

Določanje polimorfizmov in mutacij v genih *MLH1* in *MSH2* pri nepolipoznem raku debelega črevesa

Vida Stegel in Srdjan Novaković

Izvleček

Rak debelega črevesa prizadene v Sloveniji okrog 1200 ljudi na leto. Dedni rak debelega črevesa (dedni nepolipozni rak debelega črevesa - HNPCC in družinska adenomatozna polipoza - FAP) predstavlja približno 10% vseh rakov debelega črevesa in danke. Pregledali smo 32 vzorcev bolnikov z rakom debelega črevesa. Z metodo HRM (analiza talitvene krivulje z visoko ločljivostjo) smo presegali gena *MLH1* in *MSH2*. Z metodo PCR smo pomnožili vse eksone genov *MLH1* in *MSH2* (»mismatch repair« geni – MMR). Vse PCR produkte smo obarvali z interkalirajočim barvilom, nato pa naredili analizo talitvene krivulje produkta. PCR produkte, katerih talitvena krivulja je odstopala od kontrolne smo sekvenirali. Našli smo 5 različnih mutacij, 2 neopredeljene variacije in 13 polimorfizmov. Med mutacijami smo našli 1 delecijo, 2 mutaciji izrezovalnih mest in 2 mutaciji, ki povzročita spremembo aminokislina.

Uvod

Po podatkih registra raka za leto 2004 v Sloveniji zbolijo za rakom debelega črevesa okrog 1200 ljudi na leto.¹ Dedni rak debelega črevesa predstavlja približno 10% vseh rakov debelega črevesa in danke.² Pojavlja se v dveh oblikah, kot družinska adenomatozna polipoza (FAP) ali kot nepolipozni rak debelega črevesa (HNPCC).

Podobno kot pri drugih oblikah dednega raka tudi člani družin, ki so obremenjene s HNPCC, zboleijo pogosteje (vsaj 2 ali 3 oboleli sorodniki v prvem kolenu) in nekaj let prej kot v splošni populaciji. Vzrok za HNPCC je dedna okvara genov udeleženi pri popravilnih mehanizmih DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*,...) tako imenovanih »mismatch repair« - MMR genih. MMR geni se izražajo recesivno. Tako, da se posledice nedelovanja gena izrazijo šele, ko sta obe kopiji gena prizadeti – neaktivni. Zato je pri osebah, pri katerih je ena okvarjena kopija gena že podedovana, verjetnost, da zbolijo večja. Okvara druge kopije gena je lahko posledica mutacije ali spremembe metilacijskega statusa gena (delovanje epigenetskih faktorjev). Nepravilno delovanje popravilnih mehanizmov DNA povzroči nestabilnost genoma in pomeni večje kopičenje napak – mutacij v DNA. S tem se poveča možnost nastanka rakaste celice.

Pravočasno odkrivanje mutacij v genih povezanih z nastankom raka je za nosilce mutacij zelo pomembno. Z zgodnejšimi in rednimi pregledi lahko odkrijemo zgodnejšo obliko raka in jo pravočasno zdravimo.

Najbolj zanesljiva metoda za odkrivanje točkovnih mutacij, ter manjših delecij in insercij je analiza sekvence DNA - sekveniranje. Ker je sekveniranje DNA razmeroma drag

postopek uporabljamo različne presejalne metode, s katerimi odkrijemo, kateri del gena je spremenjen. To omogoča, da sekveniramo le spremenjeni del in tako pocenimo preiskavo. Metod za presejanje je več npr. PTT (test skrajšanega proteina), DGGE (denaturacijska gelska elektroforeza), in SSCP (analiza konformacijskih polimorfizmov). DGGE je ena od najbolj pogosto uporabljenih metod. Ker gre za dokaj zahtevne in zamudne metode, so prizadevanja usmerjena v iskanje hitrejših, cenejših in natančnejših metod. Med slednje prištevamo HRM (»high resolution melting« - analiza talitvene krivulje z visoko ločljivostjo), DHPLC (denaturirajoča tekočinska kromatografija) in MLPA (metoda hkratnega pomnoževanja od ligacije odvisnih sond).³ Vsaka metoda ima svoje omejitve in odkriva le določeno vrsto mutacij. Z metodo MLPA odkrivamo le večje delecije in insercije. Z metodo PTT odkrivamo le mutacije, ki povzročajo skrajšanje proteina. DGGE in HRM ter ostale zgoraj omenjene metode pa uporabljamo za odkrivanje točkovnih mutacij.

