

ANALÝZA MUTACE C.1100DEL C GENU CHEK2 V POPULACI PACIENTŮ SE SPORADICKÝM KARCINOMEM KOLOREKTA A FAMILIÁRNÍ ADENOMATÓZNÍ POLYPÓZOU

ANALYSIS OF THE C.1100DEL C MUTATION OF THE CHEK2 GENE IN SPORADIC COLORECTAL CARCINOMA AND FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS PATIENT POPULATION

KLEIBL Z.¹, HAVRÁNEK O.¹, NOVOTNÝ J.², KOHOUTOVÁ M.³, ŠTEKROVÁ J.³, MATOUŠ B.¹

¹ ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE 1. LF UK,

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1. LF UK,

³ ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY 1. LF UK A VFN

Souhrn

Východisko: Česká republika patří mezi státy s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu. Přestože je většina kolorektálních karcinomů sporadického původu, významnou část pacientů, především z hlediska prediktivní onkologie, tvoří nemocní s výskytem here-ditárních nádorů. Do současné doby byla charakterizována řada genů, jejichž mutace zvyšují riziko vzniku kolorektálního karcinomu (*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *SMAD4*, *BMPRI1a*) a způsobují vznik hereditárních nádorových syndromů, jako je například familiární adenomatózní polypóza (FAP). Intenzivní pozornost je věnována rovněž genetické modifikaci nádorového rizika na základě mutací v tzv. „genech s nízkou penetrancí“. Mezi tyto geny patří i gen *CHEK2*, u kterého byla popsána patogenní mutace 1100delC podílející se na vzniku syndromu hereditárního výskytu kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu (HBC). **Metody:** Provedli jsme detekci patogenní mutace *CHEK2* c.1100delC u 433 pacientů s kolorektálním karcinodem a 113 pacientů s FAP a její atenuovanou formou (AFAP). Mutace byly analyzovány pomocí denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (DHPLC) produktu PCR zahrnujícího exon 10 genu *CHEK2*. Nalezené mutace byly ověřeny sekvenováním. **Výsledky:** V souboru 433 pacientů jsme identifikovali celkem 3 nosiče sledované mutace (0,7%); v souboru pacientů s diagnózou FAP nebyla mutace nalezena. **Závěry:** Výskyt alely *CHEK2**1100delC je v České republice nízký. Ačkoliv četnost nálezu mutace v populaci pacientů s kolorektálním karcinodem je vyšší než v nenádorové populaci, je pravděpodobné, že nosiči mutace představují méně než 1% všech nemocných.

Klíčová slova: karcinom kolorekta, familiární střevní polypóza, *CHEK2*, dědičná dispozice, zárodečná mutace

Summary

Backgrounds: Czech republic belongs to the countries with the highest incidence of colorectal cancer in both male and female population. The vast majority of colorectal cancer diagnoses arise in a form of sporadic disease. The hereditary predisposition for colorectal cancer development could be found in about 5%. Along with mutations in the major predisposing genes (*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *SMAD4*, *BMPRI1a*), the role of mutations in low penetrance genes is intensively studied. Recently it has been found that the frame-shifting *CHEK2* c.1100delC mutation contributes to the development of hereditary breast and colorectal cancer syndrome (HBC). **Methods:** We have performed mutation analysis of pathogenic *CHEK2* allele c.1100delC in 546 patients including 433 colorectal cancer patients and 113 patients with familial adenomatous polyposis (FAP). Mutation analysis was based on DHPLC prescreening, mutations were confirmed by sequencing. **Results:** We have characterized 3 mutation carriers, all in the colorectal cancer patients' cohort (0.7%). **Conclusion:** Based on our data we can speculate that Czech Republic belongs to countries with low occurrence of *CHEK2* c.1100delC allele, which therefore rarely contributes to the development of colorectal cancer and plays an insignificant role in cancer development in patients with FAP/AFAP.

Key words: colorectal cancer, *CHEK2*, familial adenomatous polyposis, hereditary disposition, germline mutation

Úvod

Česká republika patří mezi přední země s ohledem na výskyt karcinomu kolorekta (1). Incidence jeví trvale rostoucí charakter a v roce 2001 dosáhla u mužů 61,8/100 000, u žen pak 46,1/100 000 (UZIS ČR, NOR ČR 2001). Okolnosti vzniku kolorektálního karcinomu ovlivňuje řada faktorů, mezi které počítáme vlivy prostředí, dietní návyky i dědičné vloh. Doposud charakterizované genetické rizikové faktory (především zárodečné mutace v genu *APC* a genech

