

# FAMILIÁRNÍ ADENOMATÓZNÍ POLYPÓZA – NOVINKY V MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTICE

## FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS – NOVEL MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUES

ŠTEKROVÁ J.<sup>1</sup>, ŠULOVÁ M.<sup>1</sup>, ZÍDKOVÁ K.<sup>1</sup>, KLEIBL Z.<sup>2</sup>, VANDROVCOVÁ J.<sup>1</sup>, KEBRDLOVÁ V.<sup>1</sup>, KOTLAS J.<sup>1</sup>, KOHOUTOVÁ M.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY 1. LF UK A VFN, PRAHA

<sup>2</sup>ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE 1. LF UK, PRAHA

### Souhrn

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně dědičná predispozice pro vznik kolorektálního karcinomu. Příčinou onemocnění jsou zárodečné mutace v genu *APC*. Mírnější fenotyp onemocnění u pacientů s atenuovanou formou familiární adenomatózní polypózy nebo výskytem mnohočetných adenomů může být asociován se zárodečnými mutacemi v genu *MYH*. Přímá detekce zárodečných mutací v genu *APC* byla provedena v souboru 230 nepřibuzných rodin s familiární adenomatózní polypózou. Kódující oblast genu *APC* byla analyzována kombinací metod denaturační gradientové gelové elektroforézy, testem na detekci zkráceného proteinu a přímou sekvenací. V 93 rodinách bylo detekováno 66 různých mutací, z toho je 42 mutací unikátních pro testovaný soubor. V rodinách, kde nebyla detekována zárodečná mutace v genu *APC*, byla metodou MLPA provedena detekce rozsáhlých delecí v genu *APC* a metodou s využitím vysokotlakové kapalinové chromatografie byla provedena detekce zárodečných mutací v genu *MYH*. Ve dvou rodinách byla prokázána rozsáhlá delece celého genu *APC* a v jedné rodině byla prokázána delece jednoho exonu. Ve dvou rodinách byla detekována přítomnost kombinace dvou nejčastějších zárodečných mutací v genu *MYH*. V práci je diskutována korelace mezi lokalizací zárodečné mutace a klinickou manifestací onemocnění.

**Klíčová slova:** Familiární adenomatózní polypóza, kolorektální karcinom, gen *APC*, gen *MYH*, mutační analýza DNA

### Summary

Familial adenomatous polyposis is an autosomal dominant predisposition to colorectal cancer and is caused by germline mutations in the *APC* gene. A milder phenotype is found in patients affected with attenuated familial adenomatous polyposis or multiple adenomas. Patients with multiple adenomas might be associated with germline mutations in the *MYH* gene. We studied a cohort of 230 adenomatous polyposis families; we screened the entire *APC* coding region using the combination of denaturing gradient gel electrophoresis and/or a protein truncation test and direct sequencing. We detected 66 different mutations in 93 families; 42 of the mutations were unique. The *APC* mutation negative patients have been screened for large *APC* deletions using multiplex ligation dependent probe amplification and for germline mutations in the *MYH* gene using the denaturing high performance liquid chromatography (system WAVE; Transgenomic) and direct sequencing. Two families showed a constitutional deletion of the entire *APC* gene and one family a single exon deletion. The most common biallelic germline mutation in the *MYH* gene was detected in two families. Correlations between the localization of germline mutations and clinical manifestations of the diseases are discussed.

**Key words:** Familial adenomatous polyposis, colorectal carcinoma, *APC* gene, *MYH* gene, mutation analysis of DNA

### Úvod

Familiární adenomatózní polypóza (MIM # 175100) je autozomálně dominantně dědičná predispozice pro vznik kolorektálního karcinomu (CRC – colorectal carcinoma). Familiární adenomatózní polypóza (FAP), společně s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem (HNPCC), patří mezi nejvíce studované formy hereditárních kolorektálních karcinomů. Výzkum těchto onemocnění umožnil identifikaci a charakteristiku genů zodpovědných za kolorektální karcinogenezi hereditárních i sporadických forem onemocnění. Hereditární formy tvoří přibližně 20% všech případů CRC. Znalost molekulárně genetické podstaty onemocnění umožňuje presymptomatickou diagnostiku na úrovni DNA a na jejím podkladě vypracovat preventivní a léčebnou strategii.