Bolniki in metode

Na onkološkem Inštitutu smo leta 2007 pričeli s presejanjem genov *MLH1* in *MSH2*. DNA smo izolirali iz krvi 32 bolnikov z rakom debelega črevesa, pri katerih je obstajal sum, da gre za večjo dedno obremenjenost.

Uporabili smo metodi MLPA in HRM. Pri izvedbi HRM metode smo vse eksone genov *MLH1* in *MSH2* najprej pomnožili z verižno reakcijo polimeraze (PCR). Reakcija je vsebovala barvilo, ki se interkalira v dvojnoveržno DNK vzdolž celega fragmenta.

Tako označen PCR produkt smo s segrevanjem razklenili in naredili talitveno krivuljo padca fluorescence v odvisnosti od temperature. Talitvene krivulje različnih vzorcev smo primerjali s talitveno krivuljo kontrole (z znano sekvenco, ki ne sme vsebovati nobenega heterozigotnega polimorfizma). Vse fragmente, katerih talitvene krivulje so odstopale od kontrole, smo sekvenirali

Rezultati in diskusija

Pri preiskovanju 32 bolnikov smo našli 13 polimorfizmov, 2 neopredeljene variacije in 5 mutacij. V Tabeli 1 so navedene variacije, ki smo jih našli pri bolnikih in so do sedaj že opisane v literaturi. Poleg mutacij in polimorfizmov navedenih v Tabeli 1 smo našli še pet novih variacij, ki do sedaj še niso bile opisane oz. jih nismo našli v strokovni literaturi. Dve od njih sta verjetno patogeni, tri pa so verjetno nepatogene variacije.

Za izvedbo metode mora biti PCR produkt zelo čist (brez nespecifičnih fragmentov), koncentracije DNA pa umerjene na isto vrednost. Optimalna dolžina preiskovanih fragmentov

