

DIAGNOSTIKA FAMILIÁRNEJ ADENOMATÓZNEJ POLYPÓZY NA ÚROVNI DNA

MEGO M.

DIAGNOSIS OF FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS ON THE DNA LEVEL

ODBORNÝ ŠKOLITEL: ZAJAC V., ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLÓGIE SAV, BRATISLAVA

Background: Familial adenomatous polyposis is an autosomal dominant precancerous condition, characterized by the appearance of hundreds to thousands of colorectal polyps. Mutation of the APC gene located on 5q21-22 plays the major role in its etiology.

Objective: Diagnoses and genetic prognosis of 7 persons of a family with previous case of FAP using combination of two molecular methods-heteroduplex and linkage analysis.

Methods: In heteroduplex analysis (HDA) the E-G region of the 15 exon of the APC gene was amplified using PCR. PCR products were then loaded on nondenaturing polyacrylamid gele and visualised by silver staining. In linkage analysis we used linkage between pathologic alele of the APC gene and MspI polymorphism.

Results: Using heteroduplex analysis an identical mutation in two persons in suspected region was detected and linkage analysis revealed that pathologic alele of APC gene in one person is linked to B2 alele of MspI polymorphism. For the second person the linkage analysis was not informative.

Conclusions: Using these methods presymptomatic diagnostics of FAP, genetic prognosis and detection of persons at high risk have become available. Comparing to classical diagnostics these methods are quick, exact not embarrassing for the patient and it is not necessary to repeat them. (Fig. 3, Ref. 13.)

Key words: FAP, APC gene, HDA, linkage analysis.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 543-545

Familiárna adenomatózna polypóza je autozomálne dominantné prekancerózne ochorenie prejavujúce sa výskytom veľkého množstva polypov (100-1000) v celom rozsahu hrubého čreva (Bussey, 1975). Polypy sa objavujú najčastejšie medzi 10. až 30. rokom života, pričom vo veku nad 40 rokov je takmer 100 % riziko vzniku kolorektálneho karcinómu. Penetrancia pri FAP je

Pozadie problému: Familiárna adenomatózna polypóza (FAP) je autozomálne dominantné ochorenie prekancerózneho charakteru vyznačujúce sa vytvorením 100-1000 kolorektálnych polypov. V jej etiológii majú významnú úlohu mutácie APC génu lokalizovaného v oblasti 5q21-22.

Ciel: Diagnostika a genetická prognóza 7 členov rodiny s výskytom FAP kombináciou dvoch molekulárnych metód - heteroduplexnej a väzbovej analýzy.

Metódy: Pri heteroduplexnej analýze (HDA) bola pomocou PCR amplifikovaná E-G oblasť 15. exónu génu APC. Produkty reakcie sa podrobili elektroforéze na nedenurovanom polyakrylamidovom géli a vizualizovali impregnáciou striebrom. Pri väzbovej analýze sa využila väzba medzi patologickou alelou génu APC a MspI polymorfizmom.

Výsledky: Pomocou HDA sa v sledovanej oblasti odhalila identická mutácia u dvoch jedincov vyšetrovanej rodiny. Väzbová analýza ukázala, že patologická alela génu APC je u jedného z postihnutých viazaná s alelou B2 MspI polymorfizmu. U druhého postihnutého nebolo možné určiť väzbu pre neúplnú informativnosť rodiny.

Záver: Použitie týchto metód umožnilo presymptomatickú diagnostiku FAP, uskutočnenie genetickej prognózy a odlišenie vysokorizikových jedincov od jedincov s malým rizikom ochorenia. V porovnaní s klasickou diagnostikou sú použité metódy rýchlejšie, presné, pacienta prakticky nezaťažujú a netreba ich opakovať. (Obr. 3, lit. 13.)

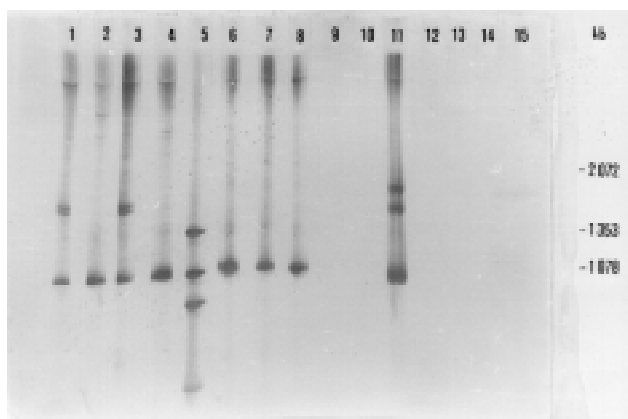
Kľúčové slová: FAP, gén APC, HDA, väzbová analýza.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 10, s. 543-545

takmer 100 %, čo znamená, že prakticky každý nositeľ alterovanej alely je postihnutý (Mahrer a spol., 1993).

