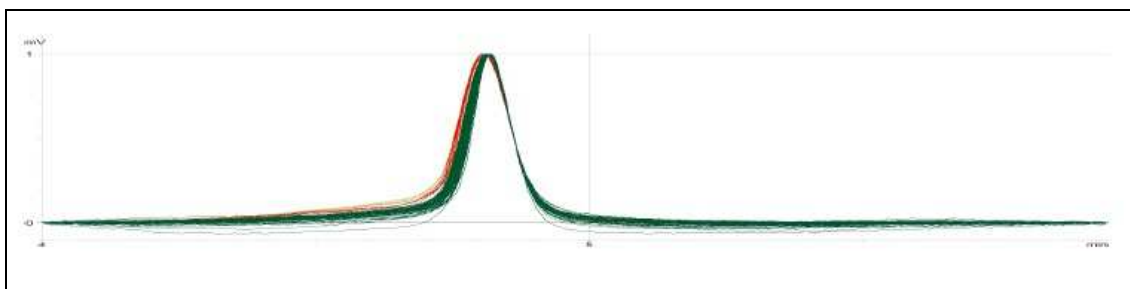
Obrázek 43 Chromatogram exonu 9 genu *MUTYH*



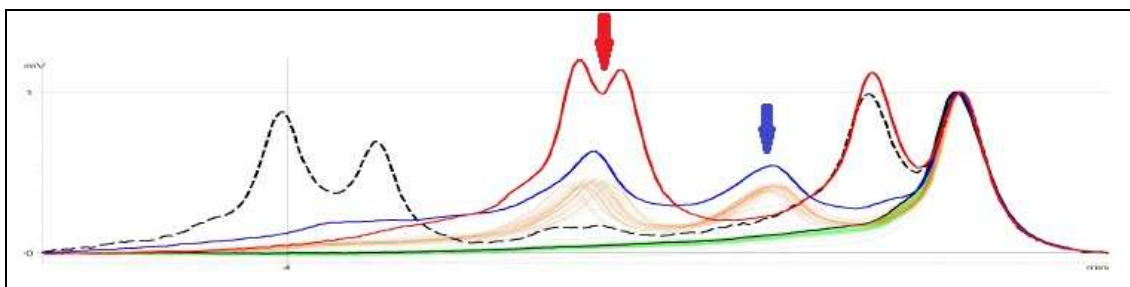
Obrázek 44 Chromatogram exonu 10 genu *MUTYH*



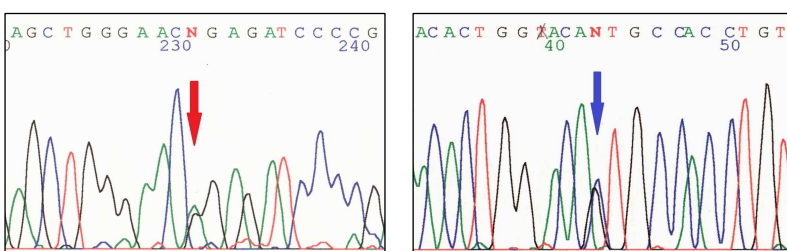
Obrázek 45 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.891+3A>C (v R směru) v genu *MUTYH*



Obrázek 46 Chromatogram exonu 11 genu *MUTYH*



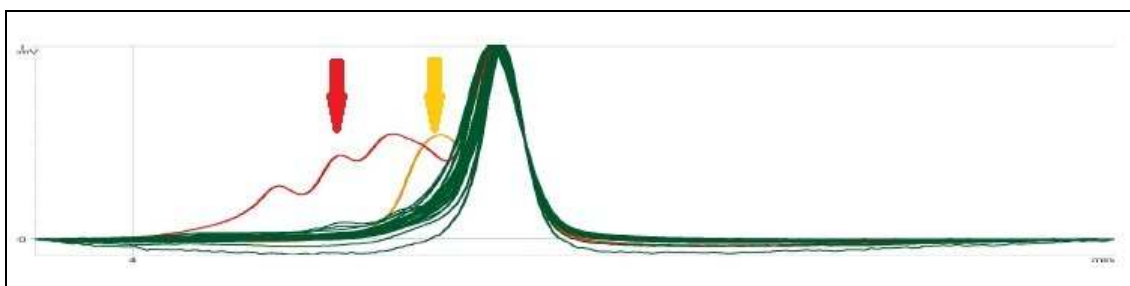
Obrázek 47 Chromatogram exonu 12 genu *MUTYH*



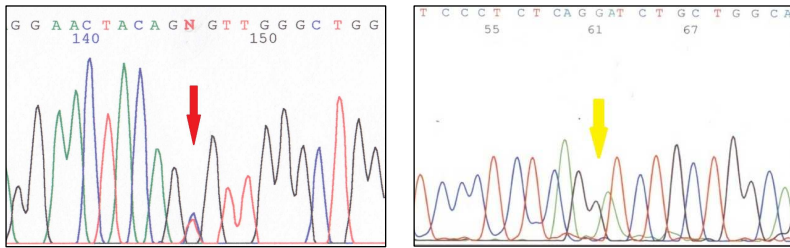
Obrázek 48 Sekvence vzorků s detekovanou záměnou v genu *MUTYH*

a) c.956-9C>T (v R směru) (vlevo)

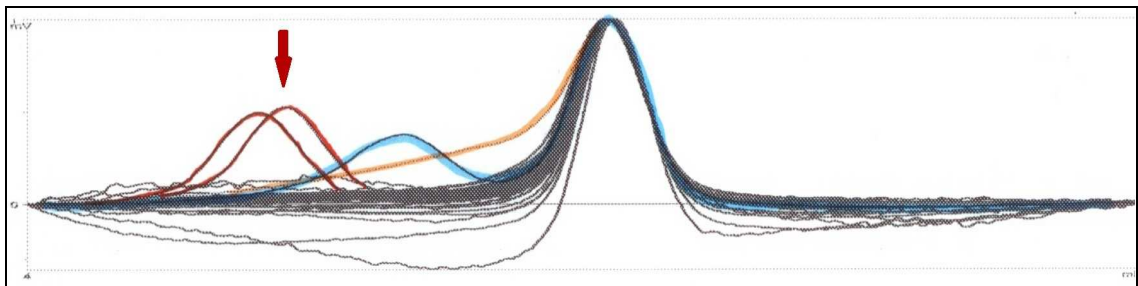
b) c.972G>C (vpravo)



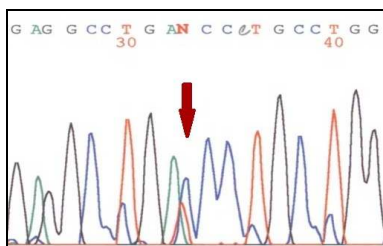
Obrázek 49 Chromatogram exonu 13 genu *MUTYH*



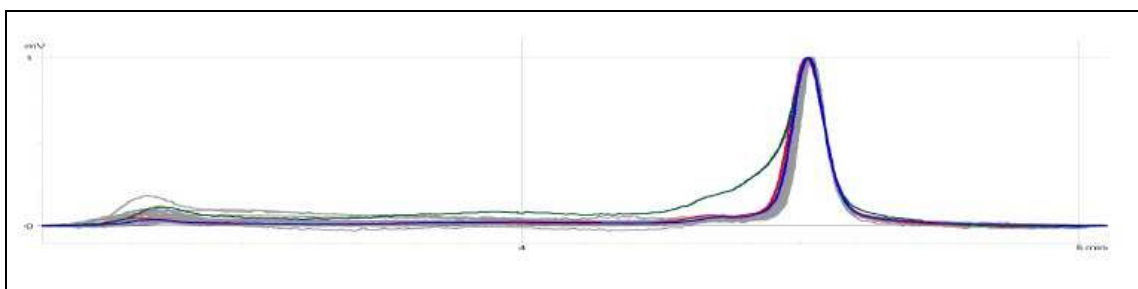
Obrázek 50 Sekvenace vzorků s detekovanou záměnou v genu *MUTYH*
 a) c.1234C>T (vlevo)
 b) c.1145G>A (vpravo)



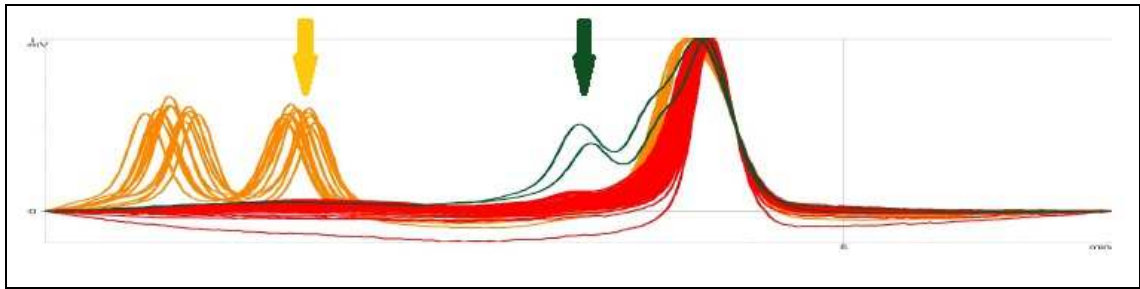
Obrázek 51 Chromatogram exonu 13 genu *MUTYH*



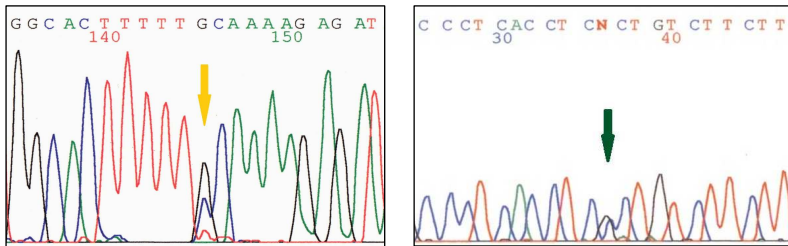
Obrázek 52 Sekvenace vzorku s detekovanou záměnou c.1145-27C>T v genu *MUTYH*