Gen in ekson	sprememba	Podatki v literaturi
MLH1		
ekson 2	Gly67Arg (c.199G>A)	Variacija Gly67Arg je v HGMD* opredeljena kot mutacija. Nemški konzorcij za HNPCC jo obravnava kot variacijo neznanega pomena, verjetno patogeno. Funkcionalne analize na in vitro testih <i>Saharomices cerevisiae</i> so pokazale signifikantno patogenost. ^{4,7}
Intron 4	IVS4-41 A>G (c.381-41A>G)	Variacija IVS4-41 A>G je, glede na veliko oddaljenost od izrezovalnega mesta eksona, verjetno polimorfizem. V splošni populaciji prisoten v deležu 0,01.** (podatek iz NCBI Gen Bank)
Intron 5	IVS 5+25 A>G (c.453+25A>G)	Variacija IVS 5+25 A>G je polimorfizem. V NCBI Gen Bank je v splošni populaciji prisoten v p=0,01.**
Intron 5	IVS5+79A>G (c.453+79A>G)	Variacija IVS5+79A>G je, glede na visoko frekvenco pojavljanja v svetovni populaciji (p=0,36)**(podatek iz NCBI Gen Bank) in glede na veliko oddaljenost od izrezovalnega mesta, polimorfizem.
Ekson 8	p.Ile219Val (c.655A>G)	Variacija p.Ile219Val (c.655A>G) je v literaturi navedeni v HGMD* opisana kot možna nizko penetrantna mutacija, oz. kot polimorfizem povezan z blago povečanim tveganjem za nastanek bolezni. ³ Glede na funkcionalne analize na <i>Saharomices cerevisiae</i> pa so jo opredelili kot nepatogeno variacijo. ⁷
Intron 9	IVS9+1G>A (c.790+1G>A)	Variacija IVS9+1G>A je v HGMD bazi opredeljena kot »splice-site« mutacija (mutacija, ki spremeni izrezovalno mesto). ⁸
Intron 13	IVS13+14G>A (c.1558+14G>A)	Variacijo IVS13+14G>A so Hutter et al opredelili kot polimorfizem. ⁹
Intron 14	IVS14-19A>G (c.1668-19A>G)	Variacijo IVS14-19A>G nemški konzorcij za HNPCC opredeljuje kot polimorfizem. ⁴
Ekson 19	pVal716Met (c.2146)	Variacijo pVal716Met (c.2146) je v literaturi navedeni v HGMD* bazi opredeljena kot neopredeljena variacija. ⁷
MSH2		
Intron 1	IVS1+9 G>C (c.211+9G>C)	Variacija IVS1+9 G>C je zaradi pogostosti v splošni svetovni populaciji (p=0.44) opredeljena kot polimorfizem. Tako jo obravnava tudi nemški konzorcij za HNPCC. ⁴
Ekson 6	Gly322Asp (c.965G>A)	Variacija Gly322Asp je v HGMD* opisana kot mutacija. Funkcionalne analize na in vitro testih so pokazale okrnjen »mismatch« popravljalni mehanizem. ¹⁰ Nekateri avtorji pa jo opredeljujejo kot polimorfizem.
Intron 6	IVS6-10T>C (c.1077-10T>C)	Variacijo IVS6-10T>C nemški HNPCC konzorcij obravnava kot polimorfizem. Sprememba rahlo zniža točke splicing mestu. ⁴
Intron 9	IVS9-9 A>T (c.1511-9A>T)	Variacija IVS9-9 A>T nemški HNPCC konzorcij obravnava kot polimorfizem. ⁴
Intron 10	IVS10+11G>A (c.1661+11G>A)	Variacija IVS10+11G>A nemški HNPCC konzorcij obravnava kot polimorfizem. ⁴
Intron 12	IVS12-6T>C (c.2006-6T>C)	Variacija IVS12-6T>C nemški HNPCC konzorcij obravnava kot polimorfizem. Sprememba rahlo zniža točke splicing mestu. ⁴

Mutacije so povzete po bazi podatkov HGMD. Oznake sprememb na DNA so oštevilčene po NCBI referenčni sekvenci NM_000249 za mRNA gena MLH1, NM_000251 za mRNA gena MSH2. Polimorfizmi so kot variante opisani ob referenčnih sekvencah v NCBI.

*HGMD- Human genom mutation database.

**NCBI – Genbank of National Center of Biotechnology Information

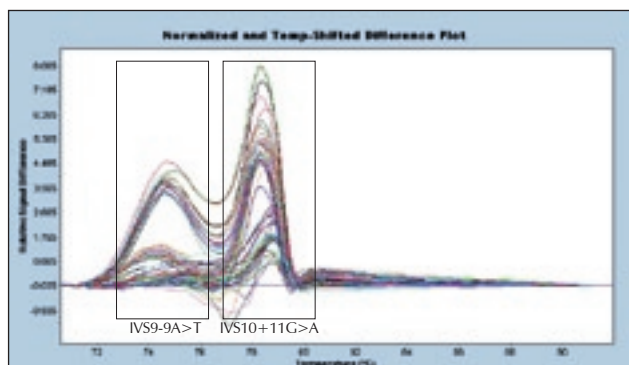
Tabela 1: Variacije v genih MLH1 in MSH2.

je od 150 do 250 baznih parov. Pri daljših fragmentih je občutljivost metode manjša. Na talitveni krivulji lahko v nekaterih primerih ločimo tudi med dvema različnima polimorfizmoma. Tak primer sta polimorfizma IVS9-9A>T in IVS10+11G>A ob eksonu 10 v MSH2 (Slika 1). V primeru, da dva polimorfizma povzročita spremembo talitvene krivulje na istem temperaturnem območju, pa ju zgolj s talitveno krivuljo ne moremo ločiti med seboj. Zaznamo jih zgolj zaradi odstopanja od kontrole, in ju določimo šele s sekveniranjem.