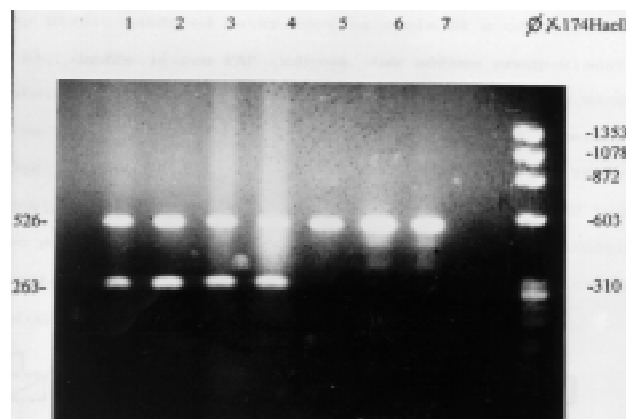
Ochorenie sprevádzajú často aj extrakolonické manifestácie, napríklad epidermoidné cysty, osteómy, desmoidné tumory a kongenitálna hypertrofia pigmentového epitelu retiny (CHRPE) vyskytujúca sa až u 75 % postihnutých (Gardner a spol., 1957; Traboulsi a spol., 1987; Polkinghorne a spol., 1990).

Významnú úlohu v jej etiológii majú zárodočné mutácie génu APC (adenomatous polyposis coli gene). Gén APC je tumor supresorový gén lokalizovaný na dlhom ramene 5. chromozómu v ob-



Obr. 1. Heteroduplexná analýza. Dráhy 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – vzorky analyzovaných jedincov. Dráha 5 – marker •X174 štiepený HaeIII, dráha 11 – pozitívna kontrola.

Fig. 1. Heteroduplex analysis. Lanes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – samples of analyzed individuals. Lane 5 – size marker HaeIII-digested DNA of •X174, lane 11 – positive control,



Obr. 2. Väzbová analýza pomocou MspI polymorfizmu. Dráhy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – vzorky analyzovaných jedincov. Dráha 8 – •X174 štiepený HaeIII.

Fig. 2. Linkage analysis using MspI polymorphism. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – samples of analyzed individuals. Lane 8 – size marker HaeIII-digested DNA of •X174.

lasti 5q21-22 (Grodén a spol., 1991; Kinzler a spol., 1991). Zárodokové mutácie v géne APC nie sú rovnomerne distribuované, ale až 70 % týchto mutácií je lokalizovaných na 5'-konci exónu 15 v oblasti medzi kodónmi 713–1597 (Miyoshi a spol., 1992).

Pri terapii FAP sa profylakticky chirurgicky odstraňuje celé hrubé črevo ako prevencia vytvorenia kolorektálneho karcinómu (Bussey a spol., 1985). Diagnostiku pri FAP môžeme rozdeliť na klasickú a molekulárnogenetickú. Klasická diagnostika, zahŕňajúca predovšetkým endoskopické vyšetrenia, umožňuje odhaliť jedincov s rizikom FAP až v symptomatickom štádiu. To znamená, že vyšetrený musí byť každý ohrozený príbuzný probanda, resp. postihnutej osoby. Vyšetrenia treba navyše opakovať v intervaloch 1 až viac rokov najčastejšie od 10. po 40. rok života.

Molekulárnogenetické metódy založené na detekcii mutácií génu APC umožňujú diagnostiku FAP v presymptomatickom, ba dokonca v prenatalnom štádiu. V porovnaní s klasickými sú rýchle, presné, pacienta prakticky nezaťažujú (na vyšetrenie stačí 8 ml venóznej krvi) a netreba ich opakovať. Ich hlavný prínos je v tom, že umožňujú odlišiť vysokorizikových jedincov od jedincov s malým rizikom FAP. Vysokorizikovní jedinci sa však naďalej vyšetrujú metódami klasickej diagnostiky až po klinickú manifestáciu ochorenia.

Cieľom tejto práce bola diagnostika 7 členov rodiny s podozrením FAP na základe klinických vyšetrení využitím dvoch molekulárných metód – heteroduplexnej a väzbovej analýzy.

Materiál a metódy

Predmet štúdie a izolácia genomickej DNA

Predmetom štúdie bola diagnostika 7 členov rodiny. FAP pozitívny proband (1) bol identifikovaný na základe klinických vyšetrení (kolorektálny karcinóm, CHRPE). Rodokmeň tejto rodiny je na obrázku 3. Na diagnostiku sa použila genomická DNA izolovaná z lymfocytov periférnej krvi fenolovo-chloroformovou metódou (Maniatis a spol., 1982).