Výskyt FAP je v české populaci odhadován na 1/5000 – 7500 jedinců. Frekvence onemocnění je v populaci udržována častý-

mi mutacemi de novo. 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). V některém z velkého množství kolorektálních polypů se postupně vyvíjejí adenokarcinomy. Pro FAP je charakteristický výskyt řady extrakolických projevů (1), mezi něž patří vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny (CHRPE), výskyt polypů v duodenu, desmoidních tumorů, epidermoidních cyst, osteomů a vzácný není ani výskyt hepatoblastomu. CHRPE se vyskytuje přibližně u 80 % pacientů a je proto důležitým diagnostickým faktorem. Atenuovaná forma FAP (AFAP) je charakterizovaná menším počtem polypů (<100) a pozdějším nástupem onemocnění, riziko vzniku karcinomu je však rovněž vysoké.

Příčinou FAP jsou zárodečné mutace v genu *APC* (Adenoma-

tous Polyposis Coli). Onemocnění, jež vykazuje značnou fenotypovou variabilitu, je vysoce penetrantní a k jeho rozvoji dojde téměř u 100% nosičů mutace. V rodinách s výskytem FAP je u osob v riziku onemocnění velmi významná presymptomatická diagnóza, která umožní včasné preventivní zákroky.

Somatické mutace v genu *APC* byly identifikovány přibližně u 80% sporadických CRC, kde tyto mutace hrají významnou úlohu v iniciaci mnohastupňového procesu kolorektální karcinogeneze.

Gen *APC* je tumor supresorový gen, který byl v roce 1987 pozicním klonováním lokalizován na dlouhé raménko 5. chromozómu (5q21) (2) a podrobněji popsán byl v roce 1991 (3,4). Gen je tvořen 15 exony, přičemž 15. exon obsahuje přibližně 75% kódující sekvence genu. Pro kolorektální tumorigenezi u FAP jsou nezbytné mutace v obou alelách genu *APC*; zárodečná mutace genu *APC* je děděna od jednoho z rodičů, k somatické mutaci pak dochází v epiteliálních buňkách střeva na druhé, dosud zdravé alele. Sporadické CRC mají obě alely genu mutované na somatické úrovni. V genu *APC* bylo dosud popsáno asi 690 mutací, které mají za následek vznik nefunkčního proteinu (5).

Gen *APC* kóduje protein APC, který hraje významnou roli v regulaci hladiny  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě a je součástí Wnt signální dráhy. V důsledku inaktivace proteinu APC dochází k hromadění  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě a následně k jeho transportu 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 a další), které regulují průběh buněčného cyklu. Protein APC se účastní i regulace buněčné migrace, buněčné adheze a stability mikrotubulárního cytoskeletu, průběhu buněčného cyklu, segregace chromozomů a apoptózy (6).

V současnosti je zárodečná mutace v genu *APC* zachycena u 60–80% rodin s výskytem FAP. Přibližně u 20–40% rodin s klinickými příznaky FAP není molekulárně genetická příčina odhalena. Příčinou mohou být mutace v regulačních oblastech genu, případně další mutace, které nejsou současnými metodami mutační analýzy zachyceny. Vyloučit však nelze ani účast mutací v dalším dosud neidentifikovaném genu, případně více genech.