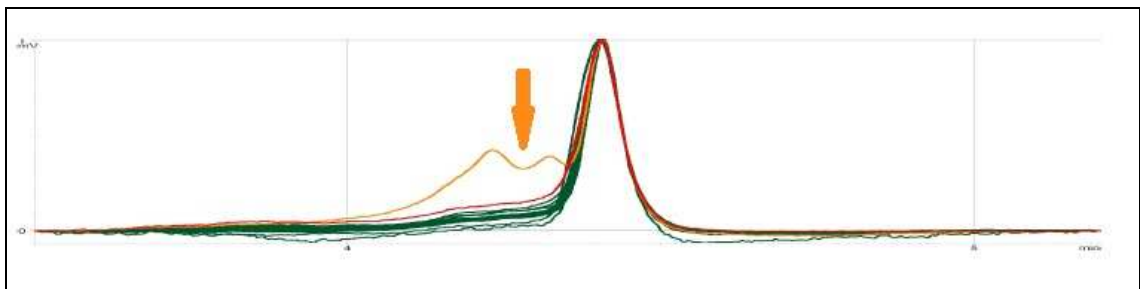
Obrázek 53 Chromatogram exonu 14 genu *MUTYH*



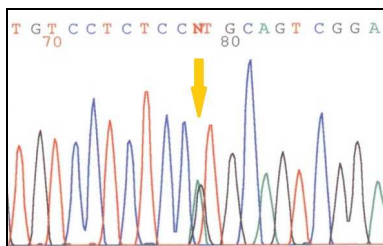
Obrázek 54 Chromatogram exonu 15 genu *MUTYH*



Obrázek 55 Sekvence vzorků s detekovanou záměnou v genu *MUTYH*
 a) c.1435–40G>C (vlevo)
 b) c.1435–17C>G (vpravo)



Obrázek 56 Chromatogram exonu 16 genu *MUTYH*



Obrázek 57 Sekvence vzorku s detekovanou záměnou c.1506G>A v genu *MUTYH*

V.3.2 Mutační analýza exonů 7 a 13 genu *MUTYH* s využitím HRM

Mutační analýza genu *MUTYH* u dalších *APC*-negativních probandů byla soustředěna pouze na exon 7 a exon 13, neboť ve vyšetřeném souboru 120 *APC*-negativních probandů, u kterých byl vyšetřen celý gen *MUTYH*, byly detekovány u probandů s bialelickou mutací jen nejčastější kavkazské mutace v exonu 7 a exonu 13.

HRM analýzou exonu 7 a 13 genu *MUTYH* bylo tedy vyšetřeno 145 *APC*-negativních probandů. Tímto vyšetřením bylo detekováno 7 probandů s alespoň jednou zárodečnou mutací v testovaných exonech (obrázek 58 a 59).

Vyšetření odhalilo u probanda 438 a probanda 448 stejnou bialelickou mutaci c.494A>G; p.Tyr165Cys v exonu 7.

U probanda 418 a probanda 346 byla detekována mutace c.494A>G; p.Tyr165Cys v exonu 7. S ohledem na nález pouze jedné zárodečné mutace byly u těchto probandů následně vyšetřeny zbývající exony genu *MUTYH* metodou přímého sekvenování. Sekvenováním bylo zjištěno, že proband 418 nese kromě výše zmíněné mutace v exonu 7, také sestřihovou mutaci c.891+3A>C; p.Gly250Trpfs*7 v intronu 10. U probanda 346 nebyla sekvenováním zbylých exonů nalezena druhá zárodečná mutace v genu *MUTYH*.

U probanda 274, probanda 464 a probanda 467 byla detekována mutace c.1145G>A; p.Gly382Asp v exonu 13. U těchto probandů byly následně vyšetřeny zbývající exony genu *MUTYH* metodou přímého sekvenování. Sekvenováním bylo zjištěno, že proband 464 nese kromě výše zmíněné mutace v exonu 13, také mutaci c.692G>A; p.Arg231His v exonu 9. U probanda 274 ani probanda 467 nebyla sekvenováním zbylých exonů nalezena druhá zárodečná mutace v genu *MUTYH*.

Souhrnem byli v souboru 145 *APC*-negativních probandů detekováni 4 probandi s bialelickou zárodečnou mutací v genu *MUTYH* a dále 3 probandi s monoalelickou mutací v genu *MUTYH*. Detekované a již dříve popsání mutace v exonech 7, 9 a 13 a intronu 10 genu *MUTYH* jsou souhrnně uvedeny v tabulce 19.

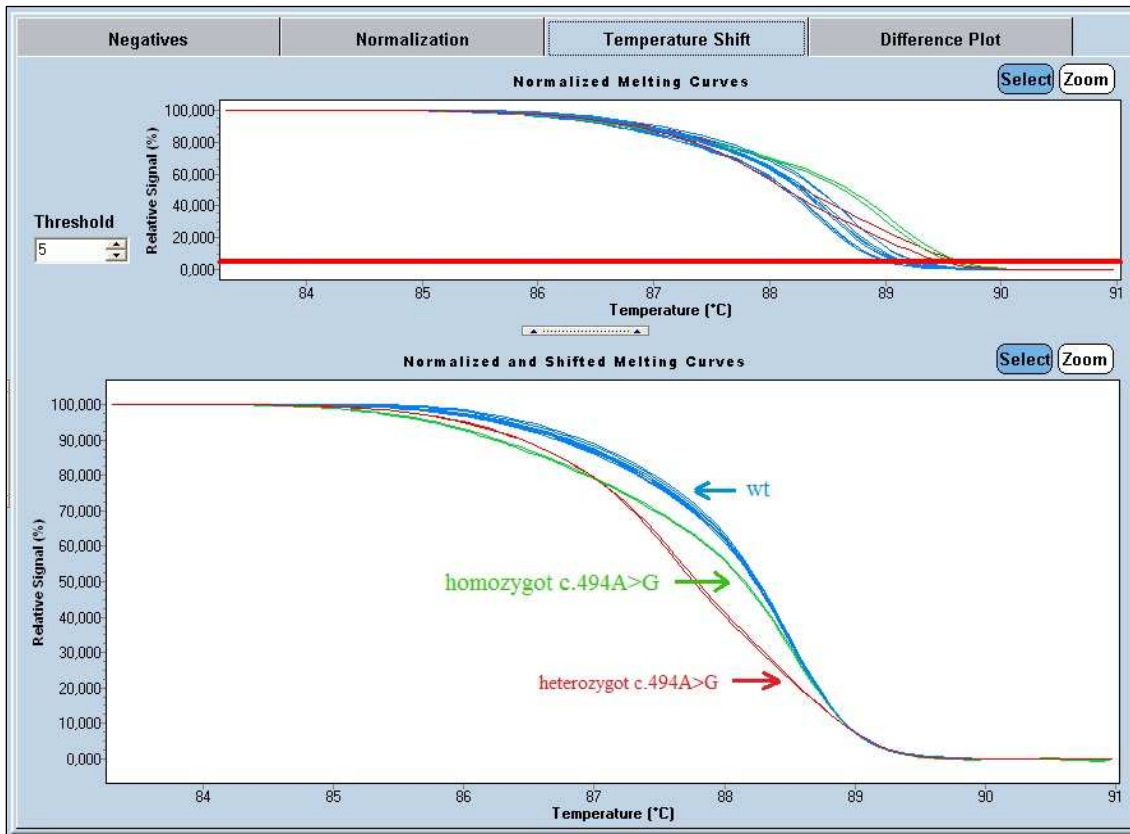
Tabulka 19 Přehled mutací v genu *MUTYH* detekovaných metodou HRM analýzy (exon 7 a 13) či sekvenováním zbývajících exonů genu *MUTYH* (použita NM_001048171.1).

| Lokalizace | Záměna nukleotidu | Záměna AK | Citace |
|------------|-------------------|-----------------|----------------------------|
| exon 7 | c.494A>G | p.Tyr165Cys | Al-Tassan et al. 2002 [59] |
| exon 9 | c.692G>A | p.Arg231His | Aceto et al. 2005 [114] |
| intron 10 | c.891+3A>C | p.Gly250Trpfs*7 | Sampson et al. 2003 [113] |
| exon 13 | c.1145G>A | p.Gly382Asp | Al-Tassan et al. 2002 [59] |

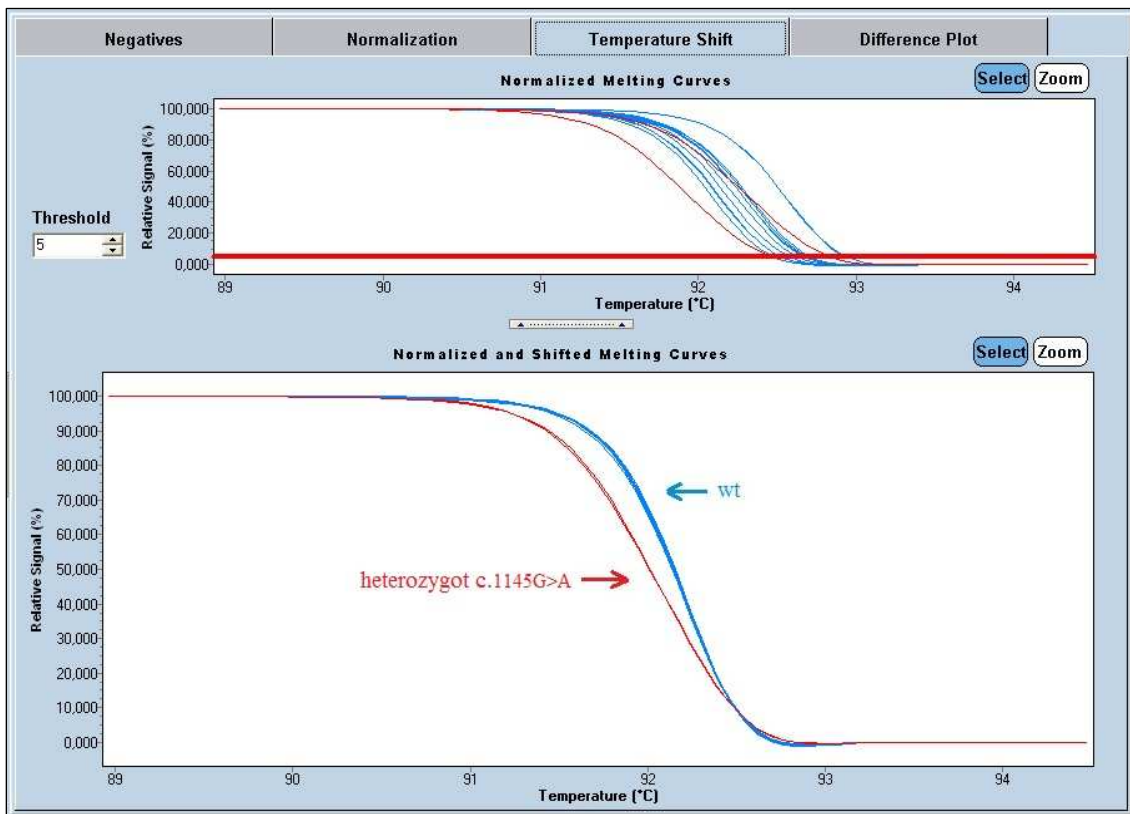
V roce 2010 byla změněna referenční cDNA sekvence genu *MUTYH*. V tabulce 20 jsou uvedeny detekované záměny v genu *MUTYH* dle původní referenční sekvence (NM_001048171.1) a současné referenční cDNA sekvence (NM_001128425.1). Nová referenční sekvence je oproti nejčastěji užívané sekvenci o 42 nukleotidů delší (jedná se o 42 nukleotidů před bazí c.157), čímž došlo ke změně označení variant v genu *MUTYH*.