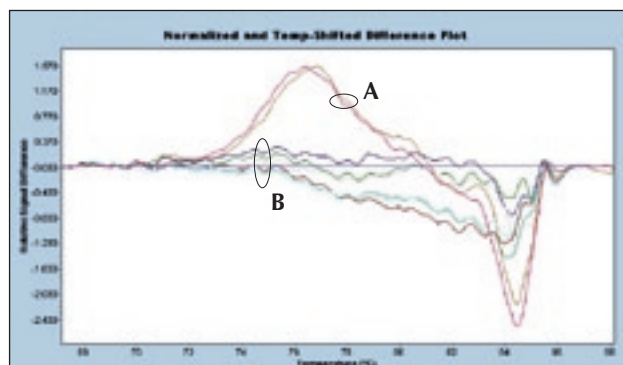
Občutljivost metode HRM, da zazna spremembo nukleotidnega zaporedja na DNA (da ni lažno negativnih rezultatov), smo preverjali s sekveniranjem 20% vzorcev, ki so bili s HRM negativni. V našem primeru lažno negativnih rezultatov ni bilo. Kljub veliki uporabnosti ima HRM tudi določene pomanjkljivosti. Heterozigotna DNA se običajno jasno loči od homozigotne DNA, medtem ko s HRM včasih

ne zaznamo razlike med dvema različnima homozigotoma (pr.c.655AA in c.655GG) (Slika 2A). Da bi se temu izognili, v PCR mešanico dodamo znano homozigotno DNA. Tako ob morebitni prisotnosti homozigotne DNA z drugačnim alelom, nastane heterozigot, katerega talitvena krivulja se jasno loči od kontrole (Slika 2B). Druga omejitev HRM je težje pomnoževanje in posledično tudi detekcija mutacij v področjih z večjo vsebnostjo GC nukleotidov npr. ekson 1 pri genu MSH2. Ta področja smo v vseh vzorcih sekvenirali. Slabša je tudi detekcija mutacij, ki se v talitveni krivulji od kontrole razlikujejo v začetnem delu talitvene krivulje. Tak primer je PCR produktov eksona E13 v MSH2, ki vsebuje polimorfizem IVS12-6T>C (Slika 3).

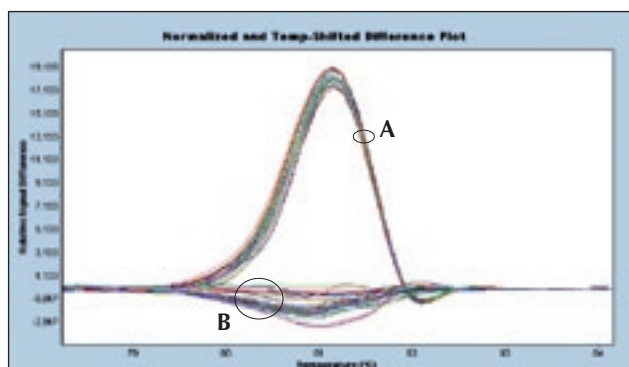
Poleg določanja sprememb na DNA potrebno je tudi ovrednotiti pomen spremembe -variacije na strukturo in funkcijo proteina. Spremembe na DNA lahko opredelimo



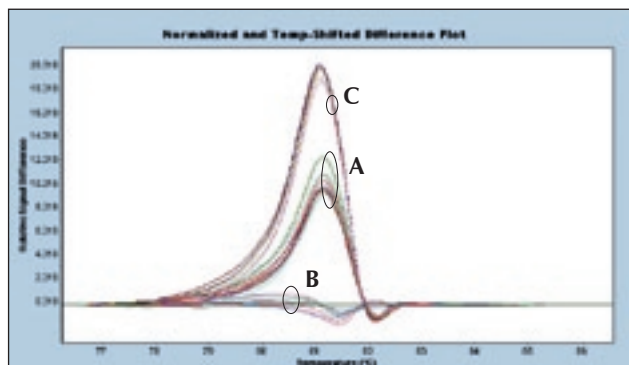
Slika 1. Slika talitvenih krivulj PCR produktov eksona E10 v *MSH2*, ki vsebuje polimorfizma IVS9-9A>T in IVS10+11G>A.