Možnost účasti dalšího genu při vzniku onemocnění byla v poslední době podpořena nálezy ve skupině pacientů s výskytem tzv. „mnohočetných adenomů“ (3 až 100 adenomatózních polypů). Pacienti vykazují mírnější fenotyp, často jsou jedinými postiženými v rodině a nemusí u nich být nalezena zárodečná mutace v genu *APC* (7). V této skupině pacientů je třeba v rámci diferenciální diagnostiky uvažovat o AFAP, ale i HNPCC nebo o nové nedávno identifikované dědičné formě polypózy pojmenované MYH asociovaná polypóza (MAP; OMIM 604933). Zárodečné mutace v genu *MYH* (MutY homolog *Escherichia coli*) mohou být příčinou autozomálně recesivně (AR) dědičné formy polypózy (8,9,10). Gen *MYH*, lokalizovaný na chromozom 1p34.3 – 1p32.1, je součástí opravného systému buňky zajišťujícího báзовé excisní opravy (BER – base excision repair). Tento opravný systém hraje důležitou úlohu při opravě mutací způsobených oxidačními produkty, které vznikají v průběhu aerobního metabolismu. Nejstabilnějším produktem oxidačního poškození DNA je 8-oxoG (8-oxo-7,8,-dihydroxy-2'-deoxyguanosine), který se místo s cytosinem páruje s adeninem, což vede k záměně bází G:C → T:A. Nádory postižených pacientů vykazují tento typ somatické mutace (transverze G:C → T:A) v genu *APC*, což vysvětluje přítomnost příznaků podobných FAP nebo AFAP. Produktem genu *MYH* je adenin specifická DNA glykosylasa, která odstraňuje nesprávně spárovaný adenin z vazby na 8-oxoG. Součástí opravného systému BER jsou ještě další dva enzymy MTH1 a OGG1, které působí současně a brání vzniku mutací indukovaných 8-oxoG.

Z uvedených důvodů vyplývá význam molekulárně genetického testování jedinců jak s velkým, tak s malým počtem kolo-

rektálních adenomatózních polypů, včetně sporadicky se vyskytujících polypů. AR typ dědičnosti onemocnění, který je podmíněn nálezem bíalelických zárodečných mutací v genu *MYH*, vysvětluje výskyt onemocnění i ve skupině pacientů s negativní rodinnou anamnézou.

Stanovení genetických příčin kolorektální polypózy, tj. určení frekvence a typu kauzálních zárodečných mutací v genu *APC* a *MYH*, umožní včasnou presymptomatickou DNA diagnostiku u příbuzných osob v riziku onemocnění a dále má nesporně diferenciálně diagnostický význam.

## Materiál a metody

### Detekce zárodečných mutací v genu *APC*

Pacienti: Přímá detekce zárodečných mutací v genu *APC* byla provedena u souboru 230 nepřibuzných pacientů z rodin s výskytem kolorektální polypózy; FAP byla jednoznačně klinicky diagnostikována ve 120 rodinách. Pacienti jsou k vyšetření doporučeni na základě koloskopických nálezů a/nebo pozitivní rodinné anamnézy. Pacienti mohou být k vyšetření zasláni po konzultaci klinickým genetikem, případně gastroenterologem, chirurgem, onkologem apod. Před genetickým testováním pacienti vždy podepisují poučený souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením.

Metody: Genomová DNA byla izolována z leukocytů periferní krve (11) a následně amplifikována polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) s využitím 30 párů oligonukleotidových primerů navržených tak, aby vyšetření pokrývalo celou oblast genu *APC*. PCR produkty byly analyzovány metodou DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (12,13). U některých pacientů bylo DNA vyšetření doplněno testem PTT (Protein Truncation Test) (14). Úseky, ve kterých byla metodou DGGE, případně testem PTT zjištěna přítomnost abnormálního PCR produktu, byly následně sekvenovány na genetickém analyzátoru ABI Prism™ 310 (PE Applied Biosystems).

V rodinách s detekovanou mutací byla provedena segregace nalezené mutace s onemocněním jednotlivých členů rodiny metodou DGGE a/nebo sekvenací. V rodinách pacientů, u nichž byla detekována mutace, bylo doporučeno vyšetření dalších příbuzných osob v riziku onemocnění. Příbuzné osoby v riziku musí být před odběrem krve k izolaci DNA a následnou presymptomatickou DNA analýzou konzultovány klinickým genetikem.

V rodinách, kde nebyla detekována zárodečná mutace v genu *APC* standardními metodami (DGGE, příp. PTT), byla provedena detekce rozsáhlých delecí v genu *APC*. Detekce dlouhých delecí byla provedena u 96 nepřibuzných pacientů metodou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) od firmy MRC-Holland. Pro vyšetření byl použit SALS A P043 APC MLPA kit (15).

### Detekce zárodečných mutací v genu *MYH*

Pacienti: Do studie bylo zařazeno 90 nepřibuzných pacientů, u nichž nebyla standardními metodami mutační analýzy nalezena zárodečná mutace v genu *APC*. Vyšetřovaná skupina zahrnovala pacienty s mnohočetnými kolorektálními adenomy (3-100) a dále pacienty s klasickou formou FAP (>100 polypů).