Tabulka 20 Přehled detekovaných záměn v genu *MUTYH* s využitím cDNA sekvence NM_001048171.1 a NM_001128425.1

| Záměna nukleotidu | Záměna AK (NM_001048171.1) | Záměna nukleotidu | Záměna AK (NM_001128425.1) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| c.64G>A | p.Val22Met | c.64G>A | p.Val22Met |
| c.157+30A>G | | c.157+30A>G | |
| c.346+55G>A | | c.388+55G>A | |
| c.347-13C>G | | c.389-13C>G | |
| c.462+35G>A | | c.504+35G>A | |
| c.494A>G | p.Tyr165Cys | c.536A>G | p.Tyr179Cys |
| c.648+21C>A | | c.690+21C>A | |
| c.692G>A | p.Arg231His | c.734G>A | p.Arg245His |
| c.891+3A>C | p.Gly250Trpfs*7 | c.933+3A>C | p.Gly264Trpfs*7 |
| c.956-9C>T | | c.998-9C>T | |
| c.972G>C | p.Gln324His | c.1014G>C | p.Gln338His |
| c.1145-27C>T | | c.1187-27C>T | |
| c.1145G>A | p.Gly382Asp | c.1187G>A | p.Gly396Asp |
| c.1234C>T | p.Arg412Cys | c.1276C>T | p.Arg426Cys |
| c.1435-40G>C | | c.1477-40G>C | |
| c.1435-17C>G | | c.1477-17C>G | |
| c.1506G>A | p.Pro502Pro | c.1548G>A | p.Pro516Pro |



Obrázek 58 HRM analýza exonu 7 genu *MUTYH*



Obrázek 59 HRM analýza exonu 13 genu *MUTYH*

V.3.3 SNaPshot analýza

Vyšetřením 120 kontrolních vzorků na deset vybraných polymorfních variant (uvedeny v tabulce 21 či 22) byly získány genotypy, které byly následně využity pro statistickou analýzu.

Statistická analýza

Většina z testovaných deseti variant měla srovnatelné zastoupení v obou souborech. U čtyř variant (c.347–13C>G; c.462+35G>A; c.648+21C>A; c.1435–40G>C) byl testován statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel mezi souborem kontrol a souborem probandů. Provedena byla jak analýza pomocí Fisherova exaktního testu, tak analýza χ^2 testem (v případě varianty c.347–13C>G a c.648+21C>A byla provedena Yatesova korekce). Ve dvou případech byl test pozitivní: c.347–13C>G ($p_{\text{Fisher's exact test}}=0,0303$; $\chi^2=4,219$, d.f. 1, $p=0,400$) a c.462+35G>A ($p_{\text{Fisher's exact test}}=0,0124$; $\chi^2=6,982$, d.f. 1, $p=0,0082$). U zbylých dvou variant nedosahoval test statistické významnosti. Ke statistické analýze byl použit program STATISTICA Ver. 9.1 (StatSoft, Inc. 2010).

V tabulce 21 jsou uvedeny testované polymorfní varianty a počty probandů a kontrol, u nichž byla záměna detekována, ať již v heterozygotním či homozygotním stavu. Odpovídající frekvence minoritních alel u obou souborů jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 21: Počet probandů a kontrol s danou záměnou

| Záměna | Počet probandů se záměnou | Počet kontrol se záměnou |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------|
| c.157+30A>G | 7 heterozygotů | 7 heterozygotů |
| c.346+56G>A | 1 heterozygot | 0 |
| c.347–13C>G | 6 heterozygotů | 0 |
| c.462+35G>A | 28 heterozygotů | 12 heterozygotů |
| c.648+21C>A | 5 heterozygotů | 0 |
| c.956–9C>T | 2 heterozygoti | 0 |
| c.972G>C | 46 heterozygotů + 1 homozygot | 43 heterozygotů + 4 homozygoti |
| c.1145–27C>T | 3 heterozygoti | 3 heterozygoti |
| c.1435–40G>C | 19 heterozygotů | 13 heterozygotů + 1 homozygot |
| c.1435–17C>G | 2 heterozygoti | 0 |

Tabulka 22 Frekvence minoritní alely u testovaných variant v genu *MUTYH*

| genetická změna | Frekvence minoritní alely | |
|--------------------------|---------------------------|----------|
| | probandi | kontroly |
| c.157+30A>G (intron 2) | 0,029167 | 0,029167 |
| c.346+56G>A (intron 4) | 0,004167 | 0 |
| c.347-13C>G (intron 4) | 0,025000 | 0 |
| c.462+35G>A (intron 6) | 0,116667 | 0,050000 |
| c.648+21C>A (intron 8) | 0,020833 | 0 |
| c.956-9C>T (intron 11) | 0,008333 | 0 |
| c.972G>C (exon 12) | 0,200000 | 0,212500 |
| c.1145-27C>T (intron 12) | 0,012500 | 0,012500 |
| c.1435-40G>C (intron 14) | 0,079167 | 0,058333 |
| c.1435-17C>G (intron 14) | 0,008333 | 0 |

Pomocí programu Arlequin Ver 3.1. byla stanovena hodnota Hardy-Weinbergovy rovnováhy, míra vazebné nerovnováhy mezi alelami polymorfních lokusů a také stanoven odhad haplotypových frekvencí [115].

Frekvence alel testovaných variant byly odhadnuty na základě počtu genotypů. Hardy-Weinbergova rovnováha byla u každého polymorfního lokusu testována pomocí χ^2 testu. Za statisticky významnou hladinu byla považována hodnota $p < 0,05$ (1 stupeň volnosti). Hardy-Weinbergova rovnováha byla v souboru probandů i v kontrolním souboru pro všechny testované varianty zachována.

Za statisticky významnou hodnotu při stanovení vazebné nerovnováhy byla považována hladina $p < 0,05$ (1 stupeň volnosti). 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, která byla popsána v práci Aretz et al. 2006 [105]. 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, $p=0,0059$).

Pomocí Gibbsovy výběrové strategie byly z pozorovaných genotypů v kontrolním souboru a v souboru probandů odhadnuty haplotypové frekvence [116]. Četnost haplotypů v kontrolním souboru a souboru probandů je uvedena v tabulce 23.

Pouze dva haplotypy (haplotyp 8; haplotyp 11) vykazovaly vyšší frekvenci v souboru probandů oproti souboru kontrol. V obou případech tento rozdíl dosáhl statistického významu. Vzhledem k frekvenci haplotypů byla analýza provedena pomocí χ^2 testu s Yatesovou korekcí: haplotyp 8 ($\chi^2=4,219$ d.f. 1, $p=0,0400$) a haplotyp 11 ($\chi^2=5,004$ d.f. 1, $p=0,0253$). Haplotyp 8 má svůj původ v nejčastějším haplotypu (haplotyp 1) a vznikl záměnou c.347–13C>G v intronu 4. Tato varianta nebyla v kontrolním souboru detekována, a proto se haplotyp u kontrol nevyskytuje. Haplotyp 11 je obdobně spojen s minoritní alelou A v pozici c.462+35, jejíž celková frekvence je významně vyšší v souboru probandů. Zdá se, že právě tento haplotyp je za rozdílnou frekvenci varianty c.462+35 G>A výrazně odpovědný.

Tabulka 23 Četnost odhadnutých haplotypů v souboru kontrol a v souboru probandů. Polymorfnní varianty v haplotypu jsou uspořádány od 5' konce k 3' konci genu

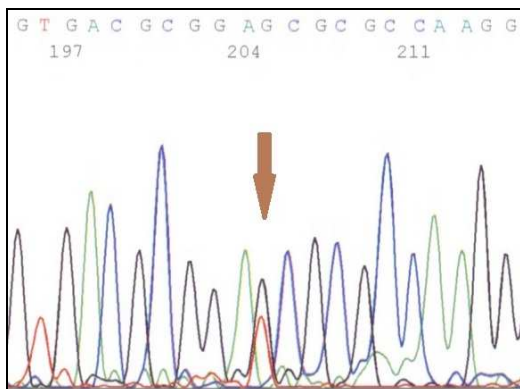
| Číslo haplotypu | Haplotyp | Frekvence u kontrol | Frekvence u probandů |
|-----------------|------------|---------------------|----------------------|
| 1 | AGCGCCGCGC | 171 | 149 |
| 2 | AGCGCCGCGG | 0 | 2 |
| 3 | AGCGCCCCGC | 44 | 41 |
| 4 | AGCACCGCCC | 11 | 15 |
| 5 | GGCGCCCCGC | 7 | 7 |
| 6 | AGCAACGCCC | 0 | 2 |
| 7 | AGCGCCGTGC | 3 | 3 |
| 8 | AGGGCCGCGC | 0 | 6 |
| 9 | AGCGACGCGC | 0 | 3 |
| 10 | AGCACTGCCC | 0 | 2 |
| 11 | AGCACCGCGC | 1 | 9 |
| 12 | AACGCCGCGC | 0 | 1 |
| 13 | AGCGCCGCCC | 3 | 0 |

V.4 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *MSH6*

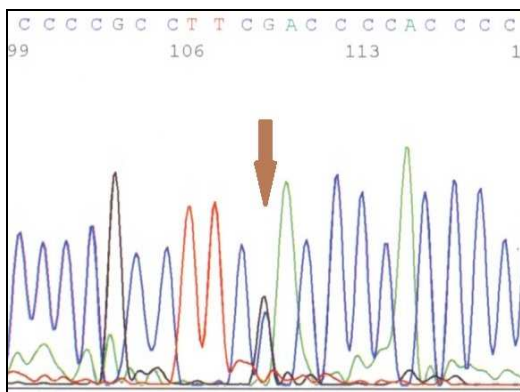
Přímá mutační analýza genu *MSH6* u šesti probandů s monoalelickou *MUTYH* mutací odhalila sedm sekvenčních změn. V šesti případech se jednalo o jednonukleotidovou záměnu (z toho ve třech případech v exonech a ve třech případech v intronech) a v jednom případě se jednalo o čtyřbodovou delecí v intronu. Detekované sekvenční změny jsou uvedeny v tabulce 24 a znázorněny na obrázcích 60 – 66.