Slika 3. Slika talitvenih krivulj PCR produktov eksona E13 v *MSH2*, ki vsebuje polimorfizem IVS12-6T>C. A - krivulje PCR produktov, ki so heterozigoti IVS12-6 TC; B - krivulje PCR produktov, ki so heterozigoti IVS12-6 TT.



Slika 2A. Slika talitvene krivulje PCR produktov eksona E8 v *MLH1*, ki vsebuje polimorfizem p.Ile219Val (c.655 A>G). A - krivulje PCR produktov, ki so heterozigoti c.655 AG, B - krivulje PCR produktov tako homozigotov c.655 AA kot tudi homozigotov c.655 GG.



Slika 2B. Analiza talitvene krivulje PCR produktov eksona E8 v *MLH1*, ki vsebuje polimorfizem p.Ile219Val (c.655 A>G) in ki imajo dodano homozigotno c.655 AA DNA. A - krivulje PCR produktov, ki so heterozigoti c.655 AG z dodano homozigotno c.655 AA DNA. B - krivulje PCR produktov homozigotov c.655 AA z dodano homozigotno c.655 AA DNA. C - krivulje PCR produktov homozigotov c.655 GG z dodano homozigotno c.655 AA DNA.

kot mutacijo ali polimorfizem. Poleg polimorfizmov in jasno patogenih mutacij (delecije, insercije, nastanek STOP koda), je tudi nekaj neopredeljenih variacij. Za interpretacijo le teh se zaenkrat poslužujemo podatkovnih baz patogenih mutacij in strokovne literature, ki vsebujejo poročila funkci-

onalnih testov. Za oceno pomena variacije pa uporabljamo tudi spletne programe, ki predvidevajo vpliv spremembe na izrezovanje eksonov in strukturo proteina. Ker so lahko določeni polimorfizmi omejeni le na ožje populacije, jih ni mogoče zaslediti v literaturi. Za lažjo interpretacijo variacij v genih *MLH1* in *MSH2* v slovenski populaciji, bi bilo potrebno določiti pogostost določenih variacij v zdravi, dedno neobremenjeni populaciji.

Viri

1. Register raka za Slovenijo 2004
2. Altoonon et al. A novel approach to estimate the proportion of hereditary non-polyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer detect. Prev.* 18,57-63 (1994).
3. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*: 2003, 49(6), 853-860.
4. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W et al. Spectrum and frequencies of mutations in *MSH2* and *MLH1* identified in 1721 german families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (german HNPCC Consortium). *Int. J. Cancer*: 116, 692-702 (2005),
5. Hudler P, Vouk K, Liovic M et al. Mutations in the h*MLH1* gene in slovenian patients with gastric carcinoma. *Clin Genet*: 2004 May; 65(5): 405-411.
6. Tomlinson PM, Beck NE, Homfray T et al. Germline HNPCC gene variants have little influence on the risk for sporadic colorectal cancer. *J Med Genet*. 1997 Jan;34(1):39-42.
7. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of *MLH1*. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):537-49.
8. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet*. 2001 Oct;69(4):780-90. Epub 2001 Aug 24. Erratum in: *Am J Hum Genet* 2001 Nov;69(5):1160.
9. Hutter P, Couturier A, Membrez V et al. Excess of h*MLH1* germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer*: 78,680-684 (1998).
10. Drotschmann K, Clark AB, Kunkel TA. Mutator phenotypes of common polymorphisms and missense mutations in *MSH2*. *Curr Biol*. 1999 Aug 26;9(16):907-10.