Metody: Genomová DNA byla izolována z leukocytů periferní krve (11) a byla amplifikována metodou PCR. Mutační analýza byla provedena metodou DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) s využitím systému WAVE (Transgenomic). Typ záměny a její přesná lokalizace byla určena následnou sekvenací na genetickém analyzátoru ABI Prism™ 310.

## Výsledky

V 93 rodinách z testovaného souboru byla standardními metodami (DGGE, příp. PTT) detekována zárodečná mutace v genu *APC*; bylo detekováno 66 různých mutací. Rozsáhlá delece celého genu *APC* včetně promotorových oblastí byla zjištěna metodou MLPA u dvou nepřibuzných probandů a u jednoho

probanda byla stejnou metodou nalezena delece exonu 14 genu *APC*. Celkový záchyt zárodečných mutací v genu *APC* je tedy 42% v celém testovaném souboru (230 rodin) a 69% v souboru rodin s jednoznačně klinicky diagnostikovanou FAP.

V našem souboru pacientů bylo detekováno 42 unikátních mutací; 18 z těchto mutací nebylo dosud popsáno a 24 mutací bylo publikováno v roce 2002 a 2004 (16, 17). Zbytek, tj. 24 mutací detekovaných u 47 probandů z testovaného souboru, tvoří zárodečné mutace již dříve popsané zahraničními autory. Standardními metodami bylo detekováno 31 různých mutací v exonech 1-14 (47% ze 66 různých mutací) a 35 různých mutací v exonu 15 (53% ze 66 různých mutací). Nejčastěji se vyskytující mutace v kodonu 1309 byla detekována v 8 rodinách; mutace v kodonu 935 byla detekována v 5 rodinách; ve 4 rodinách byla detekována mutace v kodonu 213 a mutace v kodonu 216; ve 3 rodinách byla detekována mutace v kodonu 1061 a mutace v kodonu 541. Ostatní detekované mutace jsou unikátní pro jednotlivé rodiny, případně se vyskytují ve dvou rodinách (4 mutace). 90% z nalezených mutací predikují vznik zkráceného nefunkčního APC proteinu. Bylo detekováno 7% mutací, které mění místo střihu a bez vyšetření na úrovni RNA nelze přesně určit výsledný protein; tyto mutace byly detekovány ve velkých rodinách a jednoznačně segregují s onemocněním. Pouze 3% z mutací tvoří dlouhé delece detekované metodou MLPA.

V 96 rodinách s detekovanou mutací bylo testováno celkem 320 osob; u 130 osob s klinicky diagnostikovaným onemocněním byla FAP jednoznačně potvrzena. Prediktivní testování bylo provedeno u 190 příbuzných osob v riziku, přítomnost mutace byla nově detekována u 76 převážně velmi mladých osob. Ve 4 rodinách byla potvrzena mutace de novo (ani u jednoho z rodičů probanda nebyla mutace detekována).

Molekulárně genetická analýza genu *MYH* v souboru 90 probandů odhalila 18 variací v sekvenci DNA. Dva pacienti byli složenými heterozygoty pro nejčastější dosud popsané varianty p.Y165C a p.G382D (8), které jsou příčinou kolorektální polypózy. Fenotypy těchto pacientů odpovídaly AFAP a v jejich rodinné anamnéze nebyl zaznamenán výskyt CRC nebo mnohočetných adenomů. Kromě toho bylo zjištěno 13 polymorfismů nebo intronických změn, z toho 5 nově popsaných genetických alterací nacházejících se převážně v intronech genu *MYH*.