Tabulka 24 Detekované sekvenční varianty v genu *MSH6* u probandů s monoalelickou mutací genu *MUTYH*

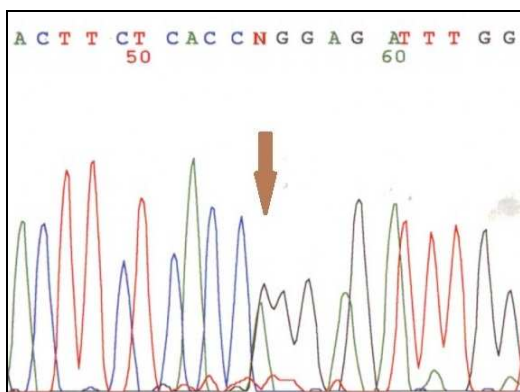
| Pozice | Záměna nukleotidu | Záměna AK | Charakter změny | Proband |
|----------|---------------------|-------------|-----------------|------------------------------|
| exon 1 | c.186C>A | p.Arg62Arg | SNP [117] | 197, 235, 326 |
| intron 1 | c.260+22C>G | | SNP [117] | 197, 235, 326 |
| exon 2 | c.276A>G | p.Pro92Pro | SNP [117] | 197, 235, 346 |
| exon 3 | c.540T>C | p.Asp180Asp | SNP [117] | 197, 235, 252, 346 |
| intron 5 | c.3438+14A>T | | SNP [117] | 197, 235, 346 |
| intron 7 | c.3646+91T>C | | neznámý [nová] | 197, 235, 346 |
| intron 7 | c.3646+29_32delCTAT | | SNP [118] | 197, 235, 252, 263, 274, 346 |



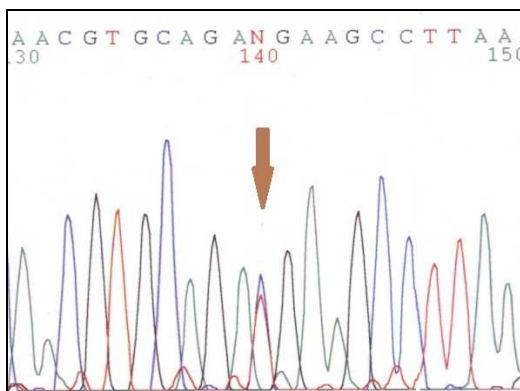
Obrázek 60 Sekvenace vzorku se záměnou c.186C>A (v R směru) v genu *MSH6*



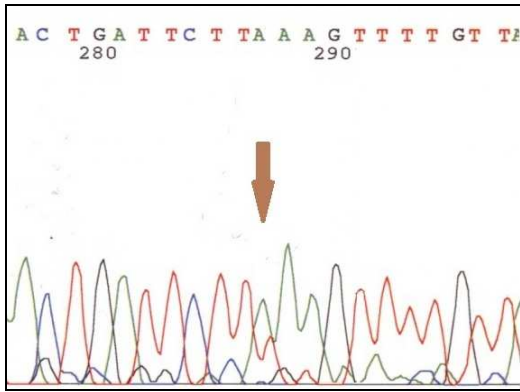
Obrázek 61 Sekvenace vzorku se záměnou c.260+22C>G (v R směru) v genu *MSH6*



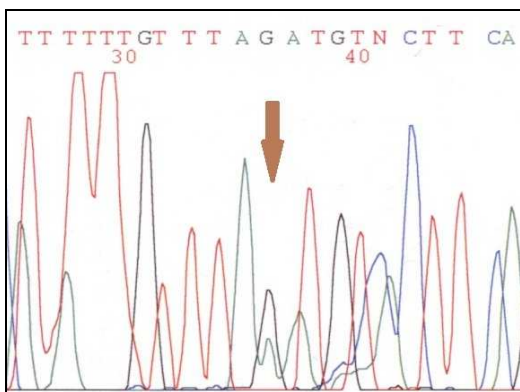
Obrázek 62 Sekvenace vzorku se záměnou c.276A>G v genu *MSH6*



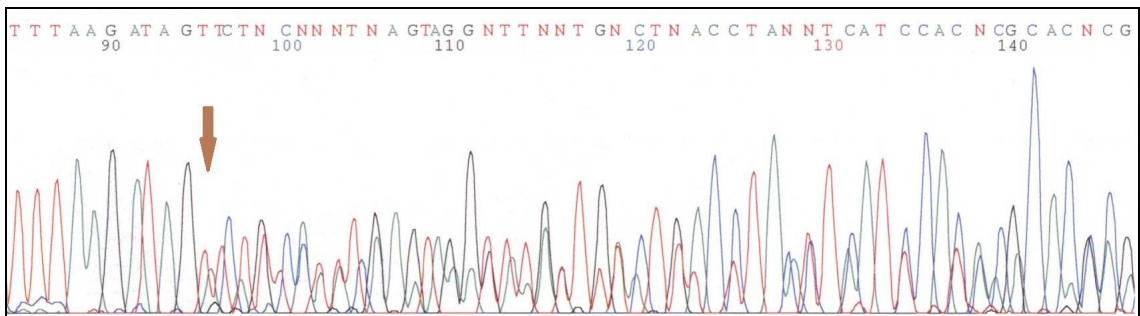
Obrázek 63 Sekvenace vzorku se záměnou c.540T>C v genu *MSH6*



Obrázek 64 Sekvence vzorku se záměnou c.3438+14A>T v genu *MSH6*



Obrázek 65 Sekvence vzorku se záměnou c.3646+91T>C (v R směru) v genu *MSH6*



Obrázek 66 Sekvence vzorku se záměnou c.3646+29_32delCTAT (v R směru) v genu *MSH6*

VI. DISKUZE

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně děděná predispozice ke vzniku kolorektálního karcinomu (CRC). Frekvence výskytu tohoto onemocnění je uváděna 1 / 10 000. Výskyt onemocnění v české populaci je odhadován na 1 / 5000-7500 osob. Důvod tohoto stavu není dosud objasněn.

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.

V testovaném souboru byli identifikováni 3 probandi s delecí celého genu *APC* včetně promotorových oblastí a 1 proband s delecí exonu 14 genu *APC*. Frekvence velkých delecí v genu *APC* v testovaném souboru činí 1,3% (4/310). 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%) [57][119][120]. Do našeho souboru však byli zařazeni všichni pacienti, u nichž byla klinickým lékařem vyslovena diagnóza FAP nebo AFAP (nebo suspektní FAP/AFAP) či mnohočetné polypózy, což může mít vliv na nižší záchyt dlouhých delecí v genu *APC* u našeho souboru (ve srovnání se zahraničními studii).

V našem souboru byly dlouhé delece genu *APC* zachyceny jen u probandů s klasickou formou FAP (tisíce polypů s časným nástupem, přítomnost CHRPE, desmoidních tumorů a osteomů, výskyt kolorektálního karcinomu nejpozději kolem 40. roku života), což je v souladu s publikovanými údaji [57][120][121]. I přes nižší frekvenci výskytu velkých delecí v genu *APC* u českých pacientů lze uzavřít, že jejich screening zvyšuje záchyt *APC* mutací u pacientů s FAP, a proto bylo navrženo, aby se stal součástí rutinního vyšetření. Tento fakt byl akceptován a vyšetření FAP pacientů na přítomnost dlouhých delecí v genu *APC* metodou MLPA se stalo v roce 2010 součástí rutinního vyšetření. Toto vyšetření se provádí 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*.

V rámci práce byli testováni na přítomnost dlouhých delecí genu *APC* také příbuzní probandek 54 a 335. Analýza u příbuzných probandky 54 potvrdila, že rozsáhlá delece genu *APC* segreguje s onemocněním. Další příbuzní byli testováni

v rámci presymptomatické diagnostiky s cílem určit jedince ve zvýšeném riziku a jedince bez příslušné genetické zátěže. Obě skupiny mohou z takového testu profitovat.

Vyšetření sestry probanda 84, oba s diagnostikovanou FAP, prokázalo stejnou delecí exonu 14 genu *APC* jako u bratra. Tyto výsledky spolu s výsledky zahraničních pracovišť dokládají, že delecí exonu 14 genu *APC* lze pokládat za příčinu onemocnění. Již v práci Aretz et al. 2005 byla metodou MLPA prokázána u jednoho probanda delece exonu 14 genu *APC*. U probanda i jeho tří bratrů byla diagnostikována klasická forma FAP [121]. Delece exonu 14 genu *APC* byla prokázána také ve studii Nielsen et al. 2007, a to u probandky s polypózou (a CRC) a výskytem mnohočetných polypů u jejích dětí a sestry [121].

Pomocí mikrosatelitových markerů byl stanoven maximální rozsah delece postihující oblast kolem genu *APC* u probandek 43 a 54. Analýza ukázala, že i v případě delecí zasahujících celý gen *APC* je rozsah delece velmi variabilní a může se lišit až o několik Mb.

Ve vyšetřeném souboru 488 nepříbuzných probandů z České republiky, kterým byla kolonoskopicky diagnostikována familiární adenomatózní polypóza či mnohočetné adenomy, bylo detekováno 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. Fenotypově se jednalo o tři probandy s FAP, 5 AFAP probandů a 2 osoby v riziku onemocnění AFAP. U dvou probandů se pro analýzu podařilo získat také vzorky střevní mukózy a u jednoho probanda též polyp.

Kódující sekvenci genu *APC* tvoří 15 exonů s alternativním sestřihem řady exonů včetně exonu 1, 2-5, 7, 9, 10A a 14 [54][123][124][125].

Provedenou analýzou *APC* transkriptu byly některé z uvedených alternativních sestřihů u probandů a/nebo kontrolních vzorků zaznamenány (např. transkript s alternativně vystřiženým exonem 2 a 3, transkript s alternativně vystřiženým exonem 9 či exonem 14).

Analýza mRNA, resp. cDNA deseti probandů s detekovanou zárodečnou variantou v genu *APC* s možným vlivem na expresi odhalila, že u sedmi probandů dochází k aberantnímu sestřihu, u jednoho probanda je změněno množství alternativně sestřihovaného produktu a u dvou probandů nebyl zjištěn žádný efekt.