MMR systému) dávající vzniknout syndromům familiární adenomatózní polypózy (FAP), hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC - Lynchův syndrom) a Lynchova syndromu. Základní charakteristikou FAP je výskyt mnohočetných polypů, které s téměř 100% pravděpodobností progredují ke vzniku kolorektálního karcinomu v průběhu pacientova života. Kromě syndromu FAP se vyskytují i pacienti s atenuovanou formou FAP (AFAP), u kterých je nacházen nižší počet polypů a pozdější nástup

onemocnění. Hereditární formy kolorektálního karcinomu způsobují necelých 5% karcinomů kolorekta. Prevalence FAP se v ČR pohybuje kolem 1 na 5000-7000 obyvatel (2). Vznik kolorektálního karcinomu je kromě mutací v hlavních predispozičních genech ovlivněn i alteracemi v řadě dalších genů. Jedním z možných kandidátních genů je *CHEK2* (checkpoint kinase 2, OMIM 604373) - proteinkináza modulující odpověď na genotoxická poškození. Sběžná role proteinu *CHEK2* spočívá v aktivaci (fosforylaci) proteinu p53. Delece cytosinu v pozici 1100 (*CHEK2* c.1100delC) způsobuje inaktivaci proteinu *CHEK2*. Díky posunu čtecího rámce dochází k předčasné terminaci translace se zkrácením proteinového produktu v místě kinázové domény. *CHEK2* c.1100delC je nejstudovanější mutací s prokázaným vztahem k řadě karcinomů (3). Na základě rozsáhlých populačních studií v různých zemích je tato mutace uváděna v souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (RR = 2) a výskytem HBCC syndromu - rodinného výskytu karcinomu prsu a kolorekta (4,5). V genu *CHEK2* bylo doposud popsáno několik dalších inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, kolorekta, prostaty, štítné žlázy, osteosarkom) tak i hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom). Například mutace c.470T>C [I157T] se vyskytuje signifikantně častěji u pacientek s karcinomem prsu a u pacientů s karcinomem prostaty (6,7).

Cíl studie

Provedli jsme vyšetření četnosti alely *CHEK2**1100delC u neselektované populace pacientů s karcinomem kolorekta a v populaci pacientů s FAP a AFAP s cílem zhodnocení vlivu této alely na vznik hereditární a sporadické formy karcinomu kolorekta.

Tabulka 1.: Klinické a histopatologické charakteristiky pacientů s karcinomem kolorekta a mutací *CHEK2* c.1100delC. Ve všech třech případech se jednalo o pacienty mužského pohlaví.

Pacient	Věk při dg.	Charakteristiky nádoru		Sekundární malignita	Kouření	Maligní onemocnění v rodině (věk dg)
		Histologie nádoru	Stádium			
R72	57	středně diferencovaný adenokarcinom	Dukes D	0	Ano	?
No340	60	Tubulární uspořádaný ložiskově povrchně ulcerovaný adenokarcinom	Dukes B	0	Ano	0
No366	52	Tubulární adenokarcinom	Dukes C	0	Ano	Matka: karcinom prsu (45)

Diskuse

Od roku 2002 bylo provedeno testování několika rozsáhlých souborů pacientů s hereditárními i sporadickými karcinomy prsu na přítomnost mutace *CHEK2* c.1100delC u nás i v zahraničí. Z výsledků těchto šetření vyplývá, že gen *CHEK2* patří mezi geny s nízkou penetrancí a specificky delece cytosinu v pozici 1100 kódující sekvence může modifikovat riziko vzniku nádorů prsu, kolorekta, nebo prostaty. Výsledky rovněž naznačují, že výskyt nosičů této mutace se v evropském regionu snižuje směrem od severu ke středomoří. Menší počet prací, ve srovnání s pracemi věnovanými karcinomu prsu, je věnován výskytu mutace

Metody

Pacientkám zařazeným do studie bylo odebráno 5 ml nesrážlivé žilní krve po podpisu informovaného souhlasu schváleného etickou komisí. Genomová DNA byla izolována pomocí JetStar 96 blood kitu (Genomed, Löhne, BRD) dle protokolu výrobce. Z důvodů homologních sekvencí v lidském genomu byla oblast, zahrnující exon 10 genu *CHEK2* amplifikována dvoukrokově pomocí nested PCR na základě publikovaných postupů (8,9). Výsledný PCR produkt byl analyzován pomocí denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (DHPLC) systému WAVE (Transgenomic, Omaha, NE) na DNASep koloně při teplotě 55°C v gradientu acetonitrilu 50,4-59,4% (Buffer B, Transgenomic). Vzorky s aberantním elučním profilem na DHPLC byly charakterizovány sekvenováním (BigDye Terminator ver. 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA) na sekvenátoru ABI310 (Applied Biosystems).

Výsledky

Celkem bylo analyzováno 433 vzorků od pacientů s kolorektálním karcinomem a 113 vzorků od pacientů s FAP/AFAP. Mutační analýza v tomto souboru odhalila přítomnost tří nosičů patogenní alely 1100delC v souboru 433 nemocných s kolorektálním karcinomem (0,69%). Klinicko-patologické charakteristiky nosičů nalezené mutace jsou uvedeny v **tabulce č.1**. Pouze u jedné ze tří pozitivně testovaných osob ve skupině karcinomu kolorekta byl zaznamenán rodinný výskyt karcinomu prsu (u matky vyšetřované osoby).

Ve skupině 113 nemocných s FAP/AFAP nebyla studovaná mutace *CHEK2* c.1100delC nalezena.