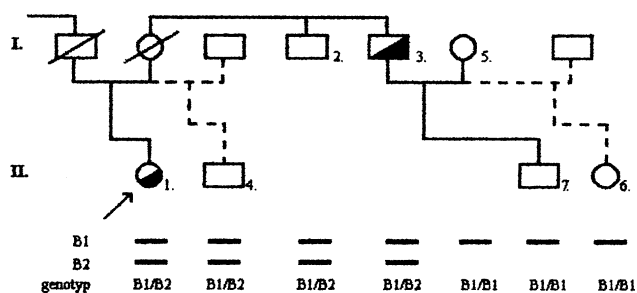
Heteroduplexná analýza – HDA

Pomocou PCR bola amplifikovaná oblasť exónu 15 génu APC s veľkosťou asi 1070 bp ohraničená primermi 5'AGT CTT AAA TAT TCA GAT GAG CAG 3' a 5'ATG AGT GGG GTC TCC TGA AC 3', ktoré sú identické s primermi 15E FOR a 15G REV podľa Grodena a spol. (1991). Genomická DNA (160 ng) bola amplifikovaná v celkovom objeme PCR zmesi 25 mmml. Táto zmes obsahovala: 5 pmol primeru 15E FOR, 5 pmol primeru 15G REV, 10xPCR tlmivý roztok 1 mM obsahujúci Mg²⁺ (Promega), 20 mM dNTP, 0,5 U Taq polymerázy (Promega). PCR podmienky: 5 min 94 °C, 5 min 80 °C. Následne 35 cyklov (1 cyklus = 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min). PCR produkt sa stabilizoval pri 72 °C 10 min. Nasledoval cyklus denaturácie pri 94 °C počas 10 minút a heteroduplexy sa formovali pri 60 °C počas 60 minút. Na elektroforézu sa použil 9,8 % nedenaturujúci polyakrylamidový gél. Elektroforéza prebiehala 4,5 hodiny pri 1 V/cm. DNA-fragmenty sa vizualizovali farbením striebrom (Friedl a spol., 1993; Kirchhoff a spol., 1997).

Väzbová analýza FAP pomocou intragénového MspI polymorfizmu

MspI reštriktáza vytvára v exóne 15 génu APC dva nezávislé dvojelektické polymorfizmy s alelami A1,2, resp. B1,2 (Cottrell a Bodmer, 1992). Na nepriamu diagnostiku sa použil druhý polymorfizmus. Alely boli detegované pomocou PCR.

Amplifikovaný bol úsek 15. exónu génu APC s výskytom polymorfizmu s veľkosťou 526 bp, v strede ktorého sa nachádza cieľová sekvencia pre MspI. Úsek je ohraničený primermi 5'ATG ATG TTG ACC TTT CCA GGG 3' a 5'CTT TTT TGG CAT TGC GGA GCT 3', ktoré sú identické s primermi 15M FOR a 15N REV podľa Grodena a spol. (1991). Zloženie PCR zmesi bolo rovnaké ako pri HDA (pozri vyššie). PCR-podmienky: 5 min 94 °C, 5 min 80 °C. Následne 35 cyklov (1 cyklus = 94 °C 1 min, 55 °C 1,5 min, 72 °C 1,5 min). Stabilizácia PCR produktu pri 72 °C 10 min. PCR-produkt bol štiepený MspI reštriktázou s aktivitou 10 U/mmml 16 h pri izbovej teplote. Štiepne pro-



Obr. 3. Rodokmeň vyšetrovanej rodiny s výsledkami analýz.
Fig. 3. Pedigree of examined family with the results of analyses.

dukty sa podrobili elektroforéze na 1,5 % agarózovom géli 4 hodiny pri prúde 85 mA.

Výsledky

Heteroduplexná analýza

Cieľom HDA bola priama detekcia mutácií v exóne 15 génu APC v oblasti E-G. Výsledky tejto analýzy sú na obrázku 1.

Heteroduplexy sa vytvorili u dvoch členov analyzovanej rodiny v dráhe 1 a 3 a u pozitívnej kontroly v dráhe 11. Z mobility heteroduplexov môžeme predpokladať, že sú spôsobené rovnakým typom mutácie, ktorý je však odlišný od mutácie v prípade pozitívnej kontroly. Na základe urobenej analýzy môžeme konštatovať, že z vyšetrených členov rodiny sú dvaja (1, resp. 3) heterozygoti pre FAP. Ostatní analyzovaní jedinci nie sú postihnutí a v sledovanej oblasti APC génu nemajú deléciu ani posunovú mutáciu.

Nepriama diagnostika FAP pomocou MspI polymorfizmu

Cieľom nepriamej diagnostiky FAP pomocou MspI polymorfizmu bolo zistiť väzbu medzi patologickou alelou génu APC a MspI polymorfizmom za účelom genetickej prognózy. Výsledky tejto analýzy je na obrázku 2.