## Diskuse

V testovaném souboru 230 nepříbuzných rodin s výskytem klasické či atenuované adenomatózní polypózy nebo s výskytem mnohočetných adenomů, případně s podezřením na toto onemocnění, bylo detekováno celkem 68 různých mutací v genu *APC* v 96 nepříbuzných rodinách (včetně dlouhých delecí detekovaných metodou MLPA). Tento fakt potvrzuje extrémně různorodé spektrum zárodečných mutací v genu *APC*. Standardně používané techniky detekce mutací nejsou úspěšné přibližně u 30% pacientů s jednoznačně prokázanou FAP v námi testovaném souboru rodin, což je ve shodě se zahraničními údaji (18). Rovněž spektrum detekovaných mutací v genu *APC* se příliš neliší od zahraničních údajů, pouze zastoupení dvou nejčastějších mutací (mutace v kodonech 1309 a 1061) je v našem souboru nižší (8% a 3%) – v zahraničních studiích tvoří tyto mutace až 30% z detekovaných mutací (19). Také v souboru našich pacientů je velká variabilita ve fenotypu, a to i u jedinců s identickou mutací v rámci jedné rodiny. Tyto výsledky dokazují, že výsledný fenotyp může být ovlivněn faktory vnějšího i vnitřního prostředí včetně možnosti účinku modifikujících genů genetického pozadí. Naše studie rovněž potvrdila přímou souvislost mezi fenotypem a lokalizací kauzální mutace v genu *APC*; mutace mezi kodony 1250 až 1464 jsou spojeny s velkým počtem kolorektálních polypů a časným nástupem onemocnění klasické formy FAP (20) a naopak mutace v exonech 1-4 a 9 jsou spojeny s fenotypem AFAP (21).

Metodou MLPA byla ve dvou rodinách s lehčí formou FAP detekována úplná delece genu *APC* a v jedné rodině s velmi těžkou formou FAP (u dvou sourozenců četné polypy + CHR-PE, v 18 letech provedena kolektomie; matka diagnostikována na FAP ve 25 letech, zemřela ve 27 letech) byla detekována delece exonu 14. Tento záchyt je nižší než v obdobných zahraničních studiích (18, 22). Lehčí formu onemocnění v rodinách s kompletní delecí genu *APC* lze vysvětlit sníženou hladinou koncentrace normálního APC proteinu; těžší formy FAP jsou však způsobeny jednak sníženou hladinou koncentrace normálního APC proteinu a jednak přítomností aberantního APC proteinu, který může funkčně interferovat se zdravou formou APC proteinu.

U dvou nepříbuzných probandů byly detekovány bíaleické zárodečné mutace v genu *MYH*, což potvrzuje nedávný poznatek, že mohou mutace genu *MYH* způsobit fenotyp mnohočetných adenomů s autozomálně recesivní dědičností; tento typ polypózy může být považován za atenuovanou formu FAP (23). Je prozatím předčasné posuzovat význam dalších nalezených změn v genu *MYH*, ať již popsaných nebo nově zjištěných. Tyto změny vyžadují podrobnější analýzu včetně korelace s klinickými projevy. Přesto jsou již nyní významnou součástí presymptomatické diagnostiky.

Ve třech rodinách se suspektním onemocněním FAP, ve kterých nebyla nalezena mutace v genu *APC*, byla následně nalezena mutace genů *MLH1* a *MSH2*, jejichž zárodečné mutace jsou příčinou HNPCC. Naopak u probandy doporučené k molekulárně genetickému vyšetření s podezřením na HNPCC byla následně detekována zárodečná mutace v genu *APC* (24). Tyto výsledky ukazují na možnosti diferenciální DNA diagnostiky mezi jednotlivými typy hereditárních forem kolorektální polypózy.

Dosud však zůstává velké množství neobjasněných příčin polypózních CRC s familiárním výskytem. Příčinou mohou být zárodečné mutace, které ovlivňují expresi genu *APC* nebo je uvažována účast dalších, dosud neidentifikovaných genů.