Frekvence výskytu mutace *CHEK2* c.1100delC v neselektované obecné populaci (2/720; 0,27%) byla stanovena v předchozí studii (10).

c.1100delC u pacientů s karcinomem kolorekta a pacientů s HNPCC (11,12,13). I výsledky těchto analýz ukazují na podobný trend daný geografickým rozložením četnosti výskytu alely *CHEK2**1100delC, jako je tomu v případě karcinomu prsu. Zatímco studie pacientů s kolorektálním karcinomem v Nizozemí prokázala zvýšení relativního rizika vzniku kolorektálního karcinomu u nemocných s kolorektálním karcinomem (RR=1,5-2,0), podobná práce ve Španělsku nenalezla žádného nosiče mutace c.1100delC u 182 pacientů s HNPCC/HNPCC-like/HBCC. Četnost mutace c.1100delC u pacientů s kolorektálním karcinomem v naší populaci dosahuje 0,69%. Třebaže je tato hodnota

vyšší, než četnost v populaci pacientek s karcinomem prsu (4 ze 1046 pacientek s hereditárním a sporadickým karcinomem prsu; 0,38%), i vyšší než u nenádorových kontrol (0,27%), k potvrzení nálezu by bylo nezbytné vyšetřit velmi rozsáhlou populaci nemocných (10).

Závěr

Výskyt alely CHEK2*1100delC je v České republice nízký. Ačkoliv četnost nálezu mutace v populaci pacientů s kolorektálním karcinomem je vyšší, je pravděpodobné, že nosiči mutace představují méně než 1% všech nemocných. Ze zahraničních údajů vyplývá, že zvýšení rizika vzniku onemocnění je mírné (RR = 1,5-2,0). To spolu s nízkou penetrancí alely omezuje klinickou použitelnost jako predispozičního faktoru pro vznik kolorektálního karcinomu. Na druhé straně, vzhledem k rychlosti stanovení je možné uvažovat o zařazení tohoto vyšetření do bloku genetické analýzy predispozičních genů u osob se zvýšeným rizikem

vzniku onemocnění, kde je prováděno genetické testování. Získání dalších výsledků by umožnilo relevantní statistické zpracování četnosti výskytu i stanovení rizika v české populaci.

Seznam zkratk

AFAP - attenuated familial adenomatous polyposis (OMIM 175100), HBCC - hereditary breast and colorectal cancer syndrome; FAP - familial adenomatous polyposis (OMIM 175100), FHA - fork head associated; HNPCC - hereditary nonpolyposis colorectal cancer (OMIM 120435), CHEK2 - checkpoint kinase 2 (OMIM 604373); p53 (OMIM 191170); PCR - polymerase chain reaction; DHPLC - denaturant high performance liquid chromatography

Poděkování

Projekt byl podpořen finančními prostředky z nadace Běhu Terryho Foxe v roce 2005.

Literatura

1. Vorlíček J.: Lesk a bída onkologie. Vnitř Lék 50 Suppl 1, 2004, S9-22
2. Vandrovčova J., Stekrova J., Kebrdlova V. et al.: Molecular analysis of the APC and MYH genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. Hum Mutat 23, 2004, 397-397
3. Schutte M., Seal S., Barfoot R. et al.: Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. Am J Hum Genet 72, 2003, 1023-1028
4. Cybulski C., Huzarski T., Gorski B. et al.: A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. Cancer Res 64, 2004, 2677-2679
5. Meijers-Heijboer H., Wijnen J., Vasen H. et al.: The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. Am J Hum Genet 72, 2003, 1308-1314
6. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. et al.: CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. Int J Cancer 111, 2004, 543-547
7. Dong X., Wang L., Taniguchi K. et al.: Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. Am J Hum Genet 72, 2003, 270-280
8. Sodha N., Houlston R.S., Williams R. et al.: A robust method for detecting CHK2/RAD53 mutations in genomic DNA. Hum Mutat 19, 2002, 173-177
9. Offit K., Pierce H., Kirchhoff T. et al.: Frequency of CHEK2*1100delC in New York breast cancer cases and controls. BMC Med Genet 4, 2003, 1-4
10. Kleibl Z., Novotný J., Malík R. et al.: Výskyt a význam mutace CHEK2*1100delC u pacientek s karcinomem prsu a v kontrolní skupině zdravých žen v České republice. Klin Onkol 18, 2005, 98-101
11. van Puijenbroek M., van Asperen C.J., van Mil A. et al.: Homozygosity for a CHEK2*1100delC mutation identified in familial colorectal cancer does not lead to a severe clinical phenotype. J Pathol 206, 2005, 198-204
12. Sanchez de Abajo A., de la Hoya M., Godino J. et al.: The CHEK2 1100delC allele is not relevant for risk assessment in HNPCC and HBCC Spanish families. Fam Cancer 4, 2005, 183-186
13. de Jong M.M., Nolte I.M., Te Meerman G.J. et al.: Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. Genes Chromosomes Cancer 43, 2005, 377-382

Došlo: 15. 2. 2006

Přijato: 10. 8. 2006