Vo vzorkách 1–4 môžeme pozorovať 2 fragmenty. Prvý má veľkosť 526 bp a zodpovedá alele RFLP, ktorá nemá reštrikčné miesto pre MspI (alela B1). Druhý fragment s veľkosťou približne 263 bp zodpovedá alele RFLP obsahujúcej cieľovú sekvenciu pre použitú reštriktažu (alela B2). Vo vzorkách 5–7 môžeme pozorovať len jeden fragment s veľkosťou 526 bp. Na základe tejto analýzy môžeme povedať, že jedinci 1–4 sú heterozygoti pre použité RFLP s genotypom B1/B2 a jedinci 5–7 sú homozygoti s genotypom B1/B1.

Diskusia

Využitím poznatkov získaných pri heteroduplexnej analýze môžeme zistiť, ktorá alela RFLP je vo väzbe s patologickou alelou génu APC obsahujúcou mutáciu. Jediniec 1 (proband) je heterozygot z hľadiska FAP, ako aj pre RFLP, no na základe tejto analýzy nemožno s určitou povedať, ktorá alela RFLP je vo väzbe s mutovanou alelou génu APC. Možno to však určiť u jedinca 3, ktorý je tiež heterozygot pre RFLP (obr. 3). Jeho manželka (5) má genotyp B1/B1 a z hľadiska FAP je zdravá, ako aj ich syn (7). Môžeme teda predpokladať, že patologická alela génu APC je u jedinca 3 vo väzbe s alelou B2 RFLP. Jediniec 2, brat jedinca 3, má s ním rovnaký genotyp RFLP, ale je z hľadiska FAP zdravý. Túto skutočnosť mož-

no vysvetliť tým, že obaja ich rodičia mali genotyp B1/B2 a jedinec 2 zdedil B2 alelu od nepostihnutého rodiča. U ďalších členov sledovanej rodiny nemožno urobiť presnú väzbovú analýzu, pričom na zvýšenie informatívnosti rodiny by bolo potrebné analyzovať väčší počet jej členov. Táto analýza však ukázala, že jedinci 1 a 3 majú rovnakú mutáciu génu APC a zároveň rovnaké alely MspI polymorfizmu, čím výsledky väzbovej analýzy neodporujú výsledkom HDA.

HDA-analýzou došlo k odlišeniu vysokorizikových členov rodiny (jediniec 1 a 3) od členov s malým rizikom FAP (2, 4, 5, 6, 7). Pravidelne endoskopicky by mal byť naďalej vyšetrovaný len jedinec 3, resp. 1. U ostatných členov rodiny stačí len sporadické vyšetrenie vzhľadom na možnosť falošnej negativity výsledkov, mozaicizmu tkanív alebo mutáciu de novo.

Možnosť odlišenia vysokorizikových osôb od osôb s nízkym rizikom pre FAP robí z molekulej diagnostiky FAP veľmi účinnú metódu, ktorá môže výrazne ovplyvniť život pacienta, resp. osoby rizikovej z hľadiska FAP, a súčasne môže znamenať faktor, ktorý prispieje k zníženiu mortality na FAP, resp. na kolorektálny karcinóm.

Literatúra

Bussey H.J.: Familial polyposis coli. Baltimore, John Hopkins University Press 1975.

Bussey H.J., Eyers A.A., Ritchie S.M., Thompson J.P.S.: The rectum in adenomatous polyposis: the St. Mark's policy. *Brit. J. Surg.*, 72, 1985, s. 529–531.

Cottrell S., Bodmer W.F.: Two MspI polymorphisms within the APC gene. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1992, s. 352.

Friedl W., Mandl M., Sengteller M.: Single step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1993, s. 1481–1482.

Gardner E.J., Richards R.C.: Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. *Amer. J. Hum. Genet.*, 5, 1957, s. 139.

Groden J. a spol.: Identification and characterisation of adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66, 1991, s. 589–600.

Kintzler K.W. a spol.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253, 1991, s. 655–669.

Maher E.R. a spol.: Evaluation of molecular genetic diagnosis in the management of familial adenomatous polyposis coli: a population based study. *J. Med. Genet.*, 30, 1993, s. 675–678.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1982.

Miyoshi Y. a spol.: Germline mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 4452–4456.

Polkinghorne P.J., Ritchie S., Neale K. a spol.: Pigmented lesions of the retinal pigment epithelium and familial adenomatous polyposis. *Eye*, 4, 1990, s. 216–222.

Traboulsi E.I. a spol.: Prevalence and importance of pigmented ocular fundus lesions in Gardner's syndroms. *New Engl. J. Med.*, 316, 1987, s. 661–667.

Kirchhoff T., Zajac V., Križan P., Repiská V., Šteurková V., Friedl W.: Identification of APC exon 15 mutations in families suspected of familial adenomatous polyposis (FAP). *Folia Biologica*, 43, 1997, s. 205–209.

Do redakcie došlo 2.10.1997.