Význam práce spočívá v možnosti časné presymptomatické diagnostiky onemocnění u jedinců v riziku onemocnění a v možnosti diferenciální DNA diagnostiky mezi jednotlivými typy hereditárních forem kolorektální polypózy. Standardní vyšetření genu *APC* u probanda rodiny s FAP je technicky náročné a je nutno počítat s výsledkem v horizontu 3 až 6 měsíců. Genetické testování probanda může indikovat klinický genetik, gastroenterolog, případně další specialista. Indikace musí obsahovat přesné klinické údaje o pacientovi s přesnou rodinnou anamnézou (viz. příloha: Formulář k molekulárně genetickému vyšetření pacienta se suspektní FAP) a poučený souhlas pacienta s genetickým vyšetřením. Vzhledem k časové náročnosti vyšetření, se nedoporučuje u pacientů s klinicky evidentní FAP, při rozhodování o operaci, čekat na výsledek analýzy genu *APC*. V rodině, ve které je již detekována kauzální mutace, lze velmi rychle vyšetřit osoby v riziku onemocnění; vzhledem k dominantnímu přenosu je riziko pro děti pacientů s FAP 50%. Výsledek presymptomatického DNA vyšetření je jednoznačný (100%). Nositelé zárodečných mutací jsou pravidelně sledováni na gastroenterologických odděleních a na základě klinického obrazu jsou včas provedeny preventivní zákroky. Jedinci, u nichž byla vyloučena přítomnost mutace, nemusí být dále systematicky kontrolováni. Vzhledem k velmi časnému nástupu onemocnění FAP je v rodinách s detekovanou mutací doporučováno vyšetření dětí již ve věku 10 let. Presymptomatickému vyšetření osob v riziku musí vždy předcházet konzultace klinickým genetikem. I přestože existuje již výše zmíněná korelace mezi genotypem (typem a lokalizací mutace) a fenotypem, fakt vysoké variability neumožňuje jednoznačně predikovat prognózu onemocnění. Vyšetření genu *MYH* se v současnosti provádí v rámci výzkumu, získané výsledky však mohou mít v rodinách diagnostický význam.

Kromě praktického výstupu mají výsledky prací, které se zabý-

vají molekulárně genetickou analýzou hereditárních forem CRC, význam i v poznání mechanismu kolorektální karcinogeneze u sporadicky se vyskytujících CRC.

#### Poděkování

Autoři děkují MUDr. A. Křepelové, CSc za vyšetření genu MLH1 a MSH2 u pacientů s podezřením na diagnosu HNPCC.

Autoři dále děkují doc. MUDr. V. Jiráskovi, CSc, MUDr. L. Fore-

tové, PhD, MUDr. P. Plevové, PhD, MUDr. Ilenčíkové, Dr. Zajacovi, MUDr. V. Krutílkové, MUDr. Puchmajerové, Doc. MUDr. F. Lošanovi, CSc, prim. MUDr. I. Šubrtovi, prim. MUDr. J. Hyjánkovi a mnoha dalším lékařům, kteří zaslali pacienty ke genetickému vyšetření a umožnili nám vytvořit unikátní soubor pacientů.