U probandky 147 podmiňuje detekovaná záměna vystřižení exonu 2, u probanda 179 vystřižení exonu 4. Vlivem aberantního sestřihu v obou případech dochází

ke vzniku zkráceného proteinu. Podle Goss et al. 2002 však může vznikat protein s využitím alternativního iniciačního kodonu na pozici 184 (tj. v exonu 5) [126]. Vznikající protein tak obsahuje všechny důležité domény s výjimkou oligomerizační domény, což se pravděpodobně odráží ve skutečnosti, že oba probandi vykazují fenotyp AFAP. Aberantní vystřížení exonu 2 nebylo v kontrolních vzorcích (krev ani střevní tkáň) detekováno. Vystřížení exonu 4 nebylo prokázáno u krevních vzorků, ovšem u 2 vzorků střevní tkáně ano. Jedná se pravděpodobně o tkáňově specifický sestřih, který může přispívat k atenuované formě polypózy u probanda 179.

V rámci testování varianty, kterou nese probandka 147, bylo u probandky i kontrolních vzorků střevní mukózy detekováno několik alternativních sestřihů v oblasti exonu 1 až 4. Byl nalezen např. transkript s exonem 1 následovaný exonem 4 v kanonickém místě (detekován u všech kontrolních vzorků střevní mukózy a také v probandčině krevním vzorku, nikoli však u krevních vzorků kontrol), dále transkript s 88 nukleotidy exonu 1 následovanými 5. bází exonu 4 (detekován u všech kontrolních vzorků střevní mukózy). U vzorků střevní mukózy byly zmíněné transkripty detekovány již v roce 2007 DeRosa et al. [125].

U probanda 164 má detekovaná záměna za následek vystřížení exonu 5 a vznik kratšího proteinu o velikosti 2805 AK. Aminokyseliny 178 – 215, které chybí ve vznikajícím proteinu, nejsou dle literatury součástí žádné vazebné domény a funkce proteinu APC o velikosti 2805 AK není pravděpodobně narušena [32][51][127]. Fenotyp probanda i dalších postižených příbuzných v rodině však vykazuje známky klasické formy FAP. Možným vysvětlením je výše zmíněný fakt, že v exonu 5 se nachází alternativní start kodon uplatňující se při tkáňově specifickém sestřihu a právě tento exon je u probanda aberantně vystřížen. V rámci analýzy nebylo u kontrolních vzorků (krev ani střevní mukóza) vystřížení exonu 5 detekováno a je tudíž možné označit studovanou záměnu jako kauzální mutaci podmiňující onemocnění.

Záměna c.1548+1G>A detekovaná u probanda 11 podmiňuje vystřížení exonu 11, které vede k posunu čtecího rámce a vzniku zkráceného proteinu, který postrádá většinu domén kromě oligomerizační domény a Armadillo úseku, konkrétně části ARM 1.

Záměna c.1548+1G>T podmiňuje vznik stejného transkriptu jako u záměny c.1548+1G>A. Kromě něj byla detekována mRNA obsahující nevystřížený intron 11. Translací vzniká zkrácený protein o velikosti 526 AK, který obsahuje pouze oligomerizační doménu a část Armadillo úseku.

Obě záměny v pozici c.1548+1G jsou příčinou klasické formy polypózy diagnostikované u obou probandů, neboť vedou k aberatního sestřihu a vzniku zkráceného proteinu, který postrádá většinu vazebných domén.

Záměna c.1312+5G>A detekovaná u probanda 392 podmiňuje vznik transkriptu, který postrádá exon 9, což vede k posunu čtecího rámce a vzniku zkráceného proteinu o délce 326 AK. Tento protein obsahuje pouze oligomerizační doménu. Polypóza detekovaná u probanda je s největší pravděpodobností podmíněna detekovanou záměnou.

V probandově vzorku byl analýzou též detekován produkt s alternativně sestřiženým exonem 9. Při alternativním sestřihu exonu 9 dochází k vystřižení 303 bp na 5' konci exonu 9, přičemž do transkriptu je přepsáno zbývajících 76 bp exonu 9 označovaných jako exon 9A [54][128]. Transkripty s přepsaným kompletním exonem 9 i s jen transkribovaným exon 9A jsou běžné ve zdravé tkáni.

U probanda 295 bylo analýzou *APC* transkriptu detekováno vystřižení exonu 13. Vznikající protein postrádá 39 AK kódovaných exonem 13. Protein o délce 2804 AK postrádá část Armadillo úseku, konkrétně část ARM 2 a ARM 3. Protein APC interaguje prostřednictvím Armadillo úseku s proteiny PP2A (protein phosphatase 2A) a Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor). Fearnhead et al. 2001 publikovali, že Armadillo úsek pravděpodobně nehraje integrální úlohu v tumor supresorové funkci APC, a přesto se zdá, že u probanda 295 právě chybění malé části Armadillo úseku představuje příčinu AFAP [32].

Při analýze záměn c.1956C>T, c.1958+8T>C a 1959G>A byl detekován fragment, ve kterém chyběl exon 14. Stejný fragment byl detekován i u kontrolních vzorků. Transkript s alternativně vystřiženým exonem 14 byl poprvé popsán Sulekova et al. 1995 [124]. V roce 1997 pak Bala et al. publikovali, že transkriptu bez exonu 14 je tvořeno maximálně 5% [129].

V následné Real-Time PCR analýze bylo zjištěno, že pouze u záměny c.1956C>T je změněno množství alternativního produktu. Transkriptu s alternativně vystřiženým exonem 14 je tvořeno stejně jako produktu konstitutivního sestřihu. Záměna c.1956C>T je zodpovědná za vznik AFAP.

Vliv záměny c.1956C>T detekované u probanda 381 byl zkoumán také autory Aretz et al. 2004 [47]. Výsledkem bylo zjištění, že tato varianta dle programu ESEfinder narušuje motiv zesilovače sestřihu (ESE, exon splicing enhancer), což vede k vystřižení exonu 14.

Při analýze dlouhých delecí byla na úrovni DNA detekována u probanda 84 delece exonu 14 genu *APC*. Lze předpokládat, že při kvantitativní analýze transkriptu by bylo dosaženo stejného výsledku jako u probanda 381, tj. transkript bez exonu 14 a konstitutivní transkript by byly detekovány v poměru 1:1. U probanda 84 je však pravděpodobně deletován nejen exon 14, ale i přilehlé intronické oblasti, což může mít širší dopad a může mít tudíž vliv na fenotyp probanda, který vykazuje znaky FAP na rozdíl od probanda 381, u něhož byly zaznamenány projevy AFAP.

U záměn c.1959G>A a c.1958+8C>T nebylo při Real Time analýze zaznamenáno signifikantně změněné množství produktu alternativního sestřihu. Záměna c.1959G>A byla detekována u probanda 334 a také u probandů 296 a 333, kteří byli diagnostikováni jako FAP, ale bohužel se nepodařilo získat RNA těchto probandů.

Varianta c.1959G>A podle klinických údajů nesegreguje v rodině probanda 334 a i podle mRNA analýzy nemá vliv na transkripci genu *APC*. Stejná varianta byla popsána také u 4 probandů v práci Aretz et al. 2004 a také u ní nebyl zaznamenán žádný vliv na transkripci genu *APC* [47]. V kontrolním souboru 3 nebyla tato varianta zachycena. V současné chvíli je tato záměna v genu *APC* považována za polymorfismus, ale pro dosažení jistoty by bylo potřeba vyloučit její vliv na translaci.

Dosud nepublikovaná varianta c.1958+8C>T byla ve vyšetřovaném souboru 388 FAP/AFAP probandů detekována pouze u dvou probandů. Od obou probandů byla získána RNA. Analýza *APC* transkriptu neprokázala vliv této záměny na sestřih.

Na úrovni DNA byla následně testována frekvence výskytu této záměny u kontrolního souboru 3. Rozdíl ve frekvenci záměny u kontrolního souboru a u souboru probandů nedosáhl statistické významnosti. Na základě provedených analýz byla tato záměna označena jako polymorfismus.

Analýza *APC* transkriptu umožnila definovat funkční dopad u dosud nepopsaných záměn (včetně variant zachycených pouze v české populaci, které byly publikovány v pracích Kohoutova et al. 2002 a Stekrova et al. 2007 a připravované publikaci Schwarzova et al. 2012), případně potvrdila výsledky z práce Aretz et al. 2004 [47][130][131][132]. Osm testovaných variant bylo možné na základě analýzy *APC* transkriptu označit jako patogenní mutace.

V rámci analýzy *APC* transkriptu deseti testovaných záměn bylo odhaleno, že detekovaná záměna v sedmi případech podmiňuje vznik aberantních transkriptů (dochází k aberantnímu vystřížení některého z exonů), což v pěti případech vede

k zařazení předčasného stop kodonu. Tyto mRNA nesoucí předčasný terminační kodon však mohou podléhat degradaci, zejména při uplatnění mechanismu nonsense-mediated mRNA decay (NMD). NMD je schopen rozeznat mRNA nesoucí předčasný stop kodon a vyvolat rychlý rozpad těchto transkriptů. Mechanismus NMD funguje pouze v případě, že předčasný terminační kodon je umístěn dál než 50-54 nukleotidů od nejbližšího „upstream“ spojení exon-exon. Pokud je předčasný terminační kodon umístěn v jiné než výše zmíněné oblasti, nedochází k mechanismu NMD [133][134]. S ohledem na umístění předčasného terminačního kodonu a jeho dopad na NMD lze u probanda 11 (stop kodon je umístěn 13 nukleotidů před spojení exonu 12 a exonu 13) a probanda 392 (stop kodon je umístěn 48 nukleotidů před spojení exonu 8 a exonu 10) vyslovit domněnku, že aberantní transkripty nepodléhají rozpadu vlivem NMD a tudíž dochází k tvorbě zkráceného proteinu. Zbývající tři aberantní transkripty se pravděpodobně mechanismem NMD rozpadají.

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 zárodečnými mutacemi v genu *MUTYH* [59][104]. V kavkazské populaci byli nejčastěji zachyceny zárodečné mutace v exonu 7 (p.Tyr165Cys) a exonu 13 (p.Gly382Asp). Frekvence záchyty uvedených mutací se u jedinců s bialelickou *MUTYH* mutací pohybuje v rozmezí 70 – 100% [113][135][136][137]. Již v roce 2002 Al-Tassan et al. prokázali, že mutace v exonu 7 a exonu 13 jsou patogenní, neboť snižují aktivitu proteinu *MUTYH* k odstraňování A:G či A:8-oxoG z dvoušroubovice DNA. Navíc se obě záměny nacházejí v konzervovaných aminokyselinách [59].