**Práce je podporována výzkumným záměrem MŠMT ČR: MSM0021620808 a grantovým projektem IGA MZ ČR: NR8103-3/2004**

#### Literatura

1. Jirásek, V.: Vyšetřování u familiární adenomatózní polypózy. Vnitř. Lék., 2002, 48, s.552-555.
2. Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J.G. et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature, 1987, 328, s.614-616.
3. Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W.S. et al.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell, 1991, 66, s.589-600.
4. Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B. et al.: Identification of FAP locus genes from chromosomes 5q21. Science, 1991, 253, s.661-665.
5. The Human Gene Mutation Database, Cardiff, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
6. Fearnhead, N.S., Britton, M.P. and Bodmer, W.F.: The ABC of APC. Hum. Mol. Genet., 2001, 10, s.721-733.
7. Sieber, O.M., 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., 2002, 99, s.2954-2958.
8. Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J. et al.: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C\_T:A mutations in colorectal tumors. Nat. Genet., 2002, 30, s.227-232.
9. 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, s.2961-2967.
10. Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M. et al.: Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. N. Engl. J. Med. 2003, 348, s.791-9.
11. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acid. Res., 1988, 16, s.1215.
12. Olschwang, S., Laurent-Puig, P., Groden, J. et al.: Germ-line mutations in the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Am. J. Hum. Genet., 1993a, 52, s. 273-279.
13. Olschwang, S., Tiret, A., Laurent-Puig, P. et al.: Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. Cell, 1993b, 75, s.959-968.
14. Van der Luijt, R.B., Meera Khan, P.: Protein truncation test for presymptomatic diagnosis of familial adenomatous polyposis. In: Adolph KW (ed): Methods in Molecular Genetics 18: Human Molecular Genetics. San Diego: Academic Press, 1996, s.97-111.
15. Bunyan, D.J., Eccles, D.M., Sillibourne, J. et al.: Dosage analysis of cancer predisposition genes by MLPA. British Journal of Cancer, 2004, 91, s.1155-1159.
16. Kohoutová, M., Štekrová, J., Jirásek, V., Kapras, J.: APC germline mutations identified in Czech patients with familial adenomatous polyposis. Hum. Mutat., 2002, 19, 4, s.460-461.
17. Vandrovcová, J., Štekrová, J., Kebrdlová, V., Kohoutová, M.: Molecular analysis of the APC and MYH genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. Hum. Mutat., 2004, 23 (4), s.397. (Mutation in Brief #695 Online, pp.8).
18. Renkonen, e.t., Nieminen, P., Abdel-Rahman, W.M. et al.: Adenomatous Polyposis Families That Screen APC Mutation-Negative by Conventional Methods Are Genetically Heterogenous. Journal of Clinical Oncology, 2005, 23 (24), s.5651-5659.
19. Fernández-Suárez, A., Cordero Fernandez, C., García Lozano, R. et al.: Clinical and ethical implications of genetic counselling in familial adenomatous polyposis. Rev Esp Enferm Dig (Madrid), 2005, 97 (9), s.654-665.
20. Spirio, L.N., Samowitz, W., Robertson, J. et al.: Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutation that lead to colon polyps. Nature Genet, 1998, 20, s. 385-388.
21. Brensinger, J.D., Laken, S.J., Luce, M.C. et al.: Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3\_ mutation in the APC gene. Gut, 1998, 43, s. 548-552.
22. Michils, G., Tejpar, S., Thoenen, 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, s.125-134.
23. Lipton, L., Halford, S.E., Johnson, V. et al.: Carcinogenesis in MYH-Associated Polyposis Follows a Distinct Genetic Pathway. Cancer Res., 2003, 63, s.7595-7599.
24. Vávra, P., Dostálík, J., Martinek, L. et al.: Familial adenomatous polyposis as a precancerosis of colon cancer. Bratisl.Lék.Listy, 2002, 103 (11), s.418-421.

**RA:** (uveďte, prosím, jméno a příjmení, u žen i příjmení za svobodna, datum narození, event. úmrtí)

**Jiný příbuzný (upřesněte)\***.....  
koléktomie ne ano upřesnění/věk .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
**Jiný příbuzný (upřesněte)\***.....  
koléktomie ne ano upřesnění/věk .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
**Jiný příbuzný (upřesněte)\***.....  
upřesnění/věk .....  
koléktomie ne ano .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
nález/počet polypů .....  
nález/počet polypů .....

**Další důležité údaje:**

**Datum:**.....

Za Vaši spolupráci Vám srdečně děkujeme!

**Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN**  
Laboratoř molekulární diagnostiky  
Albertov 4, 128 00 Praha 2,  
Tel.: 2 2496 8152

## Formulář k molekulárně genetickému vyšetření pacienta se suspektní FAP

**Jméno a příjmení pacienta:**.....  
**Rozená:**.....  
**Rodné číslo:**.....  
**Pojišťovna:**.....  
**Adresa:**.....  
koléktomie ne ano upřesnění/věk .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
nález/počet polypů .....

**RA:** (uveďte, prosím, jméno a příjmení, u žen i příjmení za svobodna, datum narození, event. úmrtí)

**Otec/matka**.....  
koléktomie ne ano upřesnění/věk .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
nález/počet polypů .....

**Jiný příbuzný (upřesněte)\***.....  
koléktomie ne ano upřesnění/věk .....  
karcinom ne ano .....  
extrakolické projevy ne ano .....  
koloskopie ne ano .....  
nález/počet polypů .....

**\*) V případě více postižených osob v rodině použijte další list.**

Podpis a adresa ošetřujícího lékaře, vč. IČZ, nákladového střediska, č. odbornosti:

**Datum:**.....

Za Vaši spolupráci Vám srdečně děkujeme!

**Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN**  
Laboratoř molekulární diagnostiky  
Albertov 4, 128 00 Praha 2,  
Tel.: 2 2496 8152