Mutační analýza celého genu *MUTYH* byla provedena u 120 *APC*-negativních probandů metodou dHPLC. Ve vyšetřeném souboru byli odhaleni pouze dva probandi (proband 70 a 79) s bialelickou mutací v exonu 7 (p.Tyr165Cys) a exonu 13 (p.Gly382Asp). Fenotypy probandů 70 a 79 odpovídaly atenuované formě FAP (<100 polypů) a v jejich rodinné anamnéze nebyl zaznamenán výskyt kolorektálního karcinomu nebo mnohočetných adenomů. U probanda 79 byl diagnostikován CRC v 56 letech a podrobil se totální kolektomii. U probanda 70 byla polypóza diagnostikována v 51 letech; CRC nebyl zjištěn.

Ve srovnání s údaji mnoha zahraničních prací je frekvence záchyty bialelických 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% [105][107][114][119][138][139][140]. Rovněž v zemích vzdálených (USA, Kanada, Austrálie) kolísá množství zachycených bialelických mutací mezi 15 – 30% [141][142][143][144]. V práci japonských autorů Miyaki et al. 2005 byl výskyt bialelických mutací v genu *MUTYH* nízký (2,86%), ale nebyly zde zachyceny nejčastější mutace kavkazské populace (tj. p.Tyr165Cys a p.Gly382Asp) [145]. V práci Kim et al. 2006 nebyly bialelické mutace genu *MUTYH* u testovaného souboru 30 probandů s mnohočetnou polypózou vůbec zachyceny [146]. Z tohoto pohledu je zajímavá také práce polských autorů Skrzypczak et al. 2006, kteří testovali výskyt nejčastějších kavkazských mutací genu *MUTYH* v souboru 90 osob s výskytem FAP či AFAP, u nichž nebyla zjištěna mutace v genu *APC*, a nenalezli žádného pacienta s bialelickou mutací v genu *MUTYH*. Nejčastější mutace kavkazské populace (p.Tyr165Cys a p.Gly382Asp) zde byly nalezeny pouze v heterozygotním stavu u 13% pacientů [147].

Uvedené výsledky potvrzují dřívější předpoklad, že mohou existovat etnické rozdíly ve frekvenci bialelických mutací v genu *MUTYH* a tím i ve frekvenci autozomálně recesivně podmíněné polypózy. Zdá se, že naše země spolu s Polskem patří do skupiny zemí, které se odlišují ve frekvenci těchto mutací od ostatních evropských zemí.

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). Fenotypy těchto probandů sjednocuje nález polypózy tlustého střeva, přičemž počet polypů nepřesáhl číslo dvacet. U třech probandů byl dokonce zaznamenán výskyt CRC. Bohužel o výskytu polypózy či CRC v rodinách těchto probandů nemáme dostatek relevantních informací.

Záchyt monoalelických *MUTYH* mutací tedy v našem souboru činí 3,3%. Ve srovnání s citovanou polskou prací je záchyt heterozygotů s jednou mutovanou alelou v našem souboru podstatně nižší. Výskyt je ovšem 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 monoalelických *MUTYH* mutací 2,6% v testované skupině britských probandů, tak

studí Nielsen et al. 2005, kde činil záchyt monoalelických *MUTYH* mutací 3,5% v testované skupině nizozemských probandů [104][105][148].

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. Údaje o vlivu monoalelických mutací genu *MUTYH* na fenotyp jsou totiž kontroverzní. Existuje však řada náznaků, že mohou mít modifikující vliv na jiné genetické faktory a predisponují tak vznik onemocnění. Jenkins et al. 2006 publikovali, že nosiči monoalelické zárodečné mutace genu *MUTYH* mají 3x vyšší riziko vzniku CRC (nosiči bialelické mutace mají 50x zvýšené riziko CRC) [149]. Vliv monoalelické *MUTYH* mutace na vznik CRC však nebyl dosud jednoznačně potvrzen, což může být také způsobeno nízkou frekvencí *MUTYH* mutací u testovaných populací [110][144][150][151]. Na základě provedených studií byl vyřčen názor, že pokud tedy existuje zvýšené riziko vzniku CRC u jedinců s monoalelickou mutací genu *MUTYH*, tak se jedná o riziko malé a navíc se projeví teprve u starší populace [152].

Genetické testování zárodečných mutací v genu *MUTYH* v citovaných pracích podstatně zvyšuje záchyt mutací ve skupině pacientů s FAP/AFAP bez prokázané mutace v genu *APC*. Testování 120 českých probandů bez prokázané *APC* mutace však tento závěr nepodpořila, neboť zvýšila záchyt mutací v testované skupině jen minimálně. Jedním z důvodů může být skutečnost, že soubor je poměrně malý. Dalším důvodem může být také skutečnost, že ve skupině pacientů s atenuovanou formou polypózy je obtížné stanovit diagnózu na základě klinického obrazu. Kromě mutací v genu *APC* nebo *MUTYH* je možné nalézt i zárodečné mutace v genech MMR, které jsou příčinou hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC). Vyloučit však nelze ani účast mutací v genech, které nebyly dosud identifikovány.

V roce 2008 byl do laboratoře Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK v Praze, kde byla tato práce vypracována, zakoupen LightCycler[®]480 od firmy Roche. Tento přístroj je možné použít jako nástroj pro mutační analýzu díky vysokorozlišovací analýze křivek tání (HRM analýza).

Vzhledem k faktu, že všech 16 sekvenčních variant v genu *MUTYH* odhalených mutační analýzou na přístroji WAVE bylo možné detekovat analýzou HRM na přístroji LightCycler[®]480, byla mutační analýza genu *MUTYH* u dalších probandů ze souboru provedena na tomto přístroji. Nezanedbatelný pro toto rozhodnutí byl i fakt, že mohly být pro analýzu použity stejné primery jako u dHPLC metody. V této fázi práce došlo

ještě k jednomu podstatnému rozhodnutí vyplývajícího z dosavadních výsledků. Toto rozhodnutí vycházelo ze skutečnosti, že mezi 120 testovanými probandy byli nalezeni pouze dva probandi s bialelickou mutací v genu *MUTYH*. Tito probandi byli nosiči dvou nejčastěji se vyskytujících mutací kavkazské populace, tj. mutací v exonu 7 a exonu 13 (byli tedy složenými heterozygoty). I s ohledem na to, že mezi 16 detekovanými sekvenčními variantami se vyskytly pouze tři sekvenční varianty charakteru kauzální mutace, byla mutační analýza genu *MUTYH* u zbývajících probandů ze souboru *APC*-negativních probandů omezena jen na exon 7 a 13 s tím, že pokud bude nalezena mutace pouze v jednom z těchto exonů, bude následovat přímá sekvenace zbývajících exonů genu *MUTYH*, aby byla odhalena případná druhá mutace v tomto genu.

Tímto postupem bylo vyšetřeno 145 *APC*-negativních probandů. Mutační analýzou exonů 7 a 13 genu *MUTYH* byli detekováni čtyři probandi (proband 346, 418, 438 a 448) s mutací v exonu 7 a tři probandi (proband 274, 464 a 467) s mutací v exonu 13. Dva probandi (proband 438 a proband 448) 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 (probandi 70 a 79 byli totiž složenými heterozygoty pro mutace v exonu 7 a 13).

U probandů s jednou mutací byla proto 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 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* (mutace v exonu 7, exonu 9, exonu 13 a intronu 10) u našeho souboru byly již dříve popsány u *APC*-negativních FAP pacientů jiných národností [59][113][114]. 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.

Za příčinu mnohočetné polypózy lze u probandů 438 a 448 označit bialelickou *MUTYH* mutaci v exonu 7. Mnohočetné polypy byly diagnostikovány u probandů až po 50. roku života a v rodinné anamnéze probandů nebyla zaznamenána mnohočetná polypóza.

Proband 418 (mnohočetné polypy, karcinom konečníku v terénu polypózy ve 28 letech, negativní rodinná anamnéza) a proband 464 (mnohočetná polypóza ve vyšším věku, výskyt CRC u strýce a bratrance) jsou nositeli odlišné bialelické mutace, přesto lze u obou probandů předpokládat, že mnohočetná polypóza je u nich podmíněna právě detekovanou bialelickou *MUTYH* mutací.

Celkem byly mezi 145 testovanými probandy odhaleny 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 [105][107][114][119][138][139] [140].

U probandů 274, 346 a 467 nebyla metodou přímého sekvenování zbylých exonů genu *MUTYH* nalezena druhá zárodečná mutace. Jedná se tedy o probandy s monoalelickou mutací genu *MUTYH*. Stejně jako v případě čtyř probandů s monoalelickou *MUTYH* mutací detekovanou metodou dHPLC byla i u těchto probandů diagnostikována polypóza tlustého střeva a u probanda 346 také CRC. Ani u této skupiny probandů nemáme informace o rodinné zátěži tohoto onemocnění.

V rámci výsledků mutační analýzy genu *MUTYH* je také třeba zmínit fakt, že frekvence zachytu dvou nejčastějších kavkazských mutací v exonu 7 a exonu 13 u jedinců s bialelickou mutací dosáhla 100% (4/4) v souboru 120 *APC*-negativních probandů a 66,6% (4/6) v souboru 145 *APC*-negativních probandů. Tyto hodnoty jsou v souladu s publikovanými daty [104][113][135][136][137].

MUTYH – asociovaná polypóza je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Vzhledem k recesivnímu typu dědičnosti jsou detekované bialelické mutace u probandů 70, 79, 418 a 464 jednoznačně kauzální pouze v případě, že se mutace nacházejí na chromozomech v pozici trans. Vzájemnou polohu identifikovaných mutací lze ověřit vyšetřením dětí probandů, případně vyšetřením dosud žijících rodičů. Přes usilovnou snahu se bohužel nepodařilo získat DNA dětí těchto probandů a ověřit, zda detekované bialelické mutace leží v pozici trans.

Na základě dosažených výsledků mutační analýzy genu *MUTYH* bylo v roce 2011 do rutinní praxe zavedeno vyšetření exonu 7 a exonu 13 genu *MUTYH* metodou

HRM u těch FAP/AFAP probandů, u kterých nebyla nalezena zárodečná mutace v genu *APC* metodou DGGE ani detekována dlouhá delece v genu *APC* metodou MLPA.

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. Smyslem testování haplotypu bylo zjistit, zda existuje haplotyp, který by byl pro rozvoj onemocnění predispoziční. Odhadnuté haplotypy v souboru probandů i kontrol dosáhly srovnatelných hodnot. Nebyl tedy nalezen žádný haplotyp, který by měl vyšší frekvenci u probandů a byl tak pro dané onemocnění predispoziční.

Frekvence recesivních alel testovaných variant v souboru probandů se příliš nelišila od jejich frekvencí v jiných populacích [59][105][109][110]. 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.

Hardy-Weinbergova rovnováha byla v souboru probandů i v populačním souboru pro všechny testované záměny zachována. Následná statistická analýza 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.1435–40 G>C) u souboru probandů i kontrol. 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; vazba však může být časem narušena a postupně zcela vymizet). 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.

S ohledem na již dříve zmíněnou skutečnost týkající se obtížné klinické diagnózy u AFAP a skutečnosti, že u pacientů s tímto onemocnění byly nalezeny také zárodečné mutace v MMR genech, bylo studováno propojení drah BER a MMR. Bylo zjištěno, že protein *MUTYH* spolupracuje s proteiny opravného systému MMR, konkrétně interaguje s heterodimerem hMSH2/hMSH6 prostřednictvím proteinu MSH6, čímž je stimulována glykosylázová aktivita proteinu *MUTYH* [77][153]. V roce 2006 navíc Niessen et al. vyslovili myšlenku, že monoalelická *MUTYH* mutace může přispívat ke vzniku rakoviny u nosičů mutace MMR genů, zejména *MSH6* genu [109].

Na podkladě těchto znalostí 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, stejně jako v případě studií Kolodner et al. 1999 a Vahteristo et al. 2005 [117][118]. Detekované záměny se nacházely jak v exonech, tak v intronech genu *MSH6*. Až na čtyřbázovou delecii v intronu 7 se ve všech případech jednalo o jednonukleotidové záměny. 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 (šest probandů) není možné vytvořit jednoznačný názor, i když je zajímavé, že bylo detekováno tolik polymorfismů v *MSH6* genu u jednotlivých probandů s monoalelickou mutací genu *MUTYH*.

Na závěr lze konstatovat, že v rámci této práce byly naplněny cíle, neboť ve skupině FAP/AFAP probandů bez detekované zárodečné mutace v genu *APC* došlo

k navýšení odhalení genetické příčiny onemocnění, a to díky testování dlouhých delecí v genu *APC* (>1%) a také mutační analýze genu *MUTYH* (>2%).

Vyšetření dlouhých delecí v genu *APC* metodou MLPA a mutační analýza exonu 7 a exonu 13 genu *MUTYH* metodou HRM analýzy byly na základě této práce zavedeny do rutinní praxe. Navíc zmíněné metody umožňují presymptomatickou diagnostiku příbuzných v rodině, což je možné podložit zejména výsledky MLPA analýzy u příbuzných probandů s detekovanou dlouhou delecí v genu *APC*.

Dosažené výsledky také potvrdily fakt, že mezi populacemi existují značné rozdíly ve frekvenci detekovaných mutací. U testovaných probandů české národnosti byli s nižší frekvencí nalezeny nejen dlouhé delece v genu *APC* ale i zárodečné mutace v genu *MUTYH*.

Ač provedená vyšetření navýšila procento odhalené genetické příčiny u testovaných probandů, stále zůstává u části probandů genetická příčina onemocnění neodhalena a bude předmětem dalšího výzkumu.

Testování detekovaných *APC* variant na úrovni transkripce umožnilo přesněji definovat dopad těchto variant a také potvrdilo, že při posuzování nově detekované varianty nelze vycházet pouze z predikovaného vlivu na úrovni proteinu, ale je vhodné záměnu otestovat alespoň analýzou transkriptu. Je jisté, že by bylo vhodné pokračovat *in vitro* analýzou v buněčných kulturách, stejně jako vždy vyšetřit segregaci záměny s fenotypem.

Mutační analýza genu *MSH6* u probandů s monoalelickou zárodečnou mutací v genu *MUTYH* nevniesla do problematiky jednoznačné výsledky, ale spíše ukázala možný další směr výzkumu.

VII. SHRnutí

Tato práce byla vypracována na ÚBLG 1.LF UK a VFN v Praze. Cílem práce bylo objasnění genetických příčin u probandů s FAP/AFAP bez detekované zárodečné mutace v genu *APC*.

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 vliv detekovaných zárodečných variant na expresi genu *APC*. Všechny testované zárodečné varianty se nacházely v místě střihu nebo jeho blízkém okolí, a proto u nich byla vyslovena hypotéza, že ovlivňují právě 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 populaci byly nalezeny jen čtyři různé 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 zhruba o 2%.

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.

VIII. LITERATURA

1. Nádory tlustého střeva a konečníku [online]. [cit 9.3.2009]. Dostupné z: <http://www.mou.cz>
2. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. [cit 25.3.2009]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>
3. Vyzula, R. Kolorektální karcinom – vedoucí pozice v incidenci na světě, významný zdravotní problém České republiky [online]. [cit 6.4.2012]. Dostupné z: http://www.mojemedicina.cz/files/leciva/jine-soubory/avastin/kolorektalni_karcinom_-_vedouci_pozice_v_indcidenci_na_svete.pdf
4. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N Engl J Med.* 2000; 343: 78-85.
5. Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 2003; 124(6): 1574-1594.
6. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary an familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun; 138(6): 2044-2058.
7. Shibata D, Aaltonen LA. Genetic predisposition and somatic diversification in tumor development and progression. *Adv Cancer Res.* 2001; 80: 83-114.
8. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009 Oct 12; 4: 22.
9. Narayan S, Roy D. Role of *APC* and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer.* 2003; 2: 41.
10. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.

11. Mecklin JP, Peltomäki P. Genetic changes associated with colon tumor development. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae* 2000; 89: 211-215.
12. Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet.* 2006; 51(5): 391-396.
13. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-767.
14. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010 May; 31(2): 31-38.
15. Tan WY, Yan XW. A new stochastic and state space model of human colon cancer incorporating multiple pathways. *Biol Direct.* 2010; 5: 26.
16. Jang E, Chung DC. Hereditary Colon Cancer: Lynch Syndrome. *Gut Liver.* 2010 June; 4(2): 151-160.
17. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary non-polyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 830-838.
18. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011 Feb 14: 1-19.
19. Klener P, Klener P jn. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* Praha: Grada, 2010, str. 48.
20. Beggs AD, Hodgson SV. The Genomics of Colorectal Cancer: State of the Art. *Curr Genomics.* 2008 March; 9(1): 1-10.
21. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-130.

22. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009 December 17; 361(25): 2449-2460.
23. Cherry LM. The genetic etiology of familial and nonfamilial colorectal cancer. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2011 April; 24(2): 139-141.
24. Noffsinger AE. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009; 4: 343-364.
25. Legget B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138: 2088-2100.
26. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology.* 2011; 42: 1-10.
27. Goel A, Boland CR. Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 January; 26(1): 47-52.
28. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer.* 2009; 8: 102.
29. Manne U, Shanmugam Ch, Bovell L, Katkoori VR, Bumpers HL. miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. *Biomark Med.* 2010 October; 4(5): 761-770.
30. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997 Dec 15; 11(24): 3286-3305.
31. Albuquerque C, Bakker ER, van Veelen W, Smits R. Colorectal cancers choosing sides. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Dec; 1816(2): 219-231.
32. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr; 10(7): 721-733.

33. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008 Jul 15; 68(14): 5795-5802.
34. DeSano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. *AAPS J.* 2009 Dec; 11(4): 682-692.
35. Davis-Dusenbery BN, Hata A. MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes Cancer.* 2010 November; 1(11): 1100-1114.
36. Panarelli NC and Yantiss RK. MicroRNA Expression in Selected Carcinomas of the Gastrointestinal Tract. *Patholog Res Int.* 2011 Feb 13; 2011: 124608.
37. Borralho PM, Simões AES, Gomes SE, et al. miR-143 Overexpression Impairs Growth of Human Colon Carcinoma Xenografts in Mice with Induction of Apoptosis and Inhibition of Proliferation. *PLoS ONE* 2011; 6(8): e23787.
38. Holubec L. Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby. Praha: Grada Publishing, 2004. 175 s.
39. Arnold CA, Montgomery E, Iacobuzio-Donahue CA. The serrated pathway of neoplasia: new insights into an evolving concept. *Diagnostic Histopathology* 2011; 17: 367-375.
40. Zbuk KM, Eng C. Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007 Sep; 4(9): 492-502.
41. Lal G, Gallinger S. Familial adenomatous polyposis. *Semin Surg Oncol.* 2000 Jun; 18(4): 314-323.
42. Manfredi M. Hereditary hamartomatous polyposis syndromes: understanding the disease risks as children reach adulthood. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2010 Mar; 6(3): 185-196.

43. Puchmajerová A, Vasovčák P, Křepelová A. Peutz-Jeghersův syndrom. *Klin Onkol* 2009; 22(Suppl): S36-S37.
44. Puchmajerová A, Vasovčák P, Křepelová A, Plevová P. Cowdenův syndrom. *Klin Onkol* 2009; 22(Suppl): S56-S57.
45. Lipton LR, Johnson V, Cummings C, et al. Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. *J Clin Oncol*. 2004 Dec 15; 22(24): 4934-4943.
46. European Medicines Agency. Public summary of positive opinion for orphan designation of celecoxib for the treatment of Familial Adenomatous Polyposis (FAP). [online]. [cit 15.6.2010]. Dostupné z: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/026404en.pdf>
47. Aretz S, Uhlhaas S, Sun Y, et al. Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat*. 2004 Nov; 24(5): 370-380.
48. Aretz S, Stienen D, Friedrichs N et al. Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mutat*. 2007 Oct; 28(10): 985-992.
49. Hes FJ, Nielsen M, Bik EC, et al. Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut*. 2008 Jan; 57(1): 71-76.
50. Kastrinos F, Syngal S. Recently identified colon cancer predispositions: *MYH* and *MSH6* mutations. *Semin Oncol*. 2007 October; 34(5): 418-424.
51. Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*. 2000 May; 18(9): 1967-1979.
52. Sieber OM, Tomlinson IP, Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor-genetics, function and disease. *Mol Med Today*. 2000 Dec; 6(12): 462-469.

53. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. 1987 Aug 13-19; 328(6131): 614-616.
54. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9; 66 (3): 589-600.
55. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991 Aug 9; 253 (5020): 661-665.
56. Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A, et al. Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med*. 2008; 6: 10.
57. Sieber OM, Lamlum H, Crabtree M, et al. Whole-gene *APC* deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or „multiple“ colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 March 5; 99(5): 2954-2958.
58. Heinimann K, Thompson A, Locher A, et al. 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.
59. 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.
60. Arnold CN, Goel A, Niedzwiecki D, et al. 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.
61. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*. 2000 Aug 15; 60(16): 4366-4371.

62. Zare M, Jazii FR, Alivand MR, Nasser NK, Malekzadeh R, Yazdanbod M. Qualitative analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter: hypermethylation, engagement and effects on survival of patients with esophageal cancer in a high risk region of the world, a potential molecular marker. *BMC Cancer*. 2009 Jan 17; 9: 24.
63. Jones S, Emmerson P, Maynard J, et al. Biallelic germline mutations in *MYH* predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum. Mol. Genet*. 2002; 11: 2961-2967.
64. 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.
65. 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.
66. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, Fujiwara T, Nakabeppu Y. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res*. 2000 Mar 15; 28(6): 1355-1364.
67. Slupska MM, Luther WM, Chiang JH, Yang H, Miller JH. Functional Expression of hMYH, a Human Homolog of the *Escherichia coli* MutY Protein. *J Bacteriol*. 1999 October; 181(19): 6210-6213.
68. Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet*. 2003 Oct 15; 12 Spec No 2:R159-165.
69. Takao M, Zhang QM, Yonei S, Yasui A. Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 1999 September 15; 27(18): 3638-3644.

70. Parker AR, Eshleman JR. Human MutY: gene structure, protein functions and interactions, and role in carcinogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Oct; 60(10): 2064-2083.
71. Yang H, Clendenin WM, Wong D, et al. Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch. *Nucleic Acids Res.* 2001 Feb 1;29(3):743-752.
72. Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, Hes FJ. MUTYH-associated polyposis (MAP) *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011 Jul;79(1):1-16.
73. Kairupan C, Scott RJ. Base excision repair and the role of MUTYH. *Hered Cancer Clin Pract.* 2007 Dec 15;5(4):199-209.
74. Out AA, Tops CM, Nielsen M, et al. Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene. *Hum Mutat.* 2010 Nov; 31(11): 1205-1215.
75. Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP. MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug; 33(Pt 4): 679-683.
76. Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS, McCullough AK. hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res.* 2001 July 1; 29(13): 2802-2809.
77. van Puijenbroek M, Nielsen M, Reinards TH, et al. The natural history of a combined defect in MSH6 and MUTYH in a HNPCC family. *Fam Cancer.* 2007; 6(1): 43-51.
78. Giovannucci E, Martinez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1717-1730.

79. Sæbø M, Skjelbred CF, Breistein R, et al. Association between cigarette smoking, *APC* mutations and the risk of developing sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer*. 2006; 6: 71.
80. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol*. 2002;3:461-469.
81. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity and cancer risk. *Lancet Oncol*. 2002;3:565-574.
82. Hines RB, Shanmugam C, Waterbor JW, et al. Effect of Comorbidity and Body Mass Index on Colon Cancer Survival of African American and Caucasian Patients. *Cancer*. 2009 December 15; 115(24): 5798–5806.
83. Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011; 29 (2): 222-228.
84. Nahleh Z, Bhatti NS, Mal M. How to reduce your cancer risk: mechanisms and myths. *Int J Gen Med*. 2011; 4: 277-287.
85. Goodwin PJ. Insulin in the adjuvant breast cancer setting: a novel therapeutic target for lifestyle and pharmacologic interventions? *J Clin Oncol*. 2008; 26: 833-834.
86. Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiological evidence and biological mechanism. *J Nutr*. 2002; 132 (11 Suppl): 3456S-3464S.
87. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100:611-616.
88. Slattery ML. Physical activity and colorectal cancer. *Sports Medicine*. 2004; 34: 239-252.

89. Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, et al. Diet and Cancer. *Acta Biomed.* 2006; 77: 118-123.
90. Dong LM, Ulrich CM, Hsu L, et al. Vitamin D Related Genes, *CYP24A1* and *CYP27B1*, and Colon Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 September; 18(9): 2540-2548.
91. Connelly-Frost A, Poole C, Satia JA, Kupper LL, Millikan RC, Sandler RS. Selenium, Folate, and Colon Cancer. *Nutr Cancer.* 2009; 61(2): 165-178.
92. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 149-156.
93. Gordon PH. Screening for colorectal carcinoma. *Curr Oncol.* 2010 Apr; 17(2): 34-39.
94. Test na okultní krvácení [online]. [cit 12.1.2009]. Dostupné z: <http://www.vzp.cz/klienti/programy-prevence/preventivni-prohlidky/test-okultniho-krvaceni-do-stolice-toks>
95. Kolonoskopie [online]. [cit 12.1.2009]. Dostupné z: <http://www.vzp.cz/klienti/programy-prevence/preventivni-prohlidky/kolonoskopie>
96. Irigografie [online]. [cit 12.1.2009]. Dostupné z: <http://www.kolorektalni-karcinom.cz/irigografie>
97. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale -update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003; 124: 544-560.
98. 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.

99. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. *Nucl Acid Res.* 1988; 16: 1215.
100. Validation of the MLPA method by EuroGentest [online]. [cit 25.10.2012].
Dostupné z:
http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit5/MLPA_validation_study_NoE_EuroGentest.xhtml
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348(9): 791-799.
105. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, et al. 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.
106. Peterlongo P, Mitra N, Chuai S, et al. Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MYH. *Int J Cancer* 2005; 114(3): 505-507.
107. Isidro G, Laranjeira F, Pires A, et al. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat* 2004; 24(4): 353-364.

108. Al-Tassan N, Eisen T, Maynard J, et al. Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma. *Hum Genet* 2004; 114(2): 207-210.
109. Niessen RC, Sijmons RH, Ou J, et al. MUTYH and the mismatch repair system: partners in crime? *Hum Genet* 2006; 119(1-2): 206-211.
110. Peterlongo P, Mitra N, Sanchez de Abajo A, et al. Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis*, 2006, 27: 2243-2249.
111. 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.
112. 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.
113. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet*. 2003 Jul 5; 362(9377): 39-41.
114. Aceto G, Curia MC, Veschi S, et al. Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat*. 2005 Oct; 26(4): 394.
115. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005; 1: 47-50.
116. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics* 2003; 1:7-19.
117. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res*. 1999 Oct 15; 59(20): 5068-5074.

118. Vahteristo P, Ojala S, Tamminen A, et al. No MSH6 germline mutations in breast cancer families with colorectal and/or endometrial cancer. *J Med Genet.* 2005 Apr; 42(4): e22.
119. Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, et al. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5651-5659.
120. Michils G, Tejpar S, Thoelen R, et al. 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.
121. Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, et al. Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J Med Genet.* 2005; 42: 185-192.
122. Nielsen M, Bik E, Hes FJ, et al. Genotype-phenotype correlations in 19 Dutch cases with APC gene deletions and a literature review. *Eur J Hum Genet.* 2007 Oct; 15(10): 1034-1042.
123. Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum Mol Genet.* 1993 Mar; 2(3): 283-287.
124. Sulekova Z, Ballhausen WG. A novel coding exon of the human adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet.* 1995 Oct;96(4):469-71.
125. De Rosa M, Morelli G, Cesaro E, et al. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in the regulation of a new adenomatous polyposis coli transcript. *Gene.* 2007 Jun 15; 395(1-2): 8-14.
126. Goss KH, Trzepacz C, Tuohy TM, Groden J. Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11; 99(12): 8161-8166.

127. Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM. Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer*. 2011 Aug 22;10:101.
128. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*. 1991 Aug 9; 66(3): 601-613.
129. Bala S, Sulekova Z, Ballhausen WG. Constitutive APC exon 14 skipping in early-onset familial adenomatous polyposis reveals a dramatic quantitative distortion of APC gene-specific isoforms. *Hum Mutat*. 1997; 10(3): 201-206.
130. 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.
131. Stekrova J, Sulova M, Kebrdlova V, et al. Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med Genet*. 2007; 8: 16.
132. Schwarzova L, Stekrova J, Florianova M, et al. Novel mutations of the APC gene in the Czech FAP families and genetics consequences of splicing mutations. *Fam Cancer*. V recenzním řízení.
133. Lejeune F, Maquat LE. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Jun; 17(3): 309-315.
134. Silva AL, Romão L. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett*. 2009 Feb 4; 583(3): 499-505.
135. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, et al. Proportion and Phenotype of MYH-Associated Colorectal Neoplasia in a Population-Based Series of Finnish Colorectal Cancer Patients. *Am J Pathol*. 2003 September; 163(3): 827-832.

136. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, et al. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer*. 2004 May 1;109(5):680-684.
137. Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C, et al. Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet*. 2009 Jun 16;10:57.
138. Russell AM, Zhang J, Luz J, et al. Prevalence of *MYH* germline mutations in Weiss *APC* mutation-negative polyposis patients. *Int J Cancer*. 2006; 118: 1937-1940.
139. Lefevre JH, Rodrique CM, Mourra N, et al. Implication of MYH in colorectal polyposis. *Ann Surg*. 2006; 244: 874-879.
140. Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, et al. Novel findings in Swedish patients with MYH associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4: 499-506.
141. Jo WS, Bandipalliam P, Shannon KM, et al. Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3: 1022-1028.
142. Croitoru ME, Cleary SP, Berk T, et al. Germline MYH mutations in a clinic-based series of Canadian multiple colorectal adenoma patients. *J Surg Oncol*. 2007 May 1; 95(6): 499-506.
143. Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R, et al. 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.
144. Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, et al. MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology*. 2004 Jul; 127(1): 9-16.

145. Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, et al. Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat Res.* 2005; 578: 430-433.
146. Kim H, Kim HJ, Chi SG, et al. Absence of MutY homologue mutation in patients with multiple sporadic adenomatous polyps in Korea. *World J Gastroenterol.* 2006 Feb 14; 12(6): 951-955.
147. Skrzypczak M, Podralska M, Heinritz W, et al. *MYH* gene status in Polish FAP patients without *APC* gene mutations. *Hered Cancer Clin Pract.* 2006 Jan 15; 4(1): 43-47.
148. Nielsen M, Franken P, Reinards T, et al. 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.
149. Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N, et al. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Feb; 15(2): 312-314.
150. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 112-119.
151. Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ, et al. Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 May; 40(1): 1-9.
152. Worthley DL, Suthers G, Lipton L. Management of MUTYH-associated neoplasia in Australia. *Intern Med J.* 2008 Aug; 38(8): 644-650.
153. Bai H, Jones S, Guan X, et al. Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(2): 597-604.